



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

FACULTAD DE QUIMICA

**INVESTIGACION DE AFLATOXINAS  
EN CACAHUATES MEXICANOS**

**T E S I S**

Que para Obtener el Título de:

**Químico Farmaceutico Biólogo**

Presenta:

*Silvia Maricela Uribe Zuñiga*

---

México, D. F.

1 9 7 7 .



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.

Tesis 1977

ADG M- 4  
FECHA  
PRSC 393



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA :

PRESENTE : Profra. Natalia Salgado Clavarieta  
VOCAL : Profra. Ninfa Guerrero de Callejas  
SECRETARIO : Prof. Enrique García Galeano  
1º SUPLENTE : Profra. Angela Sotelo López  
2º SUPLENTE : Prof. Alfredo Echeagaray Alemán

Sitio donde se desarrolló el tema : Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química. Laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Laboratorio del Departamento de Pruebas y Análisis de Ferrocarriles Nacionales de México.

Nombre completo y firma del sustentante : Silvia Maricela Uribe Zúñiga

Nombre completo y firma del asesor del tema : Enrique García Galeano

A MIS PADRES Y HERMANOS  
POR SU CARÍÑO Y COMPRENSION

## INDICE GENERAL

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
Cápitulo I Introducción.	
1.1 Objetivos.	1
1.2 Presentación del tema.	2
Cápitulo II Generalidades sobre el cacahuate.	
2.1 Origen e historia.	5
2.2 Botánica y taxonomía.	6
2.3 Variedades cultivadas en México.	8
2.4 Condiciones de desarrollo de la planta.	9
2.4.1 Germinación.	
2.4.2 Crecimiento.	
2.4.3 Floración y fructificación.	
2.4.4 Ciclo vegetativo y madurez.	
2.4.5 Necesidades de clima, tierra y agua.	
2.4.6 Rotación y tratamiento por nitragina.	
2.5 Cuidados del cultivo.	15
2.5.1 Condiciones del suelo.	
2.5.2 Selección de la semilla.	
2.5.3 Técnicas de cultivo.	
2.5.4 Recolección.	
2.6 Alteración de los granos durante la Maduración, Secado y Almacenamiento.	23

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
2.7 Características de los principales constituyentes de la planta.	25
2.7.1 Características de la paja.	
2.7.2 Características del fruto.	
Capítulo III Tecnología de procesado del cacahuete.	
3.1 Almacenado de los granos.	29
3.2 Obtención y refinado de aceite.	30
3.3 Composición y características del aceite de cacahuete.	36
3.4 Usos principales.	37
3.5 Subproductos de la almazara.	37
3.6 Manteca de cacahuete.	40
3.7 Cacahuete de boca.	41
Capítulo IV Producción y comercialización del cacahuete.	
4.1 Producción de cacahuete en México.	45
4.2 Destino geográfico de la producción.	54
4.3 Principales canales de comercialización.	54
4.4 Comercialización externa.	55
Capítulo V Generalidades sobre las aflatoxinas.	
5.1 Historia sobre el problema de las aflatoxinas.	60
5.2 Tipos de aflatoxinas.	60
5.3 El grupo <u>Aspergillus flavus</u> .	68
5.4 Características taxonómicas del grupo <u>Aspergillus flavus</u> .	74
✓ 5.5 Factores que influyen en la producción de aflatoxinas en sustratos naturales.	75

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
5.6 Factores que influyen en la producción de aflatoxinas en medios de cultivo.	92
5.7 Biosíntesis de las aflatoxinas.	98
5.8 Producción de aflatoxinas en el laboratorio.	99
Capítulo VI Análisis de aflatoxinas.	
6.1 Introducción.	102
6.2 Métodos recomendados para la extracción primaria en frutos con vaina.	103
6.3 Métodos para purificar los extractos primarios de pigmentos y lípidos polares.	104
6.4 Métodos para la separación de aflatoxinas.	106
6.5 Condiciones propuestas para la separación de aflatoxinas por Cromatografía en capa fina con Gel. de Silice.	107
6.6 Rf's obtenidos con diferentes disolventes en Gel de Silice G-RH de diferentes grosores.	108
6.7 Determinación de la cantidad de aflatoxinas.	109
6.7.1 Método visual.	
6.7.2 Método por absorción espectrofotométrica.	
6.7.3 Método fluorodensitométrico.	
6.8 Estándares de aflatoxinas.	111
6.9 Métodos corroborativos para la identificación de aflatoxinas.	112
6.10 Métodos biológicos para la determinación de aflatoxinas.	115
6.10.1 Prueba del embrión.	
6.10.2 Prueba de los patitos.	

TEMAPAGINA

## Capítulo VII Experimentación y datos.

7.1	Análisis de rutina de alimentos y forrajes para determinar aflatoxinas.	119
7.1.1	Introducción.	
7.1.2	Procedimiento general.	
7.1.3	Sección A: método de muestreo y preparación de la muestra para análisis.	
7.1.4	Sección B: desengrasado.	
7.1.5	Sección C: método de extracción de toxinas.	
7.1.6	Sección D: limpiado.	
7.1.7	Sección E: estimación del contenido de aflatoxinas por cromatografía en capa fina.	
7.2	Método experimental.	127
7.3	Tabla de resultados.	129
Capítulo VIII Observaciones y conclusiones.		
8.1	Observaciones.	130
8.2	Recomendaciones.	132
	Bibliografía.	134

CAPITULO I  
INTRODUCCION.

## CAPITULO I

### 1.1 Objetivos

Uno de los problemas tradicionales de nuestra escuela, dentro de una universidad tan grande como lo es la U.N.A.M., ha sido la carencia de materiales informativos actualizados y accesibles. Paradoja que se antoja increíble ante las dimensiones de nuestra Alma Mater y los continuos esfuerzos de las diversas escuelas y facultades.

Tal problema se acentúa cuando se trata de verificar los datos que la literatura extranjera reporta, ya que los diversos productos mexicanos presentan diferencias que en ocasiones son de vital importancia. Esta es una de las características más específicas de todos los problemas de desarrollo en un marco de dependencia técnico-científica, a la vez que uno de los escollos por librar en casi todos los proyectos de desarrollo en nuestro país.

La falta de recursos agiganta los problemas señalados, ya que no se cuenta en ocasiones ni con el equipo ni con el personal adecuado. Y en todos los casos se presenta la necesidad de dar a conocer el tema de una forma intensiva, a la vez que más sencilla.

Al realizar el presente trabajo me he sentido motivada por todos los puntos anteriores y he pretendido hacer una modesta contribución para la solución de los mismos. Los problemas planteados han sido a la vez que alicientes, obstáculos por superar. La crónica carencia del equipo y reactivos adecuados hicieron que la parte experimental de este trabajo fuese más ardua, pero nunca al punto de optar por la solución trivial, sino lo contrario, siempre hubo una persona interesada que puso a mi alcance equipo y material acordes a las

necesidades del trabajo.

Así pues, espero que el presente trabajo sirva, además de fuente de referencia para la literatura sobre el tema, de medio de estudio sencillo y accesible. Desde luego, mis resultados experimentales estarán siempre listos para comparación con los reportados por otros medios.

## 1.2 PRESENTACION DEL TEMA.

En 1960 aproximadamente 100000 pavos jóvenes murieron en Gran Bretaña en el transcurso de unos cuantos meses. Después de varias investigaciones la causa de que esto ocurriera fué la presencia de un factor común en los materiales alimenticios de la harina de cacahuete que los pavos tomaban. Otro -- trabajo indicó que la toxina producida por un microorganismo podía ser la causa del problema y esto trajo como consecuencia el hallazgo del hongo - - - Aspergillus flavus, que era el responsable de la producción del factor tóxico, el cual fué llamado AFLATOXINA.

El establecimiento del hongo que produce la aflatoxina, se fija en el abono, en el suelo, en la suciedad y de ahí sus esporas se fijan en la planta. A. flavus puede crecer y producir aflatoxinas sobre una gran variedad de productos agrícolas incluyendo granos, legumbres secas y frescas y oleaginosas como el cacahuete. Considerables recursos son dedicados a la preparación de productos no contaminados. Las investigaciones relativas a la infección por - - - Aspergillus flavus y la producción de aflatoxinas en diferentes variedades de cacahuates, pueden orientarse con perspectivas a encontrar granos resistentes a A. flavus, aunque esto parece muy lejano.

Sólo unas pocas variedades de A. flavus producen aflatoxinas y no siempre están en condiciones de crecimiento. / Un buen patrón de crecimiento no es necesariamente paralelo a una alta concentración de aflatoxinas, hay varias diferencias y las condiciones de crecimiento afectan el porcentaje y la cantidad total de las aflatoxinas producidas por Aspergillus flavus. †

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos carcinógenos altamente tóxicos; cuatro de estos metabolitos designados como aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son muy comunes en materiales infectados con A. flavus.

La aflatoxina B<sub>1</sub> está normalmente presente en altas concentraciones en relación a las otras aflatoxinas, que varían de acuerdo a las condiciones de crecimiento y cepa de organismo.

Los derivados hidroxilados de las aflatoxinas designados como B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>, -- M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> han sido también aislados bajo ciertas condiciones de cultivo. La aflatoxina "M" o toxina de la leche, es producida cuando las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son parcialmente metabolizadas por algunos animales, siendo excretadas por ejemplo en la leche, orina, etc.

Aunque las aflatoxinas fueron originalmente encontradas como contaminantes en frutos con vaina, han sido ya aisladas también a partir de una gran variedad de productos agrícolas de diversas procedencias.

En vista de la extrema toxicidad y sus propiedades carcinogénicas y dada la amplia distribución de las aflatoxinas, muchos esfuerzos han sido desarrollados para alcanzar un control efectivo de la distribución de alimentos y forrajes que probablemente contengan aflatoxinas.

Esto ha originado el desarrollo de métodos de mayor sensibilidad para la determinación de aflatoxinas en productos agrícolas, labor que es analizada y discutida en base a un estudio bibliográfico y a los resultados experimentales que más adelante se especificarán.

CAPITULO II  
GENERALIDADES SOBRE EL CACAHUATE.

## 2.1 Origen e Historia.

El cacahuete, al igual que muchas otras plantas útiles, es originario del -- Nuevo Mundo y una de las pruebas objetivas al respecto es el descubrimiento de granos semejantes a los de las variedades actualmente cultivadas en -- Perú, en tumbas precolombinas situadas en Ancón, Pachacamac y otros lugares, por E. G. Squier, alrededor de 1875. La especie no es conocida en estado silvestre sólo cultivada, pero la ausencia de algunas especies de este género en las demás regiones del mundo y su relativa abundancia en la zona que va desde Brasil a Argentina, confirman su origen Sudamericano. Actualmente se admite que es originaria de El Gran Chaco, Paraguay y Panamá.

La distribución de la especie fué en la época precolombina, por América del Sur, América Central, Antillas y México, siendo hasta el siglo XIX cuando los portugueses la introducen a la costa occidental de Africa y los Españoles a las Filipinas, extendiéndose de ahí hacia Asia y Australia, llegando -- por último a Europa.

El origen y la historia de la difusión del cacahuete en el mundo explican la gran diversidad de variedades existentes; las mas antiguas y base de la diversificación son los grupos Valencia, Spanish y Virginia.

Respecto a su utilización, se conoce que los precolombinos ya extraían el -- aceite como más tarde lo hicieron los chinos, pero no fué sino hasta 1800 -- cuando se le dió uso industrial en una almazara situada en la región de -- Rouen en Francia, incrementándose con el tiempo el número de las almazaras que utilizan (aún actualmente) el cacahuete.

## 2.2. Botánica y Taxonomía.

El cacahuete es una planta de la familia de las leguminosas del género - - - Arachis, pertenece a la subfamilia de las Papilionáceas. Durante largo tiempo la única especie conocida del género era Arachis hypogea, descrita por Linneo en 1753. En 1838 fueron descritas cinco nuevas especies espontáneas en Brasil por Bentham, y actualmente están en estudio otras cuyas características aún no son masivamente conocidas. Todas las especies presentan caracteres botánicos comunes, algunos de los cuales son:

- Plantas herbáceas o leñosas, perennes o anuales.
- Tubo del cáliz largo, terminado en cinco lóbulos de los cuales cuatro están soldados.
- Pétalos y estambres insertados en la parte superior del tubo del cáliz.
- Diez estambres reunidos en un tubo longitudinal, alternados largos y cortos.
- Ovario sesil que contiene de una a seis cámaras, filiforme y terminado por un pequeño estigma.
- Fructificación enterrada de la prolongación de la base del ovario.

El número de cromosomas básico del género *Arachis* es de 20 en sus células somáticas. El cacahuete cultivado *A. hypogea* y las especies *A. monticola*, *A. glabrata*, *A. hagenbeckii* son tetraploides con 40 cromosomas.

La morfología de los cacahuates cultivados *Arachis hypogea* es la siguiente:

- Tallos débiles, flexibles y casi rastreros; de colores verde claro, verde oscuro o mas o menos purpúreo, llegando a medir de 0.20 m. a 0.70 m.
- Hojas pinadas compuestas de cuatro foliolos de forma ovoide, con un peciolo de 4 cms. a 9 cms. y los bordes en forma de sierra.
- Raíz ramificada en forma intensa; su eje central puede hundirse hasta 1.3m;

posee nódulos que son la asociación simbiótica de la planta con bacterias fijadoras de nitrógeno. Generalmente de forma leñosa.

- Las flores son de dos clases, las masculinas de color amarillo brillante y las femeninas ocultas, agrupadas de 3 y 5 en las axilas de las hojas.
- Sus diez estambres son monodelfos, es decir, unidos en un solo cuerpo.
- Las flores masculinas se marchitan y caen mientras que las hembras crecen rápidamente por distensión del receptáculo, y el tallo floral pronto se inclina hacia el suelo, en donde penetra madurando ahí la vaina.
- Los frutos son vainas oblongas que contienen de una a cuatro almendras - según la variedad.
- La cubierta de las almendras es morena o rojiza.
- Su poder germinativo es de un año.
- Las semillas son de dimensiones, formas y colores diferentes, su peso puede oscilar entre 0.2 g. y 2 g.
- La proporción de grano con relación a la vaina en condiciones controladas, varía entre el 68% y 80%.
- Las semillas constituyen el elemento económicamente importante por su riqueza en aceite y proteínas.

Para la clasificación de los cacahuates se han utilizado diversos criterios como son:

- El porte (rastrero o erecto).
- El tipo de ramificación que presente (secuencial o alternado en sus diferentes caracteres).

Con ésto se han constituido tres grupos principales que son el Spanish, el Valencia y el Virginia.

Para distinguir las variedades, se han usado caracteres hereditarios independientes de los factores del medio y los mas útiles son:

- Dimensión de la vaina de 20 mm de diámetro a 5mm o de 80 g. a 250 g.
- Forma de la vaina con estrangulaciones dorsales o ventrales de forma aplana o redonda.
- Ornamentaciones de la planta (dibujos sobre la vaina en forma de red, anastomosados o no).
- Número de semillas por vaina (dos o tres por vaina).
- Color del tegumento seminal que puede ser blanco, rosado, rojo, violáceo o negro.

Gracias a estas características se han encontrado muchas variedades de las cuales las principales por su extensión y cultivo son la Natitingou, Rasteiro, Mamou, Cayor, Baol, Saloum, Virginia, Jumbo, Java, Kolo saba, Philippine, Valencia, Volete, Natal, Spanish, etc.

### 2.3 Variedades cultivadas en México.

En este trabajo sólo se describirán a grandes rasgos las variedades que mas se cultivan en México que son las del paso Salvatierra, Chiapas y desde hace pocos años, las procedentes de Virginia, entre las cuales pueden citarse la Jumbo; y las de España, es decir las llamadas Española y Valenciana, cuyas características resumidas son las siguientes:

a) Jumbo. - Presenta vaina grande, lisa y contiene de una a tres almen dras, generalmente dos, de color uniforme, de red anastomosada y con ramificación abierta alternada. Su almendra alcanza el precio más alto en el mercado.

b) Virginia Cerrada. - Vaina grande, lisa con dos almendras de color uniforme, de red anastomosada de ramificación cerrada alternada. Rinde la menor cosecha de todos los tipos de vaina grande.

c) Virginia Abierta. - Vaina grande, lisa con dos almendras de color uniforme, de red anastomosada de ramificación abierta alternada, de tallos cortos pero de gran desarrollo, generalmente se cultiva para vender las almendras tostadas.

d) Española. - Vaina pequeña, con cintura muy marcada que forma -- montones alrededor del eje principal, con ramificación secuencial. Su rendimiento es alto.

e) Valenciana. - Vaina de tamaño medio, con la presencia de dos o cuatro almendras (generalmente) que son de color rojo y cuyo peso es igual a la mitad del de las vainas; con ramificación secuencial.

Además de las variedades citadas se cultivan la Tenesse red, la - - - Macspan, Carolina y la Africana, pero son de menor importancia por lo que no se hablará de ellas. ]\*

## 2.4 Condiciones de desarrollo de la planta.

### 2.4.1 Germinación.

La semilla, para conservar su capacidad germinativa, debe de almacenarse con un índice de humedad inferior al 8% a temperatura ambiente, pero para germinar requiere gran cantidad de agua, su índice de imbibición al -- momento de germinar es de 35% a 40%.

Entre los grupos Spanish y Valencia la germinación de la semilla puede ser inmediata a la madurez, mientras que en el grupo Virginia se requieren de uno o dos meses de vida latente, por lo que se han empleado diversas técnicas para reducir este período como son tratamientos a base de gibberelina, gas etileno, calor, eliminación del tegumento seminal, etc. El más útil de estos es el tratar con calor el grano, 40°C por 14 días.

Terminado el período de vida latente, los granos del cacahuete pueden germinar durante un período bastante largo, que depende esencialmente de las condiciones de conservación.

Si se mantiene la temperatura a unos 15°C y una humedad inferior a 8%, la conservación del grano puede alargarse hasta cinco años siempre y cuando el cacahuete haya sido cosechado en buenas condiciones.

Para saber si las semillas conservan su capacidad germinativa existen dos pruebas que son: la prueba clásica de germinación y la prueba del te-trazolio.

#### 2.4.2 Crecimiento.

El cacahuete es una planta anual herbácea, cuyo ritmo y rapidez de desarrollo están en función de la temperatura; se ha observado que un índice que se puede usar para seguir el desarrollo de la planta es la relación entre el peso de las hojas y el peso de los tallos, relación que tiende a disminuir al finalizar la vegetación.

#### 2.4.3 Floración y fructificación.

\* La duración del período nascencia-floración es característico de la variedad y de la situación ecológica. Esta diferencia entre las variedades precoces (Valencia y Spanish) y la tardía (Virginia) difiere de 4 a 5 días en climas tropicales, de 15 a 25 días en zonas tropicales cálidas y puede llegar de 40 a 50 días en zonas templadas o de altura.

Si las condiciones del clima son favorables, la floración alcanza su máximo según el tipo de cacahuate entre el 40avo y 60avo día después de la siembra y decrece con regularidad.

La cantidad de flores producida por planta varía pues las variedades Valencia y Española (Spanish) dan de 600 a 700 flores como máximo mientras que la Virginia llega hasta 1000 flores. Este dato es importante en la producción por hectárea de cacahuate.

El cacahuate es una planta casi estrictamente autógena, comportamiento que se debe a su fecundación nocturna y al hecho de no abrir las flores antes de su fecundación.

#### 2.4.4 Ciclo Vegetativo y Madurez.

\* El ciclo vegetativo del cacahuate está fuertemente influenciado por la temperatura y varía con la especie. La temperatura óptima para que este período sea lo más breve, es cercana a los 30°C y uniforme de preferencia. \* El ciclo se puede sintetizar como se muestra a continuación:

	Variedades precoces	Variedades tardías.
Siembra-nascencia	4 - 5 días	4 - 5 días
Nacimiento de la planta primera flor	15 - 20 "	18 - 25 "

Floración	20 - 25 días	30 - 40 días.
Duración de la maduración	40 - 45 "	54 - 55 "

La fase de maduración es una etapa delicada y existen diversos criterios para apreciar el grado de madurez, como son el peso máximo de aceite y el peso de materia seca del grano. En el desarrollo del cacahuate primero crece y evoluciona la vaina, pues el grano lo hace con lentitud, después se desarrolla la semilla, empezando por un notable crecimiento de la película y finalmente del grano.

Los diferentes constituyentes de la vaina, película y grano, varían en su desarrollo.

Las proteínas elaboradas y almacenadas en la cáscara durante las primeras tres semanas son muy importantes y enseguida decrecen con rapidez, lo mismo ocurre con la película aunque en menor cantidad y alrededor de la cuarta semana, en cambio en el grano, el principio de la acumulación se sitúa en la segunda y tercera semana y no cesa de crecer hasta que llega a la madurez. El índice de proteína alcanzado al final es de 30%.

Los lípidos y ácidos grasos libres en la cáscara y en la película se presentan en muy poca cantidad durante todo su desarrollo, en cambio el aceite se presenta muy pronto en la semilla, pues en la tercera semana se puede detectar un 30% y la semilla apenas empieza a formarse, en la cuarta semana se lleva a cabo la máxima acumulación de aceite; aquí en las variedades precoces el total del aceite se logra a las seis semanas, mientras que en las variedades tardías se presenta en diez semanas. La cantidad de ácidos grasos libres decrece conforme el grano alcanza su madurez.

*Edes*

La cáscara tiene un gran contenido de almidón y de azúcar en sus tejidos parenquimatosos, que evolucionan rápidamente con la edad. En la madurez se detecta un 11.5% de hemicelulosa en la materia seca de la cáscara. El almidón contenido en el grano también presenta una proporción muy elevada al principio de su desarrollo, pero este componente se encuentra principalmente en la película. El porcentaje de almidón disminuye con la madurez y la hemicelulosa no rebasa el 3%.

#### 2.4.5 Necesidades de clima, tierra y agua.

{ El cacahuate se adapta a climas bastante variables, siempre que el suelo reúna las condiciones favorables para su desarrollo. } Necesita un clima con una temperatura relativamente alta y una estación de 130 días de lluvias moderadas, los mejores resultados se obtienen en lugares donde la precipitación pluvial es de 1000 milímetros a 1300 milímetros anuales.

El cacahuate se cultiva generalmente en terrenos de riego, pero se llegan a obtener buenas cosechas de temporal en regiones donde la precipitación pluvial es de 600 milímetros. En las tierras bajas se levantan las mejores cosechas de temporal con una precipitación de 1400 a 1500 milímetros anuales.

Los mejores terrenos para el cultivo del cacahuate son los arenomargosos ligeros, bien drenados. Para alimentación de cerdos el cacahuate puede cultivarse en cualquier tipo de suelo excepto los muy compactos.

Estos datos han sido obtenidos para los cultivos en México ya que el consumo de agua depende de la evapo-transpiración y esto en cierta forma de

pende de la temperatura y la intensidad de luz recibida por el vegetal.

Se sabe que si se cultiva cacahuete en una zona de baja precipitación pluvial, por ejemplo 450 mm. anuales, decrece la producción de cacahuete por hectárea, y se ha observado que a este régimen la producción aumenta en 150 Kg. de cacahuete por hectárea por cada 100 mm. adicionales de agua.

Es importante hacer notar que el cacahuete es una planta medianamente resistente a la sal, pues se puede regar con agua que contenga 1.5% de sal y el rendimiento no disminuye; si se riega con agua con un 2.5% de sal el rendimiento no disminuye: pero el peso seco de la planta se vé disminuído en un 3%.

#### 2.4.6 Rotación y tratamiento por nitragina.

Antes de pasar al punto que se refiere a los cuidados culturales del cacahuete, debemos de mencionar dos puntos importantes, las rotaciones -- adecuadas para la planta de cacahuete y la inoculación de los granos destinados a la siembra con nitragina.

Al escoger el terreno para la siembra del cacahuete, debe tenerse -- presente además de la adaptabilidad del suelo, la rotación adecuada por la -- limpia de plantas adventicias que suelen invadir los terrenos, constituyendo plagas que causan serios daños a la planta.

Se puede mencionar por ejemplo: primer año con maíz de riego y chícharo en invierno, el segundo año cacahuete y una gramínea menor en invierno. O se puede sembrar cacahuete el primer año, seguido de avena en in-

vierno o alguna otra leguminosa forrajera, terminando la rotación con camote.

