

8
24 300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

**ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA UNAM.**

**“ DETERMINACION DE MICOTOXINAS EN DULCE DE CACA-
HUATE ESTILO MAZAPAN, UTILIZANDO UNA TECNICA DE
DETECCION MULTIPLE”**

Tesis Profesional

**Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

p r e s e n t a

CAROLINA BRAVO HERRERA

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

	Pág.
Descripción del trabajo	3
Justificación	3
Objetivos	5
Generalidades	5
- Micotoxinas	5
- Aflatoxinas	15
- Aspectos Analíticos	38
- Métodos de Control de Aflatoxinas	42
Desarrollo Analítico	49
Método	51
Resultados y Discusión de Resultados	53
Conclusiones	59
Anexos	61
Bibliografía	62

DESCRIPCION DEL TRABAJO

La presente investigación tiene como objetivo primordial, la detección de micotoxinas en dulce de cacahuete estilo mazapán, -- principalmente de aquellas que en su estructura contienen un anillo bisfurano. Para establecer el muestreo adecuado, fue necesario considerar las marcas comerciales existentes en el D.F. El tamaño de la muestra se eligió con base en los Planes de Toma de Muestras para Alimentos Preenvasados del Codex Alimentarius.

Las muestras se prepararon conforme a lo recomendado por los Métodos Oficiales de la AOAC y el análisis se hizo por el método de Stoloff, con variantes en la eliminación de la fracción grasa. La cuantificación se efectuó por un método semicuantitativo en cromatografía en capa fina, comparando intensidad de mancha con estándares puros.

Los resultados se agruparon y fueron analizados. Con base a lo anterior, se formularon las conclusiones y recomendaciones pertinentes.

JUSTIFICACION

Desde el punto de vista de la salud pública, la determinación de micotoxinas en alimentos de consumo humano animal es importante, porque entre ellas se encuentran sustancias con un elevado poder carcinogénico, como es el caso de las aflatoxinas, que presentan uno de los mayores poderes hepatocarcinogénicos sobre una gran variedad de animales y sobre el hombre. Por otro lado, las micotoxinas son productos metabólicos de un organismo vivo (el hongo) que existe en el sistema ecológico natural, por lo que no pueden ser totalmente erradicados.

De las micotoxinas se determinaron aquellas que tienen en su

estructura un anillo bisfurano, porque se sabe que son las que presentan mayor toxicidad. Entre estos compuestos se encuentran la esterigmatocistina y las aflatoxinas, ambas producidas principalmente por los géneros Aspergillus y Penicillium.

La esterigmatocistina es uno de los precursores de las aflatoxinas y aunque presenta una menor toxicidad, se considera de mucha importancia.

Las aflatoxinas son sustancias que se encuentran fácilmente en productos agrícolas (maíz, arroz, cacahuate, etc.), ya que en ellos los hongos productores de éstas, encuentran un medio favorable para su desarrollo.

Actualmente, no existe ningún proceso a nivel industrial que sea adecuado para la eliminación de las aflatoxinas, a excepción de la técnica para el refinamiento del aceite comestible, sin que además, se altere el valor nutritivo de los alimentos.

Uno de los sustratos en el cual se pueden desarrollar este tipo de hongos productores de micotoxinas, como anteriormente se mencionó, es el cacahuate. En estudios realizados sobre este tema, se ha encontrado que contienen niveles considerables de aflatoxinas.

Debido a los elevados niveles de producción comercial de dulces de cacahuate estilo mazapán, y de acuerdo a lo anteriormente expuesto, se impone la necesidad de conocer el grado de contaminación debido a la presencia de aflatoxinas.

El estudio está enfocado básicamente a la detección de aflatoxina B₁, puesto que es la que presenta mayor grado de toxicidad y la que se encuentra en mayor cantidad en relación a los otros tipos de aflatoxinas.

OBJETIVOS

1. Determinar la presencia de micotoxinas, principalmente de aflatoxina B₁ y esterigmatocistina, en dulce de cacahuete estilo mazapán.
2. Investigar medios de control para evitar la contaminación en el producto final (dulce).

