

300627

21

24



**UNIVERSIDAD LA SALLE**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS**

INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE  
AFLATOXINAS EN LA Matricaria chamomilla  
EN PRESENTACION COMERCIAL**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

PRESENTA

**MA. LUISA ROMERO LOPEZ**

DIRECTORA DE TESIS:

**Q.F.B. MARTHA ANGELICA MUSTRE DE LEON**

MEXICO D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **IMPLORACION**

Señor, vengo humildemente a darte  
las gracias por estos años  
que me has permitido vivir  
con días radiantes de sol y noches  
de aparente oscuridad ya que por la fe  
vi siempre un destello de tu amor.

Gracias Señor, por las alegrías y las penas,  
por lo que me prestaste y luego me pediste.

Bendice Señor a todas las almas que me rodean,  
ya que gracias a ellas  
he podido sobrevivir. Bendícelas.

Señor, lléname de amor para dar,  
sencillez y humildad para servir,  
para que al final de la jornada pueda decirte:  
Señor, mi misión de amar está cumplida.

## DEDICATORIAS

*Gracias PAPA por darme todo tu apoyo incondicional,  
tanto espiritual, moral y económico, gracias por creer en mí,  
porque me has dado ejemplos con hechos, que se puede  
realizar todo lo que uno se propone con sólo ponerle empeño.  
Eres un gran Padre.*

*Gracias MAMA por darme esta maravillosa vida, que si  
vale la pena vivir, gracias por darme talces tan fuertes  
y alas tan ligeras para realizar la misión que me ha  
tocado vivir, por el apoyo espiritual, moral y el sacrificio  
que hiciste para que yo realizara mi carrera.  
Eres una gran Mujer y madre.*

*A mis hermanos BETO, GUS y a mi cuñada PILAR  
por darme palabras de aliento en los momentos difíciles  
y seguir adelante, gracias por su cariño y amor que me han  
dado a lo largo de mi vida.*

*A ti RAMON por creer en mí, por apoyarme en todo  
momento sin pedir nada a cambio, por que cuando te  
necesite estuviste a mi lado sin importar que tuvieras  
que hacer y alentarme para que saliera adelante.  
Te amo mucho.*

*A LILI por brindarme tu amistad y cariño,  
por preocuparte por mi en todos los aspectos,  
por darme consejos cuando los necesitaba.  
Eres una gran persona y amiga. Te quiero.*

*A MARTHA MUSTRE por el apoyo que me brindaste  
como maestra y amiga, Muchas Gracias.*

*Para Conchita, Lalo y Vero por ser los mejores  
amigos que he tenido en el D.F.*

*Para la Familia Ramírez Roman y Srta. Elvira  
por brindarme la confianza y apoyo, por considerarme  
como miembro de su familia, gracias por todo.*

*Para mi prima JUANITA por su confianza,  
amistad y apoyo, por los momentos que pasamos  
juntas para lograr nuestras metas.*

*Para no excluir nombres a todos mis compañeros,  
amigos y familiares que me apoyaron en todo momento.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Q. Ma. Teresa Estrada Alvarado y Q.F.B. Ma. De Jesús Ramírez Palomares: por darme la oportunidad de realizar los análisis experimentales en los Laboratorios de la Escuela de Ciencias Químicas.*

*A mis sinodales: Martha Mustre, Lupita Morales, Irene Montalvo, Ma. de Jesús y Angelina Ochoa por brindarme su apoyo, tiempo y recomendaciones.*

*Al Dr. Gabriel Cuevas por su apoyo y recomendaciones en el desarrollo experimental de este trabajo.*

*A todos los profesores que me brindaron sus conocimientos, su tiempo y sus esfuerzos para lograr mi carrera profesional como Q.F.B.*

## INDICE GENERAL

	<u>PAGINA</u>
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCION</b>	1
<b>CAPITULO 2. OBJETIVOS</b>	4
<b>CAPITULO 3. ANTECEDENTES DE LA <i>Matricaria chamomilla</i> (Manzanilla)</b>	
3.1 Generalidades de las plantas medicinales	7
3.2 Las plantas medicinales en forma de infusión	8
3.3 Generalidades del té	9
3.3.1 Té a granel y Té elaborado	9
3.3.2 Calidad del té	10
3.3.2.1 Métodos de sanitización	11
3.3.2.1.1 Métodos alternos para sanitización de especias	12
3.3.2.2 Factores de contaminación que alteran la calidad del té	14
3.3.2.2.1 Suelo	14
3.3.2.2.2 Agua	14
3.3.3 Elementos de distribución de té	14
3.3.4 Presentaciones comerciales del té	16
3.4 El té de manzanilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	16
3.4.1 Descripción	17
3.4.2 Recolección	18
3.4.3 Composición	18
3.4.4 Propiedades farmacológicas	18
3.4.5 Usos	19
3.4.6 Producción en México	19

**PAGINA**

3.4.7	Procesos de manufactura	20
3.5	Normas de Calidad	20
3.5.1	Especificaciones para la manzanilla	21
3.5.1.1	Sensoriales	21
3.5.1.2	Físicas y Químicas	21
3.5.1.3	Microbiológicas	22
3.5.1.4	Materia extraña objetable	22
3.5.1.5	Aditivos	22
3.5.1.6	Contaminantes químicos	22
3.5.2	Muestreo	23
3.5.3	Envase, marcado, etiquetado y embalaje	23
3.5.3.1	Envase	23
3.5.3.2	Marcado en el envase	23
3.5.3.3	Marcado en el embalaje	24
3.5.3.4	Embalaje	24
3.5.4	Almacenamiento	24
3.5.5	Determinación de microorganismos	25
3.5.5.1	Preparación de la muestra	25
3.5.5.2	Cuenta de hongos y levaduras	25
3.5.5.3	Interpretación de resultados	25

**CAPITULO IV. ANTECEDENTES DE LAS AFLATOXINAS**

4.1	Generalidades de las micotoxinas	27
4.2	Tipos de micotoxinas	28
4.3	Géneros de hongos productores de micotoxinas	28
4.3.1	Efectos que producen las micotoxinas	29



**PAGINA**

4.3.2	Micotoxinas producidas por <i>Aspergillus</i> y sus efectos tóxicos	29
4.3.3	Micotoxinas producidas por <i>Penicillium</i> y sus efectos tóxicos	30
4.3.4	Micotoxinas producidas por <i>Fusarium</i> y sus efectos tóxicos	30
4.3.5	Micotoxinas producidas por <i>Stachybotrys</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Thichoderma</i> , <i>Trichothecium</i> y <i>Cephalosporium</i> .	31
4.4	Género <i>Aspergillus</i>	32
4.4.1	Estructura microscópica de <i>Aspergillus</i>	32
4.4.1.1	Morfología macroscópica y microscópica de <i>Aspergillus flavus</i>	34
4.4.1.2	Clasificación de <i>Aspergillus flavus</i>	34
4.4.1.3	Morfología macroscópica y microscópica de <i>A. parasiticus</i>	35
4.5	Origen de las aflatoxinas	35
4.5.1	Tipos de aflatoxinas	36
4.5.1.1	Estructuras de las aflatoxinas	37
4.5.2	Características de las principales aflatoxinas	39
4.5.3	Factores que intervienen en la producción de aflatoxinas	39
4.5.3.1	Humedad	39
4.5.3.2	Temperatura	40
4.5.3.3	pH	40
4.5.4	Toxicidad de las aflatoxinas	41
4.5.4.1	Estudios sobre la toxicidad	42
4.5.5	Legislación de aflatoxinas	42

**CAPITULO V. DETERMINACION E IDENTIFICACION  
DE AFLATOXINAS**

5.1	Análisis de las aflatoxinas	45
5.2	Tipos de pruebas para determinar la presencia y cantidad de aflatoxinas	45
5.2.1	Prueba Presuntiva	45
5.2.2	Métodos analíticos	46
5.2.2.1	Muestreo	46
5.2.2.2	Extracción y purificación	47
5.2.2.3	Detección y determinación	48
5.2.2.3.1	Métodos Físicoquímicos	49
5.2.2.3.1.1	Cromatografía en capa fina, (CCF)	49
5.2.2.3.1.2	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	52
5.2.2.3.1.3	Prueba de Fluorescencia Verde-Amarillo Brillante	53
5.2.2.3.1.4	Detección en Minicolumna	53
5.2.2.3.2	Métodos Inmunoquímicos	53
5.2.2.3.2.1	Cromatografía de Inmuno- afinidad (AFLATEST®)	53
5.2.2.3.2.2	ELISA	54
5.2.2.3.2.3	Radioinmunoensayo (RIA)	54
5.2.2.3.3	Métodos Biológicos	55
5.2.2.3.3.1	Cultivo de Células y Tejidos	55
5.2.2.3.3.2	Animales de Experimentación	55
5.2.2.3.3.3	Microorganismos	56

**CAPITULO VI. METODOS**

6.1 Métodos	58
6.1.1 Recolección de muestras	58
6.1.2 Identificación del género <i>Aspergillus</i>	58
6.1.2.1 Cuenta total de hongos	58
6.1.2.2 Microcultivo de posible género <i>Aspergillus</i>	59
6.1.2.3 Identificación en el microscopio del hongo <i>Aspergillus</i>	60
6.1.3 Determinación de aflatoxinas por el método de Cromatografía en Capa Fina (CCF)	61
6.1.3.1 Preparación de las muestras	61
6.1.3.2 Extracción	61
6.1.3.3 Eliminación de interferencias	61
6.1.3.4 Purificación del extracto	62
6.1.3.5 Preparación del estándar de aflatoxinas	63
6.1.3.6 Preparación de los residuos de las muestras	64
6.1.3.7 Aplicación de las muestras en CCF	64
6.1.3.8 Interpretación de resultados	64

<b>CAPITULO V. RESULTADOS</b>	65
-------------------------------	----

<b>CAPITULO VI. ANALISIS DE RESULTADOS</b>	80
--	----

<b>CAPITULO VII. CONCLUSIONES</b>	83
-----------------------------------	----

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	86
-----------------------------------	----

## INDICE DE FIGURAS

	<u>PAGINA</u>
3.3.3 Elementos que intervienen en la producción y distribución del té	15
3.4.1 Esquema de la <i>Matricaria chamomilla</i>	17
4.4.1 Estructura microscópica de <i>Aspergillus</i>	33
4.4.1.2 Estructura microscópica de <i>Aspergillus flavus</i>	34
4.4.1.3 Estructura microscópica de <i>Aspergillus parasiticus</i>	35
4.5.1.1 Estructuras de aflatoxinas	37
5.2.2.3.1.1 Cálculo del valor $R_f$ .	50

## INDICE DE TABLAS

4.3.2 Micotoxinas producidas por <i>Aspergillus</i>	29
4.3.3 Micotoxinas producidas por <i>Penicillium</i>	30
4.3.4 Micotoxinas producidas por <i>Fusarium</i>	31
4.3.5 Micotoxinas producidas por <i>Stacybotrys</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trichothecium</i> y <i>Cephalosporium</i>	32
4.5.2 Características químicas de las aflatoxinas	39
5.2.2.3 Métodos de determinación e identificación de aflatoxinas	48
5.2.2.3.1.1 Tabla de disolventes para correr placas en CCF	51

# *CAPITULO*

*II*

## INTRODUCCION

Las toxinas son metabolitos de los hongos y son venenosos para los animales y presumiblemente para el hombre, siendo conocidos como micotoxinas. Especialmente se han enfocado los estudios en las aflatoxinas por sus propiedades carcinogénicas y su presencia en muchos alimentos.

La contaminación por micotoxinas en los alimentos se debe a que los hongos colonizan a plantas, flores y frutos; las toxinas no se forman durante el crecimiento del hongo, sino hasta después de 48 horas de la germinación de la espora. Entonces en el momento del almacenamiento, y con cierto porcentaje de humedad producen sus sustancias venenosas, permaneciendo las esporas activas hasta la preparación de los forrajes o de los productos alimenticios.

Las micotoxinas son producidas por el género *Aspergillus* y en especial las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios que se forman después de la fase logarítmica de crecimiento del hongo *Aspergillus flavus*. La palabra aflatoxina se deriva de las primeras letras del hongo *A. flavus* seguida de la palabra toxina. Se encuentran, como contaminantes naturales en muchos tipos de alimentos, como del cacahuete también en la harina de semilla de algodón, el maíz, la mandioca, el arroz, los frijoles, el trigo, el sorgo, la cebada y otros.

Aún cuando las aflatoxinas constituyen un campo de investigación extenso, no han sido estudiadas en plantas medicinales como lo es la *Matricaria chamomilla*, mejor conocida como "Manzanilla".

Se ha observado que los factores que influyen en la producción de aflatoxinas no actúan individualmente sino como un todo. La cantidad de inóculo, temperatura, humedad del sustrato, condiciones físicas del sustrato y crecimiento de otros hongos también interfiere en cuestión de

horas. El factor más importante en el desarrollo y producción de las aflatoxinas del *A. flavus* es la humedad que circunda el sustrato natural.

Hay doce tipos diferentes de aflatoxinas: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, GM<sub>1</sub>, B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub> y aflatoxicol. Las aflatoxinas más importantes son B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> debido a su toxicidad, en segundo plano son B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>.

Los análisis que se realizan para la determinación de aflatoxinas son métodos fisicoquímicos, métodos inmunoquímicos y métodos biológicos. La cromatografía en capa fina (CCF) es un método fisicoquímico que se emplea en la determinación de aflatoxinas en la manzanilla, obteniendo resultados semicuantitativos debido a que la comparación de la muestra a analizar se hace con 4 estándares de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) de concentraciones de 5, 10, 15 y 20 ppb; se observan las placas en luz UV y se comparan la muestra con el estándar y de acuerdo a la intensidad de las manchas se obtienen los resultados.

Por lo tanto, en este trabajo de tesis uno de los objetivos es la identificación de este género y la determinación semicuantitativa de aflatoxinas en la *Matricaria chamomilla*, demostrando que la manzanilla puede tener aflatoxinas aunque pase por una esterilización comercial, ya que son moléculas relativamente estables al calor.