En cuanto a la inoculación de nitrosina no se ha determinado que sea indispensable, pues afortunadamente en todos los terrenos donde se siembra se presentan nódulos bacterianos fijadores de nitrógeno atmosférico en gran abundancia, esto se recomienda en los casos donde por primera vez se intenta cultivar cacahuete.

## 2.5 Cuidados del cultivo.

### 2.5.1 Condiciones del suelo.

Se requiere que el aire ocupe de un 30 a 55% de la porosidad total del suelo.

Se requiere de suelos arcillosos.

En cuanto al pH se puede cultivar en tierras cuya escala de pH sea de 4 a 8 y hasta 9 si ésto se debe a la presencia de cal.

Las temperaturas más favorables son las comprendidas entre los 25°C y 35°C, con pocas variaciones entre la noche y el día y nunca menor a 10°C.

Se necesitan precipitaciones pluviales entre 1000 y 1300 milímetros anuales.

Se requiere que haya una buena cantidad de nitrógeno en el suelo y que se puedan formar nódulos de bacterias nitrificantes en la raíz del vegetal.

También se utiliza fósforo, que se absorbe de los suelos, ya que este elemento activa el crecimiento del cacahuete y apresura su maduración.

El potasio debe estar en proporción con el fósforo, pues si hay poco potasio, se multiplican las vainas con un solo grano.

El contenido de calcio en las tierras de cultivo debe ser muy alto pues facilita la formación de granos grandes y vaina gruesa. Este calcio debe estar en forma soluble y si no está presente en cantidades adecuadas disminuye la fertilidad de las flores, aumenta la debilidad de la vaina y origina que no se pueda llenar la vaina.

El azufre es un elemento que ayuda a la absorción de nitrógeno y fósforo, activa la floración y la prolonga; su carencia baja el rendimiento y la resistencia a las enfermedades criptogámicas.

Los oligoelementos que utiliza el cacahuate son el Hierro, Cobre, Boro y el Molibdeno.

#### 2.5.2 Selección de la semilla.

Se deben tomar en cuenta dos factores al escoger la semilla que se va a sembrar:

##### a) Productividad.

Hay algunos caracteres que afectan la productividad y rigen la adaptación de la planta a todas las condiciones presentes en la región, inclusive las técnicas agronómicas puestas en práctica. Entre ellos figuran los caracteres que constituyen el rendimiento: peso y número de frutos por pie, producción de paja; los que crean la adaptación al medio, ciclo, latencia, resistencia a las enfermedades; y los que rigen la adaptación a las técnicas de cultivo; --

respuesta a los abonos, respuesta a las densidades, porte, agrupación de - -  
vainas.

#### b) Utilización.

Los caracteres que afectan la utilización comprenden el tamaño, la -  
forma y el aspecto de los frutos, el rendimiento al descortezado, y también  
el contenido de aceite, proteína, y celulosa, las cualidades organolépticas y  
la resistencia de los granos a las manipulaciones.

En América Latina en general, se da preferencia al rendimiento, buen  
contenido de aceite, adaptación a distintos climas y a la resistencia a las en-  
fermedades.

Se pueden seguir varias técnicas para la selección de la semilla e in-  
cluso para mejorarla; las más usadas son:

b.1) Cruces artificiales. - El índice de alogamia de la planta debe ser  
muy bajo, si bien permite la autofecundación sin ensacado, obliga a realizar  
los cruces a mano.

b.2) Disposición de las plantas para su observación. Las plantas son  
dispuestas entre líneas con gran separación (de 60 cm. x 60 cm. a 100 cm. x  
100 cm.) para las observaciones delicadas y la producción máxima de semi-  
llas por pie y con separación corriente para los ensayos comparativos - - -  
(60 cm. x 20 cm. ó 60 cm. x 15 cm.)

b.3) Mantenimiento de líneas puras aisladas. - Estas son cultivadas -  
cada año a partir de un pie del año anterior, tomando todas las precauciones

para eliminar las mezclas e hibridaciones accidentales.

Con estas técnicas aparte de seleccionar la semilla, se han logrado mejoras como el aumento de proteína, el aumento de aceite, mayor resistencia al mondado, resistencia a enfermedades, etc.

### 2.5.3 Técnicas de cultivo.

En la mayor parte de México el cacahuete se cultiva por métodos tradicionales, pero como su producción ha ido aumentando en algunas zonas, se están empleando nuevos métodos de cultivo para mejorar la producción y calidad del cacahuete. Hablaremos de estas técnicas siguiendo el orden natural.

#### a) Rotaciones.

La fertilidad natural de suelos empleados para cultivar cacahuete es escasa, y las condiciones climáticas en algunos casos extremas. Por lo cual el cultivador no puede disponer de una serie de rotaciones provechosas para el cacahuete y por lo que en estos casos se recomiendan la asociación con otras plantas (por ejemplo sorgo) que aunque no solucionan el problema, si lo disminuyen en una buena proporción.

#### b) Preparación del suelo.

Para una buena preparación del suelo que se va a ocupar en el cultivo del cacahuete, es necesario evitar o retrasar el desarrollo de plantas adventicias, esto se puede lograr sembrando antes alguna planta que permita la entrada de agua y permitir la entrada de las raíces con una operación como es

el barbecho. Otro método usado es dejar que salgan las hierbas y quemarlas después.

### c) Siembra.

Debe efectuarse una siembra temprana pues es necesario para el cacahuate un buen aporte pluvial y de esta forma se pierde menos producto y la planta está más libre de parásitos.

Para preparar las semillas para la siembra deben descortezarse poco antes de la misma para que no sufra algún deterioro, el descortezado en México se efectúa de dos formas: mecánica, que provoca la pérdida de un 20% del grano y manualmente que requiere de mucho tiempo y trabajo pero se aumenta el rendimiento.

Hay que tratar el grano con una mezcla de fungicida y bactericida para evitar enfermedades y por consiguiente pérdidas en el almacenamiento y germinación. Como ya se mencionó algunos granos se inoculan con alguna cepa de Rhizobium para casos de nuevo cultivo.

La cantidad de grano que se debe sembrar por hectárea depende de la variedad; las variedades tardías se siembran en menor cantidad que las variedades precoces.

La profundidad de la siembra debe ser de aproximadamente 3 cm. y la separación varía según el tipo de cacahuate que sea, las variedades tardías requieren 60 cm. x 15 cm. y las variedades precoces 40 cm. x 15 cm. y los granos deben colocarse de uno en uno, en México la siembra aún es muy ru-

dimentaria, empleándose generalmente bueyes para la siembra.

La cosecha deberá mantenerse libre de hierbas adventicias, y para -- esto pueden usarse medios mecánicos o químicos.

#### 2.5.4 Recolección.

La fecha para la recolección del cacahuate no es fácil de determinar, ya que no existen indicadores o síntomas característicos exactos, aunque generalmente se usan dos observaciones:

- Cuando los pies del cacahuate presenten germinación (aproximada -- mente un 2%). Esto solo sirve para variedades sin período de latencia, o sea las precoces.

- El aspecto de las hojas (tendiendo a amarillo) o el color interior de -- la cubierta (que se vuelve marrón oscuro) son índices tomados para las varie -- dades tardías.

Hay un tercer método que aún está en estudio y es el referente a la pig -- mentación del aceite, que parece permitir fijar la madurez con precisión.

La recolección constituye una de las operaciones mas delicadas del -- cultivo del cacahuate y se descompone en tres tiempos, arranque, secado y -- trilla.

El arranque consistente en seccionar la planta por arriba del tallo -- principal y por debajo de donde empieza la fructificación, lo cual en México se efectúa pasando primero un arado para que rompa la capa superficial y la sub

yacente, para facilitar el arrancado de las plantas. En ocasiones quedan algunas porciones demasiado enterradas y éstas hay que recogerlas a mano, lo cual se llama pepena y el producto queda a beneficio de los peones de la finca.

Después de la recolección de las plantas, éstas están muy húmedas y conservan del 60% al 80% de humedad, mientras que la vaina conserva alrededor de un 35% de humedad, es por ésto que se somete a un secado o asoleo en el mismo lugar o cerca de donde se cosecha; se debe secar sin excesiva brusquedad y con temperaturas no muy altas para disminuir el contenido de humedad hasta un 15% rápidamente y después progresivamente hasta un 8%. Esto se logra colocando las plantas con las vainas adheridas, a la acción del sol, lográndose que las vainas se desequen gradualmente hasta alcanzar su completa madurez. En México ésto se efectua en los llamados paseros que son lugares bien secos y libres de hierbas cercanos a la zona de cultivo, donde de la planta después de sacudirla para quitarle la tierra, se acomoda sobre la pasera y son removidas dos o tres veces al día. Estas paseras son rectángulos de 60 cm. x 125 cm. que están a 20 cm. ó 15 cm. de altura del piso normal. Al caer la tarde se recoje la planta y se guarda bajo techo para sacarla al día siguiente y seguirla secando. Este proceso dura de ocho a diez días y si las plantas no han quedado aun quebradizas, ya están listas para llevarse al trillado.

Se entiende que por estas razones la cosecha debe de efectuarse en época de secas, pues si las plantas se amontonan mojadas, pueden presentarse enfermedades fúngicas, entre ellas la que nos interesa o sea la producida por Aspergillus flavus, del que hablaremos más adelante.

Cuando el fruto ha alcanzado un índice de humedad cercano a 10% - - (aproximadamente de 2 a 6 semanas después del arranque), se puede proceder a la trilla, operación que consiste en la separación de las vainas de las hojas y los tallos. Generalmente este paso se realiza con ayuda de máquinas que se conocen con el nombre de trilladoras, pero en México aun se usa en algunas regiones el método tradicional, que efectúa la separación de las vainas en forma manual y después avientan las vainas para separar las mas pesadas, lo cual exige mayor tiempo de trabajo, aunque tiene la ventaja de dejar el forraje intacto y poderlo utilizar para alimento de ganado.

A continuación se darán los pasos que deben seguirse para el cultivo del cacahuate a manera de síntesis:

Programa General de Cultivo:

1. - Preparación del Terreno.
2. - Descortezado de la semilla.
3. - Siembra.
4. - Aplicación de abono.
5. - Primera bina.
6. - Segunda bina.
7. - Tercera bina.
8. - Tratamiento antiparasitario.
9. - Arranque.
10. - Formación del almiar.
11. - Trilla.
12. - Venta y transporte.

## 2.6 Alteración de los Granos durante la Maduración, Secado y Almacenamiento.

Los frutos y los granos pueden ser atacados antes de la cosecha por diversos hongos entre los cuales se encuentran Macrophomina phaseoli y -- Sclerotium rolfii, además las picaduras de insectos, sobre todo de termites, permiten la penetración de otros agentes patógenos en el interior de la vaina y la almendra. Los agentes patógenos más comunes pertenecen a los géne--ros Aspergillus (A. niger, A. flavus, A. nidulans, A. parasiticus, etc.) Penicillium, Trichothecium, Fusarium, Coniothecium, Sclerotium, Botry---  
dipodia, Rhizopus, Chaetomium, Pythium, Trichoderma y otros.

La penetración de estos hongos se ve favorecida por varias razones, entre las cuales están las malas condiciones edafoclimáticas que ocasionan la fragilidad de las paredes de las vainas, dando por consecuencia que las almendras no protegidas sean invadidas por los microorganismos.

Al llegar a la madurez, los cacahuates son desenterrados y puestos a secar en condiciones naturales o artificiales, (en México se usa el secado na--  
tural) y si el contenido de agua del aire se mantiene elevado o si se produ--cen precipitaciones durante este período, las vainas y los granos conservan durante largo tiempo una humedad elevada que es favorable para el desarro--  
llo de hongos.

El ataque de insectos provoca una puerta de entrada para estos micror--ganismos, al igual que el daño mecánico de las vainas. Estas son las razo--nes mas frecuentes que originan la presencia de los hongos en el almacenamiento.

La forma en que se presenta la alteración puede ser que las hifas pasen a través de los tejidos de la cubierta y penetran en las almendras. A menudo vainas y granos se vuelven marrones a consecuencia de los ataques de Macrophomina phaseoli y del Botryodiplodia theobromae, pero también puede presentar tonalidades mas claras, causadas por otros géneros tales como Fusarium, Sclerotium, Trichothecium, Aspergillus y Penicillium.

En los granos enterrados y en los que se están sacando los hongos - pueden instalarse en el espacio intercotiledonio y provocar manchas únicamente internas entre los dos cotiledones, siendo este tipo de alteración de las mas peligrosas, pues el grano exteriormente parece sano. Esta afec--- ción se conoce con el nombre de "daño oculto" del cacahuate. Aparte de las manchas sobre las vainas y los granos estas alteraciones, van acompañadas de un aumento en el contenido de ácidos grasos libres en el aceite.

Entre los hongos mencionados, hay dos especies que nos interesan en forma particular que son Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus, ya que resultan particularmente peligrosas en ciertas condiciones, pues segregan aflatoxinas, compuestos cancerígenos muy tóxicos. Las toxinas que han recibido el nombre de aflatoxinas no pasan al aceite, pero en cambio permanecen en los turtos o tortas que son utilizadas sin precaución para la alimentación de ganado, ocasionando gran mortandad o retrasos importantes en el crecimiento.

En las condiciones naturales, las aflatoxinas se forman cuando los granos poseen un contenido de agua comprendido entre el 9% y el 35%. Las heridas en las vainas favorecen la instalación de los hongos. Si observa---

mos con detenimiento, en el almacenamiento también pueden presentarse - los dos hongos señalados pues la humedad de los granos y vainas en el almacenamiento varía entre 10% y 15%.

Para obtener una cosecha sana o muy baja en contenido de aflatoxinas, se sugieren las siguientes medidas:

a) Cosechar en cuanto la planta llegue a la madurez; no se debe permitir que los cacahuates se deshidraten por debajo de un 35% en el suelo; los pies muertos en el momento del arranque no deben ser cosechados, con el fin de no contaminar el resto de la cosecha después.

b) Efectuar un secado rápido. Si en la zona existe un bajo nivel de humedad el secado natural es suficiente, pero en las zonas húmedas es preciso tomar precauciones especiales, como alternar el secado manual con otro artificial.

c) Evitar a toda costa que se rehumidifiquen los frutos en cualquier etapa posterior al secado.

d) Seleccionar los granos, eliminando las vainas hendidas o agujeradas así como las almendras manchadas, aunque es fácil suponer que cuando el daño es oculto es prácticamente imposible efectuar esta selección.

Tomando en cuenta estas recomendaciones se pueden obtener cosechas sanas o casi sanas. De las aflatoxinas hablaremos más adelante con mayor detalle.

## 2.7 Características de los principales constituyentes de la planta.

### 2.7.1 Características de la paja.

La cantidad de hojas secas varía con la madurez, ataques de animales, variedades, etc. pero en general la cosecha de vainas es de una a tres veces menor que la de hojas.

Las hojas constituyen el elemento más rico de la parte aérea y tienen gran valor nutritivo como forraje. Su composición es, en comparación con los valores de la alfalfa, la que se indica en la tabla siguiente:

	<u>Paja de Cacahuete</u>	<u>Alfalfa</u>
Proteína .....	9.5 %	14.7 %
Celulosa .....	24.3 %	28.4 %
Proteína digestible .....	6.1 %	11.0 %
Extractos volátiles .....	3.1 %	1.9 %
Extracto no Nitrogenado .....	45.3 %	37.3 %
Cenizas .....	8.2 %	8.4 %
Agua .....	9.5 %	9.1 %

### 2.7.2 Características del Fruto. *de la planta de cacahuete*

El fruto es el elemento esencial de la planta y está compuesto de 20% a 25% de vaina o cáscara y de 75% a 80% de almendra o semilla. La densidad del cacahuete en cáscara varía de 0.25 a 0.37.

La cáscara varía entre 1cm. x 0.5cm. y 8cm. x 2cm. de tamaño; el espesor varía de unas décimas de milímetro a 2mm.; la composición de la vaina varía conforme va madurando, pero como se le da importancia sólo en

estado de madurez, se indica la composición en estas condiciones en la tabla siguiente:

Proteína .....	6.76	%
Materia Grasa .....	1.10	%
Celulosa .....	60.83	%
Extracto no Nitrogenado .	19.64	%
Agua .....	7.48	%
Ceniza .....	4.19	%

La semilla varía en forma y color según la variedad; su peso puede oscilar entre 0.2 g. a 2 g. ; su forma puede ser esférica, elíptica o mas o menos alargada o con una parte alargada, pero en general está constituida de tres porciones que ocupan generalmente los mismos porcentajes en peso:

Cotiledones .....	72.6	%
Tegumento seminal .....	4.1	%
Embriones .....	3.3	%

La densidad del cacahuate mondado oscila entre 0.55 y 0.68.

Cada una de estas porciones tiene una composición diferente, por ejemplo, el tegumento seminal es rico en taninos y en pigmentos (en especial leucoantocianina); el embrión contiene compuestos a base de saponina, que confieren un sabor amargo a esta parte del grano. El cotiledón es la parte más importante del grano, su contenido en proteínas es 26% (principalmente dos globulinas, la araquina y la conaraquina, ésta última muy rica en azufre).

El contenido de aceite cambia según la variedad , al igual que la composición del mismo, pero en general las almendras presentan de 45% a 53% de aceite.

El contenido porcentual promedio de las variedades Virginia y - - - Spanish se indica a continuación:

	<u>Variedades Spanish</u>	<u>Variedades Virginia</u>
Palmítico .....	12.7 %	11.3 %
Estearico .....	6.1 %	3.4 %
Oléico .....	45.6 %	58.8 %
Linoleico .....	29.9 %	20.3 %
Araquídico .....	2.4 %	1.3 %
Eicosanoico .....	1.1 %	1.2 %
Behémico .....	2.2 %	2.6 %
Lignocérico .....	-	1.1 %
Relación Oléico/Linoleico .	1.5 %	2.9 %

Las almendras son pobres en elementos minerales pues presentan un 3% de cenizas, donde el más abundante es el potasio.

CAPITULO III  
TECNOLOGIA DE PROCESADO DEL CACAHUATE

### 3.1 Almacenado de los granos.

Antes de ser tratados los granos deben ser descortezados para obtener un máximo rendimiento de aceite y obtener una torta utilizable para la alimentación animal. Este descortezado se efectúa casi inmediatamente después de la cosecha, por razones de costos de transporte y ahorro de espacio en almacén. Este almacenaje se efectúa en sacos, sin embargo, en México también se almacena el fruto con vaina a granel. Sobre el descortezado se hablará mas adelante, aquí solo mencionaremos las condiciones generales de almacenado.

La conservación en clima intertropical de un grano oleaginoso es una operación particularmente delicada, las precauciones que se deben tomar durante el almacenado del cacahuete son, por consiguiente, importantes, pero también en las zonas templadas debe cuidarse su almacenado.

Puede haber desquebrajamiento a causa de malos tratos en la carga y la descarga o por un descortezado defectuoso y todo esto, unido a la presencia de impurezas, favorece las alteraciones del grano causadas por insectos y microorganismos, en especial por mohos.

La mayoría de los insectos prolifera a humedades relativamente altas (de un 80%), pero no suelen resistir temperaturas superiores a los 42°C, por espacio de varias horas a excepción de Trogoderma granarium.

Los insectos incrementan las roturas de los granos convirtiéndolos en polvillo, el cual es atacado de inmediato por los microorganismos, sobre todo si el contenido de agua de esos fragmentos es elevado. Los resultados

mas comunes son la pérdida de peso, la acidificación del aceite y la contaminación por mohos, entre éstos se encuentra Aspergillus flavus.

Para asegurar una buena preservación de los granos es necesario observar algunas reglas durante el almacenado, como son:

- Eliminar las impurezas antes de almacenar el grano.
- Evitar el resquebrajamiento de los granos por malos manejos o por el ataque de insectos.
- Secar bien el grano para evitar el ataque de bacterias y mohos.
- Utilizar, para almacenar los granos, locales secos y bien ventilados.

Estas precauciones evitarán los daños mencionados o cuando menos los disminuirán notablemente. Después del almacenado, el grano es llevado al lugar donde será procesado, principalmente para la obtención de aceite, que es el producto mas importante, o bien para ser consumido directamente por el público, quien lo adquiere con vaina. Se hablará primero del proceso de obtención y refinado del aceite.

### 3.2 Obtención y refinado de aceite.

Los granos de cacahuete son conducidos al molino de aceite o almazara, al llegar su contenido de agua suele ser bajo (de un 9 a 15%) lo cual puede ser obtenido por secado natural (que es el método practicado en México) por lo que no es necesario un secado adicional. Los pasos que se siguen normalmente son:

a) Recepción y limpieza de los granos o de las vainas.

Al llegar a la almazara los granos son vertidos en una tolva, generalmente subterránea, que suele tener en la parte superior una malla o enrejado que permite la eliminación de impurezas de gran tamaño.

Antes de pasar a la etapa de fabricación, el cacahuate debe limpiarse eliminando cualquier tipo de impurezas, esta operación se alterna con la de pesado del cacahuate, pero de cualquier forma esto ocurre antes de llegar a la fase de fabricación, cosa que no sucede con el almacenado del grano ya que es una operación opcional según los requerimientos de la almazara.

Una vez limpio el cacahuate pasa a la operación de mondado o descortezado.

b) Mondado o descortezado del cacahuate.

Esta operación tiene por objeto la rotura de las vainas y la liberación de los granos, evitando al mínimo la fragmentación de las almendras por medio de maquinaria. El equipo que se utiliza para el mondado se puede considerar en dos grupos: Los primeros son aparatos que tienen una jaula cilíndrica con paredes formadas por barras metálicas o planchas perforadas de metal; en el interior de la jaula se encuentra un eje rotatorio provisto de aspas o bien de un tambor de superficie lisa u ondulada en los que al cobrar los granos en el interior de la jaula provocan la rotura de las vainas, saliendo por los espacios los fragmentos de vainas con los granos y en el interior quedan los cacahuates enteros. El segundo grupo está formado por los que poseen dos plataformas ranuradas, una de ellas fija y otra rotatoria, entre ellas se

comprime el fruto con cáscara y por las ranuras salen los granos con las -- porciones de vaina y en el interior se quedan los cacahuates enteros.

Por lo general, cualquiera que sea el tipo de descortezadora usado, la mezcla de productos sale del aparato y cae o es llevado a un tamiz ventilado de dos o más rejillas, el cual separa los granos de los fragmentos de vaina y de la harinilla de los granos rotos así como de la película del grano. Existen aparatos especiales para asegurar la eliminación de la película, que suelen usar rodillos rotatorios de goma provistos de un tamiz ventilado.

Después de esta etapa, los granos ya limpios pasan a otra operación antes de la extracción del aceite.

#### c) Preparación del grano.

Dependiendo del tipo de extracción de aceites que se use, se debe efectuar una preparación preliminar del grano, la cual consiste básicamente en tres pasos:

1º Triturar el grano (a un tamaño aproximado al de los granos de trigo), para ésto se puede usar un molino simple de dos rodillos.

2º Calentamiento de la molienda, en este paso el grano triturado es calentado a temperaturas variables entre los 100° C y los 120° C.

3º El acondicionamiento que consiste en un reajuste de humedad, generalmente a alrededor de un 12%.

#### d) Extracción de aceite.

Las almazaras modernas y de cierta importancia efectúan la extracción del aceite con la ayuda de prensas mecánicas que pueden utilizarse solas, en sistema continuo, o combinadas con la extracción por disolventes. Existe un tercer método que es por medio de prensas hidráulicas, que se operan en sistema discontinuo, pero únicamente se usan en almazaras muy antiguas que no han renovado su equipo y tecnología.

La elección del método a usar depende de muchos factores como son la importancia y situación del molino aceitero, la posibilidad de aprovisionar lo del disolvente, la calidad de la mano de obra, el uso que se le va a dar al aceite, etc.

#### 1º Extracción a presión continua.

Una prensa mecánica continua está generalmente compuesta por cajas cilíndricas o cónicas de acero, con ranuraciones de milímetros de separación, (que permiten la salida del aceite) con un eje en el centro que gira y está provisto de elementos de "tornillo" (la disposición y número varían según el objetivo buscado). La pasta de la molienda de los granos convenientemente calentados y "acondicionados" se introduce en las cajas metálicas, que gracias a la acción del eje central con los elementos de tornillo es presionada, a la vez que la pasta se acumula en el extremo inferior de la caja. La pasta sale por el espacio comprendido entre el eje y los extremos terminales de las cajas.

