

87.0127

6

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA *Lej*

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON
FALLA EN ORIGEN

DETERMINACION DE AFLATOXINA B, EN DULCE DE
MAZAPAN Y CHOCOLATE INSTANTANEO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ANA VIRINIA RIVERA VALENZUELA

ASESOR: Q. F. B. ROSA MARIA MUÑOZ SAUCEDA

GUADALAJARA, JALISCO. 1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Página
1.- INTRODUCCION	2
2.- OBJETIVO	3
3.- GENERALIDADES, CACAHUATE Y CACAO	3
3.1 Cacahuate	5
3.2 Cacao	9
4.- AFLATOXINAS	15
4.1 Aspectos que Regulan el Problema de Micotoxinas en los Alimentos	17
4.2 Química de las Aflatoxinas	19
4.3 Metabolismo Y Efectos Bioquímicos de Aflatoxinas	25
4.4 Efectos Patofisiológicos de Aflatoxinas	29
4.5 Contaminación por Micotoxinas	33
5.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	39
6.- RESULTADOS Y DISCUSION	40
7.- CONCLUSIONES	44
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

1. INTRODUCCION

Las micotoxinas son compuestos elaborados por hongos. El interés en los efectos de micotoxinas se incrementó después -- del descubrimiento de que las aflatoxinas fueron los agentes -- causantes de la enfermedad " X " en pavos, la cual mató miles de ellos en Inglaterra en 1960.

Las aflatoxinas son factores tóxicos fluorescentes elaborados por el hongo Aspergillus flavus. Originalmente se obtuvieron dos productos, que fueron nombrados B₁ y G₁, los cuales -- mostraron fluorescencia azul y verde, respectivamente. Las toxinas tienen estructuras y formas similares; un grupo único al -- tamente oxigenado, con compuestos heterocíclicos que muestran fluorescencia al exponerlos a luz Ultravioleta.

El crecimiento de mohos en productos alimenticios durante -- la desecación y el almacenamiento da origen a la formación de esas toxinas en el interior del producto en descomposición. -- Aunque otras micotoxinas han sido y son descubiertas, las aflatoxinas siguen teniendo mayor importancia por su alta toxicidad y su natural y común presencia en alimentos como cereales, granos, cacahuates y otros, bajo condiciones adversas.

Aunque los efectos en humanos no son muy claros aún, las micotoxinas son potentes cancerígenos para un gran número de animales y pueden considerarse potencialmente peligrosos para los humanos.

Prácticamente todos los productos sufren la producción de -- aflatoxinas si las condiciones son favorables para el crecimiento de Asp. flavus.

Varios estudios han demostrado la alta incidencia de aflatoxinas en diferentes alimentos de consumo directo en la dieta -- habitual del mexicano. El cacahuete y cacao pueden ser excelentes sustratos para el desarrollo de hongos productores de aflatoxinas, ya que estos después de la cosecha se almacenan un -- tiempo determinado durante el cual es muy posible que se pre--

senten las condiciones óptimas para el desarrollo de hongos. - Estos problemas se presentan debido a el deficiente control e higiene observados en el almacenamiento, desecación al aire libre y proceso de los productos agrícolas.

Considerando que el dulce de mazapán y el chocolate instantáneo son de consumo elevado en todos los estratos sociales, se hace necesario conocer la situación de estos productos en lo que se refiere a aflatoxinas. El objetivo de esta tesis es determinar y cuantificar a partir de la cromatografía de capa fina, la existencia de aflatoxina B₁ en los alimentos procesados ya mencionados, ya que ésta aflatoxina es la más tóxica y la más cancerígena de todas las existentes.

2. OBJETIVO

Identificación y cuantificación de la aflatoxina B₁ en dulce de mazapán y en chocolate instantáneo, elaborados ambos de cacahuate y cacao, respectivamente.

3. GENERALIDADES, CACAHUATE Y CACAO

3.1 Cacahuate

El cacahuate, de nombre botánico Arachis hypogaea, pertenece a la familia Leguminosae. Es una planta herbácea, de origen del centro del Brasil y Paraguay. Su cultivo también se realiza en Asia, Cercano Oriente, Africa, América del Norte y Central.

Los climas de producción del cacahuete son trópicos semiáridos y en los húmedos bajos de Africa, Asia Sudoriental y -- América Central. La distribución de sus cultivos se limita a las llanuras o tierras muy bajas situadas entre los 30°N y -- 30°S. Las temperaturas requeridas durante el ciclo vital del cultivo son de 20 a 35°C, aunque pueden sobrevivir hasta 45°C si se mantiene un nivel adecuado de humedad del suelo, siendo las precipitaciones óptimas para su crecimiento, las comprendidas entre 250 y 1000 mm.

El cacahuete en México se cultiva en 25 estados de la república; en el año de 1981 se obtuvo una producción total nacional de 87,381 Ton., en una superficie sembrada de 79,704 Ha., - el rendimiento promedio nacional fue de 1.164 Ton./Ha. El mayor productor de cacahuete en ese año fue el Estado de Chihuahua con un total de 21,349 Ton. (24.45% de la producción nacional) y un área sembrada de 9,366 Ha. (11.75% de la superficie sembrada nacional). El segundo Estado productor fue Puebla con 12,815 Ton. (14.66%) y una superficie sembrada de --- 22,486 Ha. (28.2%). El Estado de Jalisco produjo 1,545 Ton. - (1.76%) en un área sembrada de 982 Ha. (1.2%).

Según datos (12) de 1975, la producción de cacahuete se -- destinó más para la producción de mazapán (400 Ton.) que para elaborar palanqueta y cacahuete garapiñado (57 Ton.). Lo que señala la importancia del mazapán como golosina en nuestro -- país.

El cacahuete que se va a almacenar por un tiempo, inmediatamente después de la cosecha, debe secarse para evitar que - los daños causados por insectos y otras plagas, que se dan so lamente en el cultivo en crecimiento, provoquen que el cacahuete sea más susceptible al ataque por mohos.

Generalmente, ya seco el cacahuete entero, para su trans-- porte en gran cantidad, se envasa en sacos de yute. Los pesos envasados son de 45 u 80 kg por saco.

Comunmente se emplean forros de polietileno para los sacos, que lo protegen contra posibles daños debidos al agua y a una alta humedad del medio ambiente, por lo que es muy importante que el cacahuete antes de ser envasado tenga un contenido de humedad seguro (6 - 7%).

. Almacenamiento

Antes de almacenar el grano, éste debe cumplir con ciertos requisitos para evitar una contaminación con hongos y la consiguiente producción de aflatoxinas:

- Los cacahuates deben ser inicialmente de alta calidad; deben estar libres de insectos, hongos, rancidez, olores, y poseer el olor característico de la variedad a que pertenecen.
- Deben ser almacenados a baja temperatura.
- El grado de humedad deberá ser mantenido lo más bajo posible (10% o menos), si dicho % llegara al 70% el grano podría ser fácilmente atacado.
- Los cacahuates pueden absorber olores y sabores del área don de se encuentran almacenados, por lo que dicha área debe ser inodora y con una buena ventilación.
- Se debe evitar la condensación de la humedad sobre los cacahuates, ya sea removiéndolos durante los períodos de baja humedad, o transportando los granos utilizando refrigeración.