# *CAPITULO*

## *II*



## **OBJETIVOS**

- 1) Cuantificar esporas e identificar el género *Aspergillus* en la *Matricaria chamomilla* de las marcas comerciales nacionales y de las muestras a granel deshidratadas.**
  
- 2) Determinar la presencia de aflatoxinas en la *Matricaria chamomilla*, en bolsitas de marcas comerciales nacionales y en muestras a granel deshidratadas.**
  
- 3) Destacar la importancia sanitaria y de almacenamiento de la *Matricaria chamomilla* en presentaciones comerciales.**

# *CAPITULO*

## *III*

## ANTECEDENTES DE LA *Matricaria chamomilla*

### 3.1 GENERALIDADES DE LAS PLANTAS MEDICINALES.

Los juicios acerca de los logros de la medicina indígena han sido por lo regular, y desde el momento mismo del choque de europeos y americanos, tremendamente exagerados. Se afirma la existencia de curas milagrosas, de hierbas con propiedades extraordinarias, o se niega a los indígenas la capacidad intelectual suficiente para haber obtenido un elemental conocimiento de los efectos simples sobre el organismo. Ambos extremos son absurdos. Un antiguo conocimiento médico de la flora (y en menor escala de la fauna) en las diferentes zonas geográficas de Mesoamérica, indudablemente pudo enriquecer de manera considerable la farmacopea de los conquistadores, en igual forma que una mentalidad fija en las teorías médicas de su época impidió a éstos valorar debidamente las correspondientes a las culturas de los conquistados (16).

En la mayoría de las culturas antiguas, la enfermedad se consideraba un castigo de los dioses, y los curanderos trataban a los enfermos a base de conjuros y ritos que incluan lo que para ellos eran pócimas mágicas (infusiones) preparadas con plantas locales. Usar magia y religión como dos ritos fundamentales en su empleo, los practicantes de medicina tradicional ayudaban a conceptualizar la realidad última de su cultura y todas las actividades que personifican. Es muy probable que en un principio escogieran esas plantas por su color, olor, forma o rareza, pero al paso del tiempo debieron advertir que unas daban mejor resultados que otras para aliviar determinadas dolencias, y esos conocimientos se fueron transmitiendo a través de las generaciones (2, 27).

Se puede identificar tres tipos de practicantes de medicina tradicional y la extensión de su uso de plantas medicinales. Primero, los herbolarios son aquellos quienes disfrutan del prestigio y reputación de ser los practicantes reales de la medicina tradicional. Segundo, los curanderos divinos son aquellos cuya práctica depende de sus pretendidos poderes

sobrenaturales de diagnóstico. Tercero, el doctor brujo es quien se da crédito con la habilidad de interceptar los hechos malignos de una bruja o exorcizar el espíritu malo que posee el paciente (2).

En los últimos decenios, no obstante, la Fitoterapia ha comenzado a recuperar el puesto de antaño que tenía junto a otros métodos curativos alumbrada por nuevos conocimientos científicos y apoyada en un análisis objetivo; se ha ido despojando de la carga emocional y mítica que por tanto tiempo arrastro consigo (27).

La utilidad de las drogas usadas en Mesoamérica todavía están en gran parte por descubrirse. Indudablemente los modernos estudios bioquímicos pueden obtener productos aprovechables en la lucha contra la enfermedad, el dolor y la muerte, entre otros muchos que sin duda habrán de ser rechazados como inútiles absolutamente.

Junto a estos elementos tan extendidos y que deben suponerse muy antiguos, se encuentran otros íntimamente ligados al pensamiento religioso mesoamericano (específicamente náhuatl) del periodo postclásico y por último, hay una tradición peculiar, determinada por la geografía, que en cada zona creó una farmacopea con la flora, la fauna y los minerales que el pueblo tenía a su alcance (16).

### **3.2 LAS PLANTAS MEDICINALES EN FORMA DE INFUSION.**

Algunos de los tratamientos con plantas medicinales que se empleaban en su mayoría eran en forma de infusiones, que aún en la actualidad se utilizan.

INFUSION es una operación farmacéutica de verter agua hirviendo sobre drogas vegetales para obtener sus principios activos medicamentosos (9).

Las plantas medicinales y sus partes son una fuente primaria de productos para la industria farmacéutica. Se usan cantidades grandes en la preparación de infusiones y decocciones, en países en desarrollo; donde la medicina tradicional es todavía de gran ayuda, utilidad e importancia económica y en los países industrializados, donde alguna vez la población proporcionó el crecimiento de uso de drogas crudas para la medicación misma (21).

### 3.3 GENERALIDADES DEL TÉ.

El Té es una infusión de hojas, flores frescas o secas de diferentes plantas, obteniéndose una bebida aromática y en ocasiones se considera medicinal (8).

Las plantas que se utilizan para preparar té se pueden cultivar bajo una amplia variedad de condiciones climáticas, desde mediterráneas hasta tropicales. En términos generales, cuanto más cercana al ecuador se encuentre la zona de cultivo de plantas para preparar té, mayor altitud será necesaria para conseguir un nivel determinado de calidad (28).

En muchos países en desarrollo, el té es importante como fuente de divisas y como fuente de empleo y de ingresos para muchos habitantes de las zonas rurales. En la conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo, se examinó la posibilidad de aumentar el valor de las exportaciones de té de los países en desarrollo, en primer lugar, mejorando o cambiando la forma en que se comercializa el té a granel y, en segundo lugar, elaborando el té antes de su exportación, elevando así el valor añadido (22).

#### 3.3.1 Té a granel y Té elaborado.

**TÉ A GRANEL:** Después de la recolección, el té se manufactura rápidamente en el lugar de producción o cerca del mismo, antes de que se deteriore. Se clasifica el té en diferentes calidades antes de envasarlo en cajas de unos 50 kg. y enviarlo para subastarlo o venderlo directamente a un mezclador (22).

**TE ELABORADO:** La elaboración puede consistir únicamente en la mezcla de diferentes calidades de té antes de la venta a granel. El término elaboración se utiliza para describir la mezcla y el envasado del té en paquetes y bolsitas para la venta, actividad que puede realizarse en el país exportador o en el país importador, también abarca la fabricación de té soluble, que puede realizarse directamente con té recién recogido o con té elaborado (22)

### **3.3.2 Calidad del té.**

Todos los derivados naturales (productos puros, extractos y medicamentos crudos) deben satisfacer un requisito definido: deben tener una calidad estandarizada, que puede garantizar la consistencia de sus propiedades farmacológicas y/u organolépticas. Si se asocia el concepto de regularización para productos puros, medicamentos crudos y extractos, con una serie de parámetros como: origen del medicamento, periodos de recolección, identificación, determinación cuantitativa de los componentes activos, propiedades químico físicas (pH sólidos totales), contaminantes externos (metales tóxicos, pesticidas), contenido microbiológico e impurezas del potencial; se obtendría una excelente calidad (21)

El té elaborado se clasifica en un gran número de grados, por lo que no existe un índice único para la medición de la calidad. La calidad del té varía considerablemente según el origen, el tipo de manufactura y la época del año. Debido a que el té es higroscópico (es decir que absorbe con facilidad la humedad del ambiente), no se puede almacenar durante periodos prolongados en la mayoría de los países productores. La vida del té es también muy limitada en comparación con la de otros productos básicos tales como el café; el té comienza a deteriorarse después de cuatro o cinco meses, e incluso la calidad puede resultar afectada si el té se guarda durante un lapso que exceda de seis a ocho meses (22, 28).

### 3.3.2.1 Métodos de sanitización.

La preservación de los alimentos está asociada con el tratamiento externo aplicado para lograr una mayor duración o una mejor calidad del producto, actualmente podemos reunir estos métodos en siete grupos específicos (26):

1. Manejo aséptico
2. Calor
3. Temperaturas bajas
4. Deshidratación
5. Presión osmótica
6. Químicos
7. Radiaciones

Dichos sistemas de conservación se basan en uno o más de los siguientes principios:

- a) Prevención o eliminación de contaminantes.
- b) Inhibición del desarrollo y metabolismo microbiano (acción microbiostática).
- c) Muerte de los microorganismos (acción microbicida).

Todos buscan mantener las características originales del producto por el mayor tiempo posible (26).

Para la aplicación que nos interesa, tres de estos grupos pudieran ser utilizados: a) calor, b) deshidratación, c) radiaciones.

El tratamiento por calor lo encontramos como uno de los más usados, ya que la temperatura elevada es uno de los métodos más seguros y fáciles para conservar los alimentos, pudiendo aplicarse a una amplia gama de productos. Este puede subdividirse en tres sistemas específicos (26):

- a) Ebullición
- b) Vapor a presión
- c) Pasteurización

El calor se emplea para destruir los microorganismos existentes en latas, frascos y otros recipientes destinados a contener alimentos; la preservación de estos por calor requiere que sea conocida la resistencia de los microorganismos al calor; en particular las esporas (las cuales son más resistentes), ya que la muerte de la flora microbiana es una relación entre el tiempo y la temperatura de proceso (26).

Uno de los procesos más usados en la industria, es el conocido como pasteurización, el cual consiste en elevar la temperatura de un líquido aproximadamente a 62°C, durante 30 minutos y posteriormente enfriarlo bruscamente.

A pesar de todas sus ventajas, uno de los principales problemas del tratamiento con altas temperaturas, es que no todos los alimentos conservan su buen sabor, características organolépticas o su valor nutritivo al ser procesados.

#### **3.3.2.1.1 Métodos alternos para la sanitización de especias.**

Algunos métodos alternativos potenciales para la reducción de la carga microbiana en especias, incluyen irradiación con rayos gamma, tratamiento por medio de microondas, deshidratación y exposición al óxido de propileno o bromuro de metilo (7)

El uso de este gas es ampliamente preferido para el control de microorganismos cuando es comparado con cualquiera de los métodos alternos.

La irradiación con rayos gamma es efectiva para reducir la flora microbiana de una gran cantidad de especias sin afectar su calidad (su uso está aprobado por la FDA), la irradiación



con rayos gamma es considerada tan efectiva como el óxido de etileno (OE) para el control de contaminaciones microbiológicas, apesar de esto, muchos procesadores de alimentos se niegan a aceptar especias tratadas con este método, debido a que no quieren arriesgarse a una respuesta adversa de los consumidores hacia sus productos (7).

Debido a sus estrictas normas ecológicas y de medicina ocupacional en California, se ha generado gran interés para usar óxido de propileno en ves de óxido de etileno para sanitizar especias. El óxido de propileno es 10 veces menos tóxico que el óxido de etileno, sin embargo la Environmental Protection Agency (EPA) estima que el óxido de propileno es menos efectivo que el óxido de etileno como esterilizante, ya que es de menor reactividad y menos penetrante que el óxido de etileno, además de ser más difícil de remover con aireación después del tratamiento (7).

Los otros métodos son mucho menos efectivos que el óxido de etileno para la reducción de la carga microbiana en especias.

Otra limitante para el cambio de método de sanitización es el impacto económico que éste trae consigo, desde la inversión en modificar las cámaras de óxido de etileno a que funcionen con óxido de propileno, hasta la campaña educacional al consumidor y que éste acepte sin prejuicios las especias irradiadas con rayos gamma (7).

Hay pocos agentes o tal vez ninguno, que sean sustitutos totalmente confiables del OE para usos regulados por la EPA y la FDA, el OE parece tener uso presente y futuro en la rama alimenticia.

### 3.3.2.2 Factores de contaminación que alteran la calidad del té.

#### 3.3.2.2.1 Suelo.

Así como el almacenamiento puede provocar contaminación microbiana y micotoxinas, también puede haberla antes de que las plantas sean obtenidas o cosechadas, como lo es la contaminación proveniente del medio ambiente. Pocos ambientes tienen tanta variedad de microorganismos como es el suelo; éste es una mezcla microscópica formada por miles de millones de bacterias, hongos y virus, los cuales siempre están en condiciones de contaminar las superficies de las plantas que ahí crecen (7, 26).

#### 3.3.2.2.2 Agua.

También influye la contaminación proveniente del agua; comúnmente existe dentro flora microbiana, de los géneros *Streptococcus*, *Enterobacter* y *Escherichia*, que aunque no son flora normal de agua, son contaminantes muy comunes y afectan fácilmente al ser humano (4).

### 3.3.3 Elementos de distribución de té.

El té, como otros productos básicos elaborados, pasa por varios intermediarios antes de llegar al consumidor final. La estructura más común abarca cinco personas: el productor, el agente, el mezclador, el mayorista y el minorista. Como el agente, en general, actúa en nombre del productor (es decir, que el té rara vez llega a ser propiedad del agente), el té propiamente dicho sólo está presente en tres transacciones. Recientemente se ha reducido, en algunos casos, el número de intermediarios. Para las ventas directas, es posible que los agentes no sean necesarios y, por otra parte, se ha observado que los mezcladores tienden cada vez más a vender directamente a los minoristas, con lo que el número de transacciones se reduce a dos. Por

supuesto, la estructura varía considerablemente según los países y según los mezcladores. Los pequeños mezcladores a veces compran té a los comerciantes en lugar de entrar en el mercado, y aun los mezcladores importantes recurren a los comerciantes para complementar sus existencias (22). Ver la figura 3.3.3.

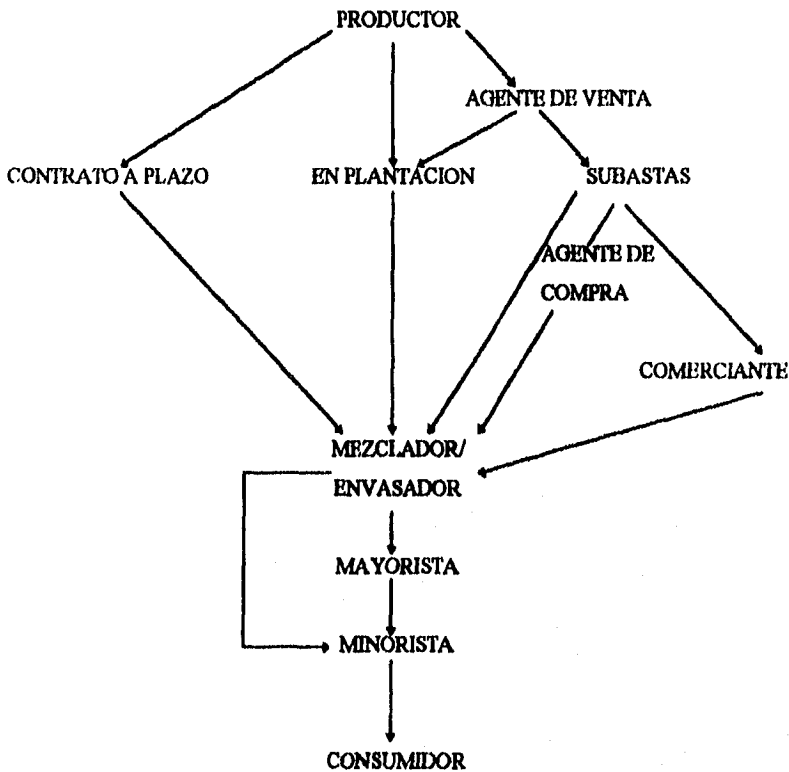


Fig 3.3.3. Elementos que intervienen en la producción y distribución del té (22).