GENERALIDADES

MICOTOXINAS

El término micotoxinas, que se deriva del griego 'mykes' (hongo) y del latín 'toxicum' (veneno), se emplea para designar metabolitos secundarios de origen fúngico, que causan cambios patológicos y anomalías fisiológicas en el hombre y en los animales de sangre caliente. La micotoxicosis es el envenenamiento que puede seguir a la ingestión de alimentos y forrajes contaminados con micotoxinas. (47)

A diferencia de otros agentes tóxicos naturales y de los microbios patógenos, los hongos productores de micotoxinas no se encuentran restringidos en cuanto a su distribución regional y son capaces de circular libremente en el ambiente sin depender de un parasitismo selectivo al cuerpo humano, como en el caso de los microbios patógenos. En segundo lugar, las micotoxinas producidas aparecen en donde el hongo crece y puede persistir en el material afectado, aún después de la erradicación del hongo. (47)

A principios de este siglo, ya se conocía que ciertos metabolitos tóxicos de origen fúngico, producían efectos biológicos tanto en el hombre como en animales; sin embargo, siempre se mostró poco interés en ellos, hasta que en 1960, se presentó un importante caso de micotoxicosis en Gran Bretaña. A partir de ese momento se ha demostrado que muchas enfermedades cuya etiología se desconocía, resultaban de la ingestión de alimento y forraje contaminado por hongos. (47)

Entre los casos de micotoxicosis que se han reportado en el último siglo, se encuentran:

1. En el siglo XIX en Japón, se presentó una enfermedad cuya -- etiología se relacionó con la ingestión de arroz amarillo con taminado. En Rusia se presentó un caso similar relacionado con la ingestión de trigo y cebada almacenada durante largos períodos.
2. Uno de los casos de micotoxicosis más importantes, es el conocido como Ergotismo, que es el producido por la ingestión de centeno y otros granos contaminados por el hongo Claviceps purpurea. En la actualidad, no se presentan más que casos muy aislados, el último brote a gran escala se presentó en 1825 e importantes casos se presentaron en Rusia (1926-27), Inglaterra (1928) y Francia (1951).
3. El eczema facial, es producido por la ingestión de pastura infectada con Pithomyces chartorum. Esta enfermedad se conoce desde 1822 y en 1952 en E.U.A. se presentaron varios casos.
4. La enfermedad producida por Fusarium es la micotoxicosis, que aparte de ser una enfermedad muy típica, es muy compleja. En Japón únicamente se han presentado casos aislados, mientras que en Rusia se han reportado casos a gran escala. (47)
5. Otro tipo de micotoxicosis, es la que resulta de la ingestión de forrajes (heno, paja, etc.) infectados por el hongo Stachybotrys atra. Este síndrome se reportó primero en Rusia en --

1931, donde afectó severamente caballos causando un elevado índice de mortalidad. Se ha demostrado que varios animales domésticos y de laboratorio, así como el hombre, son susceptibles a esta micotoxina.

6. Otra enfermedad conocida con el nombre de ATA, es la micotoxicosis, que aparte del ergotismo, ha causado muchas muertes de seres humanos durante epidemias de la enfermedad. En donde se ha presentado con mayor frecuencia es en Rusia. (40)

A pesar de los importantes casos de micotoxicosis que se han presentado, no fue hasta la década de los años 60's que debido a la muerte de muchos pavos en Inglaterra, y en otros países donde se presentaron casos similares, que se comenzaron a hacer estudios serios sobre estas enfermedades. (40)

CARACTERISTICAS Y CLASIFICACION

En general, todos los alimentos tanto para consumo humano como animal, están expuestos a la contaminación por hongos, la cual puede ocurrir durante su cultivo, cosecha, transporte y almacenamiento y aun en las tiendas, restaurantes y el hogar, en donde esperan para ser consumidos. Siempre hay una posibilidad de que se reúnan las condiciones necesarias para su crecimiento. (40)

Desde el punto de vista ecológico, las condiciones climáticas, como la temperatura y la humedad, controlan el crecimiento de los hongos y su actividad. Se ha confirmado que temperaturas moderadas favorecen la producción de micotoxinas.