Las condiciones de almacenamiento del cacahuete para almacenar por más de un mes son: temperaturas de 1 - 6°C con una humedad relativa de 55 - 70%. Los cacahuates son cosechados, secados e inmediatamente después almacenados. Es necesaria la circulación de aire seco para mantener una humedad de 6 - 7% en el cacahuete.

Al igual que todos los productos agrícolas no perecederos, el cacahuete esta sujeto al ataque por mohos si: la desecación anterior al almacenamiento ha sido insuficiente; si se ha permitido que el producto absorbiera humedad durante el almacenamiento o si se produce translocación de humedad como resultado de calentamiento localizado. Por lo tanto, puede presentarse el deterioro de la calidad, inclusive la formación de micotoxinas.

Un almacenamiento prolongado en condiciones muy secas dará por resultado una dureza excesiva que puede dar origen a mayores pérdidas de factores nutritivos durante la cocción o también, puede disminuir la digestibilidad y la aceptabilidad. -- Por lo antes mencionado son preferibles estas condiciones, al riesgo de daños por mohos.

Las plagas de insectos pueden eliminarse por medio de plaguicidas, si se le lleva a cabo en debida forma, pero la reinfestación será probable si no se observa una higiene estricta del almacén. La mejor protección contra la reinfestación se logra por medio de la aplicación directa de mezclas de insecticidas adecuados, espolvoreados o rociados.

. Procesamiento de las semillas de cacahuete

Después de recibir e inspeccionar el cacahuete en la planta, éste se almacena (en condiciones adecuadas) o puede utilizarse inmediatamente. La primera etapa del proceso es el descascado, durante el cual también se elimina toda materia extraña, - esto se hace por medio de rodillos y cribas vibratorias y con elutración por aire. Posteriormente los cacahuates son almacenados en refrigeración.

La siguiente etapa es el tostado, el cual se realiza a temperaturas cercanas a 145°C, a esta temperatura los aminoácidos libres y el azúcar en el cacahuete, reaccionan para formar pirazinas, que son los compuestos responsables del sabor propio del tostado.

Al terminar el tostado se procede a una molienda y mezclado con otros ingredientes (azúcar glass y otros), hasta obtenerse un polvo fino, el cual se prensa en los moldes y se empaca. El dulce de mazapán obtenido se almacena hasta el momento de su distribución. La fig. 3.1 muestra las operaciones en la fabricación del dulce de mazapán.

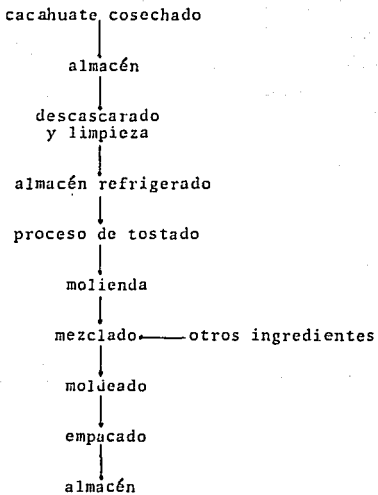


Figura 3.1 Diagrama de flujo del proceso del cacahuate para la obtención del dulce de mazapán.

3.2 Cacao

El cacao, Theobroma cacao, es una de las 22 especies que constituyen el género Theobroma, miembro de la familia Sterculiaceae. El género es nativo de América y la especie se extiende por el norte: desde el sur de México, hasta Brasil y Bolivia en el sur. Sólo Theobroma cacao produce el producto que se comercia, aunque en ocasiones se utilizan otras especies como adulterantes.

Los principales requerimientos climatológicos del cacao son:

- Precipitación de 1100 a 3000 mm/año y de preferencia entre 1500 y 2000 mm/año, con una estación de no más de 3 meses.
- Temperaturas que varían entre 30 - 32°C media máxima y 18 - 21°C de media mínima.
- Ausencia de vientos fuertes persistentes.

En México el cacao se cultiva sólo en 5 estados. En 1891 se alcanzó la producción de 30,407 Ton., en un total de 74,355 Ha. de superficie sembrada, obteniéndose un rendimiento promedio total de 0.452 Ton./Ha. En la tabla 3.2 se señala la producción nacional del cacao en el año de 1981.

Tabla 3.2 Producción de cacao en 1981.

Estado	Producción anual (Ton.)	(%)	Superficie sembrada (Ha.)
Tabasco	22,000	72	44,000
Chiapas	8,177	27	30,000
Veracruz	85.00	0.28	85.00
Guerrero	74.00	0.24	202.00
Oaxaca	71.00	0.23	68.00

El cacao se destina principalmente para la elaboración de chocolate de mesa, ya que en el año de 1975 (12) se utilizaron 12,125 Ton. de cacao para éste producto y sólo 254 Ton. para coberturas de chocolate. Por lo tanto su uso es considerable en este país.

La cosecha del cacao comprende cortar las mazorcas del árbol y abrirlas para sacar los granos húmedos, los cuales posteriormente son fermentados. El objetivo de la fermentación es producir granos de cacao que al elaborarse produzcan un buen chocolate. La fermentación significa conservar una masa de cacao bien aislada, de tal manera que retenga el calor, al mismo tiempo que permita el paso del aire a través de ésta. La operación dura hasta 7 días y es seguida de inmediato por el secado. Para poder almacenar los granos con seguridad, el contenido de humedad debe ser de 6 - 7%, por lo tanto se requiere de un secado en un lapso de 24 hrs. máximo después de la fermentación. El secado se puede hacer por exposición al sol o por medios artificiales.

Después del secado, los granos se envasan en sacos de yute y son almacenados.

Los granos de cacao son higroscópicos y en condiciones de mucha humedad la absorben; generalmente aquellos con humedad mayor del 8% se enmohecen. Por lo tanto, en los almacenes de cacao la humedad relativa no deberá exceder del 80% en ningún momento.

Donde existen condiciones en especial húmedas, o donde es probable que se prolongue el intervalo entre el envasado y el embarque, los granos se pueden proteger utilizando forros de polietileno dentro del saco normal de yute, y de ésta forma conservar la humedad entre 6 y 7%.

. Normas Internacionales para el cacao

Se han formulado unas Normas Internacionales para el cacao, resultado de una serie de reuniones entre productores y consumidores, patrocinados por la FAO (Food and Agricultural Organization).

El reglamento modelo define como sigue al "cacao de calidad comercial":

- El cacao de calidad comercial debe estar fermentado, bien seco, libre de granos ahumados, de olores anormales o extraños y libre de muestras de adulteración.
- Debe estar razonablemente libre de insectos vivos.
- Debe ser razonablemente uniforme de tamaño, libre de granos quebrados, fragmentos y trozos de cáscara y virtualmente libre de materia extraña.

. Almacenamiento

- El cacao se debe almacenar en estructuras que permitan mantener el contenido de humedad de los granos suficientemente bajo. El almacenamiento deberá hacerse sobre rejillas o plataformas, que dejen al menos un espacio de 7 cm del suelo.
- Se deben tomar medidas para prevenir la infestación por insectos, roedores y otras plagas.
- El cacao envasado se debe estibar de tal manera que:
 - a) Cada marca de clase y embarcador se conserve separada -- por pasillos libres de no menos de 60 cm de ancho, dejando un espacio similar entre los sacos y cada pared del edificio.
 - b) Donde se requiera, se debe desinfectar con fumigación y/o el empleo cuidadoso de insecticidas asperjables aprobados (piretrinas).
 - c) Se debe impedir la contaminación con olores, sabores o polvos de otros productos, tanto alimenticios como materiales tales como queroseno, cemento y alquitrán.