### 3.3.4 Presentaciones comerciales del té.

Otros cambios importantes han surgido de la creciente búsqueda de los alimentos de fácil preparación, como por ejemplo, la bolsa de té, inventada por un importador, que puso muestras de su producto en bolsitas, fáciles de manejar (7)

El consumo cada vez mayor de té en bolsitas y soluble reduce de hecho la cantidad de té que se precisa por taza y eleva también la demanda de los té ordinarios (más baratos) a expensas de los de alta calidad (28).

Una encuesta dirigida por la Asociación Americana del Té, mostró que para 1970, las bolsitas de té acaparaban el 48.3% del mercado, el instantáneo tenía un 30.7%, las mezclas del instantáneo (que ya contienen endulzantes, colorantes y saborizantes) contaban con un 15.1%, y el té a granel solo tenía un 7.9% del mercado total. El té en bolsitas representa alrededor de 10% del volumen del consumo mundial y entre los factores que parecen haber estimulado el consumo de té soluble figuran la comodidad de su uso como refrescos y la creciente utilización generalizada de las máquinas vendedoras (7, 28).

El té sigue siendo una bebida relativamente barata en los países desarrollados, donde compiten con muchas bebidas que tratan de reemplazarla. En la proyección se tiene en cuenta la escasez de insumos esenciales, como son los fertilizantes, así como la consiguiente contracción de las utilidades de los productores (28).

### 3.4 TE DE MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*).

La *Matricaria chamomilla*, mejor conocida como "manzanilla", es la traducción del griego "*chamamelon*" que es manzana de tierra o enana, y de ahí el diminutivo manzanilla, aludiendo a la forma del botón floral de la cabezuela o, según Plinio, a cierto olor a manzana

que despiden las flores. *Matricaria* se origina a su vez de "matrix", la matriz, porque estas plantas se consideraron excelentes para este órgano (10).

### 3.4.1 Descripción.

La *Matricaria chamomilla* es una hierba anual de 20 a 50 cm de altura, más o menos ramosa, lampiña, con las hojas profundamente divididas en lacinias muy finas, filiformes, y con las ramitas terminadas en cabezuelas de botón amarillo dorado y ligulas blancas. Lo que rodea la cabezuela está formado por hojitas verdes criadas, cada una de ellas, por una membranita incolora o rubia. El botón floral si se corta a lo largo, se ve que las florecitas que lo forman se infieren sobre un receptáculo cónico, hueco. El tallo y las hojas de esta planta saben a hierba, y son aromáticas. Las flores son un poco amargas y despiden el característico olor a manzanilla. La floración es a partir del mes de abril, y prosigue floreciendo durante buena parte de la primavera y hasta en verano en las tierras altas. La manzanilla pertenece a la familia de las compuestas (8, 10).

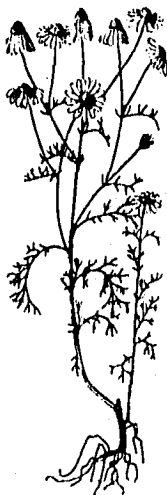


Fig. 3.4.1. Esquema de la *Matricaria chamomilla* (27).

### 3.4.2 Recolección.

Para la recolección debe elegirse un día sereno y recoger la planta cuando el sol está ya en lo alto, desde media mañana hasta el atardecer. Sólo se guardan las cabezuelas, con la menor parte posible de su cabillo. Las cabezuelas así recogidas se extienden sobre papeles, en lugar ventilado y a la sombra. Tanto el amarillo del botón central de la cabezuela como la blancura de la corona de ligulas han de conservarse en toda su pureza después de secas las cabezuelas. Con ellas se llenan saquitos de tela, y se guardan en cajas bien tapadas y en lugar seco (10).

### 3.4.3 Composición.

La *Matricaria chamomilla* ha sido muy estudiada y su composición es muy compleja. El más importante de sus productos es la esencia,, que se saca de las cabezuelas, por destilación, en cantidades variables. La esencia de manzanilla se compone de un hidrocarburo y de un alcohol sesquiterpénico, un alcohol tricclico, otros alcoholes terciarios en su mayor parte diciclicos, así como del llamado camazuleno, con un anillo de siete átomos de carbono combinado con otro de cinco (10).

Además de la esencia, en las cabezuelas de la manzanilla se han hallado el ácido salicílico, un ácido octílico, apigenina, umbeliferona y el éster metílico de la misma, pequeñas cantidades de dioxicumarina, un glucósido amorfo (que por hidrólisis da apigenina), sustancias resinosas, con triacotano, fitosterina, otro glucósido fitosterínico, etc. En la manzanilla se encuentran notables cantidades de vitamina C; en la planta florida y desecada, hasta 0.73%.

### 3.4.4 Propiedades farmacológicas.

La *Matricaria chamomilla* es antispasmódica (esta facultad se atribuye a la apigenina), sedante, y se utiliza principalmente en los trastornos de tipo nervioso de mujeres y niños; en

ellas, sobre todo, cuando sufren las molestias de sus periodos menstruales. Es también estimulante de la digestión. Actúa favoreciendo los movimientos peristálticos del intestino y, por lo tanto, tienen propiedades carminativas (expulsión de gases del estómago o intestino). En la manzanilla se han reconocido moderadamente facultades desensibilizantes o antihistamínicas, con las cuales se combaten ciertos estados alérgicos. El camazuleno o azuleno de la manzanilla se utiliza actualmente en soluciones al 2% para combatir el asma bronquial de los niños, en inyección intramuscular (10).

#### 3.4.5 Usos.

La forma más corriente de administrar la *Matricaria chamomilla* es en infusión, que se prepara con media docena de cabezuelas por taza, y si se pretende que obre como digestiva, cuando se sospecha que la comida va a sentar mal, se administra lo más caliente posible, inmediatamente después de tomar el último bocado. Se puede endulzar con un poco de azúcar, pero son muchos los que la prefieren sin él (10).

Como carminativa, todavía se emplea en los lavados intestinales. La flor de manzanilla se utiliza también para dar color rubio al cabello o para conservarlo de este color. Para ello se recomienda la infusión concentrada de manzanilla. También se prepara una loción (10).

#### 3.4.6 Producción en México.

La manzanilla es nativa de Europa e introducida en América, se cultiva ampliamente en todo México, en escala comercial y doméstica. Los principales estados productores de té del país son Puebla y el Estado de México, impulsados principalmente por su cercanía a compañías empaecedoras establecidas en la capital del país (7).

### **3.4.7 Proceso de manufactura.**

El proceso actual de manufactura para el té de manzanilla comienza cosechando la flor, cuidando no cortar junto con ella más de un 5% del tallo; se deja secar al aire libre y estando ya a un nivel de humedad de aproximadamente 9% se pasa por un molino para obtener un producto con una granulometría aproximada de malla 10, este producto a granel es empacado en sacos de 50 Kg., los cuales son vendidos a los diferentes empacadores de té (7).

El producto, antes de ser empacado, es enviado a compañías que lo someten a un proceso de sanitización, el cual reduce las cuentas microbianas a cero (7).

Estando ya sanitizado, es empacado en bolsitas de papel filtro con un contenido neto de 1 gr. Algunas compañías colocan una envoltura de celofán a cada una de ellas para conservar su higiene microbiológica y su sabor por más tiempo (7).

En esta presentación es como el producto llega a el público para su consumo final.

### **3.5 NORMAS DE CALIDAD.**

Una manera de aumentar la aceptación del té y de presentar al consumidor un producto mejorado es la introducción de normas mínimas para el té. Este control de calidad tendría dos efectos principales; en primer lugar, daría mayor satisfacción al consumidor e influir así la demanda y, en segundo lugar, eliminaría del mercado los té inferiores, los desechos de té, los té rancios y los té contaminados.

Actualmente podemos encontrar la manzanilla para infusiones (té de manzanilla), definida dentro de las Normas Oficiales Mexicanas NOM-F 293-1982 como:



El producto elaborado con la flor amarilla y su tallo, sana y limpia de la hierba manzanilla común (*Matricaria chamomilla L.*) que es sometida a un proceso de secado y molienda, usándose como infusión estomacal, antiespasmódica y febrífuga (20).

### 3.5.1 Especificaciones para la manzanilla.

Las especificaciones que indica la Norma Oficial Mexicana son las siguientes (20):

#### 3.5.1.1 Sensoriales.

Color:       Amarillo característico  
Olor:         Dulce y fresco  
Sabor:        Característico  
Aspecto:      Fragmentos pequeños de la manzanilla

#### 3.5.1.2 Físicas y químicas.

Humedad (%):	12 max.
Cenizas (%):	10 max.
Extracto etéreo (%):	4.5 max.
Extracto acuoso (%):	30 min.
Proteínas (%):	12 min.
Fibra cruda (%):	15 max.
Alcalinidad de las cenizas solubles (cm <sup>3</sup> HCl 0.1 N/100 g)	35 max.
Cenizas solubles en H <sub>2</sub> O (%):	4 max.

### **3.5.1.3 Microbiológicas.**

El producto objeto de esta norma al ser preparado de acuerdo a las instrucciones declaradas por el fabricante, no debe contener microorganismos patógenos, toxinas microbianas, ni otras sustancias tóxicas que puedan afectar la salud del consumidor o provocar deterioro del producto (20).

### **3.5.1.4 Materia extraña objetable.**

La manzanilla para infusiones debe estar libre de insectos vivos, enmohecimiento, y prácticamente libre de insectos muertos, fragmentos de otros vegetales y de insectos, pelos y excretas de roedores, así como de cualquier otra materia extraña.

La proporción total de materia extraña, incluida la originada por la misma planta (ratz, partículas comunes, etc.), no debe exceder de 0.5% de producto terminado (20).

### **3.5.1.5 Aditivos.**

En la manzanilla para infusiones, no se permite el empleo de aditivos (20).

### **3.5.1.6 Contaminantes químicos.**

El producto objeto de esta norma no deberá contener ningún contaminante químico en cantidades que puedan representar un riesgo para la salud. Los límites máximos para estos contaminantes quedan sujetos a lo que establezca la Secretaría de Salubridad y Asistencia (20).

### **3.5.2 Muestreo.**

Cuando se requiera el muestreo del producto, éste podrá ser establecido de común acuerdo entre productor y comprador, recomendándose el uso de la Norma Oficial Mexicana NOM-Z-12. El muestreo para efectos oficiales estará sujeto a la legislación y disposiciones de la Dependencia Oficial correspondiente (20).

### **3.5.3 Envase, marcado, etiquetado y embalaje.**

#### **3.5.3.1 Envase.**

El producto objeto de esta norma se debe envasar en recipientes de un material resistente e inocuo, que garantice la estabilidad del mismo, que evite su contaminación, no altere su calidad ni sus especificaciones sensoriales (20).

El producto se envasará en bolsitas individuales hechas de un papel filtro especial, y se colocará una determinada cantidad de bolsitas en una caja de cartón, esta última se considerará el envase (20).

#### **3.5.3.2 Marcado en el envase.**

Cada envase del producto, debe llevar una etiqueta o impresión permanente visible e indeleble con los siguientes datos (20):

- Denominación del producto, conforme a la clasificación de esta norma.
- Nombre o marca comercial registrada, pudiendo aparecer el símbolo del fabricante.
- El "Contenido Neto" de acuerdo con las disposiciones de la Secretaría de Comercio.
- Nombre y domicilio del fabricante.

- La leyenda "HECHO EN MEXICO".
- Texto de las siglas Reg. S.S.A. No. \_\_\_\_\_ "A" debiendo figurar en el espacio en blanco el número de registro correspondiente.
- Otros datos que exija el reglamento respectivo o disposiciones de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.
- Número del lote o fecha de fabricación.

### **3.5.3.3 Marcado en el embalaje.**

Deben anotarse los datos necesarios de "marcado en el envase", para identificar el producto y todos aquellos otros que se juzguen convenientes tales como las precauciones que deben tenerse en el manejo y uso de los embalajes (20).

### **3.5.3.4 Embalaje.**

Para el embalaje del producto objeto de esta norma, se deben usar cajas de cartón o envolturas de algún otro material apropiado, que tengan la debida resistencia y que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez faciliten su manejo en el almacenamiento y distribución de los mismos, sin exponer a las personas que los manipulen (20).

### **3.5.4 Almacenamiento.**

El producto terminado debe conservarse en locales que reúnan los requisitos sanitarios que señala la Secretaría de Salud (20).

### **3.5.5 Determinación de microorganismos.**

En la Norma Oficial Mexicana NOM-F-248: Alimentos para Humanos - Microbiológicos - Especies y Condimentos - Determinación de Microorganismos, se realiza la técnica para cuenta total de hongos de la muestra a analizar, como se menciona adelante.

#### **3.5.5.1 Preparación de la muestra.**

Se pesan 10 g de la especia transfiriéndose a un frasco de dilución, completando a 100 ml con solución buffer de fosfatos, y agitando durante 5 minutos. Se preparan diluciones decimales si se cree conveniente, agitándose durante un minuto y dejando asentar las partículas gruesas antes de medir la cantidad para la siguiente dilución o para sembrar las cajas de Petri (19).

#### **3.5.5.2 Cuenta de hongos y levaduras.**

Se transfiere 1 ml de la muestra o diluciones según se estime necesario a cajas de Petri estériles. Se agregan de 12 a 20 ml del medio agar-papa-glucosa (PDA) acidificado a un pH de 3.5 con ácido tartárico. Incubando dos cajas a 28°C por 5 días, reportando las colonias de hongos y levaduras que aparezcan en las placas (19).