Otro de los factores que influye en la contaminación de los granos por hongos, es que los granos presenten algún defecto o maltrato de la superficie sin pulimentar, sobre todo alrededor del embrión. (47)

La acción biológica y toxicológica de las micotoxinas no sólo se encuentra influenciada por condiciones ecológicas generales, sí no también por la ecología humana, incluyendo factores personales y socioeconómicos. Estos últimos afectan claramente el tamaño y - el patrón de formación de la enfermedad y características epidemiológicas, mientras que la situación ecológica total pueden servir - para promover o inhibir la enfermedad en desarrollo como un todo y así afectar los pasos para la prevención de la enfermedad. (47)

CLASIFICACION

Existen varias formas de clasificar a las micotoxinas:

1. De acuerdo a las diferentes afinidades que presentan ante los órganos animales: (47)
 - 1.1 Organos digestivos:
 - 1.1.1 Hígado: Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y M₁), esterigmatocistina, ochratoxina, patulina.
 - 1.1.2 Conductos biliares y vesícula biliar: Aflatoxina B₁ y rubratoxina B.
 - 1.1.3 Tracto digestivo: (boca, esófago, estómago e intestino): Ochratoxina A, aflatoxina B₁.
 - 1.2 Organos urinarios:
 - 1.2.1 Riñón: Aflatoxina B₁ y G₁, esterigmatocistina, ochratoxina A y patulina.
 - 1.2.2 Ureteres y vejiga: esporidesmina.
 - 1.3 Organos hematopoyéticos:
 - 1.3.1 Médula ósea: Ochratoxina A.
 - 1.3.2 Ganglios linfáticos: Aflatoxina B₁, rubratoxina B.
 - 1.4 Piel: Patulina.
 - 1.5 Organos endócrinos: Aflatoxina B₁ y G₁.

- 1.6 Organos reproductores:
 - 1.6.1 Femeninos: (Ovarios, útero, vulva, glándulas mamarias): Zearalenona.
 - 1.6.2 Masculinos: (Testículos): Fusarenona X.
 - 1.7 Sistema nervioso: Aflatoxina B₁, rubratoxina B.
 - 1.8 Organos circulatorios: Zearalenona.
 - 1.8.1 Corazón: Aflatoxina B₁, rubratoxina B, zearalenona.
 - 1.9 Organos respiratorios:
 - 1.9.1 Pulmones: Aflatoxina B₁, patulina.
2. Conforme a la familia de hongos que las producen: (47)
- 2.1 Micotoxinas provenientes de hongos Penicillium: Entre éstas se encuentran citreoviridina, citina, patulina, rugulosina.
 - 2.2 Micotoxinas provenientes de hongos Aspergillus: Aflatoxinas, ácido aspergílico, esterigmatocistina.
 - 2.3 Micotoxinas provenientes de hongos Fusarium: Acido fusárico, moniliformina.
3. Desde el punto de vista de su estructura química, las micotoxinas se clasifican en: (47)
- 3.1 Micotoxinas derivadas de aminoácidos: Algunas micotoxinas importantes que contienen nitrógeno, se sabe que provienen de aminoácidos. En las rutas metabólicas de aminoácidos en plantas superiores, la descarboxilación de ellos ocurre frecuentemente formando las aminas correspondientes. Estas aminas se conocen como protoalcaloides y actúan como precursores de la biosíntesis de alcaloides. Sin embargo, la descarboxilación es menos importante en los hongos y varias amidas y péptidos se producen en plantas superiores. Algunas micotoxinas pertenecientes a este grupo son: esporidesmina, gliotoxina.

- 3.2 Micotoxinas provenientes de la vía mevalonato: Aunque - los hongos no contienen monoterpenos, generalmente se - producen muchos sesqui, di y terpenos. Como el papel - del ácido mevalónico en la síntesis de estos isoprenoí-- des fue descubierto, se le conoce a esta biosíntesis co- mo "vía mevalonato". La mayoría de estos compuestos es- tán altamente oxigenados y en general, contienen grupos epoxi.

Algunas micotoxinas provenientes de este grupo son: niva lenol, fusarenona X y la toxina T-2, que también pertene- cen al grupo de las micotoxinas provenientes de hongos - Fusarium. La toxicidad de estas micotoxinas es similar entre ellas y causan lesiones radiomiméticas al tracto - intestinal en la administración de dosis letales de las mismas, a ratones en diferentes estudios hechos en labo- ratorio.