- Periódicamente durante el almacenamiento y de inmediato, - antes del embarque, se debe comprobar el contenido de humedad de cada lote.

. Procesamiento de las semillas de cacao

En la fábrica de chocolate y cocoa, se tuestan las semillas para desarrollar más su sabor y color. El tostado reduce el contenido de humedad y ablanda la cáscara. El tiempo de tostado puede variar de 15 a 70 min, dependiendo de la construcción de la máquina y el tamaño de la carga. Los granos destinados para producción de polvo de cocoa, son usualmente tostados a temperaturas de 116 - 121°C; para el chocolate, temperaturas de tostado de 99 - 104°C. Luego, los granos se introducen a máquinas separadoras que eliminan la cáscara y separan el germen por tamices y elutriación por aire. Posteriormente las semillas se pasan por varios tipos de molinos que las desgarran y trituran, liberando la grasa de sus células. El calor generado por la molienda derrite la grasa, y las semillas molidas van adquiriendo una consistencia fluida; para evitar la contaminación microbiana se enfría con aire seco y frío. El líquido que sale del molino se conoce como licor de cacao. La fig. 3.2 indica el orden de éstas y operaciones subsecuentes de la fabricación.

El licor de cacao se comprime en prensas hidráulicas. En el prensado se reduce el contenido de grasa en la torta de 55 a 22% y en 30 min a 14%. Aquí se separa la manteca del cacao que sale de la prensa y dentro de ella queda la torta de cacao.

La pasta prensada que queda después de exprimir gran parte de la manteca de cacao del licor, es la materia prima para la fabricación de la cocoa. Obtenida la torta de cocoa, se pasa a través de unos rodillos quebradores para reducirla de tamaño y después a través de un molino de martillos en -

combinación con cribas o selectores rotatorios. La torta a la salida de la prensa tiene una temperatura de 43 - 45°C y a la salida del molino debe ser de 21 - 24°C y la temperatura en la molienda no debe sobrepasar los 34°C con el fin de que los glicéridos de la manteca de cocoa no se fundan y provoquen apelmazamientos. Esto requiere aire de enfriamiento, el cual debe ser seco y tener una humedad relativa no mayor de 50 - 60% en el molino, ya que a un alto contenido de humedad, se producen problemas microbianos, principalmente en los ductos del molino.

La propiedad más importante de la cocoa, además de sabor y color, es la fineza de las partículas, ya que ésta mejora la solubilidad en líquidos y en confitería, mejora la dispersión y pigmentación.

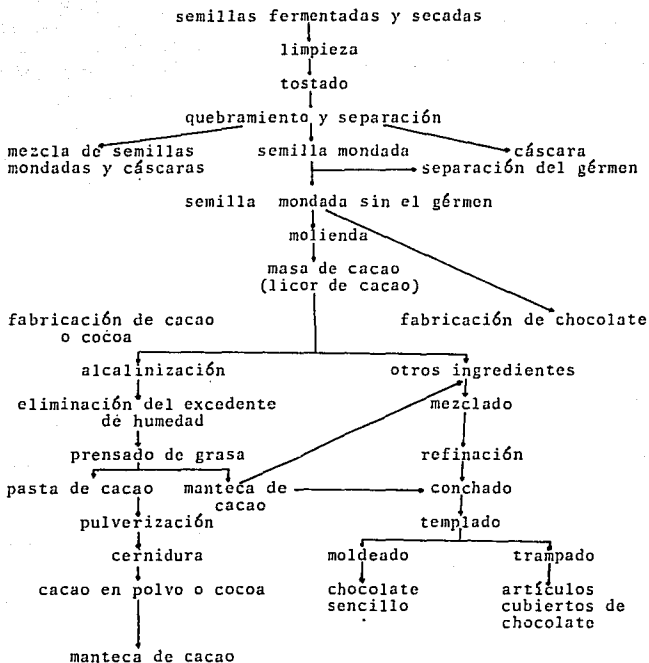


Fig. 3.2 Diagrama de flujo en la fabricación del cacao en polvo (cocoa) y chocolate.

4. AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son productos tóxicos producidos por hongos: Asp. parasíticus y Asp. flavus principalmente.

El sustrato natural para los hongos productores de aflatoxinas son principalmente semillas, y otros alimentos y materiales alimenticios de origen biológico. Estos sustratos comprenden cacahuates, arroz, maíz, trigo y otros productos de agricultura. Las aflatoxinas llegan a constituir grandes problemas, tanto de salud humana como económicos.

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

• Factores que influyen en la producción de aflatoxinas en sustratos naturales

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

La producción de aflatoxinas en algunos sustratos depende de varios factores como: especie de hongo, temperatura, aereación y período de incubación. Es ampliamente reconocido que el factor más importante en el crecimiento de Asp. flavus y en su producción de aflatoxinas, es la humedad relativa contenida en los sustratos naturales.

Asp. flavus está clasificado como un hongo mesofílico que requiere de las siguientes temperaturas para su desarrollo: -- mínima 6 - 8°C, óptima 36 - 38°C y máxima 44 - 46°C. Las temperaturas máxima y mínima de crecimiento son afectadas por: humedad, concentración de oxígeno, sustancias nutritivas y otros factores. Asp. flavus tiene un alto límite de temperatura máxima para el crecimiento sobre sustratos naturales pero éste disminuye en medios sintéticos.

Bampton (2) descubrió en cacahuates que cuando la semilla o fruto llega a su límite de madurez y no se cosecha, hay un aumento en la producción de aflatoxinas. Así mismo, demostró -- que en el caso de semillas almacenadas, Asp. flavus invade con mayor facilidad a las mismas, en relación a su tiempo de envejecimiento.

El crecimiento del hongo durante el almacenamiento en sustratos naturales, también depende de las condiciones atmosféricas en el microclima que rodea al sustrato. El hongo es altamente aeróbico y requiere una cierta cantidad de oxígeno para la formación y germinación de esporas, y crecimiento vegetativo.

Se ha visto que el hongo puede crecer y producir esporas, -- pero la concentración de aflatoxina se reduce con cada aumento sucesivo de dióxido de carbono en la atmósfera, y no hay producción de las mismas cuando hay un 100% de CO₂.

Asp. flavus frecuentemente se encuentra asociado con otros microorganismos en granos, semillas y frutos almacenados por -- lo que, debido a la competición microbiana por el sustrato, bajo condiciones favorables para su desarrollo, se reduce la concentración de aflatoxinas formadas. Aproximadamente 1000 microorganismos incluyendo bacterias, actinomicetos, levaduras, algas, mohos y esporas de hongos, tienen la habilidad de degradar las aflatoxinas, y si se encuentran creciendo en el mismo sustrato que Asp. flavus, disminuirá la concentración de las -- mismas.