#### **3.5.5.3 Interpretación de resultados.**

Se cuentan las colonias que aparezcan en la placa multiplicándolas por la inversa de la dilución para obtener el número de éstas por mililitro o gramo de muestra (19).

# *CAPITULO*

## *IV*

## ANTECEDENTES DE LAS AFLATOXINAS

### 4.1 GENERALIDADES DE LAS MICOTOXINAS.

Ciertas enfermedades transmitidas por alimentos no están producidas por bacterias o toxinas bacterianas sino por micotoxinas, virus, rickettsias, helmintos, protozoos y por el consumo de alimentos con sustancias tóxicas (11).

Las toxinas son metabolitos de los hongos y son venenosos para los animales y presumiblemente para el hombre, siendo conocidos como micotoxinas. El término "micotoxina" proviene del griego *mykes*, que significa "hongo", y de *toxicum*, que significa "veneno" (23, 30).

Recientemente se han señalado sus propiedades carcinogénicas y su presencia en muchos alimentos. Las enfermedades que producen, usualmente al ingerirse alimentos contaminados, se denominan micotoxicosis (11, 23).

En esencia, una micotoxicosis consiste en que los hongos que producen toxinas contaminan o colonizan los órganos de las plantas, tales como flores, frutos u hojas, pero no son formadas durante el crecimiento del hongo, sino hasta después de 48 horas de la germinación de la espora. Esto quiere decir que los hongos tóxicos desaparecen de los granos o productos en los que han crecido, al verse limitados por condiciones desfavorables para su crecimiento, quedando solamente las micotoxinas, lo que hace particularmente difícil verificar la calidad sanitaria de un determinado producto. Entonces, o después del almacenamiento, y con cierto porcentaje de humedad producen sus sustancias venenosas, permaneciendo estas últimas activas hasta la preparación de los forrajes o de los productos alimenticios (5, 17, 18).

Para reconocer a las micotoxinas en un determinado producto, sea grano u otra materia prima, se tienen que recurrir a técnicas químicas y biológicas para conocer su calidad sanitaria (17).

En la micotoxicosis la cantidad de hongo consumido es mínima, por lo que el trastorno en el hombre o en los animales es causado casi exclusivamente por la toxina liberada en el sustrato utilizado como alimento, de manera que si con éste se consume algo de micelio y de esporas del hongo tóxico, es en una proporción insignificante (12).

#### 4.2 TIPOS DE MICOTOXINAS.

Existen en la actualidad diferentes tipos de micotoxinas, que son las siguientes (23):

Ácido ciclopizónico, ácido cójico, aflatoxina, butenolida, cicloclorotina, citrinina, citroviridina, crotocina, esterigmatocistina, fusarenon, luteoesquirina, neosolaniol, nivalenol, ocratoxina A, oxalatos, patulina, roridina, rubratoxina, rugosina, scirpena, toxina tremorgénica, tricotecena (toxina T<sub>2</sub>), tricoquermina, tricotecina, venucarina, zearalenona.

#### 4.3 GENEROS DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS.

Los hongos que producen toxinas, y que son causantes de micotoxicosis, pertenecen a varios géneros. A continuación se describen los mohos importantes (23):

Los géneros fúngicos predominantes en los productos almacenados son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, y *Pithomyces* (11, 23).



#### 4.3.1 Efectos que producen las micotoxinas.

Las micotoxinas tienen una estructura y propiedades muy variables, como los compuestos químicos, siendo casi todas ellas relativamente termoestables; forman compuestos no volátiles que pueden producir enfermedades agudas o crónicas si se ingieren con los alimentos. Sus efectos patológicos son: irritación de la piel y de los ojos, diuresis, trastornos hepáticos, extensas hemorragias corporales, acción neurotóxica, estimulación hormonal, fenómenos teratogénicos, mutagénicos y necrosis (23).

#### 4.3.2 Micotoxinas producidas por *Aspergillus* y sus efectos tóxicos.

Las micotoxinas más importantes de los aspergilos, se muestran en la tabla 4.3.1 (23).

Tabla 4.3.2 (23).

TOXINAS	FUENTE PRINCIPAL	EFEECTO
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Hepatotóxico, carcinógeno
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	Hepatocarcinógeno
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Hepatotóxico y nefrotóxico
Oxalatos	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Irritación gástrica, tetania
Acido cójico	<i>Aspergillus flavus</i>	Convulsivo
Toxina tremorgénica	<i>Aspergillus flavus</i>	Temblores, convulsiones

#### 4.3.3 Micotoxinas producidas por *Penicillium* y sus efectos tóxicos.

El género *Penicillium* es un contaminante habitual de los alimentos y también fuentes de varios metabolitos tóxicos. Las toxinas más importantes producidas por este género se muestran en la tabla 4.3.3 (23).

Tabla 4.3.3 (23).

TOXINA	FUENTE PRINCIPAL	EFEECTO
Rubratoxina	<i>Penicillium rubrum</i> <i>Penicillium purpurogenum</i>	Necrosis hepática
Patulina	<i>Penicillium urticae</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium giganteus</i>	Neurotóxica
Acido ciclopiazónico	<i>Penicillium cyclopium</i>	Neurotóxica
Toxina tremorgénica	<i>Penicillium cyclopium</i>	Neurotóxica
Citrinina	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium citreoviride</i>	Nefrotóxicas
Citroviridina	<i>Penicillium citreoviride</i>	Neurotóxica al C.N.S.
Luteosquirina	<i>Penicillium islandicum</i>	Hepatóxica
Cicloclorotina	<i>Penicillium islandicum</i>	
Rugolosina	<i>Penicillium rugulosum</i>	Hepatóxica

#### 4.3.4 Micotoxinas producidas por *Fusarium* y sus efectos tóxicos.

Las micotoxinas producidas por *Fusarium* se muestran en la tabla 4.3.4 (23).

Tabla 4.3.4 (23).

TOXINA	FUENTE PRINCIPAL	EFECTOS
Tricotecenes (Toxina T <sub>2</sub> )	<i>Fusarium tricinatum</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Iritación de la piel, impide la síntesis de las proteínas
Nivalenol	<i>Fusarium nivale</i>	Iritación de la piel, impide la síntesis de las proteínas
Fusarenon	<i>Fusarium nivale</i>	Impide la síntesis de las proteínas
Zearalenona	<i>Fusarium roseum</i> <i>Fusarium tricinatum</i>	Iritación de la piel, impide la síntesis de las proteínas
Butenolida	<i>Fusarium tricinatum</i> <i>Fusarium nivale</i>	Necrosis de la cola de los vacunos

4.3.5 Micotoxinas producidas por *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* y *Cephalosporium*.

Los tricotecenes son un grupo químicamente afín de metabolitos fúngicos biológicamente activos, producidos en cultivos por varias especies de *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, y *Cephalosporium* (23). Ver la tabla 4.3.5.

Tabla 4.3.5. (23)

TOXINA	HONGO PRODUCTOR
Crotocina	<i>Cephalosporium</i>
Verrucarina	<i>Myrothecium</i>
Roridina	<i>Myrothecium</i> <i>Stachybotrys</i>
Scirpena	<i>Trichothecium</i>
Tricotocina	<i>Trichothecium</i>
Tricodermina	<i>Trichoderma</i>

#### 4.4 GENERO Aspergillus.

Aspergillus, las especies de este género se encuentran en casi todos los lugares, sobre cualquier tipo de sustrato. La industria utiliza algunos tipos de aspergilos, de los cuales otros producen enfermedades en el hombre y en los animales, como es la micotoxicosis (23).

##### 4.4.1 Estructura microscópica del Aspergillus.

Todas las especies de este género tienen una estructura básica que es la siguiente: el micelio es septado, en parte sumergido y en parte aéreo, con conidióforos más o menos perpendiculares a una célula pedunculada que se ensancha en su ápice, terminando en un ensanchamiento, la vesícula que contiene una o dos filas de esterigmas, la última de las cuales es la portadora de las cadenas de conidios (23). Ver la figura 4.4.1.

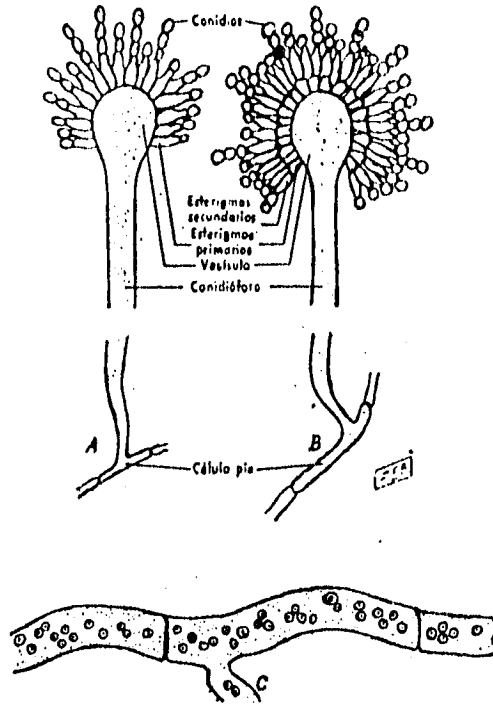


Fig. 4.4.1. Estructura microscópica de *Aspergillus*. a) Conidióforo con una hilera de esterigmas. b) Conidióforo con dos hileras de esterigmas. c) Hifa en la cual se puede ver el estado multinucleado (1).

#### 4.4.1.1 Morfología macroscópica y microscópica de Aspergillus flavus.

A. flavus: sus colonias en agar dextrosa y papa (PDA), se extienden rápidamente, y al principio tienen un color verde amarillento, que se va oscureciendo con el tiempo hasta convertirse en verde pardusco. Es un moho septado, no poseen esporas sexuales, los conidióforos libres que surgen del micelio irregularmente, con extremidades de tamaño variable, aproximadamente radiadas, que acaban siendo de forma algo columnar, con vesículas en forma de cúpula o de botella. Las hifas aéreas son fértiles, las hifas sumergidas son vegetativas. Posee esterigmas dobles de los que se desprenden los conidios globosos o de forma parecida a la pera, e irregulares (5, 23).

#### 4.4.1.2 Clasificación de Aspergillus flavus.

El Aspergillus flavus se encuentra clasificado de la siguiente forma (5):

Phylum Eumycetes  
Clase Deuteromycetes  
Orden Moniliales  
Familia Moliliaceas  
Género Aspergillus

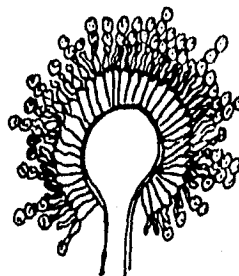


Fig. 4.4.1.2 Estructura microscópica de A. flavus (23).

#### 4.4.1.3 Morfología macroscópica y microscópica de A. parasiticus.

A. parasiticus: en un cultivo con PDA sus colonias son verdes, de tonos más oscuros que el A. flavus. Los conidióforos son cortos e irregulares, con puntas de color verde amarillento fuerte. Suelen tener una sola serie de esterigmas, conidios de forma globosa a algo poriforme, y muy irregular (23).



Fig. 4.4.1.3. Estructura microscópica de A. parasiticus (23).

## 4.5 ORIGEN DE LAS AFLATOXINAS.

La palabra aflatoxina se forma a partir del nombre del hongo que la produce, A. flavus, la primera letra, "a", proviene del género Aspergillus, las siguientes tres letras "fla" corresponden a la especie, flavus, y seguida de la palabra toxina que significa "veneno" (30).

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios que se forman después de la fase logarítmica de crecimiento, ya sea del A. flavus o A. parasiticus. Se encuentran, como contaminantes naturales, en muchos tipos de alimentos, además del cacahuate también en la harina de semilla de algodón, el maíz, la mandioca, el arroz, los frijoles, el trigo, el sorgo y la cebada (23).

#### 4.5.1 Tipos de aflatoxinas.

Hay doce tipos diferentes de aflatoxinas (23, 30):

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, GM<sub>1</sub>, B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>, Q<sub>1</sub>, P<sub>1</sub> y aflatoxicol.

Las dos aflatoxinas o metabolitos más importantes se denominan B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> por su fluorescencia azul (del inglés blue para B<sub>1</sub>) o verde (del inglés green para G<sub>1</sub>), cuando se exponen a cromatografía de capa fina a la luz ultravioleta de longitud de onda larga. Las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> son dihidroderivados de la B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>. Otras aflatoxinas afines serían la B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub> y GM<sub>1</sub>. Las aflatoxinas M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, (del inglés milk), y P<sub>1</sub> son derivados hidroxilados de la B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> que se excretan por la orina, heces y leche como productos metabólicos de la B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> después de su consumo por mamíferos. Se trata, en todo caso, de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados (11, 12).

La aflatoxina B<sub>1</sub> puede ser reducida por enzimas citosólicas NADPH-dependientes para producir aflatoxicol. Debido a que esta reacción es reversible, el aflatoxicol representa una forma de almacenamiento de aflatoxina B<sub>1</sub>; otro metabolito detoxificado producido a partir de la oxidación P-450 de la aflatoxina B<sub>1</sub> es la aflatoxina Q<sub>1</sub> (30).



4.5.1.1 Estructuras químicas de las aflatoxinas.

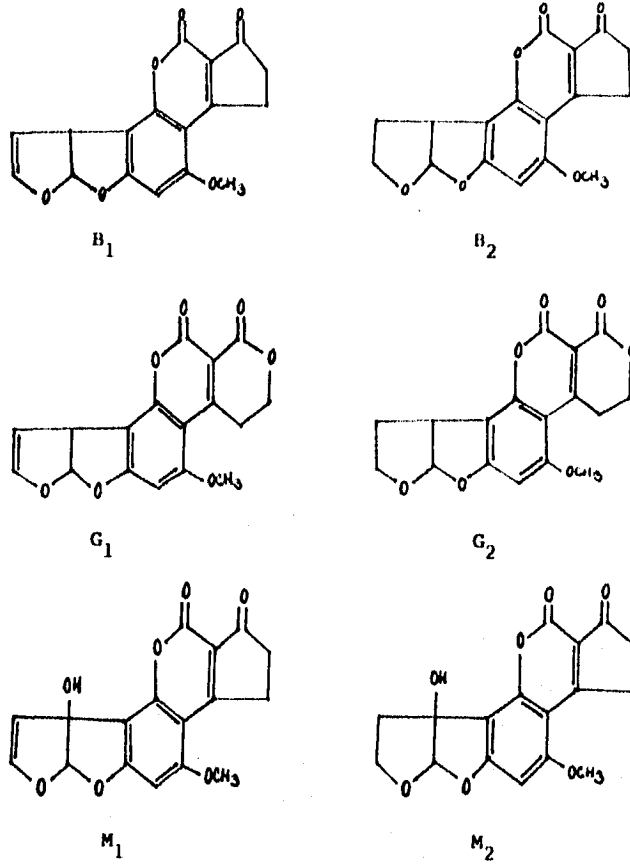
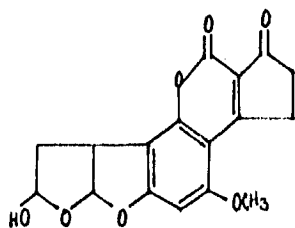
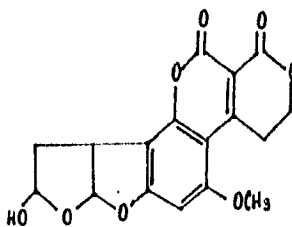


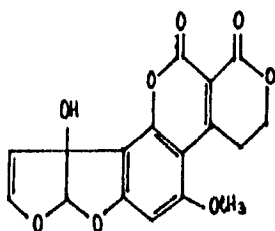
Fig. 4.5.1.1. Estructuras de Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> (30).