- 3.3 Micotoxinas derivadas a partir de la vía "acetato malona- to". A pesar de que las aflatoxinas tienen un esqueleto de cumarina y tienen la fluorescencia característica de estos compuestos, se sabe que proceden de la vía "aceta- to-malonato". Otra micotoxina que pertenece a este gru- po es la ochratoxina, cuyos efectos nefrotóxicos son co- nocidos.

- 3.4 Micotoxinas derivadas de la vía aromática de biosíntesis: Un papel importante de la vía del ácido shikímico en el metabolismo secundario, es proveer intermediarios para - la biosíntesis de compuestos aromáticos, incluyendo ami- noácidos aromáticos. Muchos compuestos fenólicos sim- - ples, se producen en los hongos, pero casi todos estos - compuestos se derivan de la vía "acetato-malonato". El ácido shikímico, juega relativamente un pequeño papel en el metabolismo fúngico.

Dentro de este grupo de micotoxinas se encuentran: La -

xantoxilina, la cual presenta hepatotoxicidad en animales de laboratorio, así como xantoascina y terfenilina.

TOXICOLOGIA DE LAS MICOTOXINAS

La toxicidad de una sustancia es su capacidad intrínseca para producir daño cuando es administrada sola. El peligro de una sustancia es su capacidad para producir daño bajo las condiciones de explosión. (4)

Como ya se mencionó, las micotoxinas son metabolitos secundarios capaces de producir una respuesta tóxica (micotoxicosis) en humanos y animales. Los hongos capaces de producir metabolitos tóxicos, están distribuidos en una gran variedad de familias y no existe una regla específica concerniente a la habilidad de producir micotoxinas. (47)

En general, las micotoxicosis se presentan más en los animales domésticos que en el hombre, probablemente esto se deba a que los primeros consumen siempre el mismo tipo de alimento (aún después de que éste se encuentre contaminado), mientras que el hombre tiene una dieta variada y la comida contaminada es rechazada debido a que se colorea por la presencia de los hongos y además presenta un olor característico. (47)

El grado de toxicidad, el cual se expresa como dosis letales para animales, depende de:

1. Especie: Uno de los factores importantes que influyen en el potencial tóxico de las micotoxinas en cuanto a los diferentes niveles tóxicos, va de acuerdo a la especie del animal en experimentación. Algunas de estas diferencias se encuentran en el Cuadro No. 1.

CUADRO No. 1

DIFERENTES VALORES DE DOSIS LETALES DE MICOTOXINAS PARA DIFERENTES ESPECIES

ESPECIE	DL ₅₀ (mg/kg)		
	Aflatoxina B ₁	Rubratoxina	Fusarenona X
Ratón	9.0	0.27	4.2
Rata	5.5 - 17.9	0.35	4.0
Hamster	10.2		
Conejo	0.3 - 0.5		
Gato	0.55	0.30	
Perro	1.0	5.00	
Mono	2.2 - 7.8		

Fuente: (47)

- Edad y sexo. En general, se sabe que los animales recién nacidos y los machos son más susceptibles a las micotoxinas que los adultos y las hembras. En cuanto a la edad, se sabe que ciertas especies maduras son más resistentes, ello quizás implica, la existencia o desarrollo en esa etapa de una enzima encargada de la biotransformación de ciertas micotoxinas. (7)
- Vía de administración. Se han hecho estudios sobre las dosis letales de las diferentes micotoxinas, dependiendo de la vía de administración. En general, se ha encontrado que la vía de administración que presenta las menores dosis letales es la intravenosa, le sigue la intraperitoneal, la subcutánea y la última es la vía oral. En el Cuadro No. 2, se observan algunas dosis letales conforme a la vía de administración.