. Factores que influyen en la producción de aflatoxinas en cultivos sintéticos

En la producción de aflatoxinas en medios sintéticos, las concentraciones obtenidas son diferentes a las que se producen en medios naturales, probablemente por la superficie expuesta a la contaminación. La aereación y el pH, son dos factores muy importantes para obtener un buen crecimiento del hongo; siendo el pH óptimo de 8. El tiempo de incubación y la temperatura están directamente relacionados con la producción de aflatoxinas, siendo la temperatura óptima de 24°C para B₁ y 30°C para G₁, con un período de incubación de 12 días. La esterilización del medio se realiza en autoclave para evitar cambios indeseables en la composición de las soluciones nutritivas. Además, se pueden producir materiales tóxicos, particularmente cuando hay altas concentraciones de carbohidratos.

4.1 Aspectos que Regulan el Problema de Micotoxinas en los Alimentos

A continuación se señalan algunos aspectos importantes del problema de micotoxinas:

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

- d) Las micotoxinas son relativamente estables a solventes orgánicos de diversos tipos de estructuras. La mayoría puede sobrevivir a las operaciones de procesamiento comunes de alimentos.
- e) Los niveles de micotoxinas relacionados con efectos tóxicos agudos en humanos no son encontrados en alimentos, pero sí en aquellos para animales. De mayor interés son los posibles efectos a largo plazo y bajos niveles de ingestión (efectos de toxicidad subagudos y crónicos tales como mutagénesis, teratogénesis y carcinogénesis).
- f) Las micotoxinas han sido encontradas en alimentos para animales en niveles que pueden producir efectos tóxicos agudos en animales de granja. Existiendo la posibilidad de encontrar residuos de sus metabolitos tóxicos en carne, leche y huevos (15).

En 1960, la FDA (Food and Drug Administration) comenzó a investigar sobre un hongo contaminante de cacahuates que podría contener un componente altamente tóxico, y después con el brote de la famosa enfermedad "Turkey X", en Inglaterra. Posteriormente se concluyó que estos tóxicos son las aflatoxinas, potentes hepatocarcinógenos en animales experimentales.

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

Después que se reconoció la susceptibilidad de los cacahuates a la contaminación por aflatoxinas, la FDA y la industria establecieron un acuerdo que incluía un plan de muestreo, análisis y certificación de todos los cacahuates destinados para el consumo humano. Este acuerdo fue diseñado para eliminar --

los lotes de cacahuates crudos contaminados por aflatoxinas - antes de finalizar la manufactura del producto. Los productos finales no deben contener un total de más de 20 ppb de aflatoxinas.

Respecto a la presencia de residuos de aflatoxinas en alimentos de origen animal, como en leche, huevos, etc., se ha determinado y mantenido el mismo nivel de aflatoxinas en alimentos para animales.

4.2 Química de las aflatoxinas

El término aflatoxinas, normalmente se refiere al grupo de metabolitos de bisfurano cumarina aislada de especies de hongos Asp. flavus.

Los tipos más importantes son B_1 , B_2 , G_1 y G_2 . Las aflatoxinas muestran una alta fluorescencia bajo luz Ultravioleta; B_1 y B_2 producen una fluorescencia violeta-azul y la G_1 y G_2 una fluorescencia azul-verde. Estas propiedades facilitan los procedimientos de purificación y forman las bases para análisis químicos. Otras 4 aflatoxinas M_1 , M_2 , B_2A y G_2A las cuales se producen en cantidades menores, fueron aisladas de cultivos de Asp. flavus y Asp. parasíticus. Otros compuestos relacionados son paratísicol, aflatoxícol y aflatoxina GM_1 , que también son producidos por hongos del grupo Asp. flavus.

En algunas especies animales, por ej. el ganado lechero, - las aflatoxinas B_1 y B_2 son particularmente metabolizados y producen los derivados hidroxilados: las aflatoxinas M_1 y M_2 - respectivamente. La aflatoxina P_1 , la cual esta conjugada, es el principal metabolito urinario de la aflatoxina B_1 en monos y no ha sido aislada en cultivos.

Las estructuras de las aflatoxinas y de los derivados se - muestran en las figuras 4.1, 4.2 y 4.3.

Las aflatoxinas B_2 y G_2 son dihidroderivados de las aflatoxinas B_1 y G_1 . La síntesis en el laboratorio de la aflatoxina

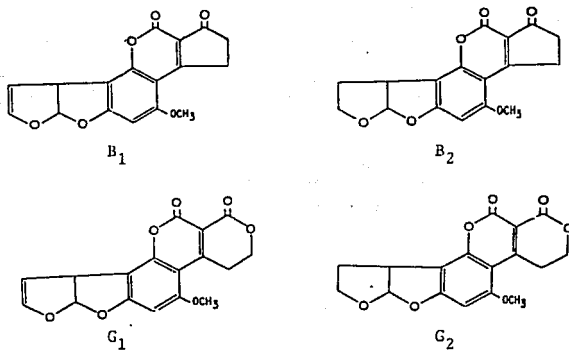


Fig. 4.1 Estructuras de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

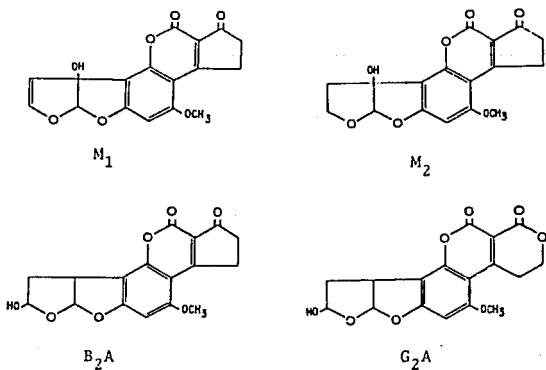
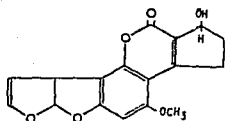
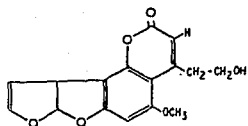


Fig. 4.2 Estructuras de las aflatoxinas M₁, M₂, B₂A y G₂A.



Aflatoxicol



Paratisicol

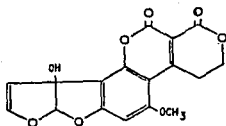
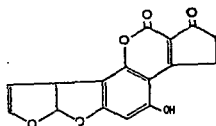
GM₁P₁

Fig. 4.3 Estructuras de aflatoxicol, paratisicol, y aflatoxinas GM₁ y P₁.

B_1 y B_2 confirman estas estructuras (fig. 4.1). Algunas de -- las propiedades químicas y físicas de las aflatoxinas y sus -- derivados más importantes están resumidas en la tabla 4.1.

. Aflatoxina B_1

Aflatoxina B_1 ($C_{17}H_{12}O_6$) de nombre químico: 2,3,6a α , 9a α -tetrahidro-4-metoxiciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1] benzopiran-1,11-diona, exhibe una fuerte fluorescencia azul -- cuando se expone a luz Ultravioleta. Forma cristales incolores, con punto de fusión de 268°C - 269°C (descomposición).

. Reacciones químicas de las aflatoxinas

Las siguientes reacciones de aflatoxinas han sido estudiadas extensivamente por la posible aplicación para la detoxificación del material contaminado por aflatoxinas.