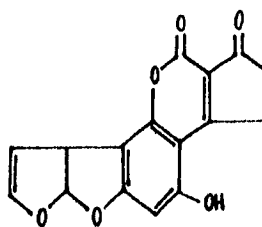
B<sub>2a</sub>



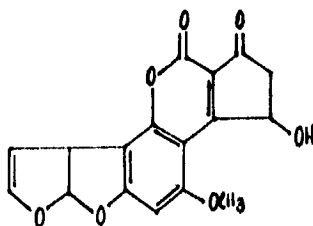
G<sub>2a</sub>



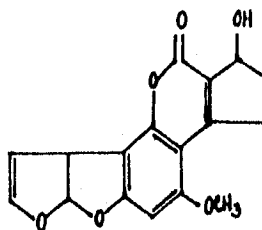
GM<sub>1</sub>



P<sub>1</sub>



Q<sub>1</sub>



Aflatoxicol

Continuación: Estructuras de Aflatoxinas B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>, GM<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub> y Aflatoxicol (14, 30).

#### 4.5.2 Características químicas de las principales aflatoxinas.

La fórmula empírica, pesos moleculares, y puntos de fusión de las aflatoxinas más grandes, se muestran en la siguiente tabla (6):

Tabla 4.5.2

Aflatoxina	Fórmula	Peso Molecular	Punto de Fusión
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312 g/gmol	268 - 269
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314 g/gmol	286 - 289
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328 g/gmol	244 - 246
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330 g/gmol	237 - 240

#### 4.5.3 Factores que intervienen en la producción de aflatoxinas.

##### 4.5.3.1 Humedad.

El factor más importante en el desarrollo y producción de las aflatoxinas del *A. flavus* es la humedad relativa de Aw 0.98 que circunda el sustrato natural. A una humedad relativa inferior al 70 % son muy pocos los hongos que pueden desarrollarse, por lo que después de secar los alimentos hasta que tengan un 15 % de humedad y un 50 % de humedad relativa, se producen muy pocas aflatoxinas (23).

Durante la cosecha la presencia de un alto contenido de humedad incrementa la probabilidad de producción de aflatoxinas, por lo que el tiempo de secado constituye un punto

crítico en la prevención de la contaminación. De igual forma, una aireación adecuada en el almacén también resulta esencial (30).

#### 4.5.3.2 Temperatura.

La temperatura óptima para el desarrollo del *A. flavus* es de 36 a 38°C. *A. flavus* crece lentamente a temperaturas menores de 12°C, y rápidamente a temperaturas hasta de 55°C; pero no produce aflatoxinas abajo de 12°C, ni arriba de 40-42°C, y para la producción de aflatoxinas, la temperatura mínima es de 12°C, la óptima de 25° C, a 30°C, y la máxima de 40°C a 42°C (17, 23).

A bajas temperaturas la producción de aflatoxinas B y G es aproximadamente igual, mientras que a temperaturas superiores la producción de las aflatoxinas B predomina sobre la de las G (30).

Las aflatoxinas son moléculas relativamente estables al calor, y los procesos térmicos comúnmente empleados en procesos de alimentos no las destruyen completamente. Solamente los procesos en que se utiliza calor seco, en los que las temperaturas alcanzan los 250°C, pueden resultar en la inactivación de aflatoxinas (30).

#### 4.5.3.3 pH.

El pH del medio de crecimiento tiene un cierto efecto sobre los procesos metabólicos primarios de los hongos; sin embargo, su efecto es más pronunciado en la biosíntesis de aflatoxinas. Los hongos aflatoxigénicos se desarrollan en un rango muy amplio de pH de 1.7 a 9.34, con un crecimiento óptimo entre 3.42 y 5.47. Sin embargo, la producción de aflatoxinas no ocurre a todos los valores de pH, ya que los valores muy ácidos inhiben la biosíntesis de estos compuestos (30).

Se ha observado que los factores que influyen en la producción de aflatoxinas no actúan individualmente sino como un todo. La cantidad de inóculo, temperatura, humedad del sustrato, condiciones físicas del sustrato, pH y crecimiento de otros hongos también interfiere en cuestión de horas (5).

#### 4.5.4 Toxicidad de las aflatoxinas.

La aflatoxina B<sub>1</sub> es la más tóxica de todas, afecta a diferentes animales. Otras aflatoxinas presentan efectos tóxicos o carcinogénicos frente a diversas especies de peces, mamíferos y aves. Las aflatoxinas consumidas por animales son acumuladas en el hígado, pero cierta cantidad se conserva en otros órganos y el resto es expulsado con las materias fecales o la orina. Debido a esto, es muy importante el control sanitario de los animales productores de carne y de leche (11, 12).

La toxicidad crónica y aguda del aflatoxicol es igual a la de la aflatoxina B<sub>1</sub>; por lo que este compuesto no se considera un metabolito detoxificado (30).

Si las vacas consumen piensos con aflatoxinas, excretan en la leche la M<sub>1</sub> y la M<sub>2</sub>. Aunque ambas son menos tóxicas que la B<sub>1</sub> y la B<sub>2</sub> de las que proceden, la M<sub>1</sub> conserva toxicidad y poder carcinogénico para muchos animales. Esta última se ha detectado también en la orina de mujeres filipinas que habían consumido crema de cacahuates con aflatoxinas (11).

Los patitos de un sólo día de edad son sumamente susceptibles a los efectos agudos de las aflatoxinas, con una DM<sub>50</sub> de 0.335 - 0.784 mg/kg. Las aves dejan de crecer, sufren hemorragias subcutáneas y una extensa proliferación biliar (23).

Los pollos son mucho menos susceptibles que los patos jóvenes y que los pavipollos. Se han dado casos también de proliferación biliar en los cerdos, terneros, corderos, perros, gatos. En la trucha, las aflatoxinas producen hepatomas (23).

La sensibilidad que los animales manifiestan hacia la toxicidad de las aflatoxinas depende de varios factores, que pueden ser: a) genéticos (especie, sexo, raza, etc.); b) fisiológicos (edad, estado nutricional, enfermedades, presencia de otros compuestos químicos, etc.); y c) ambientales (clima, vegetación, etc.). Además, la dosis y el tiempo de exposición a la toxina son muy importantes (30).

#### **4.5.4.1 Estudios sobre la toxicidad de las aflatoxinas.**

A partir del descubrimiento de las aflatoxinas, se han efectuado numerosos estudios para su detección en los alimentos (11).

No se tienen suficientes datos directos de los efectos de las aflatoxinas debido a la dificultad para exponerlo en forma experimental al riesgo de ingerir alimentos que contengan la sustancia tóxica. No obstante, se ha comprobado que en los países donde se acostumbra consumir alimentos emmohecidos, en muchos de los cuales se ha registrado la presencia de aflatoxinas, la incidencia de cáncer de hígado es muy alta. El daño hepático provocará insuficiencias tales como: problemas en la coagulación, insuficiente formación de proteínas, deficiente asimilación de vitaminas (5, 12).

#### **4.5.5 Legislación de aflatoxinas.**

La *Food and Drug Administration* (FDA) comenzó la vigilancia de la contaminación con aflatoxinas de los alimentos y piensos en 1963. Esta vigilancia se basa en dos criterios principales: 1. el efecto de las aflatoxinas en la salud y la productividad de los animales, y 2. la presencia de residuos tóxicos en alimentos de origen animal. Originalmente se estableció un nivel de 20 ppm de aflatoxina para que se procediera legalmente contra un alimento. El perfeccionamiento de los métodos de detección ha permitido que, actualmente, se puedan medir concentraciones más bajas y el límite hoy en día es de 15 a 20 partes por billón (ppb) de

aflatoxinas, así como la venta de leche cuyo contenido de aflatoxinas sea mayor a 0.5 ppb (11, 25, 30).

La póliza de la FIDA, la cual fue establecida en la década de los años setenta, está basada en la capacidad analítica con la que se contaba en esa época. Sin embargo, varias investigaciones posteriores han demostrado que niveles de aflatoxinas mucho mayores a 20 ppb no son perjudiciales para la salud de los animales, y no traen como consecuencia la presencia de residuos peligrosos en alimentos de origen animal destinados al consumo humano (25).

Al menos hasta el año de 1991, cincuenta países han establecido disposiciones reglamentarias para el control de aflatoxinas en alimentos; sin embargo, los niveles máximos de tolerancia establecidos varían mucho de un país a otro. Los límites de tolerancia para aflatoxinas por varias naciones tuvieron cierto alcance de 0 a 1000 microgramos/kilogramo (14, 25).

Los esfuerzos internacionales para analizar y controlar los niveles de aflatoxinas en los alimentos han dado como resultado el establecimiento de un límite (FAO/O.M.S./UNICEF Protein Advisory Board). Esta cifra se ha determinado sobre la base de obtener en monos un nivel no efectivo, con un coeficiente de seguridad de 50. Si se valora toda la información de que actualmente se dispone sobre aflatoxinas no se debe confiar en la harina de cacahuates como fuente proteica para la alimentación de niños en deficiente estado de nutrición (11).

# *CAPITULO*

## *V*



## DETERMINACION E IDENTIFICACION DE AFLATOXINAS

### 5.1 ANALISIS DE LAS AFLATOXINAS.

A medida que en ciertos países han venido estableciendo límites mínimos de aflatoxinas en los alimentos, se ha tenido la necesidad de mejorar la precisión de los métodos empleados para su cuantificación. No obstante que estos métodos están siendo desarrollados, existe una serie de factores que hacen difícil en la práctica tener el grado de precisión deseado (17).

Por lo que la técnica más empleada esta basada en diferentes tipos de pruebas para determinar la presencia y cantidad de aflatoxinas.

### 5.2 TIPOS DE PRUEBAS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA Y CANTIDAD DE AFLATOXINAS.

Existen dos tipos de pruebas que se llevan a cabo (17):

- a) Prueba presuntiva, que puede llevarse a cabo en el campo para determinar si se debe o no analizar la muestra para la detección de aflatoxinas.
- b) Los métodos analíticos para determinar en forma cuantitativa el nivel de contaminación por las aflatoxinas.

#### 5.2.1 Prueba presuntiva.

Esta prueba indica la posibilidad de presencia de las aflatoxinas y está basada en la propiedad de ciertas partículas que bajo la "luz negra" (luz ultravioleta de onda larga, 365 nm)

presenta una fluorescencia amarillo-verdosa brillante. Esta fluorescencia está asociada con la presencia de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Esta prueba no es del todo infalible, ya que existen en las muestras otros productos que por su color o fluorescencia pueden ser confundidos con el color de la prueba positiva. Sin embargo, se ha encontrado una buena correlación entre esa fluorescencia y la presencia de aflatoxinas (17).

### **5.2.2 Métodos analíticos.**

En general, los métodos analíticos para aflatoxinas constan de tres partes:

1. Muestreo.
2. Extracción y purificación.
3. Detección y determinación.

#### **5.2.2.1 Muestreo**

El muestreo consiste en la selección de una muestra representativa de la concentración de aflatoxinas de todo un lote, y constituye el aspecto más importante del análisis, ya que, si no se realiza adecuadamente, los resultados obtenidos no pueden considerarse como válidos. Las aflatoxinas generalmente no se encuentran uniformemente distribuidas en las muestras, sino que se concentran en puntos específicos que solamente componen un pequeño porcentaje respecto a todo el lote. Por esta razón, la técnica de colecta debe realizarse tomando porciones iguales de producto, al azar en diferentes puntos del lote, cubriendo un número suficiente de puntos (30).

Posteriormente, a fin de homogeneizar el contenido de aflatoxinas en toda la muestra, el tamaño de partícula se reduce mediante la molienda y mezclado de los granos o semillas. En el caso de productos líquidos o en forma de polvo o pasta, la contaminación es más homogénea, y por lo tanto, solamente se requiere un mezclado para obtener una muestra representativa del lote (30).

En cuanto al tamaño de la muestra, debe ser: a) representativa del lote, b) manejable para el análisis, y c) económicamente costeable (30).

#### 5.2.2.2 Extracción y purificación

Debido a la diversidad de la naturaleza de los productos que pueden ser analizados, no existe un solo método de extracción adecuada para todos los casos. En general, la naturaleza de la muestra y las propiedades de las aflatoxinas determinan el procedimiento de extracción necesario. Así pues, dado que las aflatoxinas son solubles en solventes ligeramente polares, la extracción casi siempre se realiza utilizando mezclas de solventes orgánicos en combinación con pequeñas cantidades de agua. Algunos de los factores que deben ser considerados en la selección del solvente de extracción adecuado son: costo, toxicidad y facilidad de desecho. Un ejemplo de solventes orgánicos son como el cloroformo, acetonitrilo, metanol, acetona, diclorometano, etil acetato, entre otros (17, 30).

Debido a que ciertos materiales, como pigmentos extraídos junto con las aflatoxinas, pueden interferir en el análisis, los extractos generalmente requieren ser sometidos a un proceso de purificación. Solamente en ciertos casos en que los extractos están muy limpios o cuando sólo se requieren resultados cualitativos, dicho proceso puede omitirse; sin embargo, siempre es recomendable reducir la complejidad química del extracto mediante la remoción de la materia extraña (30).