CUADRO No. 2

DIFERENCIAS EN DOSIS LETALES DE MICOTOXINAS DE ACUERDO A LA VIA DE ADMINISTRACION

Micotoxina	Animal	LD ₅₀ (mg/kg)			
		I.V.	I.P.	S.C.	P.O.*
Citreoviridina	Ratón	-	8.2	8.3	29
Rubratoxina B	Rata	-	0.35	-	6.5
Acido fusárico	Ratón	100	88	-	180
Esterignatocistina	Rata	-	60	-	166
Fusarenona	Ratón	3.4	3.4	4.2	6.0

I.V. = Intravenosa I.P. = Intraperitoneal S.C. = Subcutánea P.O. = Oral

Fuente: (47)

Otros factores que influyen en la toxicidad de las micotoxinas son: dosis, tiempo de duración de exposición, condición del animal y composición de la dieta, entre otros. (40)

Para fines prácticos, el potencial tóxico de las micotoxinas se puede clasificar tentativamente en: (47)

1. Extremadamente tóxico: Dosis letales de menos de 1 mg/kg. Por ejemplo: ciclocloratina y rubratoxina B.
2. Muy tóxico: Dosis letales de 1-10 mg/kg. Por ejemplo: aflatoxinas, malformina y citrioviridinas.
3. Tóxicas: Dosis letales de 10-100 mg/kg.

Algunas micotoxinas son altamente tóxicas a animales de laboratorio. Una toxina específica puede afectar a un rango amplio de animales domésticos y experimentales, incluyendo al hombre, mien---

tras que otras toxinas son específicas para una o dos especies. - Con respecto a la toxicidad crónica, se ha encontrado que varias - micotoxinas son carcinogénicas, teratogénicas, hemorrágicas o dermatíticas; la mayoría son hepatocarcinogénicas, nefratotóxicas o - neurotóxicas. (40)

Los metabolitos fúngicos tóxicos, presentan efectos dañinos - en varios órganos y tejidos animales. Desde el descubrimiento de las aflatoxinas como hepatotoxinas, muchos estudios han demostrado que el hígado es el órgano más afectado por muchos metabolitos fún- gicos. Las características patológicas de los daños del hígado, - indican que existen diferentes tipos de micotoxinas hepatotóxicas. Pueden atacar selectivamente las células parenquimales del hígado o células de Kupffer, o pueden afectar las áreas centrales o peri- féricas de los lóbulos del hígado. Aún más, la necrosis, acumula- ción de grasa y desaparición de glucógeno, indican modos diferen- tes de daño hepatotóxico. (40)

Muchas toxinas fúngicas, exhiben en general, especificidad, - por órganos, la cual puede atribuirse a: (47)

1. Distribución específica de las micotoxinas a los órganos se- leccionados.
2. Diferente susceptibilidad de las células involucradas de --- acuerdo al grado de crecimiento celular.
3. Transformación de las micotoxinas a agentes más tóxicos por - los mismos órganos.
4. Permeabilidad específica de los órganos y las células a las - micotoxinas.

En relación con los problemas de salud pública, las aflatoxi- nas son las micocotoxinas más importantes, dado a que su potente - hepatocarcinogenicidad ha sido demostrada en varios animales expe- rimentales y se ha visto que se encuentra en varios productos ali-

menticios. Otra micotoxina importante es la esterigmatocistina, - que aunque tiene una menor toxicidad en comparación con las otras aflatoxinas, es importante ya que es un precursor de éstas. Presenta una absorción muy lenta, pero se ha demostrado que induce a hepatomas en ratas y que puede producir tumores pulmonares cuando se administra por períodos largos. (43)

La luteoskyrina, la ciclocloratina (que puede ser idéntica a la islanditoxina) y la rugulosina, representan el tercer grupo de micotoxinas con reconocida capacidad carcinogénica para animales - alimentados durante largos períodos con productos afectados. Su presencia natural en alimentos, aparentemente aún no ha sido verificada. (47)

AFLATOXINAS

ANTECEDENTES

Antes de 1960, era poco lo que se conocía sobre la estructura de los metabolitos tóxicos producidos por el hongo Aspergillus flavus. La razón por la que el estudio de las aflatoxinas no se comenzará sino hasta ese año, fue que durante el mismo, en Inglaterra se reportó la muerte de una gran cantidad de pavos debido a una enfermedad a la que llamaron "enfermedad X", la cual también afectó a patos y faisanes (24). Casi el mismo tiempo, en E.U.A. murieron muchas truchas arcoiris que presentaban signos parecidos a los de los pavos (hepatomas) (39,44). El gran número de muertes junto con las fuertes pérdidas económicas que implicaban, dieron lugar a una intensificación de los estudios que llevaron al descubrimiento de las aflatoxinas. (24)