- Calor. Las aflatoxinas secas son muy estables al calor arriba de su punto de fusión. No obstante, en presencia de humedad y a temperaturas elevadas hay una destrucción de aflatoxinas en cierto tiempo. Tal destrucción puede ocurrir en harinas oleaginosas y en cacahuates tostados.
- Alcalis. En solución alcalina ocurre la hidrólisis de la mitad de la lactona. Esta hidrólisis parece ser reversible, -- ya ha sido mostrado que la reciclización ocurre después de una acidificación a altas temperaturas (100°C).
- Ácidos. En presencia de ácidos minerales las aflatoxinas B_1 y G_1 son convertidas a aflatoxina B_2A y G_2A debido a una -- adición de agua catalizada por ácido.
- Agentes oxidantes. Muchos agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio, el permanganato de potasio, cloro, peróxido -- de hidrógeno, ozono y perborato sódico, reaccionan con la -- aflatoxina y cambian su molécula de varias formas, perdiendo fluorescencia.
- Reducción. Una hidrogenación cuidadosa de la aflatoxina B_1 -- y G_1 produce las aflatoxinas B_2 y G_2 , respectivamente. Reducciones de la aflatoxina B_1 por 3 moles de hidrógeno produce tetrahidroxiaflatoxina. La reducción de las aflatoxi--

Tabla 4.1 Propiedades químicas y físicas de las aflatoxinas y sus derivados

Aflatoxina	Fórmula Molecular	Punto de ebullición (°C)	Absorción UV	Emisión de fluorescencia
B ₁	C ₁₇ H ₂₂ O ₆	268-269	21,800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	286-289	23,400	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	244-246	16,100	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	237-240	21,000	450
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	299	19,000 (357 nm)	425
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	295	-	-
B ₂ A	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	240	20,400	-
G ₂ A	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	190	18,000	-
R ₀	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	230-234	14,100	425
B ₃	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	233-234	9,700	-
GM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	276-277	12,000 (358 nm)	-
P ₁	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	320	14,900 (342 nm)	-

nas B₁ y B₂ con borohidruro sódico produce las aflatoxinas-RB₁ y RB₂, respectivamente. Esto es resultado de la apertura del anillo de la lactona seguida por una reducción del grupo ácido y una reducción del grupo ceto en el anillo del ciclopentano.

- Radiación. La irradiación de la aflatoxina B₁ y G₁ en placas con sílica gel con luz Ultravioleta a 365 nm, convierte ambos compuestos a dos nuevos fotoproductos fluorescentes, el producto de la aflatoxina B₁ es significativamente menos tóxico que el compuesto original. También se observan cambios en el espectro de absorción UV e IR en soluciones de B₁ y G₁ en buffer de fosfato (pH 7) expuestas a la luz UV de baja longitud de onda, produciéndose toxinas menos tóxicas.

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

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

. Biosíntesis

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

Biollaz et. al. (2) fueron los primeros en formar hipotéti-

camente un esquema de la conversión biológica de hidrocarburos polihidroxicíclicos en aflatoxinas y compuestos relacionados. Todo esto se compone de una secuencia interrelacionada. Cualquiera de las dos, una polihidroxi-naftacena o una polihidroxi-benzantraceno podrían teóricamente ser el punto de inicio para la biosíntesis de aflatoxinas. Alternativamente, un polihidroxi-benzantraceno isomérico puede servir como un precursor de aflatoxinas. En la fig. 4.4 se muestra una probable secuencia de la biosíntesis de aflatoxinas y compuestos relacionados.

4.3 Metabolismo y Efectos Bioquímicos de Aflatoxinas

. Metabolismo de aflatoxinas

Se ha puesto mucho énfasis en el metabolismo de las aflatoxinas, en el probable mecanismo bioquímico y en los efectos patofisiológicos de la toxina, por su gran potencia carcinogénica.

La molécula de aflatoxina tiene su biodegradación al menos por 6 formas:

- Ataque por moléculas de hidrógeno o agua en el vinil éter ó 2,3-doble ligadura.
- Apertura o degradación de la estructura bisfuranoide.
- Dimetilación de la estructura metoxicumarina.
- Fisión hidrolítica de la 7,8C-O, ligadura en la lactona cumarina.
- Reducción de la ciclopentanona.
- Hidroxilación en uno o más puntos de la molécula.

Es importante señalar la formación de los metabolitos hidroxilados por dos razones: primero, los derivados de las altamente tóxicas aflatoxinas B_1 y G_1 son también muy tóxicos, y segundo, la aflatoxina M_1 , siendo el metabolito de la aflatoxina B_1 más común, es algunas veces un contaminante accidental de la leche de vaca y así se introduce en los alimentos del humano.

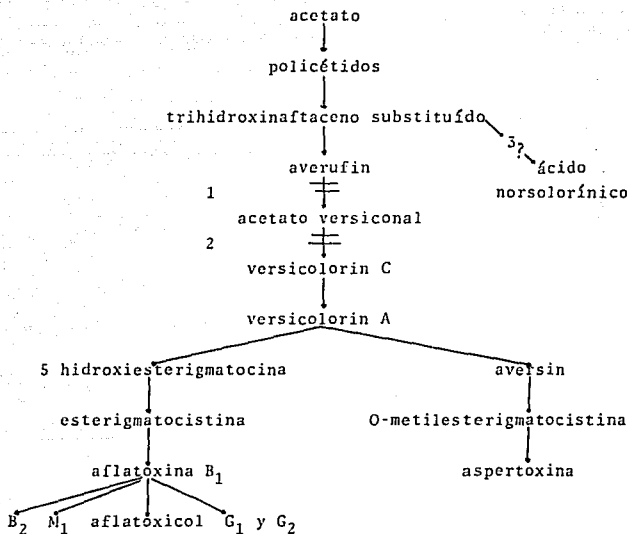


Fig. 4.4 Probable camino biosintético para aflatoxinas y -- compuestos relacionados. 1, averufin mutante; 2, resultado de la inhibición por dicloros; 3, mutación inducida del nitrosoguanadina.

Se ha establecido una relación entre la ingestión total diaria de aflatoxina B_1 y la concentración de aflatoxina M_1 en la leche. Para calcular esta relación se utiliza la fórmula $0.637X - 0.044$, expresada en $\mu\text{gr/lt}$, donde X es la cantidad diaria de aflatoxina (mg) ingerida por la vaca. De estos estudios se concluyó que cuando la ingestión diaria de aflatoxina B_1 cae bajo 0.07 mg, la aflatoxina M_1 no es detectada en la leche.

Los estudios reportados por Nabney et. al. (13) determinaron que solamente el 8.1% de una dosis oral de una mezcla de aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 (1 mg/kg) fue recuperado en sus formas identificables en la leche, orina y heces de la oveja-lechera. Posteriormente Allcroft obtuvo una conclusión similar en las vacas lecheras, solamente un 4.5% de una dosis oral de 300 mg de una mezcla de aflatoxinas fueron encontradas como aflatoxinas no metabolizadas.

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

Una representación esquemática de el metabolismo y mecanismo de acción tóxica de la aflatoxina B_1 por medio de células hepáticas, su conversión a 6 metabolitos y las probables vías de B_2A y el epóxido, como toxinas de efectos agudos y crónicos, respectivamente, puede ser observada en la fig. 4.5.