En este tipo de prensas se pueden alcanzar presiones del orden de 2000 Kg/cm<sup>2</sup>. El aceite sale por las ranuras, pero arrastra consigo restos

de los granos, por esta razón se coloca un tamiz que elimina los residuos - cuando pasa el aceite por él. Más tarde el aceite se trata para eliminar todas las impurezas.

Si la extracción es combinada con disolventes, la torta se dirige al extractor por disolventes, triturada o no, según lo requiera el equipo.

Parte del trabajo efectuado por la prensa se transforma en calor, lo cual puede oscurecer el aceite, para evitar ésto se hace circular agua fría por el centro del eje, o por riego de la parte exterior de la caja.

La depuración del aceite se puede efectuar de diversas formas, el método mas sencillo consiste en realizar una decantación en un depósito y después filtrar con ayuda de filtros prensa. Sin embargo la decantación produce una acidificación dél aceite, por lo que se ha sustituido por una homogeneización en una batidora, antes de proceder al filtrado, aunque se requieran - filtros prensa de mayor capacidad.

En algunos países europeos se adopta el método de tamices vibradores, seguidos de una filtración con filtros prensa o con filtros continuos de tambor, que permiten que los residuos de la torta solo se mantengan en contacto con el aceite por un período reducido y por lo tanto se disminuye la - acidificación.

Los residuos se reincorporan a las prensas para evitar desperdicios o pérdidas de aceite.

## 2.º Extracción por disolventes.

La torta obtenida por la extracción a presión se prepara sometiéndola a una temperatura adecuada y después es puesta en contacto con el disolvente durante un tiempo suficiente. De esta forma se obtiene una solución de aceite que se llama "miscella", que se somete a calentamiento para concentrarla y finalmente recoger el aceite por destilación y condensación de los vapores del disolvente. El disolvente se recupera generalmente, teniendo pérdidas no mayores al 1%. La temperatura a la cual se trabaja depende del disolvente.

### c) Refinado del aceite.

El aceite que se obtiene de cualquiera de los dos métodos anteriores (presión continua o extracción con disolvente) se llama aceite bruto, el cual, como ya se mencionó fue filtrado para eliminar partículas pequeñas que se desprendieran en su extracción, por lo que se puede decir que está libre de material sólido en suspensión y su contenido de agua es muy reducido. Por estas razones, puede ser conservado durante algún tiempo en buen estado, con las debidas precauciones, sobre todo si se toma en cuenta que tiene antioxidantes naturales. Sin embargo, el aceite posee una acidez débil que varía del 1 al 3%, su color es oscuro, y posee de manera más o menos acentuada el sabor y olor del grano del cual procede.

El refinado del aceite tiene por objetivos principales la neutralización, precedida de la desmucilaginación, el blanqueo y la desodorización.

La desmucilaginación previa a la neutralización con lejía permite obtener por una parte lecitina de cacahuete, que puede ser deshidratada y puri

ficada y por otra parte, pastas de neutralización libres de lecitina, que es - un agente emulsificador.

La decoloración o blanqueo generalmente se efectúa alrededor de - - 700 mm. de Hg. y a una temperatura del orden de 80°C. en una batidora provista de un dispositivo calefactor, por incorporación de un 1% a 2% de tierra activada o carbón activado en el aceite previamente deshidratado. Después de estar en contacto de 20 a 30 min. , la mezcla se pasa por un filtro prensa.

La desodorización comunmente se efectúa por arrastre de las mate-- rias volátiles con ayuda de vapor y a alrededor de 755 mm. de Hg. a una -- temperatura cercana a los 180°C.

También se suele operar a temperaturas de 230°C lo que permite simultáneamente arrastrar la mayor parte de los ácidos grasos libres presentes en el aceite, de este modo se realiza la desodorización al mismo tiempo que una destilación neutralizante. No hay necesidad de efectuar una neutralización previa.

El aceite de cacahuete refinado debe ser almacenado con precaucio-- nes superiores, incluso a las recomendadas para el aceite en bruto, pues ya no contiene antioxidantes naturales. Por lo que conviene conservarlo siempre que sea posible, al abrigo de la luz, del calor y de la humedad en depósi-- tos perfectamente limpios. El período de almacenaje debe ser reducido.

### 3.3 Composición y características del aceite de cacahuete.

El aceite refinado conserva una ligera tonalidad amarilla, pero no -

contiene prácticamente ácidos grasos libres (alrededor de un 0.10%) y ya no poseen ni el sabor ni el olor de su origen.

El peso específico a 15° C del aceite de cacahuate es de 0.910 a - - - 0.920. Su índice de yodo varía entre 80 y 100, por lo que no es secante. Su índice de saponificación es de 185 a 195, y su punto de solidificación es muy - cercano a los 3°C.

Los ácidos grasos que entran en la composición del aceite del cacahuate tienen relaciones mas o menos constantes: ácido oleico de un 60% a 70%, - ácido linoleico del 15% al 20% y de un 15% a 20% de saturados (palmítico, esteárico, araquídico, behénico y lignocérico).

### 3.4 Usos principales.

Después del refinado el aceite de cacahuate es excelente para la alimentación humana, como aceite de ensaladas y frituras ó formando parte de las - margarinas. Se emplea ya poco en la fabricación de jabones, bien se puede -- emplear como materia prima para otros productos industriales.

### 3.5 Subproductos de la almazara.

Existen varios subproductos, uno de los más importantes es la torta - de cacahuate que se obtiene después de la extracción. Las tortas de cacahuate pueden presentarse en forma de fragmentos de orujos de presión de varios tamaños, o bien en forma de grumos o incluso de harina, según el tratamiento que hayan recibido. Las placas de pasta sólo resultan de las prensas hidráulicas, que ya están desapareciendo.

Las tortas pueden ser conservadas y vendidas sin transformar o reducidas por trituración a harina, que puede ser transformada a su vez en granulos por aglomeración.

No obstante, antes de almacenar, es conveniente efectuar un enfriamiento a una temperatura que no rebase los 50°C.

Las tortas de presión continua, como las de extracción por disolvente, no pueden ser atacadas por bacterias y mohos, ya que los granos han sido sometidos para la extracción del aceite, a temperaturas mayores a los 100°C y por más de 20 minutos, lo que corresponde a una esterilización. Sin embargo pueden ser atacadas las tortas, si no se evita una rehumidificación.

La conservación de estas tortas es delicada, ya que aún contienen de un 4% a 5% de aceite, y por esta causa tienden a calentarse por la oxidación. En climas tropicales se ha dado el caso de combustión espontánea, por lo que hay que cuidar la temperatura interior de las tortas, incluso con aereación.

Es conveniente recordar que las aflatoxinas soportan sin destrucción unas temperaturas muy superiores a las alcanzadas en las prensas y que, --prácticamente, no son solubles en los disolventes del tipo hexano. Una torta procedente de un grano atacado con Aspergillus flavus contendrá, por lo menos en gran parte, la aflatoxina existente en el grano del que procede.

Las tortas de extracción por disolvente contienen alrededor de un 50% de materias protéicas, por cuya razón son empleadas en abundancia para la alimentación de ganado. Los fabricantes de alimentos compuestos las utilizan

para la preparación de sus productos, mezcladas con cereales secundarios y una proporción conveniente de cuerpos grasos, ordinariamente de origen animal y de un costo relativamente reducido.

Las tortas de presión continua son especialmente apreciadas, a causa de su contenido de aceite, por algunos ganaderos que preparan las raciones de su ganado. A causa de la presencia de este aceite y a pesar de tener menor contenido de proteínas, son vendidas a más alto precio que las obtenidas por extracción con disolvente.

La harina de la torta de cacahuete carente de aceite puede constituir, a causa de su elevado contenido de proteínas vegetales y a pesar de su deficiencia en algunos aminoácidos, un fuerte refuerzo en la alimentación de - - países carentes de proteínas animales, como lo recomiendan algunos autores. Por otro lado, también se pueden extraer las proteínas y utilizarlas en la preparación de diversos productos alimenticios y para obtener algunas fibras sintéticas, aunque su utilización aún no es significativa.

Las cáscaras de cacahuete son otro de los subproductos en una almazara y representan un volumen importante del fruto (hasta un 30% en peso). Uno de sus usos más simples es el utilizarlos como combustible en las calderas.

También se puede confeccionar, con una mezcla de cáscaras trituradas y limpias de polvo y con una pequeña porción de resina sintética, paneles de alta calidad, utilizables para la confección de tabiques, puertas y muebles.

Debido a su alto contenido en celulosa, la cáscara de cacahuete puede

ser usada como materia prima para la obtención de furfural.

Existen otros subproductos como los mucilagos de los cuales, como ya se mencionó, se puede obtener lecitina de cacahuete. Las películas rojas del cacahuete pueden usarse para complementar alimentos de ganado, etc.

### 3.6 Manteca de cacahuete.

La mantequilla de cacahuete se obtiene tostando de manera uniforme la almendra y cuidando que no se quemem los granos del cacahuete desprovistos de la película rojiza que los envuelve. Si se quema puede tomar un color obscuro y sabor amargo.

Se le quitan los embriones por medio de un tamiz y se pesa para agregarle 1.5% de sal. Enseguida se efectúa una molienda, de donde se obtiene una pasta fina, uniforme y aceitosa.

La manteca de cacahuete se envasa generalmente en frascos pequeños de vidrio. Después de cierto tiempo el aceite sale a la superficie, pero esto no es una alteración. De cada 100 Kg. de cacahuete se obtienen alrededor de 85 Kg. de mantequilla de cacahuete.

La composición aproximada de la manteca de cacahuete, según el Instituto de Fruticultura, es la siguiente:

Proteína .....	29.80 %
Materias Grasas .....	53.35 %
Celulosa .....	1.99 %

Hidratos de Carbono ..	10.82 %
Agua .....	1.18 %
Cenizas .....	2.06 %

La mantquilla de cacahuete es un buen sustituto de la mantquilla de leche de vaca y es mucho más económica que esta última.

### 3.7 Cacahuete de boca.

No todos los cultivos de cacahuete tienen como objeto la fabricación de aceite, pues una parte importante de la producción es consumida en forma de cacahuete de boca. Se reservan para este uso los productos de mejor calidad y presentación. El cacahuete de boca es comercializado tanto con cáscara como sin ella.

El cacahuete con cáscara es un fruto de dos granos, del tipo Virginia y en ocasiones del tipo Valencia que es de tres o cuatro granos.

El cacahuete mondado puede pertenecer a cualquier tipo, pero el mercado sólo se interesa por los tipos Virginia de granos grandes o por los Española.

Para merecer la calificación de cacahuete de boca, el fruto debe responder a unas normas precisas que permitirán definir su categoría y precio. Para obtener el cacahuete de boca, es necesario tener algunos cuidados extra desde el cultivo, para que cumpla con las normas. El único cuidado adicional en el cultivo es el suministro de calcio, pues las variedades (principalmente la Virginia) que se utilizan con este fin, son sensibles a la falta de este ele-

mento, provocándose la ausencia de fruto en la planta.

La recolección del cacahuate de boca deberá efectuarse con toda exactitud en el momento de madurez óptima, para evitar la presencia de granos arrugados o poco desarrollados. En las variedades precoces puede presentarse germinación en los granos.

La trilla deberá efectuarse con especial cuidado, ya que se pueden -- fracturar los frutos. Se efectúa después de la trilla una etapa de limpieza, - que consta de dos procedimientos: Lavado (que se efectúa inmediatamente - después del arranque y generalmente con agua) y limpieza en seco, que tiene por objeto eliminar todas las partículas de polvo adheridas a la vaina, en Mé- xico se efectúa en forma manual, dando un "cepillado al cacahuate".

Los frutos destinados a cacahuate de boca deben ser secados con todo cuidado para evitar todo vestigio de mohos, conservar intacto su sabor y guar- dar toda su calidad organoléptica.

Una vez secos pasan a la selección, que por sus características gene- ralmente es manual, pues hay que eliminar los frutos con un solo grano, de cá- caras manchadas, o que presenten defectos en su aspecto. Cuando se trata - de cacahuate descortezado, se selecciona en base al color y al tamaño por me- dios mecánicos como tamices y otros con celdillas fotoeléctricas que seleccio- nan el color.

Es importante hacer notar que el cacahuate de boca no debe ser trata- do con insecticidas que puedan dejar trazas o modificar su sabor. Los únicos productos utilizables actualmente son los fumigadores como el bromuro de --

metilo, que sólo pueden estar en contacto con el cacahuete por 24 horas.

El almacenado en atmósfera de CO<sub>2</sub> o de nitrógeno y en almacén refrigerado elimina todo riesgo de infección.

La preparación de los cacahuates de boca es muy diversa, por lo que sólo se mencionarán algunos métodos.

a) Cacahuates tostados salados.

Los cacahuates descortezados con una humedad alrededor del 5% son tostados en un horno, manteniéndolos a 160°C durante 40 ó 60 minutos. Una vez que se ha alcanzado el grado de tostado apropiado, se enfrían rápidamente. Se pulveriza una pequeña cantidad de aceite sobre los granos y se espolvorean con sal. Estos cacahuates se venden con su película y para ésto es muy usada la variedad Española.

En ocasiones, antes de tostar los cacahuates, se blanquean (eliminación de la película) en seco, con cepillos y correas de goma o con agua caliente. Pasan por un seleccionador eléctrico que separa los defectuosos o que no perdieron la película total o parcialmente; por último se frien en aceite y se salan.

b) Cacahuates garapiñados.

Los cacahuates se tuestan en seco como los anteriores, después se blanquean y por último son bañados en almíbar o chocolate.

c) Cacahuates con cáscara tostados.

Los cacahuates con índice de humedad del 5% al 10% son tostados a temperaturas de 150°C a 200°C, por tiempos de 20 minutos a una hora. Cuando han alcanzado la calidad deseada se retiran a un ventilado intenso para evitar la torrefacción.

d) Cacahuates con cáscara tostados y salados.

Los cacahuates son sumergidos en una salmuera al 36% en peso, con un ligero vacío en el recipiente que los contiene, durante 30 segundos. Enseguida se escurren, se lavan, se secan y se tuestan como los anteriores.

Existen otros tipos de cacahuates como los desgrasados que no se producen en México y golosinas preparadas a base de cacahuete o con cacahuete como suplemento, que no se mencionarán aquí.

CAPITULO IV

PRODUCCION Y COMERCIALIZACION DEL CACAHUATE

#### 4.1 Producción de cacahuate en México.

En los últimos años la producción nacional de cacahuate se ha mantenido prácticamente constante, pues en el período de 1960 a 1976 se incrementó en un 0.413% en forma global, mientras que el área de cultivo disminuyó en un 0.15% de la superficie total cultivada en el mismo período. Esto se debe al empleo de técnicas más avanzadas de cultivo y cosecha en algunas regiones. Hasta la fecha los esfuerzos oficiales y privados se han encaminado fundamentalmente al desarrollo y mejoramiento de las técnicas de producción, obteniéndose con ello resultados apreciables, que desgraciadamente no se han puesto en práctica por falta de recursos humanos y económicos.

La producción de cacahuate en México venía sufriendo una considerable disminución por la reducción de áreas de cultivo (como se observa en la siguiente tabla) con una ligera recuperación en los últimos tres años.

Los datos que se ponen a consideración del lector en ningún momento pretenden ser un análisis completo de la situación económica de la industria del cacahuate en México sino, como lo indica el título dado a este capítulo, sólo introduce al conocimiento del tema y de ideas generales de las cifras implicadas. Para más detalles al respecto se deberá consultar las obras citadas en la bibliografía que se da al final de este trabajo.

CULTIVO DE CACAHUATE EN MEXICO

<u>AÑO</u>	<u>SUP. COSECHADA (Hectáreas)</u>	<u>PRODUCCION TOTAL (Toneladas)</u>	<u>VAL OR EN PESOS</u>
1960	73 210	89 324	94 107 852
1961	74 945	93 684	105 336 444
1962	75 272	94 789	115 440 357
1963	74 910	92 834	118 804 093
1964	75 655	95 305	125 042 155
1965	60 541	80 425	109 571 263
1966	62 681	89 919	120 454 793
1967	59 774	74 085	102 438 827
1968	64 194	82 327	115 537 552
1969	53 656	72 895	109 351 850
1970	64 578	89 602	133 133 140
1971	59 045	79 677	119 515 500
1972	48 382	69 622	104 433 000
1973	42 136	58 949	163 464 000
1974	48 266	62 881	163 460 600
1975	61 640	68 935	243 349 800
1976	60 000	84 000	294 000 000

FUENTE: Consumo Aparente, S.A.G., D.G.E.A.

Los principales estados productores en los últimos cinco años son: Jalisco, Chihuahua, Morelos y Puebla, lo cual se aprecia mejor en las tablas de producción estatal de cacahuate que se presentan a continuación, de los años 1970 y 1976.

PRODUCCION FRUTICOLA ESTATAL EN 1970

CACAHUATE

Entidad Federativa	Superficie Cosechada Ha.	%	Producción Ton.	%	Precio me dio rural. Pesos	Valor de la Producción Pesos
TOTALES:	<u>64 578</u>	<u>100.00</u>	<u>89 602</u>	<u>100.00</u>	<u>1.49</u>	<u>133 133 140</u>
1. - Chihuahua	12 000	18.58	20 000	22.32	1.45	29 000 000
2. - Jalisco	12 000	18.58	15 600	17.40	1.36	21 216 000
3. - Guanajuato	6 400	9.91	12 250	13.67	1.40	17 150 000
4. - Puebla	7 950	12.31	9 550	10.66	1.48	14 134 000
5. - Sinaloa	6 590	10.20	7 200	8.04	1.75	12 600 000
6. - Morelos	5 500	8.52	7 425	8.29	1.50	11 137 500
7. - Nayarit	4 000	6.19	6 400	7.14	1.70	10 880 000
8. - Guerrero	3 737	5.79	3 737	4.17	1.40	5 231 800
9. - San Luis Potosí	2 100	3.25	2 310	2.58	1.56	3 603 600
10. - Zacatecas	750	1.16	1 781	1.99	1.60	2 849 600
11. - Oaxaca	1 000	1.55	600	0.67	1.56	936 000
12. - México	660	1.02	693	0.77	1.30	900 900
13. - Michoacán	405	0.63	450	0.50	1.77	796 500
14. - Veracruz	450	0.70	414	0.46	1.51	625 140
15. - Chiapas	250	0.39	250	0.28	1.70	425 000
16. - Yucatán	200	0.31	200	0.22	1.70	340 000
17. - Sonora	120	0.19	204	0.23	1.60	326 400
18. - Colima	100	0.15	130	0.15	2.45	318 500
19. - Tabasco	150	0.23	150	0.17	1.55	232 500
20. - Aguascalientes	110	0.17	100	0.11	1.50	150 000
21. - Querétaro	50	0.08	80	0.09	1.85	148 000
22. - Hidalgo	20	0.03	60	0.07	1.70	102 000
23. - Campeche	36	0.06	18	0.02	1.65	29 700

FUENTE: Dirección General de Economía Agrícola, S.A.G.

Boletín mensual: números 536 al 560

PRODUCCION FRUTICOLA ESTATAL EN 1971

CACAHUATE

<u>Entidad Federativa</u>	<u>Superficie Cosechada Ha.</u>	<u>Producción Ton.</u>	<u>Rendimiento Kg/Ha.</u>	<u>Valor de la producción Pesos</u>
<b>TOTALES:</b>	<b>59 045</b>	<b>79 677</b>	<b>1 350</b>	<b>119 515 500.00</b>
1. - Jalisco	10 000	13 000	1 300	19 500 000.00
2. - Guanajuato	6 600	12 725	1 920	19 087 500.00
3. - Chihuahua	6 531	10 672	1 630	16 008 000.00
4. - Sinaloa	7 651	9 151	1 190	13 726 500.00
5. - Morelos	6 850	9 049	1 320	13 573 500.00
6. - Puebla	6 000	6 378	1 060	9 567 000.00
7. - Guerrero	3 737	4 358	1 300	7 287 000.00
8. - Nayarit	2 780	3 853	1 380	5 779 500.00
9. - San Luis Potosí	2 000	2 220	1 110	3 330 000.00
10. - Zacatecas	1 690	1 666	980	2 499 000.00
11. - Chiapas	1 100	1 601	1 450	2 401 500.00
12. - Oaxaca	1 084	935	860	1 402 500.00
13. - Michoacán	717	865	1 200	1 297 500.00
14. - México	600	720	1 200	1 080 000.00
15. - Veracruz	686	476	690	714 000.00
16. - Aguascalientes	260	406	1 560	609 000.00
17. - Sonora	203	324	1 590	486 000.00
18. - Colima	150	195	1 300	292 500.00
19. - Durango	98	187	1 900	283 500.00
20. - Tabasco	150	180	1 200	270 000.00
21. - Yucatán	87	116	1 330	174 000.00
22. - Querétaro	50	90	1 800	135 000.00
23. - Campeche	20	8	400	12 000.00
24. - Quintana Roo	1	2	2 000	3 000.00

NOTAS: El precio medio rural calculado fue de \$1,500.00 la tonelada.

Las cifras referidas a superficie y producción, se ajustaron coordinadamente con la Dirección General de Economía Agrícola y con la Dirección General de Agricultura de la S. A. G.

PRODUCCION NACIONAL ESTIMADA PARA 1972

CACAHUATE

Entidad	Superficie Cosechada Ha.	%	Volumen de la Producción Ton.	%	Valor de la Producción Pesos
<b>TOTALES:</b>	<b>48 382</b>	<b>100.00</b>	<b>69 622</b>	<b>100.00</b>	<b>104 433 000</b>
1. - Guanajuato	6 670	13.79	13 292	19.09	19 938 000
2. - Morelos	5 458	11.28	12 161	17.47	18 241 500
3. - Puebla	7 350	15.19	7 740	11.12	11 610 000
4. - Chihuahua	3 695	7.64	6 649	9.95	9 973 500
5. - Jalisco	5 040	10.42	6 024	8.65	9 036 000
6. - Guerrero	4 300	8.89	4 555	6.54	6 832 500
7. - Sinaloa	4 200	8.68	4 237	6.09	6 355 500
8. - Nayarit	2 200	4.55	3 740	5.37	5 610 000
9. - San Luis Potosí	1 920	3.97	2 102	3.02	3 153 000
10. - Oaxaca	1 713	3.34	1 694	4.43	2 541 000
11. - Zacatecas	1 690	3.49	1 666	2.39	2 499 000
12. - Chiapas	1 100	2.27	1 600	2.30	2 400 000
13. - Veracruz	636	1.31	954	1.37	1 431 000
14. - Michoacán	675	1.40	850	1.22	1 275 000
15. - México	500	1.03	625	0.90	937 500
16. - Aguascalientes	350	0.72	615	0.88	922 500
17. - Yucatán	235	0.59	374	0.54	561 000
18. - Sonora	265	0.55	374	0.54	561 000
19. - Colima	160	0.33	202	0.29	303 000
20. - Tabasco	150	0.31	150	0.22	225 000
21. - Campeche	20	0.04	10	0.01	15 000
22. - Quintana Roo	5	0.01	8	0.01	12 000

Precio promedio nacional en el medio rural \$1 500.00

NOTA: Estimación calculada por el Departamento de Estudios Económicos de la CONAFRUT.