Con el propósito de eliminar esos compuestos es muy común el uso de la cromatografía en columnas; utilizando diferentes tipos de sustancias para adsorber el extracto de la muestra que contiene las aflatoxinas, entre ellas el gel de sílice, poliamida, florisil, saphadex u óxidos de aluminio. Los extractos se colocan en las columnas y se purifican con solventes que eluyen los pigmentos y la toxina permanece en la columna hasta que ésta es eluida con el solvente adecuado; de esta manera queda un extracto más puro que permite la identificación y cuantificación de la toxina (17).

### 5.2.2.3 Detección y determinación

La detección de aflatoxinas consiste en la aplicación de técnicas que indican la presencia o ausencia de aflatoxinas, o bien, si el nivel de aflatoxinas es superior o inferior a cierta concentración. Los métodos de determinación permiten conocer la concentración real de aflatoxinas (totales o en forma individual) en una muestra. Las técnicas de detección y/o determinación más utilizadas en el análisis de aflatoxinas incluyen métodos fisicoquímicos, inmunoquímicos y biológicos, ver la tabla 5.2.2.3 (30).

Tabla 5.2.2.3

METODOS FISICOQUIMICOS	Cromatografía en Capa Fina (CCF)
	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)
	Prueba de Fluorescencia Verde - Amarillo Brillante
	Detección en Minicolumna
METODOS INMUNOQUIMICOS	Cromatografía de Inmunofinidad
	Elisa
	Radioinmunoensayo (RIA)
METODOS BIOLOGICOS	Cultivos de Células y Tejidos
	Animales de Experimentación
	Microorganismos

### 5.2.2.3.1 Métodos Físicoquímicos.

#### 5.2.2.3.1.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas, la CCF ha sido el método más utilizado en el análisis de aflatoxinas, a pesar de que en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de mayor exactitud y precisión (30).

La CCF consiste en la aplicación de pequeñas cantidades de extracto de aflatoxinas sobre una línea base en la parte inferior de una placa cubierta con gel de sílice. Posteriormente, la parte inferior de la placa es sumergida en un solvente, el cual, por capilaridad, migra a través de la capa de gel de sílice, resultando en la separación de "manchas" individuales en forma perpendicular a la línea base, que corresponde a las diferentes aflatoxinas contenidas en el extracto (30).

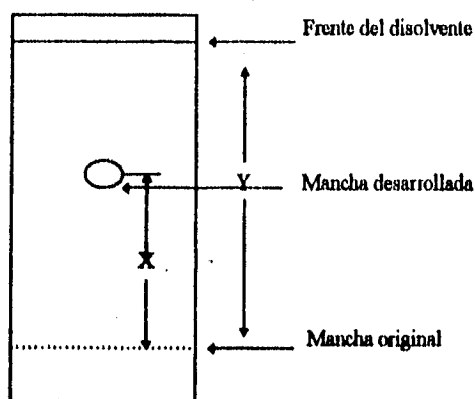
Los diversos compuestos ascienden por la capa de adsorbente a velocidades diferentes con relación al disolvente y de esta forma se realiza la separación de los componentes de una mezcla. A veces es posible identificar los componentes de la mezcla midiendo las razones de emigración de las manchas con respecto a la del frente del disolvente y estableciendo comparaciones con el comportamiento de compuestos conocidos (3).

El compuesto que avanza se ve atraído a zonas polares de la superficie del adsorbente por fuerzas electrostáticas, quedando reversiblemente ligado a la misma. El disolvente interacciona asimismo con el adsorbente, y el compuesto interacciona con el disolvente. Esta interacción competitiva triple entre soluto, disolvente y adsorbente establece las proporciones relativas en que el frente del disolvente y el soluto ascienden por la capa de adsorbente en la placa (3).

Un soluto se ve atraído por el adsorbente tanto más intensamente cuanto mayor es su polaridad. De esta forma, compuestos como alcoholes, ácidos carboxílicos y aminas son atraídos por el adsorbente con mayor fuerza que compuestos tales como hidrocarburos y sus

derivados halogenados. En consecuencia, el primer tipo de compuestos asciende por la capa de adsorbente con mayor lentitud que el segundo. La actividad del adsorbente influye asimismo en el grado de emigración del soluto. Con un soluto y adsorbente determinados, el cambio de un disolvente menos polar a otro de mayor polaridad ocasionará una atracción relativamente mayor del soluto ascenderá en mayor grado por el adsorbente en el caso del disolvente más polar (3).

El valor de  $R_f$  se define como la relación entre la distancia recorrida por el compuesto utilizado como soluto y la recorrida por el disolvente en el mismo tiempo. Lógicamente, los valores de  $R_f$  de un compuesto determinado varían ampliamente con los cambios de soluto o de disolvente. El cálculo del valor de  $R_f$  es de la siguiente manera, ver la figura 5.2.2.3.1.1 (3):



$$R_f = \frac{X}{Y} \quad \text{Fórmula para el cálculo de } R_f$$

Fig. 5.2.2.3.1.1. Cálculo del valor  $R_f$  (3).

Los  $R_f$  de las aflatoxinas varían según el tipo o mezcla de disolventes en que se corran las placas de cromatografía, ver en la tabla 5.2.2.3.1.1 (29).

Tabla 5.2.2.3.1.1

SISTEMA DE DISOLVENTES	$R_f$ APROXIMADOS			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
Cloroformo : acetona (9:1)	0.7	0.61	0.52	0.44
Cloroformo : metanol (97:3)	0.47	0.43	0.38	0.33
Benceno:etanol:agua (46:35:19)	0.58	0.53	0.47	0.43
Cloroformo:acetona:2-propanol (825:150:25)	0.73	0.66	0.59	0.52

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 (29).

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 señaladas (29).

#### 5.2.2.3.1.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Esta técnica, denominada "HPLC" por sus siglas en inglés, constituye un método de detección y determinación de aflatoxinas más exacto y preciso que la CCF. El fundamento de este método es básicamente el mismo que el de CCF, ya que consiste en la separación de las aflatoxinas mediante una distribución competitiva entre una fase móvil y una fase estacionaria, seguida de la caracterización de éstas en base a su propiedad de fluorescencia (30).

En el método de HPLC, la fase estacionaria la compone una columna a través de la cual la fase móvil fluye a presión controlada. El extracto de la muestra es inyectado a la columna y el flujo de la fase móvil permite la separación de las aflatoxinas. La eficiencia de dicha separación depende de la optimización de los parámetros de la columna, especialmente el tamaño de partícula. Posteriormente, las aflatoxinas son detectadas en un fluorómetro, y registradas en forma de cromatograma (30).

El cromatograma obtenido proporciona dos tipos de datos para cada aflatoxina registrada: tiempo de retención en la columna y área bajo la curva. Ambos parámetros permiten identificar y cuantificar cada aflatoxina presente en la muestra, al ser comparados con un cromatograma estándar (30).

La principal desventaja de HPLC es que, dado que la fluorescencia de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> en el tipo de solventes utilizados no es suficiente para que sean detectadas, antes de la inyección del extracto de la muestra es necesario realizar una "derivatización" de dichas toxinas, a fin de intensificar su fluorescencia. La técnica de derivatización más utilizada consiste en un tratamiento con ácido trifluoroacético, el cual provoca la hidratación del doble enlace del furano terminal de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, para convertirlas en aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>, respectivamente (30).



#### **5.2.2.3.1.3 Prueba de Fluorescencia Verde - Amarillo**

**Brillante.**

Esta técnica se utiliza para detectar la presencia de aflatoxinas en productos agrícolas, de una manera rápida, sin necesidad de realizar una extracción. En esta prueba, los granos y semillas son expuestos a luz UV a fin de observar una fluorescencia verde-amarillo brillante, que indica, de manera presuntiva, una contaminación por hongos aflatoxigénicos. Aunque la fluorescencia de estos productos no se debe exclusivamente a la presencia de aflatoxinas, si existe cierta correlación que permite realizar una detección rápida, y que puede servir como señal de que el producto probablemente está contaminado (17, 30).

#### **5.2.2.3.1.4 Detección en Minicolumnas.**

Es un método rápido de detección de aflatoxinas totales que consiste en el empleo de pequeñas columnas cromatográficas que contienen gel de sílice, fluorisil y alúmina. Cuando el extracto de la muestra se hace pasar por estas columnas, las aflatoxinas se fijan firmemente al fluorisil, resultando en la aparición de una banda que fluoresce al ser observada bajo luz UV. La banda fluorescente también puede ser comparada con la obtenida para una solución estándar en una columna similar, realizando así una estimación del nivel de aflatoxinas en la muestra (17, 30).

#### **5.2.2.3.2 Métodos Inmunoquímicos.**

##### **5.2.2.3.2.1 Cromatografía de Inmunoafinidad (AFLATEST®).**

Este es un método de detección y determinación de aflatoxinas en el que la purificación del extracto se realiza en columnas que contienen anticuerpos monoclonales específicos. Al hacer pasar el extracto de la muestra por la columna, las aflatoxinas son retenidas en ella al enlazarse a los anticuerpos. Posteriormente, las aflatoxinas son eluidas con un pequeño

volumen de metanol y tratadas con una solución de bromo. Finalmente, la fluorescencia de las aflatoxinas es detectada y medida en un fluorómetro. La concentración de las aflatoxinas en la muestra puede ser fácilmente calculada en base a las mediciones de fluorescencia de una solución estándar (30).

#### 5.2.2.3.2.2 ELISA.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) constituye una técnica de detección rápida de aflatoxinas, en la cual, los anticuerpos específicos se encuentran fijados en una placa de plástico con microagujeros. El extracto de la muestra es mezclado con una solución de aflatoxinas y enzimas conjugadas, y después es aplicada a la placa de anticuerpos. Las aflatoxinas de la muestra (aflatoxinas libres) compiten con las aflatoxinas conjugadas por los sitios de enlace en los anticuerpos. Posteriormente, se realiza un lavado para eliminar a las aflatoxinas libres y conjugados sobrantes, que no se unieron a los anticuerpos, y se adiciona una solución que sirve de sustrato a las enzimas, la cual, al ser catalizada por éstas, provoca un cambio de coloración en la solución. Debido a que la concentración del complejo anticuerpo-aflatoxina-enzima es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas libres, el cambio de coloración de la solución es considerado como un resultado positivo de la presencia de aflatoxinas en la muestra (30).

#### 5.2.2.3.2.3 Radioinmunoensayo (RIA).

En este método, el extracto de la muestra problema, disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos se incuba junto con una cantidad determinada de anticuerpos específicos y aflatoxinas conjugadas, marcadas radiactivamente. Las aflatoxinas libres de la muestra y las aflatoxinas conjugadas se separan, y mediante un contador de "centelleo" se determinan los niveles de radiactividad. La concentración de aflatoxinas en la muestra se determina a partir de una curva estándar del nivel de radiactividad de las aflatoxinas conjugadas y libres (30).

### **5.2.2.3.3 Métodos Biológicos.**

#### **5.2.2.3.3.1 Cultivos de Células y Tejidos.**

Uno de los sistemas de cultivos de tejidos más utilizado es el embrión de pollo. En esta técnica, el extracto de aflatoxinas se inyecta a través del cascarón a la cámara de aire del huevo, el cual se somete a un periodo de incubación. La muerte del embrión se considera como una prueba positiva, y el índice de mortalidad se compara con un control para estimar el grado de toxicidad de la muestra (30).

Este método es relativamente económico y simple; sin embargo, la información que proporciona no es específica, dado la mortalidad el embrión también puede deberse a otro tipo de factores (30).

#### **5.2.2.3.3.1 Animales de Experimentación.**

El empleo de camarón de salmuera, Artemia salina, constituye un método muy económico y sencillo de detección de aflatoxinas. En esta técnica, el extracto de la muestra es adicionada a un pequeño volumen de salmuera que contiene de 30 a 50 larvas de camarón, la cual posteriormente se incuba durante 24 horas a 37.5°C. El grado de toxicidad de la muestra es determinada a partir del índice de mortalidad de los camarones (30).

Otras especies animales que, debido a su alta sensibilidad a los efectos de las aflatoxinas resultan muy adecuados para ser utilizados en estudios de experimentación, son la trucha y los patos de un día de edad (30).

#### 5.2.2.3.3 Microorganismos.

Las cepas bacterianas que presentan mayor sensibilidad a las aflatoxinas pertenecen a las especies *Bacillus megaterium* y *B. brevis*. La técnica de discos generalmente utilizada en pruebas de antibióticos también es utilizada en estos ensayos, los cuales consisten en la aplicación de pequeños discos de papel filtro inmersos en el extracto de la muestra, sobre agar nutritivo sembrado con el microorganismo de prueba. Se obtiene un resultado positivo si se observa un halo de inhibición alrededor de los discos, y la comparación con un estándar puede proporcionar información acerca del nivel de aflatoxinas en la muestra (30).

# *CAPITULO*

## *VI*

## METODOS

### 6.1 METODOS.

#### 6.1.1 Recolección de muestras.

La obtención de muestras de la *Matricaria chamomilla* (manzanilla) fue al azar, tomadas de diferentes tiendas comerciales y mercados. Analizando 5 marcas comerciales nacionales más consumidas en base a la información obtenida en SECOFI; de cada una de las marcas se obtuvieron 10 muestras y 5 muestras deshidratadas a granel de diferentes mercados

#### 6.1.2 Identificación del género Aspergillus.

Se trabajo con la cepa de *Aspergillus sp* obtenida del cepario de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad La Salle para determinar y conocer sus características microscópicas y morfología colonial.

##### 6.1.2.1 Cuenta total de hongos.

a) Preparación de la muestra: Pesar de 1 a 10 g de la muestra (dependiendo de la contaminación que se espera encontrar). Transferir a un frasco de dilución, se completa a 10 ó 100 ml con agua estéril, dependiendo del peso de muestra tomado. Agitar durante 5 minutos, y preparar diluciones decimales si se cree conveniente, agitar durante un minuto y dejar asentarse las partículas gruesas antes de medir la cantidad para la siguiente dilución o para sembrar en las cajas Petri (19).

b) Transferir 1 ml de la muestra o diluciones a cajas Petri estériles. Agregar de 12 a 20 ml del medio de cultivo Agar papa y dextrosa (PDA) fundido (se mantiene a temperatura de  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua) y acidificado a un pH de 3.5 con ácido tartárico. Mezclar la muestra cuidando de que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar e incubar las cajas en posición invertida a  $22^{\circ}\text{C}$  por 5 días (19).

c) Interpretación de resultados: contar las colonias de hongos que aparezcan en las placas. Multiplicar por la inversa de la dilución (19).