Al analizarse los alimentos consumidos, en un principio se sospechó de la existencia de un virus, pero después de varios estudios la idea fue descartada, también se sospechó de bacterias pató

genas, pero nuevamente los análisis demostraron que no estaban involucradas. Se realizaron análisis para buscar agentes venenosos en las muestras, ya fueran vegetales o de origen orgánico o inorgánico, pero éstos también resultaron negativos (8). Por último, se vio la posibilidad de una intoxicación, lo cual orientó mejor a la solución del problema. (7, 39)

En 1962, se encontró que el factor común a esta enfermedad de todas las aves que la padecieron, era un lote de cacahuates procedentes del Brail. (7, 39)

Se hicieron varios estudios para poder aislar a la toxina y - después de investigar su procedencia, se llegó a la conclusión de que era de origen fúngico y fue identificada como Aspergillus flavus. (22)

Más tarde, a la toxina se le denominó aflatoxina, término que se deriva de la abreviación taxonómica de Aspergillus (A) y las especies flavus (fla) (8), y que en la actualidad se le asigna a un grupo de metabolitos secundarios tóxicos y carcinogénicos principalmente producidos por algunos hongos. (6)

CARACTERISTICAS Y TAXONOMIA DEL ASPERGILLUS

REINO: Fungi
 DIVISION: Eumycota
 SUBDIVISION: Phycomycotina
 CLASE: Hyphomycetes
 ORDEN: Monoliales
 FAMILIA: Monoliaceae
 GENERO: Aspergillus

En los hyphomycetes, el micelo está bien desarrollado y hay ausencia de células gemantes. Los conidios se producen en conidio

foros que no se encuentran en un cuerpo fructífero. Algunas especies sólo forman esclerocios. Estos hongos están colocados en un solo orden, los monolineales.

Aspergillus:

Este género se caracteriza por tener conidióforos con una vesícula hinchada en el ápice. Los conidios son producidos por filoides que pueden originarse directamente sobre la vesícula (biseñados). Las cabezuelas conidiales en Aspergillus son secas (es decir, no tienen mucílago) y los conidióforos son amerosporas (sin septas).

Las aflatoxinas son producidas por Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus. El grupo A. flavus es un constituyente de la microflora del aire y la tierra, y está asociado con plantas vivas y muertas y animales en todo el mundo. El A. flavus contribuye intensamente al deterioro de granos almacenados y otros productos agrícolas. (40)

El A. flavus crece y produce aflatoxinas en casi todos los productos agrícolas, muchos productos procesados, bebidas y en ciertos medios de cultivo de laboratorio. (40)

PROPIEDADES QUIMICAS DE LAS AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son un grupo de bisfurano isocumarinas altamente insaturadas. Los derivados más comúnmente asociados a los hongos anteriormente mencionados, son las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (Fig. 1), las cuales reciben estos nombres debido al color de su fluorescencia bajo luz ultravioleta de onda larga. La B₁ y la B₂, tienen una fluorescencia azul (blue en inglés) y la G₁ y la G₂, verde (green en inglés). El número indica la movilidad presentada sobre el cromatograma de capa fina. La intensa fluorescencia que

presentan es la base de muchos estudios sobre análisis de aflatoxinas. (8)

En un estudio realizado (13, 28), se alimentaron ovejas con una mezcla que contenía a las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂; al sacrificar estos animales, se pudo identificar una toxina que presentaba una estructura química ligeramente diferente a las aflatoxinas suministradas, la cual recibió el nombre de aflatoxina M, porque fue aislada por primera vez, en la leche (milk en inglés). Por cromatografía en capa fina, este producto fue dividido en sus dos componentes: M₁, aflatoxina con fluorescencia azul violeta y M₂, la cual después de haber sido estudiada se observó con un Rf menor y de color violeta más intenso. Sus estructuras se pueden observar en la Fig. 1.