PRODUCCION NACIONAL CALCULADA PARA 1973

CACAHUATE

Entidades	Superficie Cosechada Ha.	%	Producción Ton.	%	Valor de la Producción Pesos
<b>TOTALES:</b>	<b>68 460</b>	<b>100.00</b>	<b>102 165</b>	<b>100.00</b>	<b>163 464 000</b>
1. - Jalisco	12 340	18.02	25 920	25.37	41 472 000
2. - Chihuahua	11 600	16.94	16 240	15.90	25 984 000
3. - Guanajuato	8 450	12.34	13 060	12.78	20 896 000
4. - Puebla	7 406	10.82	9 880	9.67	15 808 000
5. - Morelos	6 718	9.81	9 740	9.53	15 584 000
6. - Sinaloa	6 584	9.62	7 900	7.73	12 640 000
7. - Guerrero	3 440	5.03	4 472	4.38	7 155 200
8. - San Luis Potosí	3 156	4.61	4 418	4.33	7 068 800
9. - Nayarit	2 200	3.21	2 640	2.58	4 224 000
10. - Zacatecas	2 300	3.36	2 500	2.45	4 000 000
11. - Oaxaca	1 142	1.67	1 598	1.56	2 556 800
12. - Michoacán	695	1.02	1 008	0.99	1 612 800
13. - México	470	0.69	580	0.57	928 000
14. - Veracruz	426	0.62	468	0.46	748 800
15. - Chiapas	400	0.59	420	0.41	672 000
16. - Sonora	274	0.40	328	0.32	524 800
17. - Tabasco	194	0.28	232	0.23	371 200
18. - Colima	168	0.25	218	0.21	348 800
19. - Aguascalientes	145	0.21	150	0.15	240 000
20. - Durango	96	0.14	114	0.11	182 400
21. - Hidalgo	109	0.16	103	0.10	164 800
22. - Querétaro	68	0.10	102	0.10	163 200
23. - Yucatán	50	0.07	50	0.05	80 000
24. - Campeche	28	0.04	22	0.02	35 200
25. - Quintana Roo	1	0.00	2	0.00	3 200

FUENTE: Departamento de Estudios Económicos de la CONAFRUT y Dirección General de Economía Agrícola de la S. A. G.

PRODUCCION FRUTICOLA NACIONAL ESTIMADA PARA 1974

CACAHUATE

Estados	Superficie Cosechada Ha.	%	Producción Ton.	%	Valor de la Producción Pesos
<b>TOTALES:</b>	48 266	100.00	62 881	100.00	163 490 600
1. - Morelos	8 505	17.62	11 558	18.38	30 050 800
2. - Chihuahua	4 200	8.70	9 107	14.48	23 678 200
3. - Puebla	7 400	15.33	7 840	12.47	20 384 000
4. - Sinaloa	5 774	11.96	5 863	9.32	15 243 800
5. - Guerrero	5 180	10.74	5 720	9.11	14 872 000
6. - Nayarit	3 515	7.28	5 466	8.70	14 211 600
7. - San Luis Potosí	3 500	7.26	3 899	6.20	10 137 400
8. - Oaxaca	3 389	7.02	3 652	5.81	9 495 200
9. - Chiapas	1 800	3.73	2 900	4.62	7 540 000
10. - Jalisco	1 120	2.32	2 348	3.73	6 104 800
11. - Zacatecas	1 600	3.31	1 600	2.54	4 160 000
12. - Michoacán	643	1.33	809	1.29	2 103 400
13. - Guanajuato	350	0.73	640	1.02	1 664 000
14. - México	500	0.04	600	0.95	1 560 000
15. - Durango	126	0.26	252	0.40	655 200
16. - Colima	180	0.37	242	0.38	629 200
17. - Campeche	288	0.60	147	0.23	382 200
18. - Yucatán	75	0.16	90	0.14	234 000
19. - Querétaro	50	0.10	75	0.12	195 000
20. - Sonora	40	0.08	40	0.06	104 000
21. - Quintana Roo	21	0.04	21	0.03	54 600
22. - Aguascalientes	10	0.02	12	0.02	31 200

NOTA: El precio promedio rural nacional calculado por CONAFRUT - fue de \$2,600.00 la tonelada.

FUENTES: Dirección General de Economía Agrícola de la Secretaría de Agricultura y Ganadería y Departamento de Estudios Económicos de la CONAFRUT.

PRODUCCION FRUTICOLA ESTATAL ESTIMADA PARA 1975

CACAHUATE

<u>Entidades</u>	<u>Superficie cosechada Ha.</u>	<u>Producción Ton.</u>	<u>Precio medio rural - Pesos/Ton.</u>	<u>Valor de la producción Pesos</u>
TOTALES:	61 640	68 935		243 349 800
1. - Morelos	11 895	14 528	3 500	50 848 000
2. - Chihuahua	4 865	8 757	4 000	35 028 000
3. - Puebla	7 400	8 208	4 000	32 832 000
4. - Nayarit	3 996	6 593	3 500	23 075 500
5. - Guerrero	5 150	6 275	3 000	18 825 000
6. - San Luis Potosí	3 650	3 690	4 000	14 760 000
7. - Chiapas	5 043	4 550	3 000	13 650 000
8. - Sinaloa	9 864	4 165	3 000	12 495 000
9. - Jalisco	1 800	2 700	3 300	8 910 000
10. - Guanajuato	1 500	2 400	3 200	7 680 000
11. - Oaxaca	2 139	2 227	3 000	6 681 000
12. - Zacatecas	1 500	1 290	3 500	4 515 000
13. - Campeche	854	1 025	3 800	3 895 000
14. - Michoacán	650	745	4 700	3 501 500
15. - Durango	207	493	4 100	2 021 300
16. - Colima	300	385	4 500	1 732 500
17. - México	500	515	3 000	1 545 000
18. - Tabasco	160	192	3 500	672 000
19. - Yucatán	106	127	3 200	406 400
20. - Querétaro	50	53	4 000	212 000
21. - Quintana Roo	11	17	3 800	64 600

NOTA: Precio medio rural nacional estimado por CONAFRUT \$3, 530. 00 ton.

FUENTES: Dirección General de Economía Agrícola de la S. A. G. y -- Departamento de Estudios Económicos de la CONAFRUT.

PRODUCCION FRUTICOLA ESTATAL ESTIMADA PARA 1976

CACAHUATE

<u>Entidad</u>	<u>Superficie Cosechada Ha.</u>	<u>Producción Ton.</u>	<u>Valor de la Producción Pesos</u>
TOTAL:	60 000	84 000	294 000 000
1. - Morelos	11 580	16 212	56 742 000
2. - Chihuahua	4 734	6 628	23 198 000
3. - Puebla	7 206	10 088	35 308 000
4. - Nayarit	3 894	5 444	19 054 000
5. - Guerrero	5 010	7 014	24 549 000
6. - San Luis Potosí	3 552	4 974	17 409 000
7. - Chiapas	4 908	6 871	24 048 500
8. - Sinaloa	9 600	13 440	47 040 000
9. - Jalisco	1 752	2 453	8 585 500
10. - Guanajuato	1 458	2 042	7 147 000
11. - Oaxaca	2 082	2 916	10 206 000
12. - Zacatecas	1 458	2 042	7 147 000
13. - Campeche	834	1 169	4 091 500
14. - Michoacán	630	882	3 087 000
15. - Durango	204	287	1 004 500
16. - Colima	294	413	1 445 500
17. - México	486	680	2 380 000
18. - Tabasco	156	218	763 000
19. - Yucatán	102	143	500 500
20. - Querétaro	48	67	234 500
21. - Quintana Roo	12	17	59 500

NOTA: Precio medio rural estimado por CONAFRUT \$3,500.00 tonelada.

FUENTE: Estimaciones del Departamento de Estudios Económicos de la CONAFRUT, en base a datos proporcionados por la Dirección General de Economía Agrícola de la S. A. G.

#### 4.2 Destino Geográfico de la Producción.

El 39.32% de la producción nacional de cacahuete en vaina se envía a los principales mercados de la República Mexicana, principalmente los que se encuentran localizados en las ciudades de México, D.F., Guadalajara, -- Puebla, Monterrey, León, Torreón y otros de menor importancia con la distribución que se puede observar en la siguiente tabla.

<u>Destino Geográfico</u>	<u>Volumen en Toneladas</u>	<u>Porcentaje</u>
Distrito Federal	9 726	35.53
Guadalajara, Jal.	4 582	16.74
Puebla, Pue.	2 631	9.61
Monterrey, N.L.	2 480	9.06
León, Gto.	1 919	7.00
Torreón, Coah.	1 478	5.40
Resto del País.	4 561	16.66

NOTA: Estos cálculos fueron realizados por el Depto. de Desarrollo Comercial Frutícola (para el año de 1972) de la Comisión Nacional de Fruticultura.

[ El 56.11% de la producción nacional se destina a la industria, principalmente para la producción de aceite de cacahuete. ]

[ El 4.5% se destina para la exportación, ] de la cual hablaremos mas -- adelante en la comercialización externa del cacahuete.

#### 4.3 Principales Canales de Comercialización.

Los canales de comercialización de mayor uso en la República Mexi-

cana son los siguientes:

1. - Acaparador Rural.

Es el canal más importante. Por lo general es un comerciante establecido en los principales centros de consumo, el cual absorbe la mayor -- parte de la producción, que a su vez vende el cacahuate en vaina a la industria.

2. - Comprador rural.

Es el que se encuentra en las zonas de producción del cacahuate y se abastece directamente del productor y que a su vez lo vende a la industria.

3. - Venta directa en los centros de consumo.

Algunos productores cuentan con bodegas en los mercados mas importantes, donde realizan las ventas de sus productos o lo entregan directamente a la industria ya que así obtienen mayores beneficios. También existen comerciantes que compran directamente al productor.

4.4 Comercialización externa.

Los principales países importadores de cacahuate son:

Estados Unidos	Surinam
Canadá	Guayana Británica
Panamá	Suiza
República Federal Alemana	Australia
Austria	Nueva Zelanda

Bélgica	Antillas Holandesas
Finlandia	Trinidad y Tobago
Francia	Chile
Reino Unido	Venezuela
Italia	Bélgica - Luxemburgo
Países Bajos.	

La exportación del cacahuate se efectúa en diversas formas como son:

- Cacahuate con cáscara limpio uniforme y clasificado.
- Cacahuate sin cáscara tostado.
- Cacahuate con cáscara no especificado.
- Cacahuate sin cáscara no especificado.

También se pueden exportar sus productos como son:

- Mantequilla de cacahuate.
- Aceite de cacahuate.

A continuación se presenta una tabla que especifica las exportaciones de cacahuate y sus productos en el período de 1970 a 1976.

<u>Año</u>	<u>Producto</u>	<u>Volumen exportado</u> Kg.	<u>Valor en pesos</u>
1970	Aceite de cacahuate .....	---	---
	Almendra sin cáscara .....	50	230
	Cacahuate sin cáscara tosta- do .....	406	6 449

<u>Año</u>	<u>Producto</u>	<u>Volumen exportado</u>	<u>Valor en pesos</u>
	Cacahuete con cáscara		
	entero .....	3 243 816	7 922 142
	Cacahuete con cáscara		
	no especificado .....	158 309	366 457
	Mantequilla de cacahuete	---	---
1972	Aceite de cacahuete ....	---	---
	Almendra sin cáscara ...	---	---
	Cacahuete sin cáscara -		
	tostado .....	4	20
	Cacahuete con cáscara -		
	entero .....	4 146 727	9 683 511
	Cacahuete con cáscara --		
	no especificado .....	331 059	761 270
	Mantequilla de cacahuete .	---	---
1973	Aceite de cacahuete .....	---	---
	Almendra sin cáscara ....	---	---
	Cacahuete sin cáscara --		
	tostado .....	---	---
	Cacahuete con cáscara --		
	entero .....	3 080 145	7 941 522
	Cacahuete con cáscara no		
	especificado .....	103 223	278 995
	Mantequilla de cacahuete ...	98	500

<u>Año</u>	<u>Producto</u>	<u>Volumen exportado</u>	<u>Valor en pesos</u>
1974	Aceite de cacahuate .....	---	---
	Almendra sin cáscara .....	---	---
	Cacahuate sin cáscara tosta- do .....	62	870
	Cacahuate con cáscara entero .	978 051	3 360 586
	Cacahuate con cáscar no espe- cificado .....	---	---
	Mantequilla de cacahuate .....	---	---
1975	Aceite de cacahuate .....	---	---
	Almendra sin cáscara .....	---	---
	Cacahuate sin cáscara tosta- do .....	30	1 075
	Cacahuate con cáscara entero .	1 655 503	4 476 370
	Cacahuate con cáscara no es- pecificado .....	40 607	103 558
	Mantequilla de cacahuate .....	---	---
1976	Aceite de cacahuate .....	---	---
	Almendra sin cáscara .....	---	---
	Cacahuate sin cáscara tostado .	---	---
	Cacahuate sin cáscara entero ..	2 152 501	7 537 592
	Mantequilla de cacahuate .....	---	---

En algunas ocasiones se ha importado cacahuete, pero en muy pequeñas cantidades que no vale la pena considerar. Además, la última importación se efectuó en 1972 y en los años posteriores no se han realizado importaciones de cacahuete de importancia.

CAPITULO V  
GENERALIDADES SOBRE LAS AFLATOXINAS

## CAPITULO V

### GENERALIDADES SOBRE LAS AFLATOXINAS.

#### 5.1 Historia sobre las aflatoxinas.

La primera noticia que se tuvo sobre las aflatoxinas, fué en 1960, -- cuando aproximadamente 100,000 pavos jóvenes murieron en Gran Bretaña - en el transcurso de unos cuantos meses. Después de varias investigaciones, se encontró que el origen del problema era la presencia de un factor común en los alimentos que contenían harina de cacahuete de origen brasileño.

Las investigaciones se intensificaron, dando por resultado conclusiones importantes. Asplin y Carnaghan en 1961 investigaron la toxicidad y síntomas en diversas aves, encontrándose que los patos eran los más susceptibles a desarrollar las lesiones hepáticas típicas en la sintomatología de este factor. Sargeant et. al., en el mismo año determinaron las bases para la rutina que debería seguirse para estudiar el factor tóxico, separándolo después de una serie de extracciones con disolventes y posteriores purificaciones por cromatografía, encontrando que el factor tóxico era una sustancia fluorescente. También en este año Austwick y Ayerst encontraron que en la harina contaminada con el factor tóxico, se encontraban residuos de hifas, por lo que se determinó el origen fúngico de la toxina; más tarde lograron identificar al hongo Aspergillus flavus, fué por esta razón que se le dió el nombre de AFLATOXINA al factor tóxico encontrado en la harina de cacahuete.

#### 5.2 Tipos de aflatoxinas.

A pesar de estos logros los investigadores siguieron su tarea hasta --

esclarecer la naturaleza química y biológica de este factor tóxico, encontrándose que no se trataba de un compuesto, sino de varios que tenían en conjunto la toxicidad señalada.

Varios investigadores llegaron por diversos métodos a las mismas conclusiones, así Nesbitt et. al., en 1962 por cromatografía en placa de alúmina seguida de cromatografía en papel, obtuvieron dos manchas fluorescentes, con Rf's muy cercanos, alrededor de 0.7 para la cromatografía en placa desarrollada con cloroformo-metanol y cercanos a 0.6 en la cromatografía en papel con n-butanol-ac. acético. Una de las manchas tenía fluorescencia azul-violácea bajo luz ultravioleta y la otra con un Rf un poco menor daba fluorescencia verde bajo las mismas condiciones. Debido a esta referencia, se les denominó a aflatoxina B (azul) y aflatoxina G (verde).

Con base en análisis elemental y determinaciones por espectrometría de masas, se le designó a la aflatoxina B la fórmula molecular  $C_{17}H_{12}O_6$  y a la aflatoxina G la fórmula  $C_{17}H_{12}O_7$ .

Más tarde con el uso de gel de sílice en las cromatografías y del ácido silícico en cromatografía en placa fina, Smith y McKernan en 1962, partiendo de extractos de cultivos de Aspergillus flavus, obtuvieron 12 compuestos fluorescentes, cinco de los cuales causaban lesiones en los patos cuando eran alimentados con material contaminado con estas sustancias. Dos de estas manchas presentaban fluorescencia azul-verde y las otras tres presentaban fluorescencia azul oscuro; se concluyó que la actividad hepatotóxica estaba relacionada con estas 5 sustancias fluorescentes.

Van der Zijden et. al., en 1962, después de purificar las toxinas por cromatografía en capa fina con sílica G (Merck), por columna cromatográfica con sílica G/celita y finalmente por columna de alúmina, encontraron que los cristales obtenidos después de recrystalizar con cloroformo-metanol aún contenían impurezas, pero se les denominó aflatoxina  $FB_1$ .

De Iongh et. al., en el mismo año y siguiendo el camino planteado -- por Van der Zijden, obtuvieron un concentrado de la toxina que trataron con cloroformo y reactivo de Girard T, logrando la descomposición de los derivados; este extracto se corrió en capa fina en dos dimensiones, encontrando por resultado un complicado patrón de fluorescencia. Dos de las manchas -- designadas como  $FB_1$  y  $FB_2$  contenían material tóxico para patos. La substancia denominada  $FB_1$  en forma cristalina, tenía fluorescencia azul-violácea asignándole la fórmula  $C_{17}H_{12}O_6$  en base a estudios por análisis elemental, espectrometría de masas y estudios de estructura. Se encontró la presencia de grupos  $OCH_3$  con espectros de resonancia magnética nuclear.

La caracterización de las cuatro aflatoxinas fué reportada por -- -- Hartley et. al. en 1963, cuando lograron separarlas por cromatografía en -- capa fina usando metanol-cloroformo como ~~disolvente~~ y se les designó como Aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ , y  $G_2$  en orden decreciente del valor de su Rf.

La llamada aflatoxina  $B_1$  era idéntica a la substancia denominada como  $FB_1$  que describieron Zijden e Iongh.

El material denominado como Aflatoxina B por Nesbitt era en realidad la aflatoxina  $B_1$  contaminada con aflatoxina  $B_2$ .

La aflatoxina G<sub>1</sub> era idéntica al material previamente descrito por Nesbitt et. al. como toxina G.

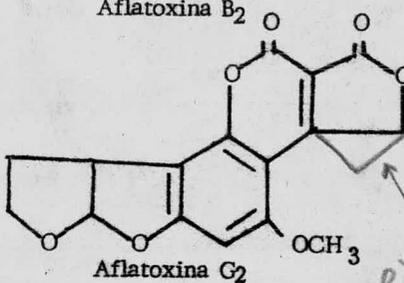
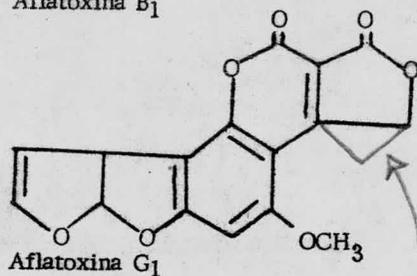
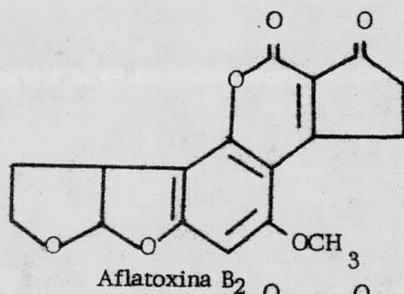
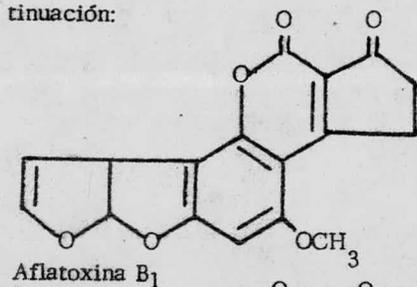
Las fórmulas moleculares determinadas fueron:

Aflatoxina B<sub>1</sub>            C<sub>17</sub> H<sub>12</sub> O<sub>6</sub>

Aflatoxina B<sub>2</sub>            C<sub>17</sub> H<sub>14</sub> O<sub>6</sub>

Las Aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> fueron establecidas como los derivados dihidro de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> respectivamente, por espectros de absorción infrarrojos y ultravioleta.

Buchi y colaboradores por interpretación del infrarrojo, ultravioleta, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, establecieron las fórmulas completas de las cuatro aflatoxinas, las cuales se muestran a continuación:



*error*

*error*

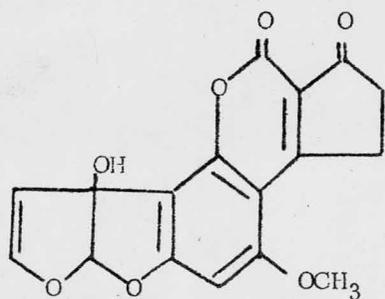
En experimentos en que se determinó si había o no agentes tóxicos - en la leche y tejidos de bovinos que consumían raciones contaminadas con -- aflatoxinas, Allcroft y Carnaghan, encontraron un factor tóxico que causaba daños similares a los causados por las aflatoxinas en patos.

De Iongh et. al, demostraron por cromatografía en ácido silísico, - que el factor tóxico de la leche tiene una flouescencia azul - violácea y que poseía un Rf mucho menor que el de la Aflatoxina B<sub>1</sub> presentaron además evi- dencia cromatográfica de que un extracto obtenido de un cultivo de Aspergi- llus flavus en cacahuete contenía un compuesto idéntico al factor tóxico de la leche.

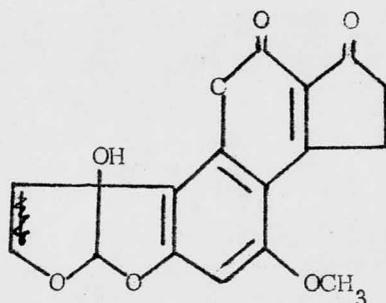
Allcroft et. al., en 1966, encontraron este mismo material en hígado, riñón y orina de ovejas, a las que se había administrado pequeñas dosis de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en mezcla, ya que los animales murieron 2 - horas mas tarde y en la leche también se encontró el material tóxico antes señalado, por lo que se le llamó aflatoxina M (milk).

Holzapfel et. al. en este mismo año y repitiendo los experimentos - de Allcroft, extrajeron la aflatoxina M de la orina de ovejas y la corrieron en papel cromatográfico en dos dimensiones, encontraron 2 manchas fluores- centes: una daba fluoreescencia azul-violeta a la cual se llamó aflatoxinas M<sub>1</sub> y la otra una fluoreescencia violeta y Rf menor, por lo que se llamó aflatoxi- na M<sub>2</sub>. Es importante hacer notar que las aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> se lograron separar por cromatografía en papel, no por cromatografía en capa fina y las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se separaron por cromatografía en capa fina, no por cromatografía en papel.

Holzafel et. al, estudiaron, las aflatoxinas  $M_1$  y  $M_2$  por infrarrojo, ultravioleta, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas y -- después de confirmar con reacciones químicas adecuadas obtuvieron las fórmulas desarrolladas de las  $M_1$  y  $M_2$  (las cuales se dan a continuación) concluyendo que eran los derivados 4-hidroxi de las aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  respectivamente.



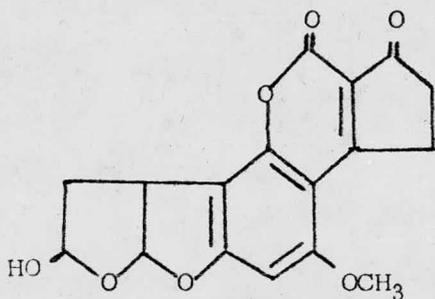
Aflatoxina  $M_1$



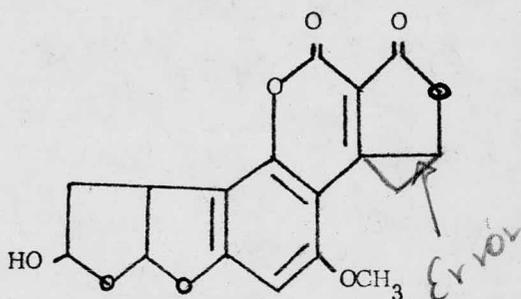
Aflatoxina  $M_2$

Dutton y Heathcote en 1966, reportaron dos nuevas aflatoxinas, una con fluorescencia azul y otra con fluorescencia verde. Estas dos nuevas -- aflatoxinas, fueron estudiadas por los métodos ya mencionados de infrarrojo, ultravioleta, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y reacciones seleccionadas, encontrando que las nuevas aflatoxinas eran los derivados 2-hidroxi de las aflatoxinas  $B_2$  y  $G_2$  por lo que se les denominó --

aflatoxinas B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub> respectivamente, cuyas fórmulas se presentan a continuación.