#### 6.1.2.2 Microcultivo de posible género Aspergillus.

a) Con el bisturi previamente mojado en alcohol y flameado para esterilizarlo, cortar un cuadrado de PDA, de 1 cm por lado.

b) Con la aguja de disección previamente esterilizada colocar el agar en el centro del portaobjetos dentro de la caja de petri que anteriormente fue puesto sobre la varilla doblada.

c) Mediante el asa doblada en ángulo recto tomar un pequeño fragmento de la colonia del hongo aislado e inocular un lado del cuadro de agar. Hacer lo mismo con los tres lados restantes.

d) Con las pinzas previamente flameadas poner el cubreobjetos sobre el agar. Presionar ligeramente sobre el cubreobjetos con el fin de que se adhiera al agar.

e) Con una pipeta estéril poner 10 ml de glicerol en la caja de petri procurando no mojar el microcultivo.

f) Incubar a  $25^{\circ}\text{C}$ .

g) Examinar el microcultivo periódicamente hasta observar que ha crecido y esporulado. Esto se puede observar a simple vista o bien al microscopio.

h) Una vez que el hongo ha esporulado, con una pipeta Pasteur desechar el glicerol y sustituirlo por formol al 10%. Dejar actuar por 1 hora.

i) Poner 1 gota de azul de algodón lactofenol en el centro de un portaobjetos limpio

j) Con unas pinzas separar el cubreobjetos del microcultivo y si es necesario quitar restos de agar, hacerlo con la aguja de disección.

k) Poner el cubreobjetos sobre la gota de colorante y presionar un poco con el fin de eliminar las burbujas de aire que pudieran haberse formado.

l) Eliminar el exceso de colorante si lo hay y sellar la preparación con esmalte de uñas incoloro.

m) Observar la preparación al microscopio para su identificación.

### **6.1.2.3 Identificación en el microscopio del hongo Aspergillus.**

Morfológicamente, sus colonias se extienden rápidamente, y al principio tienen un color verde amarillento en medio de cultivo PDA, que se oscurece con el tiempo hasta convertirse en verde pardusco.

Microscópicamente, el micelio es septado, en la parte sumergida y en la parte aérea, con conidióforos más o menos perpendiculares a una célula pedunculada que se ensancha en su ápice, terminando en un ensanchamiento, la vesícula, que contiene una o dos filas de esterigmas, la última de las cuales es la portadora de las cadenas de conidios.



### **6.1.3 Determinación de aflatoxinas por el método de cromatografía en capa fina.**

Esta prueba es diseñada para hallar la posible presencia de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, que son contaminantes muy peligrosos en cualquier material de origen vegetal (24).

#### **6.1.3.1 Preparación de las muestras.**

Moler no menos de 100 gramos de la planta medicinal cruda a un polvo algo fino (pasarla por un tamiz N° 325). El tamaño más grande de muestra, puede ser de 500 gramos a 1 kilogramo, entre más grande sea el potencial es mejor para descubrir embolsados de contaminación.

#### **6.1.3.2 Extracción.**

Pesar y transferir 50 gramos del material pulverizado a un matraz de cristal cónico tapado y añadir 170 ml de metanol y 30 ml de agua destilada. Usar un aparato mecánico, agitar vigorosamente por espacio de 30 minutos. Filtrar a través de un papel filtro de porosidad media. Si requiere de un procedimiento especial de limpieza general (eliminación de interferencias), coleccionar por una parte 100 ml del filtrado (A), por otra parte desechar los primeros 50 ml y coleccionar 40 ml del filtrado (B).

#### **6.1.3.3 Eliminación de interferencias.**

Para eliminar interferencias de pigmentos de la planta usar el procedimiento especial de limpieza general, transferir 100 ml del filtrado (A) a un vaso de precipitados de 250 ml. Agregar 20 ml de acetato de zinc/cloruro de aluminio y 80 ml de agua destilada. Agitar durante

5 minutos, añadir 5 gramos de tierra de diatomáceas, mezclar y filtrar a través de un papel filtro de porosidad media. Desechar los primeros 50 ml y coleccionar 80 ml de filtrado (C).

Transferir cualquiera de los dos filtrados B o C a un embudo de separación. Agregar 40 ml de cloruro de sodio (100 g/l) y 25 ml de éter de petróleo, y agitar por 1 minuto. Dejar que las capas se separen y transferir la capa más baja a un segundo embudo de separación. Extraer dos veces con 25 ml de diclorometano y agitar por 1 minuto. Dejar que las capas se separen y combinar las capas más bajas en un matraz cónico de 125 ml. Añadir varias perlas de ebullición y evaporar casi a sequedad en un baño de agua. Enfriar el residuo, tapar el matraz y guardar para la determinación por cromatografía en capa fina.

#### 6.1.3.4 Purificación del extracto.

Si es necesario, purificar el extracto además de las interferencias usar una columna de 300 mm x 10 mm con tapón. Poner 2 gramos de sílica gel con 10 ml de una mezcla de 3 volúmenes de éter etílico y 1 volumen de éter de petróleo, verter en la columna y lavar con 5 ml de la misma mezcla de solvente. Dejar que el absorbente se establezca y aumentar la superficie de la columna con una capa de 1.5 gramos de sulfato de sodio anhidro. Disolver el residuo en 3 ml de diclorometano y transferirlo a la columna. Enjuagar el matraz dos veces con porciones de 1 ml de diclorometano y agregarlos a la columna, eluir a una velocidad de 1 ml/min. Añadir sucesivamente a la columna 5 ml de éter de petróleo, 5 ml de éter etílico y 5 ml de diclorometano, y eluir a una velocidad no mayor de 3 ml/min. Desechar las eluciones. Aumentar la columna con 6 ml de una mezcla de 9 volúmenes de diclorometano y 1 volumen de acetona y eluir a una velocidad de 1 ml/min., preferentemente sin usar vacío. Colectar esta elución en un matraz pequeño (frasco color ámbar de preferencia), añadir unas perlas de ebullición y evaporar justo a sequedad en un baño de agua.

### 6.1.3.5 Preparación del estándar de aflatoxinas.

Preparar el estándar de 1 mg en 5 ml de una mezcla de 98 volúmenes de cloroformo y 2 volúmenes de acetonitrilo. Para tener las concentraciones precisas de los estándares de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en partes por billón (ppb) se hace lo siguiente:

Se toma: 1 ml Std. + 9 ml de cloroformo-acetonitrilo (98:2 v/v) = 20 ppm (1)  
0.75 ml Std. + 9.25 ml de cloroformo-acetonitrilo (98:2 v/v) = 15 ppm (1)  
0.5 ml Std. + 9.5 ml de cloroformo-acetonitrilo (98:2 v/v) = 10 ppm (1)  
0.1 ml Std. + 9.9 ml de cloroformo-acetonitrilo (98:2 v/v) = 5 ppm (1)

↓  
solución 1 de cada concentración

↓  
De la solución 1 de cada concentración se toma  
0.1 ml + 0.9 ml de cloroformo-acetonitrilo (98:2 v/v)

↓  
solución 2, (1:10)

↓  
De la solución 2 de cada concentración se toma  
0.1 ml + 0.9 ml de cloroformo-acetonitrilo (98:2 v/v)

↓  
solución 3, (1:100)

↓  
De la solución 3 de cada concentración se toma  
0.1 ml + 0.9 ml de cloroformo-acetonitrilo (98:2 v/v)

↓  
solución en ppb, (1:1000)

#### **6.1.3.6 Preparación de los residuos de las muestras.**

A uno de los residuos obtenidos de las muestras, agregar 0.2 ml de una mezcla de 98 volúmenes de cloroformo y 2 volúmenes de acetoneitrilo, tapar el matraz y agitar vigorosamente hasta disolver los residuos, preferentemente usar un agitador de tipo Vortex.

#### **6.1.3.7 Aplicación de las muestras en cromatografía en capa fina.**

Llevar a cabo la prueba de "cromatografía en capa fina", usar sílica gel como la sustancia de la capa y una mezcla de 85 volúmenes de cloroformo, 10 volúmenes de acetona y 5 volúmenes de 2 propanol como la fase móvil. Aplicar separadamente a la placa 30 µl de cada uno de los estándares de aflatoxinas a las concentraciones de 5, 10, 15 y 20 ppb, entonces aplicar tres volúmenes, cada uno de 10 µl de los residuos de muestra. Colocar la placa en una cámara de saturación, esperar a que la mezcla de solventes (fase móvil) suba al límite de la placa. Después de remover la placa de la cámara de saturación, dejar que seque en aire y examinar el cromatograma en un cuarto oscuro o caja bajo luz ultravioleta (365 nm).

#### **6.1.3.8 Interpretación de resultados.**

Claramente se separan cuatro manchas, dos azules fluorescentes y dos verdes fluorescentes que se obtienen de la mezcla de los estándares de aflatoxinas B y G respectivamente. Observar cualquier mancha obtenida de las soluciones de los residuos que coinciden en color de fluorescencia y posición de los  $R_f$  (mencionados en la tabla 5.2.2.3.1.1) de los estándares de aflatoxina. Si se obtiene cualquier mancha, igual a la posición de cada mancha fluorescente de las soluciones de los residuos con los de los estándares de aflatoxinas identificar el tipo de aflatoxina presente. Obtener una estimación aproximada en la muestra por comparación de intensidad de las manchas con la concentración de los estándares de aflatoxina.

# *CAPITULO*

## *VII*

## RESULTADOS

En las Tablas de la 1 a la 9 se muestran los resultados obtenidos de las 55 muestras analizadas, para la cuantificación de hongos, la identificación del género *Aspergillus*, la determinación y cuantificación de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

Las 50 primeras muestras son de marcas comerciales nacionales más consumidas mostradas en las tablas 1 a la 8 y en la tabla 9 son las 5 muestras restantes a granel deshidratadas.

En los resultados de la cuantificación de hongos se expresan en "unidades formadoras de colonias/gramo, (ufc/g)".

Así como, en los resultados de determinación y cuantificación de aflatoxinas se expresan en "partes por billón, (ppb)".

En la gráfica N° 1 se muestra los resultados obtenidos en porcentajes de las 36 muestras con el género *Aspergillus*. En la gráfica N° 2 se muestran los porcentajes de las muestras que contienen aflatoxinas.

En la gráfica N° 3 se muestran los resultados obtenidos en porcentajes de las 15 muestras que contienen aflatoxinas, 13 muestras con *Aspergillus* y 2 muestras no contienen *Aspergillus*. En la gráfica N° 4 son los porcentajes de los diferentes tipos de aflatoxinas que son B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en las 15 muestras.

**MUESTRAS DE MARCAS COMERCIALES NACIONALES**

Tabla N° 1.

MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <i>Aspergillus</i>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
1	10 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
2	10 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
3	100 ufc/g	43/100	(-)	(-)	(-)	(-)
4	40 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
5	55 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
6	17 ufc/g	10/17	(-)	(-)	(-)	(-)
7	< 10 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabla N° 2.

MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <i>Aspergillus</i>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
8	2600 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
9	148 ufc/g	107/148	(-)	(-)	(-)	(-)
10	60 ufc/g	10/60	(-)	(-)	(-)	(-)
11	30000 ufc/g	8333/30000	(-)	(-)	(-)	(-)
12	29200 ufc/g	7000/29200	(-)	(-)	(-)	(-)
13	12200 ufc/g	1000/12200	(-)	(-)	(-)	(-)
14	18667 ufc/g	2000/18667	(-)	(-)	(-)	(-)
15	19667 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)



Tabla N° 3.

MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <i>Aspergillus</i>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
16	8250 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
17	7600 ufc/g	1333/7600	(-)	(-)	(-)	(-)
18	15500 ufc/g	15000/15500	(-)	(-)	(-)	(-)
19	28500 ufc/g	16000/28500	(-)	(-)	(-)	(-)
20	16000 ufc/g	4250/16000	(-)	(-)	(-)	(-)
21	13 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
22	< 10 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabla N° 4.

MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <i>Aspergillus</i>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
23	184 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
24	17 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
25	25 ufc/g	25/25	(-)	(-)	(-)	(-)
26	40 ufc/g	10/40	(-)	(-)	(-)	(-)
27	55 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
28	10 ufc/g	10/10	(-)	(-)	(-)	(-)
29	10 ufc/g	10/10	(-)	(-)	(-)	(-)
30	17 ufc/g	10/17	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabla N° 5.

MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <i>Aspergillus</i>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
31	72 ufc/g	50/72	(-)	(-)	(+) 10 ppb	(+) 10ppb
32	80 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
33	85 ufc/g	40/85	(-)	(-)	(-)	(-)
34	30 ufc/g	20/30	(-)	(-)	(-)	(-)
35	74 ufc/g	27/74	(-)	(-)	(-)	(+) 5ppb
36	137 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabla N° 6.

MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <i>Aspergillus</i>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
37	110 ufc/g	55/110	(-)	(-)	(-)	(-)
38	155 ufc/g	45/155	(-)	(-)	(+) 10 ppb	(-)
39	633 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
40	162 ufc/g	43/162	(-)	(-)	(-)	(-)
41	1033 ufc/g	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
42	4700 ufc/g	1300/4700	(-)	(-)	(-)	(-)
43	3100 ufc/g	1367/3100	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabla N°7.

MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <del>Aspergillus</del>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
44	3033 ufo/g	667/3033	(+) 10 ppb	(-)	(-)	(-)
45	3450 ufo/g	933/3450	(+) 5-10	(-)	(+) 5-10 ppb	(+) 10-15 ppb
46	2767 ufo/g	867/2767	(-)	(-)	(-)	(+) 5-10 ppb
47	1400 ufo/g	100/1400	(-)	(-)	(-)	(+) 5-10 ppb
48	1400 ufo/g	Negativo	(-)	(-)	(+) 5-10 ppb	(+) 5-10 ppb

Tabla N° 8.