Más tarde fueron aislados otros tipos de aflatoxinas a partir de cultivos de A. flavus. Entre ellas se pueden mencionar a las que presentaban una fluorescencia azul y otra verde. Al realizar otros análisis para su identificación (espectros ultravioleta, infrarrojo, etc.), se observó que era 2-hidroxiderivados de las aflatoxinas B₂ y G₂, por lo que se les denominó alfatoxinas B_{2a} y G_{2a} (24). (Fig. 1)

Algunas de las principales propiedades químicas de las aflatoxinas, se pueden observar en el Cuadro No. 3.

CUADRO No. 3

PROPIEDADES QUIMICAS DE AFLATOXINAS

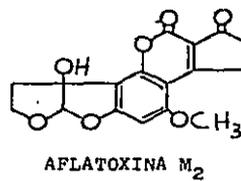
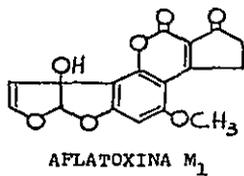
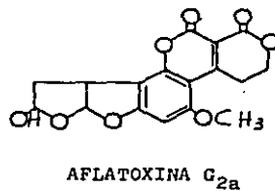
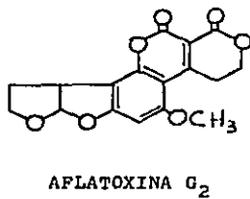
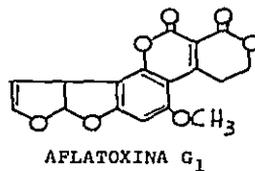
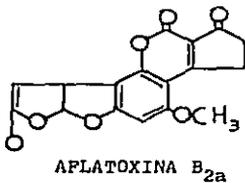
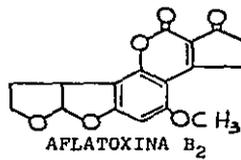
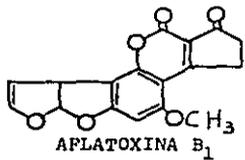
Aflatoxina	P.M.	P.F. °C	E.F.*	Rf**	ABSORCION U.V.
B ₁	312	268 - 269	425	0.56	233 265 360
B ₂	314	286 - 289	425	0.53	222 265 362
G ₁	328	286 - 290	450	0.48	243 264 362
G ₂	330	237 - 240	450	0.46	214 265 362
M ₁	328	299	425	0.40	221 265 357
M ₂	330	293	425	0.30	221 264 357

* Emisión de fluorescencia

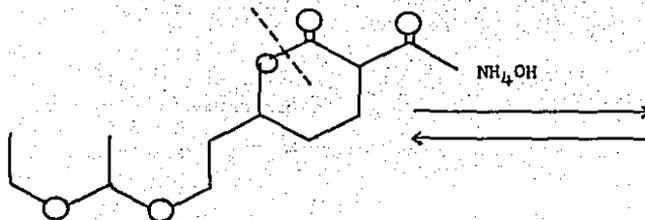
** Silica gel. Cloroformo.

Fuente: (20)

Las aflatoxinas son solubles principalmente en ecetonitrilo, cloroformo y metanol, y son insolubles en hexanol, agua y soluciones alcalinas. Son muy estables frente a la acción del calor, en ambiente seco. En ambiente húmedo se descomponen en corto --- tiempo. Las aflatoxinas se degradan a pH = 7 y una humedad relativa mayor. (20)

FIG. 1. ESTRUCTURA QUIMICA DE ALGUNAS AFLATOXINAS.

Estando en presencia de álcali, la lactona sufre una escisión, siendo ésta una reacción reversible:



Con amoníaco se obtienen productos no tóxicos. Con ácidos minerales y en presencia de agua, se forman los dihidroderivados y - con el ácido acético forman los acetoxi o acetato derivados.

Al hacerlos reaccionar con agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio, permanganato de potasio, cloro, peróxido de hidrógeno u ozono, forman compuestos no fluorescentes, pudiéndose obtener análisis negativos falsos, por lo que hay que tener el equipo completamente limpio.

Con agentes reductores como el hidrógeno y el borato ácido de sodio, forman unos compuestos llamados RB_1 y RB_2 .