Aflatoxina B<sub>2a</sub>

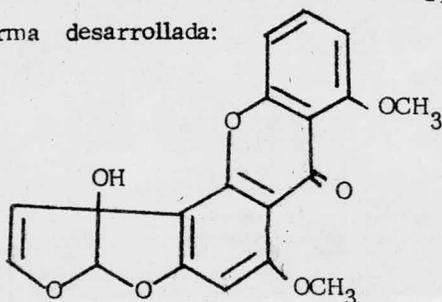


Aflatoxina G<sub>2a</sub>

También se determinó que su dosis letal era mucho mayor que la de las demás aflatoxinas (1200 g para B<sub>2a</sub> y 1600 g para G<sub>2a</sub> en patos, que equivale de 60 a 100 veces la dosis de la Aflatoxina B<sub>1</sub>), además no causaba daños

en el crecimiento, ni afectaba a los pájaros como las otras aflatoxinas, - por lo que según Goldblatt no es apropiado llamarlas flatoxinas, pero existe la posibilidad que las Aflatoxinas B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub> puedan tener mayor toxicidad que las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> por dihidratación lo cual aun está en estudio.

Rodricks et. al. en 1968 reportaron una nueva toxina, que se cree fue la quinta reportada por Smith y McKernan en 1962, a la cual se le dió el nombre de aspertoxina, cuya fórmula C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub> se da a continuación - en forma desarrollada:



Aspertoxina

También fue reportada por Weiss et. al., en 1968 al ser obtenida de cultivos de Aspergillus Flavus, que causaba también daños a los patos similares a los ocasionados por las aflatoxinas.

Como puede observarse, el estudio de las aflatoxinas ha presentado grandes problemas, ya que fueron necesarios 8 años para poder determinar los componentes tóxicos que produce el hongo Aspergillus flavus. Hasta la fecha se han encontrado 9 componentes, que se cree son todos, los cuales como ya se mencionó son:

- Aflatoxina B<sub>1</sub>
- Aflatoxina B<sub>2</sub>
- Aflatoxina G<sub>1</sub>
- Aflatoxina G<sub>2</sub>
- Aflatoxina B<sub>2a</sub>
- Aflatoxina G<sub>2a</sub>
- Aflatoxina M<sub>1</sub>
- Aflatoxina M<sub>2</sub>

Los cuales causan daños similares en patos, pavos, bovinos y otros animales de laboratorio, presentan gran toxicidad y dosis letales pequeñas, son separables por cromatografía y presentan fluorescencia. Estos y otros caracteres más de las aflatoxinas serán señalados mas adelante por lo que trataremos enseguida su origen y condiciones en que se producen.

### 5.3 El Grupo Aspergillus flavus.

El grupo Aspergillus flavus se encuentra constituyendo la microflora del aire y tierra; se han encontrado también viviendo sobre plantas vivas o muertas y en animales.

Es uno de los hongos que atacan a los vegetales durante su almacenamiento; no parece tener selectividad por algún vegetal, aunque se ha encontrado frecuentemente invadiendo oleaginosas y gramíneas.

Se han efectuado numerosos estudios acerca de este grupo y su relación con la producción de aflatoxinas en diferentes sustratos naturales encontrándose datos muy importantes.

Chute y Barden en 1965 examinaron la incidencia de Aspergillus flavus en varias granjas de los Estados Unidos, encontrando que era de un 64.3% con respecto al total de hongos encontrados. Otros autores que investigaron la incidencia del Aspergillus flavus en diversos medios (aire, cereales, granos deteriorados, etc.) encontraron que la cantidad de Aspergillus flavus siempre es muy elevada, mayor al 35% del total de hongos encontrados.

Con el desarrollo de los métodos de determinación de aflatoxinas, Allcroft en 1963 estudió las pastas para ganado en 13 países, encontrando en todos los casos la presencia de Aspergillus flavus; las aflatoxinas las encontró en cacahuates en vaina, pastas de cacahuete (en los Estados Unidos principalmente).

De acuerdo con Borker et al. en 1966, las aflatoxinas son un contaminante natural en numerosos productos agrícolas y hay grandes posibilidades de que continúen encontrándose en alimentos, pasturas y pastas para ganado, siempre que las condiciones sean de temperatura templada y de gran humedad (condiciones malas de almacenamiento en general) y errores humanos o ignorancia unida a condiciones favorables para el crecimiento del hongo.

Por varios años el nombre Aspergillus flavus abarcaba un conjunto de especies del grupo A. flavus que fue descrito por Raper y Fennell en 1965, incluyendo en él los siguientes hongos:

Aspergillus parasiticus

Aspergillus tamarii

Aspergillus oryzae

Aspergillus flavus var. columnaris

Aspergillus parasiticus var. globosus

Aspergillus flavus

Este grupo de especies son las productoras de aflatoxinas en sustratos naturales, entendiéndose por sustratos naturales granos y semillas en estado natural o productos de un procesado elemental y otros alimentos o pasturas de origen biológico.

Los estudios siguieron avanzando y Hesseltine et al. estudiaron las 132 especies que forman el grupo Aspergillus flavus, con diferentes sustratos y condiciones, encontrando que la mayoría (excepto dos especies) producen aflatoxinas.

Este grupo no es el único que produce aflatoxinas, por ésto diversos investigadores se dedicaron a encontrar cuales eran todas las especies que producían aflatoxinas, la cantidad de aflatoxinas producida y el tipo de aflatoxinas que se producía, encontrándose que algunos hongos producían aflatoxinas en cantidades no detectables por las técnicas normales, mientras otras especies producían cantidades apreciables. Como es imposible hacer una lista que contenga todas las especies, se hablará sólo de las especies que producían aflatoxinas en mayor cantidad y que se encontraron más frecuentemente en los alimentos examinados, dándose también el tipo de aflatoxinas que produce y el investigador que lo reportó y estudió.

Tabla de Productores Naturales de Aflatoxinas

<u>Hongo</u>	<u>Investigadores</u>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
<u>Grupo Aspergillus flavus</u>					
<u>A. flavus</u>	Sargeant et al.	X	X	X	X
<u>A. flavus var. columnaris</u>	Van Walbeek et al		X		
<u>A. oryzae</u>	Basappa et. al.	X	X		
<u>A. parasiticus</u>	Codner et al	X	X	X	X
<u>A. parasiticus var globosus</u>	Murakami et al	X	X	X	X
Otras especies de					
<u>Aspergillus y Penicillium</u>					
<u>A. niger</u>	Kulik y Holaday	X			
<u>A. wentii</u>	Kulik y Holaday	X			
<u>A. ruber</u>	Kulik y Holaday	X			
<u>A. ostianus</u>	Scott et al.	X		X	
<u>A. ochraceus</u>	Van Walbeek et al	X			
<u>Penicillium puberulum</u>	Hodges et al.	X		X	
	Kulik y Holaday	X	X	X	X
<u>P. variable</u>	Kulik y Holaday	X			
<u>P. frequentans</u>	Kulik y Holaday	X			
<u>P. citrinum</u>	Kulik y Holaday	X			
<u>Rhizopus sp.</u>	Van Walbeek et al.	X		X	

No debe olvidarse que en esta tabla sólo están los más importantes.

El grupo Aspergillus flavus produce también otros metabolitos tóxicos y se sabe que Aspergillus parasiticus es el que produce aflatoxinas -

en mayor cantidad.

De ahora en adelante nos referiremos a los hongos productores del grupo Aspergillus flavus, como A. flavus simplemente con excepciones que se aclararán debidamente.

Algunos científicos investigaron en que productos agrícolas naturales se encontraban los hongos productores de aflatoxinas, encontrándose una larga lista de sustratos naturales que presentaban la incidencia de Aspergillus flavus y la consecuente contaminación con aflatoxinas. Para ejemplificar ésto se presenta una lista con los productos encontrados contaminados, el investigador que lo reportó y el año en que se efectuó el estudio:

Tabla de Productos contaminados con A. flavus

<u>Sustrato</u>	<u>Investigador</u>	<u>Año</u>
Aceites vegetales	Wallbrigde et al	1963
Ajonjolif	Wogan et al	1968
Arroz	Berker et al	1966
Avellanas	Wallbrigde et al	1963
Ávena	Sthotwell et al	1968
Cacahuate	Norton et al	1957
Café verde	Sthotwell et al	1968
Cazabé (harina de yuca)	Berker et al	1966
Cebada	Wogan et al	1968
Centeno	Sthotwell et al	1968
Cocoa	Wallbrigde et al	1963
Copra	Wallbrigde et al	1963

<u>Sustrato</u>	<u>Investigador</u>	<u>Año</u>
Dátiles	Wallbrigde et al	1963
Espagueti seco	Walbeek et al	1967
Guisantes	Borker et al	1966
Harinas de leguminosas	Duner y Davis	1966
Harina de raíz de yuca	Duner y Davis	1966
Katsoubishi (pescado preparado seco japonés)	Kulik y Holaday	1967
Maíz	Korker et al	1966
Mantequilla de Cacahuete	Salmon y Newberne	1963
Mijo	Wogan et al	1968
Nuez de Brasil	Walbeek et al	1967
Nuez de Castilla	Walbeek et al	1967
Nuez de la India	Walbeek et al	1967
Patatas	Hogges et al	1964
Pastas de algodón	Jackson et al	1963
Pastas de cacahuete	Salmon y Newberne	1963
Pasturas	Wogan et al	1968
Piñón	Wallbrigde et al	1967
Pistache	Wallbrigde et al	1967
Salvado	Wolf y Jackson	1963
Semilla de algodón	Wolf y Jackson	1963
Sorgo	Wogan et al	1968
Soya	Borker et al	1966
Trigo	Borker et al	1966

Debe quedar claro que hay otros sustratos, pero los mencionados son los que presentan en forma espontánea la contaminación.

#### 5.4 Características taxonómicas del grupo Aspergillus flavus.

El grupo Aspergillus flavus, se encuentra clasificado en la siguiente forma:

Phylum	Eumycetes u Hongos verdaderos.
Clase	Deuteromicetos (Ascomicetos).*
Orden	Moniliales.
Familia	Moniliaceae
Genero	Aspergillus Existen 14 grupos de Aspergillus según Raper y Fennell.

\* Algunos autores clasifican a unas especies de Aspergillus dentro de los Ascomicetos.

Las características distintivas de aspergillus son:

- Mohos septados.
- No poseen esporas sexuales.
- Conidióforos libres que surgen del micelio irregularmente.
- Micelio claro o sin coloración o coloreado débil o fuertemente.
- Son muy abundantes.
- Son responsables de ciertas alteraciones alimenticias.
- Útiles en la preparación de alimentos.
- Existen 14 grupos según Raper y Fennell.

- ✓ - Hay 132 especies.
- ✓ - Micelio ramificado, sin colorear generalmente.
- ✓ - Las hifas aéreas son fértiles.
- ✓ - Las hifas sumergidas son vegetativas.
- ✓ - Colonias a menudo circulares.
- ✓ - El conidióforo o pedículo puede ser septado o no y surge de la célula basal.
- ✓ - El conidióforo en la porción distal se hincha formando una vesícula que sirve de soporte a los esterigmas de los que se desprenden los conidios.
- ✓ - Conidios generalmente en cadenas, de color verde, marrón o negro.
- ✓ - Crecen bien a temperaturas de 37°C o superiores.

✓ Algunas de las características distintivas del grupo Aspergillus flavus, son las siguientes:

- ✓ - El esterigma es típicamente biseriado.
- ✓ - Conidios altamente ramificados.
- ✓ - Conidióforos con paredes fuertes.
- ✓ - Conidióforos muy ásperos y rugosos.
- ✓ - Presencia de esclerocia

Se aclara que estas características no son todas las necesarias para clasificar el hongo, pero sí las más importantes o al menos las más usadas, ya que son las que usan los investigadores de referencia.

#### 5.5 Factores que Influyen en la Producción de aflatoxinas en Sustrato

tos Naturales.

Son varios los factores que influyen en la producción de aflatoxinas, los cuales se enumerarán a continuación.

a) HONGO:

Como ya se mencionó dependiendo de la especie de hongo que esté produciendo las aflatoxinas, variarán la cantidad y tipo de toxinas producidas, lo cual se ejemplificó con la tabla que se incluye mas adelante.

Sin embargo, la especie de hongo y el tipo de sustrato siempre van unidos, pues regularmente al cambiar o alterar uno de ellos produce trastornos en el otro factor y en consecuencia en la producción de toxinas. Debido a ésto algunos investigadores determinaron la producción de aflatoxinas en sustratos naturales y artificiales, observando el número de especies que producían aflatoxinas, encontrándose que de 1390 hongos estudiados en diferentes sustratos, 803 producían aflatoxinas, lo que corresponde a un 58.12% del total de hongos estudiados.

Producción de aflatoxinas por diversos hongos.

Investigador	Sustrato	Total	Productores de Aflatoxinas
Austwick y Ayerst	Medio nutritivo	59	11
Codner et al	Cacahuates	6	6
Armbrecht et al	Granos y Medios nutritivos.	10	7
Wallbrigde	Medio nutritivo	43	32

Investigador	Sustrato	Total	Productores de Aflatoxinas
Sreenivasamurthy et al	Cacahuete	150	4
Vogel et al.	Medio nutritivo	50	20
Scott	Maíz	10	6
Borut y joffe	Cacahuete	330	235
Rao et al	Cacahuete	29	6
Parrish et al	Medio nutritivo.	108	30
Boller y Schroeder	Cacahuates y Arroz	284	268
Diener y Davis	Cacahuates y Medio nutritivo.	44	35
Hesseltine et al.	Medio nutritivo.	53	0
Taber y Schroeder	Cacahuete y Arroz	<u>213</u>	<u>107</u>
		1390	803

También ya se mencionó que cada especie de hongo produce diferente tipo o tipos de aflatoxinas, sabiéndose que la mayoría produce mezclas de las aflatoxinas B y G, otro grupo produce exclusivamente del tipo B y los menos producen aflatoxina tipo G.

#### b) SUSTRATO.

Después de una serie de estudios comparativos entre medios artificiales y medios naturales, se concluyó que es preferible usar sustratos naturales para la producción de aflatoxinas, que dan mayores rendimientos que los sustratos artificiales. También se encontró que presentan menos sustancias que interfieran en la extracción y purificación de las aflatoxinas.

Para utilizar los sustratos naturales en la producción de aflatoxinas es necesario;

- Homogenizarlos.
- Esterilizarlos.
- Inocularlos.
- Incubarlos a 25 - 30°C; 5 a 14 días.

Mas tarde se efectuaron varias investigaciones con los mejores productores de aflatoxinas en diferentes sustratos naturales, para determinar cuales sustratos eran los que soportaban una mayor producción de aflatoxinas. En 1966 Mayne et al., encontraron que las avellanas y las semillas de algodón maduras tenían una producción igual a la del trigo y aproximadamente el doble que el cacahuate, asimismo, se encontró que el trigo, el arroz y el maíz, con o sin adición de metionina, producían mayor cantidad de aflatoxinas que el sorgo, cacahuate, soya, avena y vainilla como se ilustra en la tabla (de sustratos y cantidades de aflatoxinas producidas) que se presenta adelante.

Shroeder y Hein encontraron que el efecto de la concentración del sustrato sobre la producción de toxina, está en relación inversa (al aumentar el sustrato, disminuye la cantidad de toxina) al contrario de lo que sucede con la temperatura, que lleva una relación directa (al aumentar la temperatura aumenta la cantidad de toxina). Ellos postulan que este efecto se debe a la proporción de material nutritivo presente en el endospermo.

También se descubrió que algunas frutas pueden ser utilizadas como -

79

sustratos para la producción de aflatoxinas, como es el caso de la manzana uva, moras, piña, jugo de tomate, chabacano y jugos de frutas mezcladas. Estos sustratos soportaban producciones de aflatoxinas de 12 a 44  $\mu\text{g/g}$ .

Likewise estudió la carne de res como sustrato en infusiones y en -  
contró producciones que variaban entre 11 y 34  $\mu\text{g/g}$ . Según este investi-  
gador, la baja producción de aflatoxina, se debía a la falta de nitrógeno y/o  
minerales.

El grupo Aspergillus flavus puede producir aflatoxinas en muchos ali-  
mentos que incluyen huevos, queso, leche condensada, leche en polvo, nue-  
ces, cáscaras de nuez, cocos, jugo de manzana, productos ahumados (como -  
el tocino,) frijoles, lentejas, duraznos, semillas de amapola, pimentón, al-  
falfa, etc.

Los datos indican que los sustratos con alto contenido de carbohidra-  
tos (trigo, arroz, etc.) soportan mayores cantidades de aflatoxinas que las  
oleaginosas y es probable que los aceites en grandes cantidades no sean me-  
tabolizados por el grupo Aspergillus flavus, según Goldblatt.

Siempre se encuentran diferencias en la producción de aflatoxinas -  
sobre el mismo sustrato, ésto se atribuye a varios factores como la clase  
de hongo, temperatura, humedad, grado de homogenización del sustrato,  
aereación, periodo de incubación y método de análisis de las aflatoxinas.

c) Humedad relativa y cantidad de agua libre.

Como ya se sabe, el factor mas importante en el crecimiento y la -



QUIM 02

Investigador	Sustrato	Especie	Cantidad de aflatoxinas $\mu\text{g/g}$
-----	-----	-----	-----
Codner et al.	Cacahuate	<u>A. parasiticus</u> 15957	894
Vogel et al.	Cacahuate triturado	<u>A. flavus</u> - NRRL 3000	1 000
Shorwell et al.	Arroz pulido	<u>A. flavus</u> - NRRL 2999	
Cucullu et al	Germen de cacahuate	<u>A. flavus</u>	4 000
Schroeder	Cacahuates españoles	<u>A. parasiticus</u> 64 - R8	650
	Arroz	<u>A. parasiticus</u> 64 - R8	580
Boller y Schroeder	Cacahuates Spanish	<u>A. flavus</u> F 262	894
	Arroz	<u>A. flavus</u> F 262	1 237
Nartey	Cazabe (harina de Yuca)	<u>A. flavus</u> , Austwick	104.5
Diener y Davis	Trigo triturado	<u>A. parasiticus</u> Ala - 6	151
	Cacahuate	<u>A. parasiticus</u> Ala - 6	364
Hesseltine et al.	Sorgo + Metionina	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	339
	Soya + Metionina	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	417
	Cacahuate	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	488
	Mafz + Metionina	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	732
	Trigo + Metionina	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	1 699
	Arroz + Metionina	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	591

Investigador	Sustrato	Especie	Cantidad de aflatoxinas $\mu\text{g/g}$	18
-----	-----	-----	-----	
Stubblefield et al.	Trigo mondado	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	1 628	
	Avena	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	913	
	Trigo	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	1 963	
Schroeder y Hein	Cacahuete	<u>A. flavus</u> # 10	680	
	Arroz	<u>A. flavus</u> # 191	1 100	
	Semilla de algod3n	<u>A. flavus</u> # 191	1 100	
Wildman et al.	Trigo triturado	<u>A. flavus</u> NRRL A - 13 794	2 250	
Eldridge	Soya	<u>A. parasiticus</u> Ala - 6	376	
Hesseltine et al.	Ostras.	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	105	
	Trebol dulce	<u>A. flavus</u> - NRRL 3145	30	
Taber y Schroeder	Cacahuete Spanish	<u>A. flavus</u> - oryzae grupo	363	
	Arroz	<u>A. flavus</u> - oryzae grupo	286	

Y producción de aflatoxinas por el grupo Aspergillus flavus son la humedad relativa del medio y el contenido de agua de el sustrato. Las cantidades límite (mínimo y máximo) y la cantidad óptima, tienen valores similares para cada especie de hongo en sustratos naturales vivos o muertos, o procesados, siempre y cuando la cantidad de agua sea medida en términos de equilibrio higrométrico.

El contenido de agua almacenada en semillas y otros sustratos naturales ha sido medido estableciendo la cantidad de agua del sustrato en equilibrio con 70% de HR, lo cual es muy poco para que el hongo pueda desarrollarse.

El grupo Aspergillus flavus está constituido por hongos mesófilos, ya que sus requerimientos mínimos de agua para crecer están entre 80% y 90% de la presión de vapor relativa o HR.

La cantidad mínima de agua que se requiere para la germinación de las esporas de los hongos Aspergillus flavus es de 80% de HR, mientras que el valor mínimo para esporulación es de 85% de HR. Estos datos indican que el crecimiento del hongo Aspergillus flavus se puede efectuar con bastante margen a condiciones ambientales que la esporulación.

Los mohos presentan variaciones en sus requerimientos mínimos de agua de acuerdo con las variaciones de temperatura; también se sabe que cuando están a temperatura óptima sus límites son mas amplios, mientras que a temperaturas cercanas a los límites, tanto inferior como superior, sus límites son mas estrechos, como es lógico.

Otro factor que afecta los requerimientos de agua en el crecimiento del hongo es la presencia o ausencia de nutrientes.

Desde que se presentó el problema de las aflatoxinas y éste fue asociado con los cacahuates, se han efectuado varios estudios sobre ellos, así Karon y Hellery determinaron el equilibrio higroscópico para los cacahuates variedad Spanish a 25°C sobre varias soluciones salinas saturadas, encontrándolo dentro del rango de 11.1% a 92.5% de HR.

Cuando la deshidratación de los granos de cacahuete no se efectúa con suficiente rapidez y tarda más de 4 ó 5 días, hay probabilidades de que antes de almacenarlos ocurra la invasión fúngica.

Un retardo en el secado por lluvias, humedad en el ambiente o aumento del contenido de agua antes de almacenarlo o después de hacerlo, generalmente provoca el desarrollo de mohos y la consecuente formación de toxinas. Esto puede solucionarse con un secado artificial.

Existen otros problemas que contribuyen a una invasión fúngica después o dentro del almacén, como son la absorción de humedad del ambiente por el grano, rehumidificación en el mondado del cacahuete, variaciones en el contenido de agua en el triturado, etc.

A una humedad relativa de  $85\% \pm 1\%$  de HR a 30°C por 2 días, se tienen las condiciones límite para la producción de aflatoxinas en cantidades letales en granos maduros (intactos o dañados). En granos vivos los datos son similares en cuanto a humedad relativa.

Dickens y Pattee encontraron que se necesitan dos días para que se desarrollen las aflatoxinas en muestras con un contenido de humedad entre el 15% y 30% a 32°C, y 4 días para muestras con un contenido de agua entre el 20% y 31% a 21°C en cacahuates frescos.

Poco o nada de aflatoxinas se producen cuando los cacahuates cosechados se secan a 15% de contenido de agua a 90°C y 15% de HR. La mayoría de los granos presentan contaminación con aflatoxinas cuando se secan a 90°C y 85% de HR en cantidades que varían entre 6 a 960  $\mu\text{g/g}$  en granos inmaduros rotos y granos maduros después de 84 días de incubación.

No se presenta producción de aflatoxinas bajo ninguna condición a humedades relativas menores a 83% y bajo la producción a 87% de HR. La cantidad de aflatoxinas máxima se presenta a las 2 o 3 semanas de incubación.

#### d) Temperatura y tiempo.

El grupo Aspergillus flavus está clasificado como un hongo mesófilo - cuyos rangos de crecimiento son:

6° a 8°C como temperatura mínima de crecimiento.

36° a 38°C como temperatura óptima de crecimiento.

44° a 46°C como temperatura máxima de crecimiento.

Las temperaturas máxima y mínima, se ven influenciadas por el contenido de agua libre, la concentración de oxígeno, la cantidad de nutrientes y otros factores.

Christensén encontró que la temperatura máxima de crecimiento en sustratos naturales, para el grupo Aspergillus flavus, es más alta que en sustratos artificiales.

Para la producción de aflatoxinas el tiempo y la temperatura óptimos en cacahuates esterilizados y en frascos de cultivo son:

Temperatura óptima	25°C
Tiempo óptimo	7 a 9 días

A 20°C la máxima cantidad de aflatoxinas se produce entre los 11 y 13 días según Diener y Davis.

En cambio para Aspergillus parasiticus, la máxima cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub> se produce entre 30°C y 35°C, para la Aflatoxina G<sub>1</sub> se necesitan entre 25°C ó 30°C en períodos de incubación de 7 a 15 días.

Diener y Davis reportaron que el límite mas bajo de temperatura para la producción de aflatoxinas por A. flavus, era de 20° ± 1°C por 21 días de incubación y a 98% ± 1% de HR; el límite mas alto es de 41.5°C ± 1.5°C.

Burrel et al encontraron que una temperatura constante de 45°C inhibe el crecimiento de A. flavus en cacahuete, y exponiéndolo de 2 a 4 h. a 50°C cesa su crecimiento en el lapso de 24 horas.