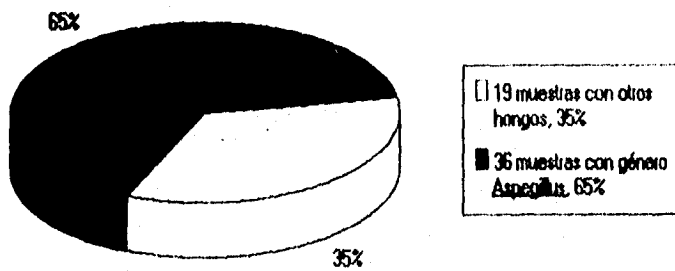
MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <i>Aspergillus</i>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
49	3950 ufc/g	1000/3950	(-)	(-)	(-)	(+) 5-10 ppb
50	1333 ufc/g	Negativo	(+) 5 ppb	(-)	(+) 15-20 ppb	(+) 5-10 ppb

**MUESTRAS A GRANEL DESHIDRATADAS**

Tabla N°9.

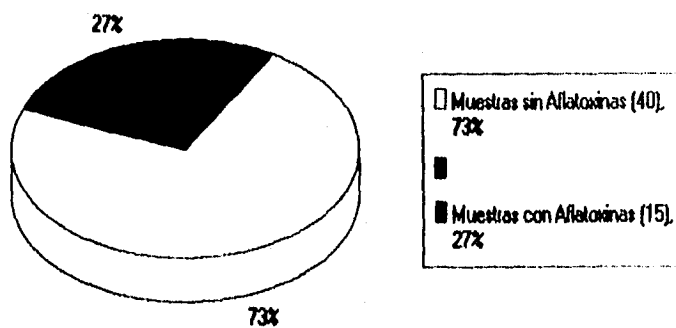
MUESTRA	CUENTA TOTAL DE HONGOS	N° DE HONGOS CON MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA IGUAL AL GENERO <i>Aspergillus</i>	AFLATOXINAS			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
51	13000 ufc/g	400/13000	(-)	(-)	(-)	(+) 5-10 ppb
52	23667 ufc/g	1000/23667	(-)	(-)	(+) 15-20 ppb	(+) 15-20 ppb
53	3000 ufc/g	100/3000	(-)	(-)	(+) 5-10 ppb	(+) 5-10 ppb
54	54333 ufc/g	2000/54333	(-)	(-)	(+) 10 ppb	(+) 5-10 ppb
55	78000 ufc/g	11000/78000	(-)	(-)	(+) 10-15ppb	(+) 10 ppb

Gráfica N° 1. Porcentaje de muestras con género *Aspergillus*

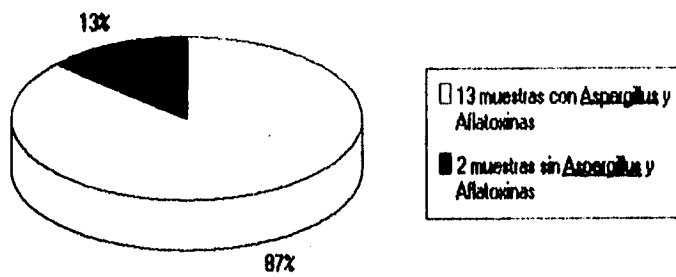




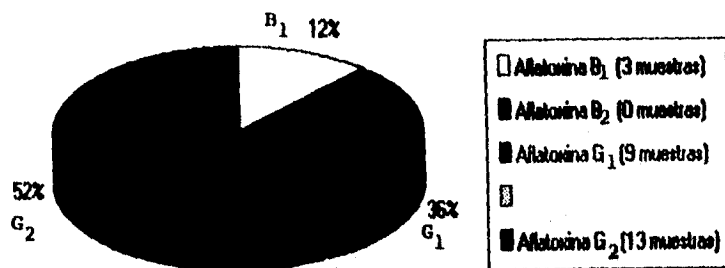
**Gráfica N° 2. Porcentaje de muestras con aflatoxinas y sin aflatoxinas.**



*Gráfica N° 3. Porcentaje de muestras con y sin género Aspergillus que presentan Aflatoxinas*



**Gráfica N° 4. Porcentajes de los tipos de Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> contenidas en las 15 muestras con aflatoxinas.**



*CAPITULO*

*VIII*

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este trabajo de tesis se realizó con una planta medicinal como lo es la *Matricaria chamomilla* (manzanilla) para determinar la presencia de aflatoxinas, debido a la gran importancia carcinogénica de estas últimas.

En primer lugar se analizaron 55 muestras que son un número aceptable, esto fue determinado por el método de aproximación con distribución binomial, siendo del 95 a 99% de confiabilidad.

Se realizó la cuenta total de hongos y con una cepa de *Aspergillus sp* se comparó la morfología colonial de las muestras y así de esta manera se seleccionaron las muestras con dicha morfología y se procedió a realizar los microcultivos, obteniendo de éstos la morfología microscópica y así obtener resultados seguros de la presencia del género *Aspergillus*, como se muestran en las tablas de resultados de la 1 a la 9. De las 55 muestras sólo 36 muestras son positivas por la presencia del género *Aspergillus* (65.5%), como se muestra en la gráfica N° 1.

Después de haber realizado la cuenta total de hongos se llevó a cabo la determinación de aflatoxinas por cromatografía en capa fina; de las 55 muestras totales solo 15 muestras contienen aflatoxinas de los diferentes tipos (27.3%), como se muestra en la gráfica N° 2.

De las 36 muestras con género *Aspergillus* solo 13 contienen aflatoxinas (23.7%) y 2 muestras sin este género que presentan aflatoxinas (3.6%).

En la gráfica N° 3 se observan los porcentajes de muestras con y sin género *Aspergillus* que presentan aflatoxinas, el 86.7% y el 13.3% respectivamente.

De las 13 muestras con el género *Aspergillus* y aflatoxinas tienen sus límites superior e inferior de cuenta del género *Aspergillus* de 11000 ufc/g y 27 ufc/g respectivamente, la cuenta total de hongos de estas 13 es de 78000 y 74 ufc/g respectivamente; la cuenta total de hongos de

las 2 muestras sin el género *Aspergillus* y aflatoxinas tienen sus límites entre 1400 y 1333 ufc/g.

En base a éstos resultados se demuestra que pueden existir aflatoxinas sin la presencia del género, esto se debe a que desde el momento de la recolección de la manzanilla no sea manejada adecuadamente cuidando la humedad, temperatura y almacenamiento, realizándose así la producción de hongos que posteriormente serán eliminados con la sanitización (también depende del tipo de sanitización que se lleve a cabo), quedando el metabolito del hongo *Aspergillus flavus* o *parasiticus* y así produciéndose las aflatoxinas sin que esté presente los hongos, pero en este estudio la sanitización no fue buena ya que hay presencia de hongos de diferentes tipos en todas las muestras.

En la gráfica N° 4 se observa que el porcentaje de cada aflatoxina es: B<sub>1</sub> tiene un 12%, la G<sub>1</sub> es del 36% y G<sub>2</sub> es del 52%, lo cual indica que la aflatoxina G<sub>2</sub> esta presente en más de la mitad de las 15 muestras.

De las 55 muestras totales analizadas, las 5 últimas que aparecen en la tabla 9 de resultados fueron las que mostraron las concentraciones más altas de aflatoxinas, esto se debe a que no llevaron ningún control de sanitización.

En base a todos estos resultados se dice que el 23.6% de 55 muestras totales cumplen con la Norma Oficial Mexicana NOM-F-293-1982, porque no contienen microorganismos patógenos (género *Aspergillus*) y sustancias tóxicas para el ser humano.

Con los resultados obtenidos de aflatoxinas el 73.3% si cumplen con lo propuesto por la FDA ya que el límite permitido es de 15 - 20 ppb de aflatoxinas y el 26.7% no cumplen con el límite permitido ya que contienen más de dos tipos de aflatoxinas que con la suma de la cantidades de aflatoxinas rebasan el límite de 15 - 20 ppb.

*CAPITULO*

*IX*

## CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis, se analizaron 55 muestras totales de *Matricaria chamomilla* (manzanilla), de las cuales 15 muestras (27.3%) salieron positivas con aflatoxinas

En la cuantificación de esporas e identificación del género *Aspergillus*, se encontró que de las 55 muestras totales, el 65.5% contienen este género.

La aflatoxina más frecuente es la G<sub>2</sub>. Con esto se puede concluir que probablemente el hongo presente en la manzanilla en su mayor parte es el *Aspergillus parasiticus* ya que éste es formador de las aflatoxinas B y G, el hongo *Aspergillus flavus* principalmente forma a la aflatoxina B.

El porcentaje de las muestras que cumplen con el límite permitido de aflatoxinas (15-20 ppb) propuesto por la FDA es del 73.3% y el 26.7% no cumple con el límite mencionado debido a que 4 muestras contienen más de dos tipos de aflatoxinas y la suma de las concentraciones de las aflatoxinas rebasan el límite permitido por la FDA.

La importancia sanitaria es de mencionarse porque las aflatoxinas principalmente producen cáncer en el hígado por absorción de la piel, inhalación o ingestión. En el caso de la preparación de té de manzanilla no es de preocupación porque se prepara la infusión con agua hirviendo, en la cual no se disuelven las aflatoxinas; pero si habría problema si se ingiere un licor de manzanilla o se aplican fomentos de manzanilla preparados principalmente con alcohol porque las aflatoxinas se disuelven en este tipo de solventes y de esta forma pasa al organismo humano, provocando los daños mencionados con anterioridad.



*REFERENCIAS*  
*BIBLIOGRAFICAS*

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alexopoulos, C., Mims, C.W.: INTRODUCTORY MYCOLOGY. Tercera edición. Editorial John Wiley & Sons. EE.UU. 1979.
2. Bannerman, R.; Burton, J.: TRADITIONAL MEDICINE AND HEALTH CARE COVERAGE. Editado por World Health Organization. England, 1983.
3. Brewster, R.: CURSO PRACTICO DE QUIMICA ORGANICA. Segunda edición. Editorial Alhambra. España, 1986.
4. Burrows, W.: TRATADO DE MICROBIOLOGIA. 19ª edición. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F., 1969.
5. Cea Reyes, A., Valdivia Martínez, J. A.: TESIS DE DETERMINACION CUALITATIVA DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS PARA GANADO. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 1978.
6. Cliver, D.: FOODBORNE DISEASES. Academic Press, Inc. San Diego, CA., 1990.
7. De Lago Acosta, G.: Tesis de ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LOS METODOS DE SANITIZACION DE TE DE MANZANILLA POR ESTERILIZACION CON OXIDO DE ETILENO Y POR PASTEURIZACION CON CALOR SECCO. Universidad La Salle. México D.F., 1993.
8. DICCIONARIO ENCICLOPEDICO ILUSTRADO. Tomo 7 y 11. Editado por Reader's Digest. México, D. F.
9. DICCIONARIO TERMINOLOGICO DE CIENCIAS MEDICAS. Décima edición. Salvat Editores.
10. Font, P.: PLANTAS MEDICINALES. Editorial Labor, S. A. España, 1962
11. Frazier, W.C., Westhoff, D.C.: MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. Tercera edición. Editorial Acribia, S. A. España, 1991.
12. Herrera, T., Ulloa, M.: REINO DE LOS HONGOS, "Micología básica y aplicada". Primera edición. Fondo de Cultura Económica, UNAM. México, D.F. 1990
13. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): MICROORGANISMS IN FOOD. Tomo 1. Segunda edición. Canadá, 1978.
14. Krugh, P.: MICOTOXINS IN FOOD. Academic Press. San Diego, CA , 1987.

15. Lennette, E.: MICROBIOLOGIA CLINICA. Tercera edición. Editorial Médico - Panamericana, Buenos Aires, 1982.
16. López, A.: TEXTOS DE MEDICINA NAHUATL. Tercera edición. Editado por Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1984.
17. Moreno, E.: MANUAL PARA LA IDENTIFICACION DE HONGOS EN GRANOS Y SUS DERIVADOS. Editorial Programa Universitario de alimentos. Instituto de Biología de UNAM. México, D. F.
18. Müller, E., Loeffler, W.: MICOLOGIA, "Manual para naturalistas y médicos". Ediciones Omega, S. A. Barcelona, 1976.
19. Norma Oficial Mexicana NOM-F-248.: ALIMENTOS PARA HUMANOS - MICROBIOLOGICOS - ESPECIAS Y CONDIMENTOS - DETERMINACION DE MICROORGANISMOS. Dirección General de Normas, Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. México, D.F. 1975.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-F-293-1982.: ALIMENTOS PARA HUMANOS - MANZANILLA PARA INFUSIONES. Dirección General de Normas, Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. México, D.F., 1982.
21. Olayiwola, A.; Vernon, H; Hugh, S.: CONSERVATION OF MEDICAL PLANTS. Primera edición. Editorial Cambridge University Press. 1991.
22. Organización de las Naciones Unidas.: ESTUDIOS SOBRE LA ELABORACION, LA COMERCIALIZACION Y LA DISTRIBUCION DE LOS PRODUCTOS BASICOS. Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo; Elaboración y comercialización del té: Esfuerzos para la cooperación internacional. Publicaciones de las Naciones Unidas. Nueva York, 1984.
23. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: MANUALES PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS. Tomo 4 "Análisis Microbiológico". Roma, 1981.
24. Organización Mundial de la Salud: QUALITY CONTROL METHODS FOR MEDICINAL PLANT MATERIALS. 1992.
25. Park, D. L.: CONTROLLING AFLATOXIN IN FOOD AND FEED. Food Technology. 47(10):92-96. 1993.
26. Pelczar, J.: MICROBIOLOGIA. Segunda edición. Editorial Mc Graw Hill. México, D.F., 1990.
27. PLANTAS MEDICINALES. Selecciones del Reader's Digest. Primera edición. México, D.F., 1987.

28. Sharnher, S.: CAFE, TE Y CACAO. Perspectivas del mercado y financiamiento para el desarrollo. Editorial Tecnos. Madrid, España. 1970.

29. Uribe Zuñiga, S.: INVESTIGACION DE AFLATOXINAS EN CACAHUATES MEXICANOS. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 1977.

30. Valdivia Retes, M.: TESIS DE EFECTO DEL PEROXIDO DE HIDROGENO Y EL BICARBONATO DE SODIO SOBRE EL CONTENIDO DE AFLATOXINAS B1 Y B2 EN MAIZ. Universidad La Salle. México, D. F. 1995.