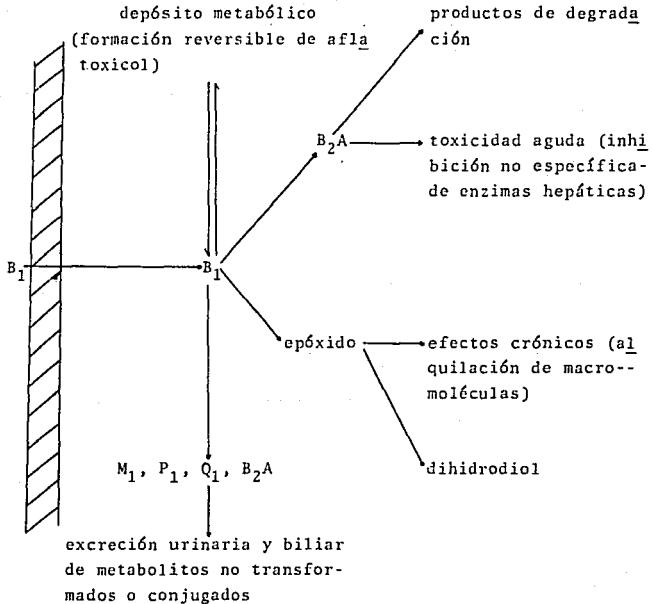


Fig. 4.5 Metabolismo y mecanismo de acción tóxica de la aflatoxina B₁.

. Efectos bioquímicos de aflatoxinas

Diversas investigaciones han dado como resultado la existencia de una interacción de aflatoxinas con constituyentes celulares que tienen varias manifestaciones según la actividad de la aflatoxina, demostrando su toxicidad y cancerogenicidad en animales y en cultivos de células, entre otros.

No existe una completa información para definir la secuencia de los efectos bioquímicos, teniendo solamente referencias de manifestaciones de cancerogenicidad y toxicidad, ya que los cambios bioquímicos ocurren inmediatamente después de la exposición de animales y cultivos de células a las aflatoxinas; las reacciones involucradas en estas respuestas son alteraciones con el ácido nucleico y metabolismo protéico. La interacción con el DNA ocurre en la transcripción, pudiendo resultar una comunicación imparcial en la síntesis de DNA y RNA, por virtud de la inhibición de las polimerasas responsables de sus respectivas síntesis.

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

Un resumen de la información sobre el tema indica que una gran proporción de una dosis sencilla de aflatoxina B₁ es rápidamente excretada por las ratas.

4.4 Efectos Patofisiológicos de Aflatoxinas

Existen interacciones entre la toxina y varios sistemas metabólicos y fisiológicos que incluyen efectos en proteínas, lípidos y metabolismo de carbohidratos; interacción con ácidos nucleicos y enzimas; interrupción del transporte de electrones en el intercambio respiratorio terminal; acción en células y membranas subcelulares y muchos otros efectos biológicos.

cos, que hacen muy notables las actividades cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas de las aflatoxinas.

. Efectos en membranas celulares

En las primeras investigaciones se encontraron concentraciones de aflatoxinas de $4 \times 10^{-6} M$ en membranas aisladas de organelos in vitro. Más adelante, Bababunmi y Bassir (15), estudiaron los efectos de aflatoxinas en mitocondrias y demostraron un significativo grado de expansión en las del hígado; -- cuando fueron expuestas a la toxina en concentraciones similares a $3 \times 10^{-6} M$. Las mitocondrias susceptibles a los efectos de la aflatoxina son las del hígado y del riñón, y no así las -- del corazón.

Las aflatoxinas también reaccionan con el retículo endoplásmico, causando rápidamente alteraciones en su apariencia granular. La desgranulación del retículo endoplásmico ocurre en la zona peritoneal del hígado, área en la cual se presenta la necrosis. La interacción entre aflatoxinas y varios organelos puede ser explicada sencillamente, de este modo las estructuras similares pueden existir entre las aflatoxinas y -- los ocupantes normales de los sitios de enlace, incluyendo moléculas relacionadas con la aflatoxina B_1 y la esterigmatocistina. Es posible que haya interacciones similares entre la cu marina y la mitocondria del hígado debido a la relación estructural con la aflatoxina.

. Efectos generales en el hígado

Uno de los efectos primarios en el metabolismo de la rata es la inhibición del DNA dependiente del RNA en los núcleos celulares del hígado. Las aflatoxinas primero son metabolizadas antes de ejercer su efecto en el RNA polimerasa y la síntesis de proteínas, este efecto no es sensitivo a esteroides.

La aflatoxina B_1 tiene un efecto diferente en el metabolismo de los carbohidratos: la administración intraperitoneal de

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

Kato et. al. (15) observó que una simple dosis intraperitoneal de la toxina inhibía marcadamente la biosíntesis del colesterol en el hígado. Por otro lado, Clifford y Rees observaron una inhibición similar de la síntesis de fosfolípidos. La síntesis de ácidos grasos hepáticos es afectada en los pollos que consumen alimentos contaminados con aflatoxinas. La inhibición de la síntesis de ácidos grasos resulta de la reducción de la formación de enzimas.

. Efectos agudos de aflatoxinas

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

Las aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 son capaces de retardar la hipersensibilidad de los cerdos de guinea. Los compuestos estructuralmente relacionados, tales como la esterigmatocistina, cumarina, D-metoxifuraleno y cloruro de furazolio son igualmente o más activos que las aflatoxinas y exhiben una reactividad cruzada en las pruebas de alergia de piel.

. Efectos crónicos de aflatoxinas

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

Aspectos metabólicos de la cancerigenicidad de las aflatoxinas:

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

. Aflatoxicosis humana

Durante muchos años se han realizado estudios en varios países, principalmente en Africa y el Sureste de Asia, los cuales han demostrado que una ingestión frecuente de alimentos contaminados con aflatoxinas, provocan cirrosis y cáncer hepático en humanos, presentándose principalmente en hombres con edades entre 35 y 45 años. Se determinó que las fuentes de aflatoxinas más comunes fueron: arroz, ajo, chile, pimienta seca y pescado seco.

4.5 Contaminación por Micotoxinas

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por hongos que crecen en alimentos humanos y para animales. Es posible prevenir la producción de la toxina evitando el crecimiento de hongos. Los insecticidas diclorados, por ej., inhiben la síntesis de aflatoxinas.

. Asp. flavus desarrollada en el campo

Asp. flavus, junto con otras especies de Aspergillus y Penicillium, ha sido considerada como un problema solamente en productos almacenados. Sin embargo el Asp. flavus ha sido detectado en el maíz antes de la cosecha.

No se conocen exactamente qué factores determinan el desarrollo y crecimiento de Asp. flavus en el campo. Su distribución geográfica en maíz, algodón y cacahuete indica que están involucrados climas calientes y/o altas temperaturas. Marsh y Taylor (2) observaron que el Asp. flavus fue abundante en áreas con temperaturas extremadamente altas, en el botón del algodón apenas abriéndose.

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

Son muchos los factores físicos y biológicos que afectan la epidemiología de Asp. flavus en algodón, cacahuete, maíz y otros cultivos. Algunos de los factores que afectan el grado de infección en cacahuates son niveles de inoculación, apertura de las vainas, competencia microbiana, temperatura y humedad. Aunque Asp. flavus está generalmente en el suelo y limitada su existencia en vainas maduras, un gran crecimiento de hongos y acumulación de aflatoxina ocurren después de que los cacahuates son cosechados y antes del secado. La contaminación es más fuerte en cacahuates que tienen dañada su vaina y aquellos que no han sido secados rápidamente.