El tiempo mínimo encontrado para la producción de aflatoxinas fue de 2.5 días después de la inoculación a 32°C y con 15% a 30% de humedad en el sustrato.

El tiempo máximo para el crecimiento y producción de aflatoxinas - en cacahuates maduros, dañados o intactos, fue de 84 días a  $13^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y a 99% de HR. El tiempo mínimo fue de 21 días a  $40.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  a 99% de HR.

La cantidad de aflatoxinas  $B_1$  y  $G_1$  producidas por especies de Aspergillus flavus, en sustratos naturales y sintéticos se ve afectada por varios factores. Wallbrigde reportó que la proporción de las diferentes aflatoxinas - puede variar debido a los cambios de composición del medio. Davis et al, encontraron que bajas concentraciones de ~~sacarosa~~ bajaban la producción de -  $B_1$  y subían la de  $G_1$ . Pero el factor mas importante para que varíe la relación entre la aflatoxina  $B_1$  y la aflatoxina  $G_1$  producidas por especies del grupo Aspergillus flavus, parece ser la temperatura. La temperatura óptima para la producción de aflatoxinas  $B_1$  es a  $24^{\circ}\text{C}$  y sólo se producen pequeñas cantidades a  $18^{\circ}\text{C}$  y a  $30^{\circ}\text{C}$ . En cambio la temperatura óptima para la producción de aflatoxinas  $G_1$  es a  $30^{\circ}\text{C}$  con una producción muy baja a  $24^{\circ}\text{C}$ , a  $36^{\circ}\text{C}$  y a  $42^{\circ}$ .

Sorensen et al encontraron que a temperaturas bajas se producían cantidades iguales de aflatoxinas  $B_1$  y  $G_1$  en arroz, cacahuete, trigo y semilla - de algodón; ésto ocurría dentro del rango de  $15^{\circ}\text{C}$  a  $18^{\circ}\text{C}$ .

e) Madurez del Grano.

Mc Donald y Harkness demostraron que en granos y vainas de cacahuete con aproximadamente 1 año de vida, la invasión por Aspergillus flavus se - lleva a cabo más rápidamente que en frutos frescos o inmaduros.

f) Daños en los granos.

La tesis que señala que los granos de cacahuete u otros productos in tactos, rara vez son invadidos por A. flavus u otros hongos después de la cosecha, es ampliamente aceptada. Ashworth y Langley encontraron que me nos del 1% de los granos se dañan cuando las vainas se encuentran intactas.

Mc Donald y Harkness reportaron que existe una rápida invasión fún- gica cuando existe daño físico o biológico en el fruto. También se indicó -- que cuando las vainas están abiertas la invasión por mohos es mayor. Este daño se asocia principalmente con las termitas y otros insectos que atacan a los frutos en el almacén y en otros casos se habla de hongos como Rhizoc- tia solani y Sclerotium rolfsii, que abren el camino de entrada para A. fla- vus.

Se ha observado que el mondado de los cacahuates provoca daños en - la película del grano, especialmente después del secado, incrementando las posibilidades de la invasión fúngica. La vaina, cuando se conserva intacta, es una barrera natural contra la invasión por mohos y sirve de protección - a la película y al grano.

g) Conce ntraciones de oxígeno y bióxido de carbono.

El crecimiento del hongo en el almacén en sustratos naturales no sólo depende de que las cantidades de humedad relativa y temperatura sean adecua das o favorables, también influyen las condiciones de los alrededores del sus- trato, pues se sabe que los hongos del grupo Aspergillus flavus son altamente

aeróbicos y la cantidad mínima de oxígeno que requieren para que sus esporas germinen, para el crecimiento vegetativo y para la esporulación, puede ser muy variable.

Likewise encontró que el hongo A. flavus es muy flexible en cuanto a su tolerancia a altas concentraciones de bióxido de carbono, oxígeno y nitrógeno. Sobre el crecimiento, esporulación y formación de aflatoxinas por A. flavus en dos semanas a 30°C y 99% de HR se observó lo siguiente:

i) Concentración de 0.03% a 20% de CO<sub>2</sub>.

No se reducía el crecimiento ni la esporulación del hongo, pero las aflatoxinas bajaban en un 75% su producción.

ii) Concentración de 20% a 100% de CO<sub>2</sub>.

La producción de aflatoxinas, el crecimiento y la esporulación del hongo disminuían en forma lineal por cada 20% de CO<sub>2</sub> que aumentaba, hasta llegar a el 100% de CO<sub>2</sub>.

iii) Concentración de 100% de CO<sub>2</sub>.

No hay producción de aflatoxinas o crecimiento del Hongo.

iv) Concentraciones de 5% a 1% de O<sub>2</sub>.

No se presentaba disminución en la producción de aflatoxinas o en el crecimiento de A. flavus con una concentración de .20% a 80% de CO<sub>2</sub>.

Las aflatoxinas se producen en bajas cantidades en cacahuates almace

nados por 6 semanas a 15°C y bajo 40% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>.

Sander et al. encontraron que la producción de aflatoxinas era inhibida cuando se exponía por dos semanas a una atmósfera de 20% de CO<sub>2</sub> a 17°C y de 86% a 92% de HR; ésto no ocurre si la humedad relativa es superior a 99% y la temperatura es mayor de 25° C.

Likewise encontró que la producción de aflatoxinas se inhibía cuando se exponía a 60% de CO<sub>2</sub> a 25°C y una humedad relativa entre 86% y 92%, y con 40% de CO<sub>2</sub> a 86% de HR pero no mayor y la temperatura no debía superar los 30°C.

El efecto inhibitor de las bajas concentraciones de oxígeno en el crecimiento de A. flavus se reportó por Miller y Galding, es proporcional a la solubilidad del oxígeno en el micelio y en el medio.

Landers et al encontraron que a 1% de O<sub>2</sub>, 99% de N<sub>2</sub> y a 1% de O<sub>2</sub>, 79% de N<sub>2</sub> y 20% de CO<sub>2</sub>, seguían produciéndose aflatoxinas, pero su crecimiento era completamente inhibido a 1% de O<sub>2</sub>, 19% de N<sub>2</sub> y 80% de CO<sub>2</sub>.

De todos los datos anteriores se deduce que A. flavus tolera altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y bajas concentraciones de O<sub>2</sub>, tan bien como cualquier hongo de almacén.

Una aereación adecuada aumenta considerablemente la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub>, tal como lo demostró Hesseltine con sustratos de maíz, cacahuete, arroz, sorgo, soya y trigo.

#### h) Interacciones con otros microorganismos.

Aspergillus flavus frecuentemente se encuentra asociado con numerosos microorganismos en los granos y semillas almacenadas, por lo que la posibilidad de que estos microorganismos compitan con A. flavus por el sustrato siempre está presente, sobre todo si se encuentran en condiciones ambientales favorables, lo cual puede restringir o reducir la cantidad de aflatoxinas formadas.

✓ A. flavus o los hongos competidores pueden absorber o degradar las aflatoxinas, lo que también limitaría la cantidad presente en el sustrato. Schroeder y Ashworth determinaron que la competencia entre los diferentes microorganismos y la descomposición de sus toxinas por otros, son dos de las causas que provocan la presencia de pequeñas cantidades de aflatoxinas, no en grandes cantidades como en los cultivos puros.

Más tarde Ashworth et al demostraron que varios hongos podían abastir la cantidad de aflatoxinas en cacahuates o medios líquidos que las contengan; también demostraron que algunos hongos como A. niger y Rhizoctonia solani limitan el desarrollo de A. flavus y la producción de Aflatoxinas. Wildman observó que Penicillium sp. reduce la producción de aflatoxinas cuando crece en competencia con A. flavus, aunque aun no se determina si es por la competencia del sustrato o porque destruye las aflatoxinas.

También existen microorganismos que son inhibidos por las aflatoxinas como es el caso de Bacillus Clostridium y Streptomyces por cantidades de 30 g/ml de aflatoxinas crudas (36% de pureza) en el sustrato. La aflatoxina B<sub>1</sub> inhibe el crecimiento de algunos A. flavus como A. awamori, Penicillium crysogenum y P. duclauxi.

Ari et al encontraron que la aflatoxina B<sub>1</sub> y las aflatoxinas crudas - inactivan comunmente a las bacterias gram positivas o a las gram negativas.

Diener y Davis, Hesseltine y Schroeder, han encontrado una reducción en la producción de aflatoxinas después de que se llega a un máximo - de producción, aunque se le agregan mas carbohidratos después de este máxi - mo, de lo que deduce que no se debe a falta de sustrato. Encontraron que la degradación de las aflatoxinas se relacionaba con una lisis del micelio y ésto se debia a mucha agitación o excesiva aereación. Esto se puede prevenir, - efectuando la fermentación a bajas temperaturas y/o escasa agitación. Ellos concluyeron que el porcentaje de degradación de la toxina es independiente de la concentración de aflatoxinas en el sustrato y no era degradada por acción enzimática específica.

Se encontró mas tarde que el hongo A. flavus degrada la Aflatoxina - en un compuesto similar al ácido kojico. Otra forma de bajar la producción de aflatoxinas es agregar al medio nitrato de sodio, que también retarda el crecimiento del hongo.

Algunos de los efectos de las aflatoxinas en otros microorganismos y viceversa fueron estudiados en detalle, de los que aquí se mencionarán algu - nos: La Aflatoxina B<sub>1</sub> inhibe la síntesis de proteínas, RNA y DNA en Esche - richia coli provocando que este microorganismo de origen a formas filamen - tosas; usando técnicas de radioisótopos se encontró que reducía en un 32%, - 80% y 48% la síntesis de proteínas, DNA y RNA respectivamente.

Tetrahymena pyriformis degrada la aflatoxina B<sub>1</sub> pura en un 58% en --

el lapso de 24 horas en un compuesto azul fluorescente desconocido.

El grupo de Aspergillus niger transforma del 25% al 50% de la aflatoxina B<sub>1</sub> en otro compuesto no estudiado. Esta reacción se cree que no es enzimática, ya que se obtiene este mismo compuesto al hacer reaccionar la aflatoxina B<sub>1</sub> con algunos ácidos.

Flavobacterium aurantiacum destruye en forma irreversible la Aflatoxina B<sub>1</sub> del medio y experimentalmente ha destoxificado productos como -- leche, maíz, aceite, y mantequilla de cacahuete que estuvieron contamina-- dos.

#### 5.6 Factores que influyen en la producción de aflatoxinas en medios de cultivo.

Como este trabajo se refiere a la producción de aflatoxinas en un sustrato natural que es el cacahuete, sólo mencionaremos estos factores levemente.

##### a) Disolución de Nutrientes.

Debe contener todo lo necesario pero no en cantidades excesivas ni en volúmenes muy grandes, pues se ha observado que estos dos factores disminuyen la producción de aflatoxinas.

##### b) Aereación del cultivo.

Ya se mencionó que debe ser lenta, pero con un aporte superior al 1% de oxígeno y no mayor a un 5%, para que el hongo pueda crecer y producir aflatoxinas.

c) Potencial de hidrogeno del medio de cultivo.

Depende del hongo usado y la composición del medio, generalmente se ha encontrado que a un pH menor a 4 al inicio de la fermentación no se desarrolla bien el hongo A. flavus ni a pH mayor a 9.

d) Temperatura y tiempo de incubación.

La temperatura de máximo crecimiento de A. flavus es de 18°C.

La temperatura de máxima producción de aflatoxinas B<sub>1</sub> es de - -  
24°C.

La temperatura de máxima producción de aflatoxina G<sub>1</sub> es de 30°C.

Después de 21 días en condiciones óptimas, las aflatoxinas se - -  
reabsorben.

e) Esterilización del medio de cultivo líquido.

Ya se habló de la competencia microbiana y las diferentes formas en que otro microorganismo reducen o inhiben la producción de aflatoxinas, por lo que es necesario esterilizar el medio, pero no debe hacerse con los carbohidratos y los compuestos nitrogenados juntos, ya que se ha observado un gran aumento en la producción de materiales tóxicos que impiden la formación de aflatoxinas y el crecimiento del hongo; deben de meterse a la autoclave separados y después mezclarse.

f) Nutrientes necesarios para el hongo.

Fuente de Carbón. - Las mejores producciones de aflatoxinas, se lograron con Sacarosa, glucosa, fructuosa, xilosa, ribosa y glicerol como --  
fuentes de carbono. Para ilustrar mejor esto se dará la siguiente tabla indi-

cando la fuente de carbono, producción de aflatoxinas, y el investigador que hizo el reporte.

<u>Fuente de carbono</u>	<u>Aflatoxina producida</u> $\mu\text{g/litro}$	<u>Investigador</u>
Sacarosa	24 - 630	Davis et al, Mateles y Adye
Glucosa	27 - 160	Davis et al, Davis y Diener, Mateles y Adye
Ribosa	150	Davis y Diener, Mateles y Adye
Xilosa	8 - 140	Davis y Diener, de Iongh et al
Glicerol	5 - 120	Davis y Diener, Mateles y Adye
Glucnolactona	0 - 100	Davis y Diener
Fructosa	13 - 75	Mateles y Adye, de Iongh et al
Almidón	39	Mateles y Adye
Sorbital	29	Mateles y Adye
Manital	1 - 28	Davis et al, Mateles y Adye
Galactosa	1 - 25	Davis et al, Mateles y Adye, de Iongh et al
Maltosa	6	Mateles y Adye
Manosa	6	de Iongh et al, Mateles y Adye
Lactosa	0 - 5	Davis et al, Mateles y Adye
Sorbosa	3	Mateles y Adye
Glutamato	1	Mateles y Adye
Rafinosa	0.9	Davis et al
Gliceraldehido	positiva	de Iongh et al
Arabinosa	0	de Iongh et al
Acetato	0	Davis y Diener, Mateles y Adye

<u>Fuente de Carbono</u>	<u>Aflatoxina producida</u> $\mu\text{g/litro}$	<u>Investigador</u>
Eritosa	0	de Iongh et al
Etanol	0	Davis y Diener
Fumarato	0	Davis y Diener
etoglutarato	0	Davis y Diener
Acido Oleico	0	Davis y Diener
Piruvato	0	Davis y Diener
Citrato	0	Davis y Diener
Malato	0	Davis y Diener, Mateles y Adye
Succinato	0	Mateles y Adye

Fuente de nitrógeno. - La mejor fuente de nitrógeno es función del tipo de hongo y de la composición del medio. Se sabe que hay poca producción de sales inorgánicas y mucha en los aminoácidos alifáticos y los hidroxiaminoácidos. Los aminoácidos básicos, los sulfurados, los aromáticos y los heterocíclicos son las fuentes más pobres de nitrógeno.

Para ejemplificar estos datos se dará una tabla similar a la de fuentes de carbono.

<u>Fuente de nitrógeno</u>	<u>Aflatoxinas producidas</u> $\mu\text{g/litro}$	<u>Investigador</u>
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	4 - 49	Eldridge, Mateles y Adye
$\text{KNO}_3$	1 - 14	Davis et al, Eldridge, Mateles y Adye
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	6	Eldridge
$\text{NaNO}_3$	1 - 2	Davis et al (1967), Eldridge (1964)

<u>Fuente de nitrógeno</u>	<u>Aflatoxinas producidas</u>	<u>Investigador</u>
NH <sub>4</sub> CL	1.4	Eldridge (1964)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1	Eldridge (1964)
Extracto de Levadura	3 - 630	Davis et al (1967) Eldridge (1964), Mateles y Adye (1965)
Mafz macerado en solución	200	Codner et al (1966) Schroeder (1966)
Aminoácidos mezclados	6 - 91	Eldridge (1964) Mateles y Adye (1965)
Glutamato	7 - 51	Davis et al (1967) Eldridge (1964) Mateles y Adye (1965)
Glicina	3 - 40	Davis et al (1967) Eldridge (1964) Mateles y Adye (1965)
Peptona	14 - 333	Davis et al (1967), Mateles y Adye (1965)
Alanina	3 - 14	Davis et al (1967)
Aspartato	7 - 14	Davis et al (1967), Eldridge (1964)
Glutamina	12	Davis et al (1967)
Asparragina	4	Davis et al (1967)
Fenilalanina	3	Eldridge (1964)
Triptofano	3	Eldridge (1964)
Metionina	2	Davis et al (1967)
Tirosina	2	Eldridge (1964)
Valina	1	Davis et al (1967)

Elementos Menores. - El mas importante es el Zinc ya que estimula -

la producción de aflatoxinas. Armbrach et al encontraron que 0.4 ppm son suficientes para que haya una buena producción y que 0.8 ppm es el óptimo para máxima producción. Se cree que la importancia del zinc se debe a que actúa en algún sistema enzimático en la producción de aflatoxinas.

La ausencia de Fe baja la producción de aflatoxinas siendo 0.4 ppm la cantidad óptima que se necesita.

La falta de manganeso (Mn) reduce el crecimiento del hongo y baja la producción de aflatoxinas.

La ausencia de magnesio (Mg) reduce la producción de aflatoxinas y del hongo; la cantidad óptima es de 0.5mg/litro de  $(MgSO_4)$  sulfato de magnesio.

La falta de molibdeno (Mo) no afecta la producción de aflatoxinas, pero si disminuye el crecimiento del hongo.

La ausencia de boro (B) y cobre (Cu) afectan muy poco o nada la producción de aflatoxinas.

La presencia de bario (Ba) en el medio de cultivo, baja la producción de aflatoxinas lo mismo ocurre con el ion sulfito ( $SO_3^-$ ).

La presencia de cadmio (Cd) en el cultivo incrementa la producción de aflatoxinas.

Otros factores de crecimiento. - se han estudiado algunos factores -- como son:

<u>Factor de crecimiento</u>	<u>Efecto sobre la producción de aflatoxinas</u>
Tiamina	Incrementa la producción.
Biotina	Incrementa la producción.
Riboflavina	No hay efecto.
Piridoxina	No hay efecto.
ac. para-aminobenzoico	Inhibe la producción.
Ac. Benzoico	Inhibe la producción.
Ac. Quínico	No hay efecto.
Etanol al 4%	Estimula la producción.

NOTA: Se cree que este último, el etanol, está relacionado con la síntesis de la toxina.

### 5.7 Biosíntesis de las aflatoxinas.

Las últimas investigaciones sobre la biosíntesis de las aflatoxinas indican que se sintetizan a partir de acetato. Un importante estudio fue realizado por Donkersloot et al., quienes al encontrar que el acetato es el mejor aportador de carbono en la biosíntesis de la aflatoxina B<sub>1</sub>, prepararon aflatoxina B<sub>1</sub> a partir de acetatos marcados con carbono 14 (los dos átomos de carbono) y encontraron que en la molécula de la aflatoxina B<sub>1</sub> 13 de los 17 carbonos estaban formados por carbono 14. Esta es la evidencia para decir que las aflatoxinas se sintetizan a partir de acetato. Existen otros investigadores que lo han confirmado como Biollaz et al. Hay otras hipótesis, pero hasta ahora la que más pruebas de laboratorio tiene es la que indica que las Aflatoxinas se derivan del acetato vía esterigmatocistina.

### 5.8 Producción de aflatoxinas en el laboratorio.

Después de dar las condiciones y factores que afectan tanto al crecimiento del hongo, como a la producción de aflatoxinas, se dará un resumen sobre el método recomendado por Robertson et al en 1967 para producir pequeñas cantidades de aflatoxinas, separarlas y purificarlas.

" Colocar 150 gramos de trigo triturado o arroz, adicionarles 75 ml. de agua y colocarlo dentro de un frasco de 4 litros de Fernbach, esterilizar e inocular el sustrato con cualquiera de los siguientes hongos:

Aspergillus flavus NRRL 2999

Aspergillus flavus NRRL 3145

Aspergillus flavus NRRL - A - 13794

Que se pueden obtener en la Food and Drugs Administration, Washington D.C., U.S.A., después de incubar por 7 o 9 días a 30°C el hongo debe destruirse antes de extraer las aflatoxinas, ya que sus esporas causan aflatoxicosis pulmonares en vías respiratorias en el hombre.

Las aflatoxinas se extraen al mismo tiempo que se destruyen las esporas del hongo por reflujo con 750 ml. de Cloroformo con corriente de vapor por 10 minutos. La extracción se repite por dos ocasiones con el volumen señalado. Se baja la temperatura a temperatura ambiental y el extracto se filtra a través de 400 gramos de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidro con doble capa de papel filtro Whatman No. 1.

El extracto clarificado es evaporado a 10 mililitros aproximadamente

bajo una corriente de nitrógeno.

Las aflatoxinas se precipitan por adición lenta de 20 volúmenes de éter de petróleo (p. e. 30°C a 60°C) agitando vigorosamente. Después se enfía a 5°C y se filtra, obteniéndose aproximadamente 500 mg. de aflatoxinas crudas que contienen del 50% al 60% del total de las aflatoxinas producidas.

Las impurezas se remueven de la solución de aflatoxinas prácticamente sin pérdidas, con una columna cromatográfica de gel de sílice y si se desea separarlas en aflatoxinas B y aflatoxinas G, se separan con ácido silícico y se llevan a cristalización posterior con cloroformo-éter ó con cloroformo-metanol en cantidades apropiadas. "

Existen otros métodos como los de Crisan y Mazzucca (1967), de Fischbach y Campbell (1965), de Hesseltine (1966), Stoloff y Trager (1965), Harrington (1967), que si se desea se pueden consultar con la referencia que se anexa en la bibliografía.

A manera de resumen, se incluye una tabla de identificación, por métodos ópticos, de las aflatoxinas mas importantes basándose en su punto de fusión,  $\lambda$  máxima,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y su peso molecular.

CARACTERISTICAS DE LAS AFLATOXINAS

<u>Aflatoxina</u>	<u>Punto de fusión</u>	<u><math>\lambda</math> max. en EtOH en <math>m\mu</math></u>	<u><math>\epsilon</math></u>	<u><math>\gamma</math> en <math>CHCl_3</math> <math>cm^{-1}</math></u>	<u>Peso molecular</u>
$B_1$	268 - 269°C	223	25 600	1760 1598	312
		265	13 400	1632 y 1562	
		262	21 800		
$G_1$	244 - 246°C	243, 257	11 500, 9 900	1760, 1695	328
		264 y 362	10 000 y 16 000	1630 y 1595	
$M_1$	299°C	226, 225	25 100, 11 600		316
		263 y 357	19 000	3350 1760	
$M_2$	293°C	221, 264	20 000, 10 900	1690	330
		357	21 000	3350, 1760 1690	

NOTA; Las Aflatoxinas  $B_2$ ,  $G_2$ ,  $B_{2a}$  y  $G_{2a}$  tienen valores muy similares a la  $G_1$  y  $B_1$ .

CAPITULO VI  
ANALISIS DE AFLATOXINAS

## Capítulo VI

### 6.1 Introducción.

Debido a la gran fluorescencia que presentan bajo luz ultravioleta de onda larga, las aflatoxinas pueden detectarse en cantidades muy pequeñas - por medio de cromatografía en capa fina (TLC).

Existe un número muy elevado de reportes sobre los métodos usados por diferentes investigadores para la determinación de aflatoxinas; como -- resultaría imposible citarlos todos, se seguirán las recomendaciones de Sargeant et al, que dividen el proceso en cuatro fases que son:

1°Extracción primaria de las aflatoxinas.

2°Purificación del extracto primario.

3°Separación de las aflatoxinas por cromatografía en capa fina.

4°Estimación de la cantidad de aflatoxinas presentes en las placas.

Se aclara que estas fases son las que siempre se deben llevar a cabo y se pueden aumentar otras según el tipo de material, por ejemplo el -- desengrasado en el caso del cacahuate, la molienda y homogeneización de -- la muestra, cuando se trata de materiales sólidos, etc.

Siendo éstas las fases principales, se darán tablas en las que se indica en forma abreviada los tipos de tratamientos que se usan regularmente -- por los investigadores.

6.2 METODOS RECOMENDADOS PARA LA EXTRACCION PRIMARIA EN FRUTOS CON VAINA

<u>Método:</u>	<u>Tamaño de la muestra gm.</u>	<u>Tipo de extracción</u>	<u>Tiempo</u>	<u>disolventes de extracción</u>	<u>Separación del disolvente por:</u>
Tropical Products Institute (1965)	20*	Soxhlet	4 hrs.	Metanol	Evaporación
De longh et al (1964)	40*	Soxhlet	1 a 2 hrs.	Metanol: cloroformo	Evaporación
Trager et al (1964)	200*	Soxhlet	6 hrs.	Metanol	Evaporación
Nesheim (1964)	100*	Mezclador	3.5 Min.	Metanol: agua+hexano	Centrífuga
Robertson et al (1965)	50	Mezclador	4 Min.	Acetona: hexano: agua	Centrífuga
Lee (1965)	20*	Agitación	30 Min.	Cloroformo+agua	Filtración.
Pons et al (1966)	50	Agitación	30 Min.	Acetona: agua	Filtración.
Eppley (1966)	50	Agitación	30 Min.	Cloroformo: agua	Filtración.

\* Necesitan desengrasarse antes de la extracción.

FUENTE: Libro "Aflatoxins" por Leo A. Goldblatt  
Academic Press, New York, 1969

### 6.3 MÉTODOS PARA PURIFICAR LOS EXTRACTOS PRIMARIOS DE PIGMENTOS Y LÍPIDOS POLARES

<u>Método:</u>	<u>Procedimiento</u>	<u>Solventes</u>	<u>Condiciones</u>
Tropical Products Institute (1965)	Separación por disolventes embudos de separación.	Metanol: cloroformo: agua	4 transferencias
de Jongh et al (1964)	Separación por disolventes embudos de separación.	Metanol: agua: éter de petróleo	1 transferencia
Trager et al (1964)	Extracción continua líquido: líquido.	Cloroformo: agua	3 horas
Nesheim (1964)	Columna de celita.	Hexano	500 ml.
Robertson et al (1965)	Separación por disolventes embudos de separación.	Acetona: hexano: disolución salina	3 transferencias
Pons et al (1966)	Acetato de plomo + separación por disolvente.	Cloroformo: agua	2 transferencias
Eppley (1966)	Columna de gel de sílice	Hexano	150 ml.
Nesheim et al (1964)	Columna de alumina neutra.	Metanol: cloroformo	---
Coomes y Sanders (1963)	Columna de celita o diatomeas.	Hexano	
Levi y Borker (1968)	Columna de celita: fluorocil	Agua: metanol	
Pons et al (1966)	Columna de sílica gel (0.05 ; 0.20 mm).	Éter etílico	

Método:	Procedimiento	Solventes	Condiciones
Stoloff et al (1966)	Columna de celulosa.	Hexano: cloroformo	
de Jongh et al (1964)	Separación por disolventes en embudos de separación.	Metanol: agua: cloroformo	4 extracciones.
Trager et al (1964)	Separación por disolventes en embudos de separación.	Metanol: agua: eter de petroleo	2 extracciones.
Nesheim (1964)	Columna de celita.	Cloroformo: hexano.	600 ml.
Robertson et al (1965)	Separación por disolventes en embudos de separación.	Cloroformo: agua	2 extracciones.
Pons et al (1966)	Columna de Gel de Silice.	Eter etílico+ cloroformo: metanol	150 ml. + 150 ml.
Eppley (1966)	Columna de Gel de Silice.	Eter etílico+ cloroformo: metanol	150 ml. + 150 ml.
Pons et al (1970)	Columna de Gel de Silice.	Hexano: eter etílico.	

#### 6.4 MÉTODOS PARA LA SEPARACION DE AFLATOXINAS

<u>Método:</u>	<u>Procedimiento</u>	<u>Solventes</u>	<u>Condiciones</u>
De Iongh et al (1964)	Separación por disolventes en embudos de separación.	Metanol: agua: cloroformo	4 Extracciones.
Trager et al (1964)	Separación por disolventes en embudos de separación.	Metanol: agua: eter de petroleo.	2 Extracciones.
Nesheim (1964)	Columna de celita.	Cloroformo: hexano	
Robertson et al (1965)	Separación por disolventes en embudos de separación.	Cloroformo: agua	2 Extracciones.
Pons et al (1966)	Columna de gel de sílice.	Eter Etflico + cloroformo: etanol.	150 ml. + 150 ml.
Eppley (1966)	Columna de gel de sílice.	Eter Etflico + cloroformo: metanol.	150 ml. + 150 ml.

## 6. 5 CONDICIONES PROPUESTAS PARA LA SEPARACION DE AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA

### EN CAPA FINA EN GEL DE SILICE

<u>M é t o d o</u>	<u>Tipo de gel de sílice</u>	<u>Grosor</u> ( <i>µm</i> )	<u>Disolventes usados</u>	<u>Altura que debe correr el disolvente</u>
Tropical Products Institute (1965)	Gel de sílice G	508	Cloroformo: metanol (95:5)	10 cm.
de Jongh et al (1964)	Gel de sílice G	300	Cloroformo: metanol (98:2)	10 cm.
Trager et al (1964)	G - HR	250	Cloroformo: metanol (95:5)	15 cm.
Nesheim (1964)	G - HR	250	Cloroformo: metanol (93:7)	14 cm.
Pons et al (1966)	G - HR	500	Cloroformo: metanol (97:3)	14 cm.
Heusinkveld et al (1965)	G - HR	400	Cloroformo: metanol: Ac. cético (95:4.5:5)	10 cm.
Engbrecht et al (1965)	G	250	Cloroformo: acetona (9:1) ✓	10-15 cm.
Stoloff et al (1966)	G - HR	250	Benceno: etanol: agua (46:35:19)	12-14 cm.
Eppley (1966)	G - HR	250	Cloroformo: acetona (9:1)	12 - 14 cm.
Pons et al (1968)	Adsorbosil-1	500	Cloroformo: acetona: 2-propanol (850:125:25)	12 - 13 cm.

6.6 Rf's obtenidos con diferentes disolventes en Gel de Silice G-RH de diferentes grosores.

<u>Disolventes usados</u>	<u>Grosor (<math>\mu</math>)</u>	<u>Rf de las aflatoxinas corriendo 12 a 14 cm.</u>			
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
Cloroformo: metanol (97:3)	500	0.50	0.45	0.40	0.35
Cloroformo: metanol (93:7)	250	0.41	0.37	0.30	0.28
Benceno: etanol: agua (46:35:19)	250	0.58	0.53	0.47	0.43
Cloroformo: acetona (9:1)	250	0.36	0.30	0.24	0.20
Cloroformo: acetona (85:15)	500	0.44	0.39	0.34	0.31
Cloroformo: acetona: 2-propanol (825:150:25)	500	0.54	0.48	0.42	0.37

FUENTE: Aflatoxins, Leo A. Goldblatt, Academic Press, New York, 1969

## 6.7 Determinación de la cantidad de aflatoxinas.

Existen varios métodos para la determinación de aflatoxinas, que -- mencionaremos a continuación brevemente:

### 6.7.1. - Método visual.

Es un método semicuantitativo, ya que no determina con exactitud - la cantidad de aflatoxinas presentes sino que clasifica la muestra según su contenido de toxinas en 4 categorías:

Muy alto	más de 1 ppm
Alto	0.25 a 1 ppm
Medio	0.05 a 0.25 ppm
Bajo	menor de 0.05 ppm

Este método se realiza comparando la intensidad de la fluorescencia del extracto problema con cuatro estándares, que contengan las cantidades de aflatoxina arriba señaladas. Como es de esperarse este método tiene un ran go bastante amplio de error, que según de Longh et al (1964), Nesheim (1964), Pons et al (1966) y Eppley (1966) es de  $\pm 30\%$  a  $50\%$  cuando sólo se tienen uno o dos estándares para comparar y de  $\pm 15\%$  a  $25\%$  cuando la muestra se pueda interpolar entre dos estándares.

### 6.7.2. - Método por absorción espectrofotométrica.

Este método ya es cuantitativo, fue reportado por Nabney y Besbitt en 1965. Para usar este método se realiza la extracción primaria con cloroformo: agua, se corre en placas de Sílica Gel con éter etílico para purificar el ex tracto y después con cloroformo: metanol para separar las aflatoxinas B de las G.

Una vez localizadas las aflatoxinas se separan y se disuelven en metanol; al extracto obtenido se le determina la cantidad de aflatoxinas por absorción espectrofotométrica a 363  $\mu$ g.

Este método tiene el inconveniente de ser menos sensible que los métodos que miden la fluorescencia, ya que la absorción es mucho menor (aproximadamente 1 000 veces) que la fluorescencia y se requieren cantidades mas grandes de aflatoxinas, 3 a 10  $\mu$ g para poder efectuar la medición.

#### 6.7.3. - Método por fluorodensitométrico.

Es un método mas sensitivo que los anteriores a la vez que sencillo pues la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub> se mide directamente sobre las placas de gel de sílice. Este método fue sugerido por Ayres y Sinnhuber en 1966.

Se usa un densitómetro equipado con instrumentos para medir la emisión de la fluorescencia. La fuerza de luz ultravioleta es de onda larga de 320 a 390  $\mu$ m; el rayo de luz pasa a través de un filtro y un condensador antes de llegar a la placa, al chocar este rayo con las manchas producidas por las aflatoxinas, las excita provocando que estas emitan radiaciones fluorescentes entre los 425 a 450  $\mu$ m .

La radiación pasa por un segundo filtro y llega a un fototubo que registra la intensidad de la fluorescencia emitida en forma de gráfica. A continuación se presenta un diagrama simplificado del aparato.

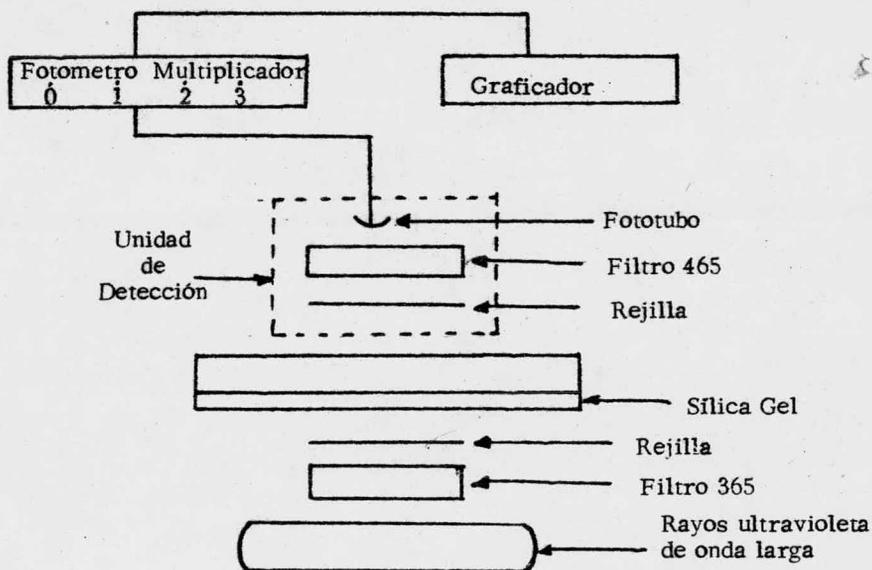


Diagrama esquematizado de un densitómetro según Pons Et Al, 1966

Se sabe que existe una relación logarítmica entre la energía de fluorescencia emitida y la concentración de las aflatoxinas dentro del rango de  $2.5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$  a  $15 \times 10^{-4} \mu\text{g}$  por banda. El porcentaje de error que se tiene al usar este método según Pons et al (1966) es del  $\pm 2\%$  al  $4\%$  en aflatoxinas puras y - del  $\pm 4\%$  al  $10\%$  en muestras problema.

Existen otros métodos mas exactos a la vez que complicados como son la resonancia magnética nuclear, espectrofotometría de masas, cromatografía de gases, etc.; que no trataremos aquí.

#### 6.8 Estándares de aflatoxinas.

En los análisis por Cromatografía de las aflatoxinas, es necesario - poseer estándares, puros de preferencia, pues sin ellos es prácticamente impo

sible determinarlas, ya que existen gran cantidad de compuestos que tienen fluorescencia, algunos de ellos a Rfs muy cercanos a los de las aflatoxinas como es el caso de ácido aspergílico y metabolitos de descomposición, de origen fúngico también.

Los estándares de las aflatoxinas, ya se pueden adquirir en forma cristalina y a partir de éstos efectuar diluciones a las concentraciones deseadas para poder correr el estándar al mismo tiempo que los problemas, a lo que se llama un estándar interno.

Existen métodos corroborativos para la identificación de aflatoxinas, de los cuales hablaremos brevemente a continuación.

#### 6.9 Métodos corroborativos para la identificación de aflatoxinas.

Estos métodos se basan en la formación de derivados de las aflatoxinas, los cuales son obtenidos por reacciones químicas específicas.

La Association of Official Analytical Chemists (AOAC) recomienda la preparación de tres diferentes derivados por tratamiento del concentrado -- problema y un estándar de aflatoxinas con ácido fórmico: tionil clorato, - ácido acético: tionil clorato y ácido trifluoroacético.

Alícuotas de los estándares tratados y de los extractos tratados se corren por cromatografía en capa fina y se comparan bajo luz ultravioleta. El producto de la reacción de la aflatoxina B con ácido acético: tionil clorato muestra dos manchas de intensa fluorescencia a los Rfs que corresponden

a la aflatoxina  $B_1$  y la  $G_2$ . El producto de la reacción de la aflatoxina  $B_1$  -- con ácido fórmico: tionil clorato y el ácido trifluoroacético muestra una so-  
la mancha de intensa fluorescencia a aproximadamente un 10% del Rf de la -  
 $B_1$ .

Crisan y Grefig sugieren la preparación de oximas y 2,4 dinitro-fenil-  
hidrazonas de las aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  ya que la  $G_1$  y la  $G_2$  no forman deriva-  
dos análogos. También se informó que la reacción de la aflatoxina  $B_1$  con la  
2,4-dinitrofenilhidrazina, puede llevarse a cabo sobre la placa si se rocía --  
el reactivo sobre ésta. El color del derivado formado es de amarillo obscu-  
ro a anaranjado, dependiendo de la concentración de  $B_1$ .

Otros investigadores propusieron el uso de los espectros de emisión  
de la excitación fluorescente o fosforescencia de las aflatoxinas en solución -  
o adsorbidas sobre bromuro de potasio, para determinar cantidades de  $10^{-2}$   
a  $10^{-4}$   $\mu\text{g/ml}$ .

Otra técnica usada es la de correr la misma muestra con varios disolven  
tes, al mismo tiempo que el estándar de aflatoxinas, pues se sabe que no todos  
los contaminantes tienen los mismos Rfs en diferentes disolventes.

Gajan et al en 1964 propusieron el uso de la polaridad oscilográfica pa-  
ra identificar aflatoxinas. Aunque sólo sirve para aflatoxinas puras ya que --  
las aflatoxinas  $B_1$  y  $G_1$  presentan potenciales de -1.33 volts y -1.25 $\pm$ 0.02 voltio  
respectivamente, con un electrodo de plata y el electrolito conteniendo bromu  
ro de tetrametil amida y cloruro de litio en solución agua: metanol.

Existen muchos otros métodos, todos tienen sus ventajas y sus desventajas, pues el estudio de las aflatoxinas aun no está completo y cada día se encuentran nuevas aportaciones en este campo.

Uno de los campos que aun no está bien estudiado es el de las hidroxiaflatoxinas,  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $G_{2a}$  y  $B_{2a}$ , pues aun están en estudio sus métodos de identificación.

Para las aflatoxinas  $M_1$  y  $M_2$  se han reportado algunos métodos como el de Purchase y Steyn en 1967 que sugieren una extracción exhaustiva con cloroformo: acetona: por Soxhlet por 6 hrs., después un desengrasado con éter de petróleo: cloroformo; la porción de cloroformo se separa, se concentra y se corre en cromatografía de capa fina (gel de sílice G-HR) usando cloroformo: metanol (95:5) como disolvente. Aparecen como manchas azulosas fluorescentes a 0.25 y 0.40 de Rf.

Roberts y Allcroft en 1968 usaron una solución acetona: agua para precipitar las proteínas, al mismo tiempo que se extraía la aflatoxina  $M_1$ ; esto era tratado con solución de metanol para separar por disolventes; la disolución de metanol era tratada con éter de petróleo para quitar la grasa y más tarde con cloroformo para extraer la aflatoxina. El extracto resultante se corría en placas de gel de sílice G usando cloroformo: metanol (97:3) como disolvente, presentando la aflatoxina  $M_1$  un Rf de 0.25.

Hay otros métodos, pero es importante hacer notar que las aflatoxinas  $M_1$  cuando se encuentran en una placa cromatográfica y ésta es expuesta a la luz y el aire, se descomponen rápidamente y esto representa problemas para la preparación de estándares de estas dos aflatoxinas.

De las aflatoxinas B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub> no hay reportes sobre su identificación pero se sabe que se descomponen en un producto amarillo en presencia de oxígeno y luz.

#### 6.10 Métodos biológicos para la determinación de aflatoxinas.

Ya que se ha presentado un panorama general sobre los métodos físico-químicos de identificación de aflatoxinas deben mencionarse los métodos biológicos para la determinación de aflatoxinas. El objeto de estos métodos es poder concretar los resultados obtenidos por los métodos fisicoquímicos en base a la potencia de la toxina aislada in vitro, debido a que no todas las toxinas producen muerte y síntomas específicos de la enfermedad.

Existen varios métodos biológicos para determinar la potencia de estos productos metabólicos de los hongos, sin embargo las dos pruebas más comunes son la prueba de embrión de pollo (Platt et al, 1962) y con patitos de un día de edad (Asplin y Carnaghan, 1961).

Enseguida las trataremos brevemente:

##### 6.10.1 Prueba del embrión de pollo.

Este método ha probado ser sencillo, reproducible y sensible. Platt et al indican que los embriones de pollo son sensibles a las aflatoxinas a los cinco días de edad y que una pequeña cantidad, desde 0.3 µg de una preparación de harina de cacahuate, causa la muerte en dos días.

El desarrollo de la técnica del embrión de pollo, fue reportado también por Verret et al en 1964, como un método biológico para determinar aflatoxinas y consiste en los siguientes pasos:

a) Las muestras sospechosas, después de la extracción con disolventes y la purificación, se separan en cromatografía de capa fina y se evalúan y cuantifican.

b) La aflatoxina se remueve de la placa de la cromatografía en capa fina y el disolvente se elimina por evaporación.

c) Al residuo se le agrega metanol absoluto para obtener una concentración de 10 µg/ml.

d) Se usan huevos fértiles de gallinas Leghorn blanca, los que son inyectados antes de meterse a la incubadora.

e) Al cascarón se le hace un agujero de 5 milímetros de diámetro y se inyecta la disolución a través de la cámara de aire, depositándola en la membrana del huevo, el agujero se tapa con cinta adhesiva de celofán.

f) Los huevos se mantienen sin moverse en posición vertical (la cámara de aire hacia arriba) aproximadamente una hora para que el material se disperse.

g) Los huevos se ovoscopian diariamente a partir del cuarto día de incubación, en ese tiempo se remueven todos los embriones que son viables.

La evaluación se basa en la mortandad a los 21 días, aun cuando ésta pueda observarse desde el cuarto día de edad, momento en que las dosis de aflatoxinas actúan más efectivamente. En un reporte de Cuca (1974) informa que cerca de 400 muestras han sido analizadas por este método en busca de aflatoxinas y que su correlación con las determinaciones fisicoquímicas es -

excelente.

#### 6. 10. 2Prueba de los patitos.

El uso de patitos de un día de edad combinado con la identificación química de las aflatoxinas, es posiblemente el procedimiento biológico mas usado y aceptado para la identificación de éstas en varios alimentos.

El uso de esta prueba se debe al efecto letal de las micotoxinas en patitos y asimismo por los cambios degenerativos en el hígado que éstas producen. La sensibilidad al daño que la aflatoxina produce y la casi inmediata proliferación del conducto biliar son las dos observaciones fundamentales para identificar el efecto de estas toxinas.

Esta prueba es específica en el pato, pues la proliferación del conducto biliar ocurre pocos días después de la inoculación de esta especie únicamente. La prueba debe usarse bajo las siguientes recomendaciones:

a) Usar patitos pequineses blancos de un día de edad y peso inicial de 50 g.

b) Usar dietas semisintéticas (caseína) de preferencia, en vez de alimento comercial. Sin embargo, se ha observado que aún con las dietas naturales esta prueba tiene validez, si se inocula al mismo tiempo un extracto con toxinas en concentraciones más o menos altas.

c) Administrar la toxina en una sola dosis o en cinco días, según las posibilidades.

d) El vehículo mas frecuente para el extracto es el propilenglicol. -  
Se puede usar también metanol y aceite de germen de trigo.

e) Se debe medir la dosis letal media y observar la proliferación del  
conducto biliar.

Cabe decir que este método no es cuantitativo, pero es una excelente  
prueba de campo para demostrar la efectividad y la patogenicidad de las - -  
aflatoxinas, dados los efectos que produce en los patos y las bajas de pro-  
ducción que origina.

Estas pruebas también se pueden efectuar con ratas, criceto dorado --  
plantas y algunos microorganismos, aunque estos últimos se usan mas para --  
efecto de estudiar los cambios que producen las aflatoxinas en ellos y las do-  
sis letales en cada especie.

CAPITULO VII  
EXPERIMENTACION Y DATOS

## Capítulo VII

### Experimentación y datos.

En este capítulo describiremos el método que se usó para determinar las aflatoxinas en las tortas de cacahuete que se estudiaron.

B. D. Jones.

Tropical Products Institute.

56/62 Gray's Inn Road, London.

W C 1X 8 LU

Foreign and Commonwealth Office.

Overseas Development Administration.

#### 7.1 Análisis de rutina de alimentos y forrajes para determinar aflatoxinas.

##### 7.1.1 Introducción.

Los métodos para la estimación de las aflatoxinas en el campo están basados generalmente en la fluorescencia característica de estos compuestos bajo luz ultravioleta de onda larga, la mayoría de estos métodos dependen de la medida cuantitativa o semicuantitativa de la fluorescencia de los extractos adecuados del material sujeto a estudio. Los diferentes métodos varían en el disolvente usado para la extracción de la toxina y en el método de estimación de la intensidad de la fluorescencia.

En las muestras mohosas, están presentes un gran número de metabo

litos aparte de las aflatoxinas por lo que es importante incluir un proceso de "limpiado" del extracto como en los casos que poseen muchos pigmentos - - (algodón y ensilados).

### 7.1.2 Procedimiento general.

El proceso para el análisis de aflatoxinas en cualquier caso dentro de las condiciones dadas, involucra todos o algunos de los siguientes pasos:

1. - Muestreo y preparación de la muestra para el análisis.
2. - Desengrasado, solo es necesario cuando el material que es analizado contiene más de un 5% de aceite (Es posible omitir este paso y extraer el aceite y la toxina juntos y remover el aceite en el paso 4).
3. - Extracción de la toxina utilizando un disolvente adecuado.
4. - Limpiado de extracto para remover interferencias de material fluorescente o para remover el aceite.
5. - Medida de la concentración de las aflatoxinas presentes.
6. - Confirmaciones químicas para diferenciar la aflatoxina B<sub>1</sub> de otros materiales fluorescentes que se encuentran presentes.

En cada uno de los pasos en éste reporte se ofrecen alternativas que se consideran adecuadas.

La elección de la secuencia depende de un gran número de factores, - tales como la muestra, facilidades del laboratorio, etc. En este reporte en la sección G se da una tabla recomendando el orden a seguir en diferentes muestras y en base a el sólo se transcribieran las secciones que descri-

ben el procedimiento que se usó.

### 7.1.3 Sección A.

Métodos de muestreo y preparación de la muestra para análisis.

Los productos agrícolas presentan varios problemas para el muestreo, pues la distribución de las aflatoxinas no es homogénea y por eso se puede -- presentar que dos muestras tomadas del mismo almacén o de la misma cosecha den resultados diferentes.

Aunque este paso no se realizó debido a que las muestras que se proporcionaron ya habían sido muestreadas y preparadas por LANFI (Laboratorios de Fomento Industrial) y ALBAMEX (Alimentos Balanceados de México) se -- darán las características que deben observarse en el muestreo de oleaginosas.

#### A. 2.1 Oleaginosas.

Las nueces descortezadas, con cáscara y otras semillas comestibles proyectadas para el consumo humano, siempre requieren de método de muestreo más riguroso.

Una vez tomadas las muestras de diferentes lotes se mezclan entre sí y se cuartean hasta obtener una cantidad razonable para el análisis y ésta se manda al laboratorio.