. Contaminación por Asp. flavus durante el almacenamiento

Especies de Asp. y Penicillium son capaces de crecer rápidamente en granos, nueces y otros productos almacenados, si el contenido de humedad es alto.

Son comunes bajos niveles de contaminación antes de la cosecha, por Asp. flavus y otros hongos de almacenamiento, más la inoculación puede venir del aire, suelo, almacenamiento y equipo de manejo. Por lo tanto, los factores críticos en el crecimiento de los hongos en cosechas almacenadas son: el contenido de humedad y la temperatura.

Asp. flavus requiere de condiciones calientes y humedad relativa arriba de 85% para el desarrollo y formación de la toxina. En el maíz, la humedad correspondiente es arriba de 16%. Los contenidos de humedad bajo los cuales el hongo no se puede desarrollar varían con las especies de granos, pero generalmente corresponden a una humedad relativa de 65% a 70%. En semillas de cereales como maíz, trigo y sorgo, humedades del 13% - al 14% son las máximas para un almacenaje seguro; en semillas con alto contenido de aceites las humedades correspondientes son bajas. La soya debe ser almacenada debajo de 12.5% y las semillas de lino debajo del 9%. Aunque las micotoxinas no pueden ser producidas en bajos niveles de humedad, estos si permiten el crecimiento de hongos, lo cual hace riesgoso el almacenamiento.

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

Actualmente es posible un almacenamiento seguro de granos a diferentes temperaturas. Distintos lotes de granos pueden ser-

en distinta forma almacenados a causa de la variabilidad en -- los daños mecánicos, en la humedad de equilibrio, poblaciones-- iniciales de hongos y almacenamiento previo.

Las siguientes sugerencias podrían ayudar a un almacenamien-- to seguro del grano manteniéndolo libre de hongos y micotoxi-- nas:

- Asegurar que todo el grano este a una humedad baja para evi-- tar el crecimiento de hongos.
- Asegurar la humedad requerida.
- Inspeccionar el grano regularmente al menos una vez por sema-- na.
- La inspección semanal debe incluir temperaturas y buscar in-- sectos, moho y manchas de humedad.
- Cualquier incremento de temperatura que no pueda ser explica-- do, por condiciones climáticas, debe ser considerado un indi-- cador de que un problema está desarrollándose.

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

Un medio de mantener temperaturas bajas y eliminar los gra-- dientes de temperaturas en el almacén es usar ventiladores pa-- ra aereación. Mantener temperaturas uniformes previene la mi-- gración de humedad. Durante los meses de invierno, cuando no -- se usan los ventiladores, se debe inspeccionar el olor y la -- temperatura del grano.

. Secado de granos

Una de las formas de lograr un almacenamiento seguro de -- los granos consiste en el secado de los mismos, con varios ti-- pos de secadores de aire caliente, los cuales trabajan a altas temperaturas. Tales secadores requieren grandes cantidades de-- combustible como gas natural o gas LP, lo cual hace muy caro -- el secado, y para muchos incosteable.

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

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

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

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

. Almacenamiento de granos a alta humedad

Como una alternativa al secado, el grano puede ser almacenado a alta humedad (20%-30% o más) y usado como alimento. El grano con alta humedad puede ser almacenado bajo condiciones herméticas tratados con químicos tales como ácido propiónico.

Estos sistemas protegen el grano contra los hongos y micotoxinas.

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

El uso de preservativos químicos en granos es un reciente desarrollo en almacenaje de los granos con alta humedad. El ácido propiónico es el material más usado, aplicado como ácido propiónico al 100% o en mezclas con ácido acético, ácido isobutírico y formaldehído.

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

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

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

con el concreto o acero no protegidos. Tales superficies deben ser cubiertas por plástico o con pintura resistente a ácidos.

La tabla 4.2 muestra las cantidades de ácido propiónico requeridas para preservar los granos con varios contenidos de humedad. Un rango del tratamiento esta dado para cada contenido de humedad.

Tabla 4.2 Acido Propiónico requerido para prevenir el crecimiento de mohos en granos de alta humedad.

Contenido de humedad (%)	%	lb/ton	kg/ton
18	0.3-0.6	6-12	2.7-5.4
22	0.5-0.8	10-16	4.5-7.2
26	0.6-1.0	12-20	5.4-9.0
30	0.8-1.2	16-24	7.2-10.8

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para identificar y cuantificar la aflatoxina B_1 presente en chocolate instantáneo y mazapán de cacahuete, se tomaron 8 muestras de cada uno de los productos comerciales, al azar, - que se expenden en la zona Metropolitana de Guadalajara, Jal.

Las muestras recolectadas se trasladaron y se analizaron - durante los meses de mayo y junio en la Escuela de Ciencias - Químicas de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de la aflatoxina, primeramente se realizó la extracción y purificación de - la toxina, de acuerdo a procedimientos ya establecidos. La de terminación de aflatoxinas en productos agrícolas presenta dificultades y problemas característicos asociados con el análisis de cada uno de ellos. En esta determinación se hizo de -- igual forma la extracción de la toxina del mazapán y del cho- colate, habiéndose hecho primero una prueba para verificar si el método era aplicable a ambos productos.

Es importante señalar que la cantidad de toxina en alimen- tos frecuentemente es pequeña y generalmente su distribución- en una muestra no es homogénea.

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

Las aflatoxinas que se emplean como estándares se deben manejar cuidadosamente por su alta toxicidad, conservándolas tapadas herméticamente y teniendo precauciones particulares -- cuando las toxinas se encuentran en forma seca o liofilizada, - por su natural electrostática y tendencia a dispersarse en -- áreas de trabajo.

.. Separación y purificación de aflatoxinas

La separación y purificación de aflatoxinas implicó el uso de un solvente de extracción, el cloroformo. El extracto crudo luego fue purificado usando cromatografía en columna.

El procedimiento (4) para la determinación de la aflatoxina comprendió las siguientes etapas:

- Preparación de la muestra (disgregar y homogenizar).
- Extracción de la toxina usando cloroformo.
- Purificación del extracto para eliminar materiales fluorescentes interferentes o, a la grasa, empleando columna de -- cromatografía empacada con sulfato de sodio anhidro y sílica gel (2:1).
- Determinación de la concentración de aflatoxina en el ex--tracto por cromatografía de capa fina, utilizando sílica --gel con indicador de fluorescencia, eluyente cloroformo-ace--tona (90:10 V) y como disolvente del extracto, benceno-ace--tonitrilo (33:2 V).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla 6.1 señala los resultados obtenidos de la determi--nación de aflatoxina B_1 en muestras de dulce de mazapán. La --tabla 6.2, los resultados del análisis de las muestras de cho--colate instantáneo. En dichas tablas se indican las muestras--que presentaron en las placas cromatográficas fluorescencia --en luz UV, así como las que presentaron manchas azules de --aflatoxina B_1 y las observaciones correspondientes.

De las 16 muestras analizadas en total, 3 de mazapán y 8 --de chocolate instantáneo, sólo la muestra 2 de mazapán conte--nía aflatoxina B_1 , ésta presentó una mancha fluorescente simi--lar a la del estandar de B_1 (azul), la cual tuvo un Rf de --0.26 y la muestra de 0.23. La concentración de esta toxina en la muestra es muy pequeña, si la comparamos con el límite dado

Tabla 6.1 Resultados de la determinación de aflatoxina B₁ -
en Dulce de Mazapán

No. de muestra	Fluorescencia azul	Aflatoxina B ₁ μg/kg	Observaciones
1	-	-	-
2	+	0.22	mancha fluorescente.
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	+	trazas	fluorescencia - llegó a la altura del std.
8	+	trazas	fluorescencia - llegó a la altura del std.

Tabla 6.2 Resultados de la determinación de aflatoxina B₁ - en Chocolate instantáneo

No. de muestra	Fluorescencia azul	Aflatoxina B ₁ $\mu\text{g}/\text{kg}$	Observaciones
1	-	-	manchas violeta:
2	-	-	manchas violeta
3	+	trazas	manchas violeta fluorescencia - llegó a la altura del std.
4	+	trazas o derivados	manchas violeta mancha fluorescente azul
5	-	-	manchas violeta
6	-	-	manchas violeta
7	+	trazas	manchas violeta fluorescencia - llegó a la altura del std.
8	+	trazas o derivados	manchas violeta mancha fluorescente azul

7. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos, se concluye que la materia prima del mazapán y chocolate instantáneo, cacahuete y cacao, respectivamente, presentan un mínimo nivel de contaminación.

En las determinaciones realizadas no se encontró aflatoxina B_1 como se esperaba; sin embargo, la contaminación por toxinas en los productos analizados no es totalmente nula.

La presencia de aflatoxina B_1 o derivados puede considerarse como un índice de toxicidad, aún cuando la concentración de ellos sea muy pequeña.

Por las concentraciones trazas y derivados de aflatoxina B_1 encontradas en algunas muestras, existe un deficiente control higiénico durante el almacenamiento y proceso de elaboración.

Para evitar el crecimiento de Asp. flavus y su producción de aflatoxinas, es necesario guardar adecuadas prácticas de almacenamiento.

Durante el proceso es importante mantener un óptimo control higiénico, que evite la contaminación de los alimentos.

El chocolate instantáneo y el dulce de mazapán, siendo productos que se consumen ampliamente por toda la población mexicana, requieren de un adecuado programa de muestreo y análisis para determinar la presencia de aflatoxinas en ellos.

Es conveniente sugerir como un parámetro de control de calidad, la determinación de aflatoxinas en las empresas que procesan productos agrícolas.

Es recomendable que las autoridades sanitarias mexicanas legislen apropiadamente la presencia de aflatoxinas en productos alimenticios.

RESUMEN

Las aflatoxinas son compuestos tóxicos producidos por hongos, principalmente por Aspergillus flavus, los cuales crecen y se desarrollan durante el almacenamiento y desecación de productos agrícolas, como el cacahuete, arroz, maíz, trigo y otros. La producción de estas toxinas depende de la temperatura, humedad y aereación.

Dichas aflatoxinas son consideradas potentes cancerígenos para un gran número de animales e incluso para el ser humano, ya que interaccionan con varios sistemas metabólicos y fisiológicos. De estas, la aflatoxina B_1 es la más tóxica de todas las existentes.

Para determinar la aflatoxina B_1 se analizaron 3 muestras de dulce de mazapán y 8 muestras de chocolate instantáneo. A las muestras preparadas se les extrajo la toxina con cloroformo, posteriormente se purificaron los extractos en columna cromatográfica y por cromatografía de capa fina se cuantificó la toxina.

Del análisis efectuado se encontró que 1 muestra de mazapán contenía .22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxina B_1 y varias muestras, tanto de mazapán como de chocolate instantáneo, contenían trazas de la toxina.

Todas las muestras analizadas de chocolate instantáneo contenían aflatoxina M_2 , derivado de B_1 . El origen de esta contaminación es posible provenga de la leche que se le adiciona al chocolate instantáneo durante su elaboración, ya que a esta aflatoxina (M_2) se le encuentra en la leche de vaca.

Se concluyó que el cacahuete y cacao, con los cuales se elabora el mazapán y el chocolate instantáneo, respectivamente, presentaron un mínimo nivel de contaminación por la aflatoxina B_1 .

Sin embargo, la presencia de trazas o derivados de esta -- toxina puede considerarse como un índice de toxicidad; por lo cual, es factible que existe un deficiente control durante el almacenamiento y proceso de elaboración de estos productos. - Así pues, se recomienda que las autoridades sanitarias mexicanas, legislen apropiadamente la presencia de aflatoxinas en - productos alimenticios.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Bravo C, González A. y Rosiles B. LA AFLATOXINA B₁ EN DULCE DE MAZAPAN. Tecnología de Alimentos, CONACYT, V. 20, No. 4, Jul-Ago, 1985, México, p. 33.
- 2.- Goldbatt A. AFLATOXIN. 2nd. ed., New York, Academic Press, 1972.
- 3.- Hernández R N. INVESTIGACION DE AFLATOXINAS B₁ y G₁ EN CACAHUATE CRUDO Y MUESTRAS COMERCIALES Y PROCESADAS. Tesis Profesional, U.A.G., Guadalajara, Jal. México, 1975.
- 4.- Horwitz W. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 12th. ed., Washington, D.C., A.O.A.C., 1975.
- 5.- Jamieson, Michael y Jobber. MANEJO DE LOS ALIMENTOS, ECOLOGIA DEL ALMACENAMIENTO. México, V. 1, Pax-México, 1981.
- 6.- John Wiley & Sons. ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY. 3rd. ed., U.S.A., John Wiley & Sons, V. 16, 1981.
- 7.- Martínez N. PLANTAS UTILES DE LA FLORA MEXICANA. México, Ediciones Botas, 1959.
- 8.- Minifie B. CHOCOLATE, COCOA AND CONFECTIONARY: SCIENCE AND TECHNOLOGY. U.S.A., A.V.I. Publishing, 1970.
- 9.- Potter N. LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. México, Edutex, 1978.
- 10.- S.A.R.H. ANUARIO ESTADISTICO DE LA PRODUCCION AGRICOLA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. México, 1981.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 11.- Sinha K. LAS LEGUMINOSAS ALIMENTICIAS: SU DISTRIBUCION, SU CAPACIDAD DE ADAPTACION Y BIOLOGIA DE LOS RENDIMIEN--TOS. F.A.O., V. 3, Roma, 1978.
- 12.- S.P.P. X CENSO INDUSTRIAL.1976. México, 1976.
- 13.- Wyllie D., Morehouse G. MYCOTOXIC FUNGI, MYCOTOXINS, MYCOTOXICOSIS, ENCYCLOPEDIC HANDBOOK. New York, V. 1, Ma--rull Sekker, 1977.
- 14.- Wyllie D., Morehouse G. MYCOTOXIC FUNGI, MYCOTOXINS, MYCOTOXICOSIS, ENCYCLOPEDIC HANDBOOK. New York, V. 3, Ma--rull Sekker, 1977.
- 15.- Wood G. CACAO. México, C.E.C.S.A., 1982.