A. 3 Muestreo a nivel de laboratorio y preparación de la muestra para análisis.

Normalmente la muestra sujeta a análisis de laboratorio pesará entre 0.5 a 5 kg. (muestras que pesen menos de 0.5 kg. no pueden considerarse como representativas). De aquí una submuestra pesando de 10 a 50 g . - será tomada para el análisis.

A. 3. 2 Materiales medios o pequeños como nueces, maíz, cacahuates, etc.

Esparcir la muestra sometida a análisis sobre una superficie limpia y reducir aproximadamente 1 kg. por cuarteo. Moler la muestra con un molino de café tipo MCOC, lo suficiente para que el material pase por un tamiz de malla 14 (Estandar británico 910:1943).

Mezclar el material molido completamente y por otro cuarteo reducir el tamaño de la muestra a la cantidad aproximada requerida para el análisis.

#### 7. 1 4 Sección B.

Desengrasado.

Extraer 20 g . de material molido y colocarlo en un aparato Soxhlet de 100 ml. con una velocidad de sifón de 10 a 12 cambios/h . durante 4 h . . con éter de petróleo libre de aromáticos, destilado (rango de ebullición 40 a 60°C o de 60 a 80°C, dependiendo de la temperatura del condensador de agua).

Secar el disolvente residual del material desengrasado por calentamiento en un horno de inducción a 105°C por 30 minutos.

Nota 2. - Este método es aplicable a oleaginosas y forrajes, pero no puede ser aplicado a materiales tales como manteca de cacahuate o forrajes

que contengan grandes cantidades de agua.

#### 7.1.5 Sección C.

Método de extracción de toxinas.

C.1 Extracción de las aflatoxinas de material libre de grasa o de bajo contenido graso.

##### C.1.1 Procedimiento estándar.

Pesar 10 g. de material ~~en desengrasado~~ material con bajo contenido de grasa, introducirlo en una botella de boca ancha de 250 ml., adicionarle 10 ml. de agua y mezclar durante 10 minutos con un agitador de vidrio. Adicionar 100 ml. de cloroformo y tapar la botella, agitar con la muñeca de la mano por 30 minutos para extraer la toxina.

O bien, como una alternativa macere 10 g. de muestra con el mismo volumen de disolvente en un mezclador por 5 minutos.

Filtrar el extracto a través de papel Whatman Num. 1.

NB (1)-Si no se tienen los 10 g. de material desengrasado, el volumen de disolvente puede ser reducido proporcionalmente por ejemplo: para 9 g. de material desengrasado, 90 ml. de cloroformo y 9 ml. de agua.

El cloroformo puede agregarse antes que el agua, si se desea y en algunos casos como el de la nuez, esto previene la agregación de la muestra -- base.

Ha sido establecido con algunos materiales, como las nueces que la filtración es muy lenta. Para evitar este problema es recomendable filtrar el extracto a través de una cama de tierra de diatomeas.

#### 7.1.6 Sección D.

Limpiado.

D.1 Desarrollo de cromatografía en capa fina con éter etílico.

Es recomendable que las placas de cromatografía en capa fina se desarrollen en éter etílico, antes de utilizar un ~~disolvente~~ disolvente útil para cromatografiar las aflatoxinas.

Esta técnica es útil, ya que remueve algunas impurezas presentes en la gel de sílice y también pequeñas cantidades de grasa presentes en el extracto de la muestra, también es útil para remover algunos compuestos extraños fluorescentes, principalmente otros metabolitos fúngicos, los cuales pueden confundirse con las aflatoxinas. Esto es particularmente necesario para un metabolito del hongo Macrophomina phaseoli, el cual se encuentra frecuentemente contaminando cosechas tropicales.

El Rf de las aflatoxinas en éter etílico es prácticamente cero.

#### 7.1.7 Sección E.

Estimación del contenido de aflatoxinas por cromatografía en capa fina.

Los extractos conteniendo la toxina pueden ser diluidos o concentra--

dos hasta que la mancha fluorescente debida a la aflatoxina sea visible. Por el uso de pequeñas cantidades de aflatoxinas en la placa, puede calcularse la concentración del extracto., ésto no es muy exacto pero se puede interpolar entre dos manchas.

La intensidad de las manchas puede medirse con un densitómetro y compararse con los estandares, para tener resultados mas exactos. En general el hecho de determinar aflatoxinas en forma cualitativa es suficiente para desechar la muestra debido a la extrema toxicidad de éstas.

#### E.1.1.

Preparación de las placas para cromatografía en capa fina.

a) Agite 100 g gel de Silice G (Merck) con 220 ml. de agua durante 20 min. con ésto se obtiene una pasta que alcanza para cubrir 14 placas de 20 cm. x 20 cm. usando un aplicador para cubrir las placas con un grosor de  $508 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$  Se dejan en una atmósfera libre de polvo por 1 hora. Caliente las placas durante una hora en un horno de convección forzada a  $100^{\circ}\text{C}$ . Enfríe las placas en atmósfera libre de polvo durante 30 min. y almacene en un desecador adecuado.

Estas placas separan las toxinas B de las G pero no permiten la separación de la toxina  $B_1$  y la  $B_2$  o de la  $G_1$  y la  $G_2$ . La utilización de estas placas proporciona una estimación del contenido total de aflatoxinas.

#### E.1.2

Desarrollo de las placas.

Aplicar las soluciones a las cromatoplasas usando una jeringa o una micropipeta desechable. Lavar la jeringa o cambiar de micropipeta después de la aplicación de cada extracto. Las micropipetas pueden volverse a usar si son lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 5%, seguido de un lavado con agua y finalmente uno de acetona.

Colocar las soluciones en una línea a 2 cm. sobre la base de la placa y al menos 2 cm. de cada lado. Deben ser aplicadas tan rápido como sea posible en luz incandescente de preferencia. Cuando los extractos han sido aplicados se deja secar, procurando que las manchas tengan una área de - - 5 mm. de diámetro.

El desarrollo de la placa se logra colocando en una cámara cromatográfica que contenga el disolvente apropiado a una profundidad no mayor de 1 cm.

TABLA DE DISOLVENTES

<u>Sistema de disolventes</u>	<u>Tipo de placa</u>	<u>Rfs aproximados</u>			
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
Cloroformo: acetona 9: 1	G - HR	0.7	0.61	0.52	0.44
Cloroformo: metanol 97: 3	G - HR	0.47	0.43	0.38	0.33
Benceno: etanol: agua 46: 35: 19	G - HR	0.58	0.53	0.47	0.43

<u>Sistema de disolventes</u>	<u>Tipo de placa</u>	<u>Rfs aproximados</u>			
Cloroformo: acetona: 2-propanol. 825: 150: 25	G - HR	0.73	0.66	0.59	0.52
Cloroformo: metanol 95: 5	G	0.55	0.55	0.45	0.45

Como ya se mencionó, es prácticamente imposible determinar aflatoxinas si no se tienen estándares internos dentro de cada placa. Estos estándares me fueron facilitados por el Dr. Rosiles del Departamento de Patología de la Facultad de Zootecnia y Veterinaria en una solución de 0.5 microgramos por mililitro. El estándar debe guardarse en la oscuridad y a 0°C de preferencia, para prevenir la evaporación del disolvente y la descomposición de las aflatoxinas.

## 7.2 Método experimental

Las muestras analizadas fueron pasta de cacahuete o tortas residuales de la extracción de aceite, proporcionadas como ya se mencionó por LANFI (Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial) y ALBAMEX (Alimentos Balanceados de México). Siguiendo el procedimiento arriba señalado, y que resumimos a continuación.

- 1.- Pesar 20 g . de muestra para someterla a Soxhlet por 4 h . -- con éter anhidro destilado.
- 2.- Evaporación del solvente residual en estufa a 100°C por 30 min.
- 3.- Pesar 10 g . de material desengrasado y colocarlo en un embudo

de separación de 250 ml.

4. - Adicionarle 10 ml. de agua destilada y agitar durante 10 min.

5. - Adicionarle 100 ml. de cloroformo y agitar durante 30 min.

6. - Filtrar en papel Whatman Núm.1 en embudo de filtración rápida.

7. - Concentrar el extracto a Baño María y bajo un flujo de nitrógeno

hasta sequedad.

8. - Suspender el extracto en 2 mililitros de Cloroformo.

9. - Aplicar el extracto en la placa con una micropipeta.

10. - Aplicar el estandar en la placa con una micropipeta. Se coloca

el estandar cerca de la muestra para poder comparar los Rfs y la fluorescencia.

cia.

11. - Correr la placa en éter etílico.

12. - Correr la placa en cloroformo: metanol (95:5)

13. - Observar las placas bajo luz ultravioleta de onda larga.

14. - Determinar los Rfs.

De las muestras analizadas un 30% de las muestras contenía aflatoxi

nas .

Los resultados se pondrán en forma de tabla.

TABLA DE RESULTADOS

<u>Muestra</u>	<u>Presencia de aflatoxinas</u>	<u>Observaciones.</u>
1	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
2	Positivo	Presentaba bandas fluorescentes
3	Positivo	Presentaba bandas fluorescentes
4	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
5	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
6	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
7	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
8	Negativo	No presentó fluorescencia
9	Positivo	Presentaba bandas fluorescentes
10	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
11	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
12	Positivo	Presentaba bandas fluorescentes
13	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
14	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
15	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
16	Positivo	Presentaba bandas fluorescentes
17	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
18	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
19	Negativo	Presentaba bandas fluorescentes
20	Positivo	Presentaba bandas fluorescentes

Debe mencionarse que todas las muestras a excepción de la número 8, se dieron por positivas en los laboratorios que las proporcionaron.

CAPITULO VIII  
OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES

## 8.1 Observaciones.

Del material que se ha presentado para estudio, del análisis de los reportes de la literatura y de la experimentación realizada, es conveniente remarcar los puntos que se indican mas abajo.

- a) La industria del cacahuete en México ha sufrido un fuerte estancamiento en los últimos años.
- b) La tecnología empleada para el cultivo del cacahuete en nuestro país es anticuada y en muchos casos obsoleta.
- c) Los productores no prestan la atención debida a los problemas de salubridad; en un gran número de casos ni siquiera se conocen los efectos de cierto tipo de prácticas.
- d) En la cadena existente desde los productores hasta los consumidores, no existe un control adecuado de las características del producto, con excepción de algunos de los productos dedicados para el consumo humano directo (cacahuete de boca y mantequilla de cacahuete).
- e) La presencia de mohos en el cacahuete puede ser prevenida en forma sencilla siguiendo las recomendaciones que se dan en el capítulo correspondiente.
- f) La presencia de los factores tóxicos en los diferentes productos puede ser prevenida siguiendo las recomendaciones señaladas en el capítulo correspondiente.

g) La identificación de los factores tóxicos en los diferentes productos -- puede ser efectuada con seguridad sólo si se cuenta con los estándares adecuados.

h) Los productos que presentan los factores tóxicos no son utilizables dado que las aflatoxinas son fuertemente resistentes a la temperatura, aún -- por períodos largos.

i) La detección de las aflatoxinas en los diferentes productos agrícolas es particularmente difícil debido a que existen muchos otros compuestos fluorescentes que tienen Rf similares.

j) Los resultados de la experimentación realizada sugieren que la metodología empleada para el análisis en algunos laboratorios es inadecuada.

k) Lo indicado en el punto anterior se debe a que los productos analizados fueron reportados como positivos en presencia de aflatoxinas, con excepción de la muestra que no presentaba fluorescencia. De todos los productos señalados, tan sólo el 30% presentó aflatoxinas, aunque todos ellos presentaron bandas fluorescentes (las cuales no corresponden a aflatoxinas, sino a algunas otras toxinas de características diferentes, como es el caso de zearalenone). Durante las pruebas realizadas, también fueron detectados otros -- compuestos fluorescentes cuyas características no fue posible definir, aunque puede ser aclarado que no se trataba ni de aflatoxinas ni de zearalenone, ya -- que las pruebas se corrieron contando con los estándares de esos compuestos.

De igual forma, durante el proceso del análisis se observaron algunos puntos de interés, que afectan en cierta forma los resultados. Sin entrar en detalles, se comentarán algunos de ellos.

- El eter empleado para la preparación del eluyente de la etapa de purificación debe ser perfectamente anhidro. La literatura cita que el Rf de las aflatoxinas en eter es prácticamente cero, pero si ese compuesto no es perfectamente anhidro o presenta impurezas, tal afirmación no es correcta. En algunos de los análisis realizados no se contó con eter anhidro y las aflatoxinas fueron arrastradas por el eluyente. Por tal motivo se debieron efectuar pruebas diferentes para evitar ese problema: Se corrieron pruebas que se purificaron y otras sin purificar, comparándose los resultados. Dado que las muestras empleadas no contienen gran cantidad de pigmentos ni de lípidos polares, no se observó interferencia y la etapa de purificación pudo así ser eliminada del proceso de análisis.

- El tiempo empleado para el secado de las placas afecta los resultados ya que varía los Rf de las muestras, e igual problema se presenta con la temperatura. Para evitar ese problema algunas muestras fueron corridas -- para observar los efectos producidos. El problema pudo ser fácilmente evitado en mi caso ya que contaba con los estándares y éstos fueron corridos -- junto con las muestras, anulando el efecto (se cree que el cambio se debe a una "activación" de la sílice empleada). Este problema confirmó la imposibilidad de la determinación de aflatoxinas en cromatografía de capa fina sin contar con los estándares adecuados.

## 8.2 Recomendaciones.

A la vista de los puntos señalados anteriormente, creo conveniente poner a consideración las siguientes recomendaciones:

i) Realizar estudios semejantes al presente en materiales de mayor relevancia en el ámbito nacional, como es el caso del maíz, frijol, ensilados rurales, sorgo, trigo y alimentos humanos. Esto es debido a que existen razones para creer que en estos sustratos se presentan gran cantidad de infecciones fúngicas y debe esperarse en consecuencia la presencia de micotoxinas. Este punto me fue confirmado en mis entrevistas con el Dr. Rosiles del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, quien ha realizado muestreos en diferentes expendios de tortillas y ha encontrado en un gran número de casos la presencia de las aflatoxinas, estudios posteriores del mismo personaje han determinado que el proceso de nixtamalización no destruye efectivamente las aflatoxinas.

ii) Los laboratorios dedicados a la determinación de factores tóxicos deben revisar la metodología empleada, ya que es necesario que las determinaciones sean precisas, evitando el daño que se llega a presentar en los consumidores, pero sin restringir la distribución de productos sanos.

iii) La Universidad debe enfocar los esfuerzos a definir un método sencillo y confiable para aplicar en las condiciones de nuestro país. Es decir, que el método permita la definición precisa de los factores bajo estudio, pero que su aplicación no requiera de equipo costoso ni de tiempo muy largo, evitando al máximo el despilfarro de recursos.

## BIBLIOGRAFIA

1. - Goldblatt, L. A.  
Aflatoxin, Scientific Background, Control and Implications.  
Academic Press, New York (1969)
2. - Guiller, P. y Silvestre, P.  
El Cacahuete o Maní.  
Ed. Blume, Barcelona (1970).
3. - Feakin, S. D.  
Pest Control in Groundnuts.  
Tercera Edición, Londres (1973).
4. - Woodroof, J. G.  
Peanuts Production Processing.  
Segunda Edición, AVI Publishing Co. (1972).
5. - Díaz, B. R.  
Cultivo, Recolección y Manipulación del Maní.  
Revista de Agricultura de la Habana, junio a agosto, 1943.
6. - Banna, A.  
Peanuts and Their Uses for Food.  
Washington D.C. (1952), 99 pág.
7. - Frazier, W. C.  
Food Microbiology.  
Mc Graw-Hill, New York (1972).
8. - Potter, N. N.  
La Ciencia de los Alimentos.  
EDUTEX, México (1973).
9. - Burdon, K. L. y Williams, R.P.  
Microbiología.  
Publi - Mex, México (1971).
10. - Itie, C. G.  
El Cultivo del Cacahuete en la Región Central.  
Departamento de Extensión Agrícola.  
S.A.G., Dirección de Agricultura, 22 pág.
11. - Marin, L.  
El Cacahuete.  
Departamento de Economía Rural.  
Secretaría de Agricultura y Fomento (1935), 32 pág.

12. - Jones, B.D.  
Methods of Aflatoxin Analysis  
Tropical Products Institute.  
Foreign and Commonwealth Office, Londres, (1972), 63 pág.
13. - Christensen, C.M. y Cesar, L.  
Daños que causan en México los Hongos de Granos Almacenados. ✓  
Centro Regional de Ayuda Técnica.  
I.N.I.A., México (1962), 27 pág.
14. - Pest Control in Groundnuts.  
Great Britain Ministry of Overseas Development.  
Londres, (1972) 138 pág.
15. - Aspectos comerciales mas Relevantes del Cacahuate.  
Departamento de Desarrollo Comercial Frutícola.  
Comisión Nacional de Fruticultura, México (1975), 16 pág.
16. - Lloyd, R. F.  
Effects of Aflatoxin B<sub>1</sub> on the Nucleolar RNA Metabolism of Rat Liver.  
Baylor University, Houston, Texas, (1967), 104 pág.
17. - López, T. R.  
Observaciones sobre la Toxicidad del Maíz Contaminado con Aspergillus  
flavus en pollos y gallinas.  
Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Méx. (1969).
18. - Martínez, L. O.  
El Cacahuate y sus Ventajas de Industrialización.  
Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Méx. (1944).
19. - Soto, B. I.  
Cultivo del Cacahuate.  
Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Méx. (1952).
20. - Ledesma, R. y Yañez, R. M.  
Las Aflatoxinas, su Importancia y Problemática en la Alimentación de ✓  
las Aves.  
Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia, U.N.A.M., Méx. (1975), 8 pág.
21. - Vaqueiro, C. y Morales, J.C.  
Aflatoxinas.  
Rev. Tecnología de Alimentos, Méx , 10 (2) 50 - 58 (1975).
22. - Edds, T. G.  
Aflatoxins and Animal Health.  
Department of Veterinary Science, University of Florida, U.S.A.  
(1974), 4 pág.

23. - Stack, M.E. y Pohland, A.E.  
Collaborative Study of a Method for Chemical Confirmation of the Identity of Aflatoxin.  
Journal of the AOAC, 58 ( 1 ) 110-113 (1975).
24. - Thomas, F., Eppley, R.M. y Trucksess, W.M.  
Rapid Screening Method for Aflatoxins and Zearalenone in Corn.  
Journal of the AOAC, 58 (1) 114-116 (1975).
25. - Aflatoxinas.  
Servicio Informativo Merck, No. 14.
26. - Natural Poisons.  
Aflatoxins.  
Official Methods of the AOAC, 53 (26) 426-438 (1970).
27. - Tiemstra, P.J.  
A Study of the Variability Associated with Sampling Peanuts for Aflatoxins.  
Journal of the AOCS, 46, 667-672 (1969).
28. - Stoloff, L., Campbell, A.D., Beckwith, A.C., Nesheim, S., Winbush, J.S. y Fordham, O.M.  
Sample Preparation for Aflatoxin Assay.  
Journal of the AOCS, 46, 678-684 (1969).
29. - Buchi, Foulkes, Kurono, Mitchell y Schneider.  
The Total Synthesis of Racemic Aflatoxin B.  
Journal of the AOCS, 89 (25) 6748-6753 (1967).
30. - Brown, F.R.  
Some Bioassay for Mycotoxins  
Proceedings. First U.S. - Japan Conference on Toxic Micro-organisms.  
Division of Microbiology, Food and Drug Administration, Washington - D.C., pág. 12 - 18.
31. - Hiroshi Yoshikura y Kageaki Aibara.  
Synchronized Culture as an Assay System of Aflatoxin.  
Proceedings. First U.S. - Japan Conference on Toxic Micro-organisms.  
Department of Feed Research, National Institute of Health, Tokyo, Japan, pág. 19 - 22.
32. - Masary Manabe, Shinji Matsuura, y Masahiro Nakano.  
Isolation and Quantitative Analysis of Four Aflatoxins ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$ ) by Thin-Layer and Liquid Chromatography.  
Proceedings, First U.S. - Japan Conference on Toxic Micro-organisms.  
Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Japan - pág. 23 - 29.

33. - Goldblatt, A.L.  
Objective Determination of Aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> by Fluorodensitometry.  
Proceedings, First U.S. - Japan Conference on Toxic Micro-organisms. Oilseed Crops Laboratory, Southern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of -- Agriculture, New Orleans, pág. 30 - 35.
34. - Campbell, A.D.  
Chemical Methods for Mycotoxins.  
Proceedings, First U.S. - Japan Conference on Toxic Micro-organisms Division of Food Chemistry and Technology, Bureau of Science, Food and Drug Administration, Department of Health, Education, and Welfare, Washington, D.C., pág. 36 - 42.
35. - Cuca, M.G.  
El Problema de las Aflatoxinas en Productos Agrícolas Animales.  
Conferencia sustentada ante la A.P.Y.Z.A. en Guaymas, Son., (Feb. 1973) 11 pág.
36. - Shinji Matsuura, Masaru Manabe y Tomotaro Sato.  
Surveillance for Aflatoxins of Rice and Fermented - Rice Products in -- Japan.  
Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Japan pág. 48 - 55.
37. - Schroeder, W.H.  
Aflatoxins in Rice in the United States.  
Proceedings, First U.S. - Japan Conference on Toxic Micro-organisms. USDA, ARS, Market Quality Research Division, College Station, Tex. - pág. 54 - 60.
38. - Shotwell, L.O., Goulden, L. M. y Hesseltine, W.C.  
Aflatoxin Contamination: Association with Foreign Material and Characteristic Fluorescence in Damaged Corn Kernels.  
Journal of Cereal Chemistry, 49 (4) 458-465 (1972).
39. - Shin, N. C. y Marth, H.E.  
Some Cultural Conditions That Control Biosynthesis of Lipid and Aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*.  
Applied Microbiology, 27 (3) 452 - 455 (1974).
40. - Stoloff, L. et al.  
A. Multimycotoxin Detection Method for Aflatoxins, Ochratoxins, Zearalenone, Sterigmatocystin, and Patulin.  
Journal of the A OAC, 84 (5) 7 pág. (1970)

41. - Velasco, J.  
Detection of Aflatoxin Using Small Columns of Florisil.  
Journal of the AOCS, 49 (2) 141 - 142 (1972).
42. - Romer, T. R.  
Determination of Aflatoxins in Mixed Feeds.  
Journal of the AOAC, 50 (5) 1111 - 1114 (1973).
43. - Newberne, M.P., Wogan, N.G., Carlton, W. W. y Abdel Kader, M. M.  
Histopathologic Lesions in Ducklins Caused by Aspergillus flavus Cultures, Culture Extracts, and Crystalline Aflatoxins.  
Toxicology and Applied Pharmacology, 6, 542 - 556 (1964).
44. - Davis, D.N. y Diener, L.U.  
Environmental Factors Affecting the Production of Aflatoxin.  
Proceedings, First U.S. - Japan Conference on Toxic Micro-organisms.  
Botany and Plant Pathology Department, Auburn, Alabama, pág. 43 - 47.
45. - Schroeder, W. H. y Kelton, H. W.  
Production of Sterigmatocystin by Some Species of the Genus Aspergillus and its Toxicity to Chicken Embryos.  
Applied Microbiology, 30 (4) 589 - 591 (1975).
46. - Chute, L.H., Hollander, L. S., Barden, S. E. y O'Meara.  
The Pathology of Mycotoxicosis of Certain Fungi in Chickens.  
Presented at Northeast Avian Dis. Conf., Raleigh N.C.  
June 22 - 24 (1964) 57 - 66.
47. - Newberne M.P. y Butler, H.W.  
Acute and Chronic Effects of Aflatoxin on the Liver of Domestic and Laboratory Animals.  
Cancer Research, 29, 236 - 250 (1969).
48. - Shreeve, J.B., Paterson, P.S.D. y Roberts, A.B.  
Investigation of Suspected Cases of Mycotoxicosis in Farm Animals in Britain.  
The Veterinary Record, 275 - 279, (Oct. 11, 1975).
49. - Edds, T.G.  
Acute Aflatoxicosis: A Review.  
Journal of American Veterinary Research, 162 (4) 304 - 309 (1973).
50. - Newberne, MP.  
Chronic Aflatoxicosis.  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 163 (11) 1262 - 1267 (1973).