Con la acción de las radiaciones se forman fotoproductos muy poco tóxicos. (20)

Factores que influyen en la producción de aflatoxinas

Hay ciertos factores que influyen sobre la producción de aflatoxinas en sustratos naturales. Estos son:

1. Naturaleza del sustrato. Son muchos los productos naturales, en los que se ha demostrado que se pueden desarrollar los hongos que producen las aflatoxinas, entre estos productos se encuentran: cacahuates y sus productos, arroz, trigo, cebada, maíz, sorgo (en pequeñas cantidades), harinas de cereales y productos (pastas como espaguetí, codo, etc.), pan, semillas de algodón, frijoles, pescado seco, naranja, limones, durazno, tomates, ajo, vegetales secos y frutas secas, especias, etc. (7, 47)

En general, se sabe que los sustratos con mayor cantidad de carbohidratos, como es el trigo y el arroz, generalmente producen más aflatoxinas que aquellos que son oleaginosos, como soya y algodón, probablemente debido a que la gran cantidad de aceite que contienen no puede ser fácilmente metabolizado por el hongo. (46)

Al comparar los rendimientos de producción de aflatoxinas en sustratos naturales y artificiales, se observó que los primeros dan mayores rendimiento que los sustratos artificiales. (8)

El efecto de la concentración del sustrato sobre la producción de toxina, está en relación inversa, es decir, al aumentar el sustrato disminuye la cantidad de toxina; mientras que la relación de la temperatura y producción de toxina es directa (al aumentar la temperatura aumenta la cantidad de toxina hasta un punto límite). Este efecto se debe a la proporción de material nutritivo presente en el endospermo. (25)

2. Madurez del sustrato. En general, los productos agrícolas inmaduros o en punto de madurez, si no están deteriorados por alguna causa natural o artificial, son mucho más difícilmente atacados por A. flavus, que los sobremaduros (7), debido a que en éstos, hay descenso en la actividad fisiológica y la poca humedad del suelo, la cual favorece la invasión de granos por hongos. (47)

3. Grado de deterioro del sustrato. El hecho de que los granos sin manchas, intactos, inmaduros y vainas maduras sean raramente invadidos por A. flavus, se ha comprobado totalmente.

La rápida invasión de los productos por hongos en la tierra, se ha asociado principalmente con daños físicos y biológicos a la cascarilla y los granos.

También se ha demostrado que la mayor invasión por A. flavus, ocurre después de la cosecha o durante el tiempo de secado. - (20)

Los daños también se asocian con los insectos que atacan a los granos en el almacén y en otros casos se habla de hongos como Rhizoctia solani y Sclerotium rolfsi, que abren camino de entrada para A. flavus. (8)

4. Naturaleza del hongo. Por mucho tiempo se pensó que el A. flavus era el único género de hongos que podían producir las aflatoxinas, pero en la actualidad se sabe que también otros hongos las pueden producir (46). En el Cuadro No. 4, se pueden observar algunos de estos hongos.

También se ha observado que no todos los Aspergillus y demás hongos tienen la misma capacidad de producir los diferentes tipos de aflatoxinas, ni de producirlas en las mismas cantidades. Algunos cultivos sólo producen el compuesto B, otros el G y otros el B y G y cada uno lo produce en diferentes cantidades o proporciones. (46)

Tanto la especie de hongo, como el tipo de sustrato, están muy relacionados entre sí, pues regularmente al alterar o cambiar uno de ellos, se producen trastornos en el otro factor y por ende, en la producción de aflatoxinas. (20)

5. Humedad. Se sabe que el factor más importante en el crecimiento y la producción de aflatoxinas por A. flavus, es la humedad del sustrato y la humedad relativa que lo rodea (20, 46).

Los límites de humedad y la humedad óptima para un hongo específico, es similar para diferentes sustratos, cuando se miden en términos de equilibrio higroscópico.

El contenido de humedad para un seguro almacenamiento de semillas y otros sustratos naturales se ha establecido cuando la humedad relativa es del 70%, en la cual crecen muy pocos hongos. (20)

Cuadro No. 4

HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS IN VITRO

H O N G O	A F L A T O X I N A S			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
GRUPO <u>A. FLAVUS</u>				
A. flavus	X	X	X	X
A. flavus var. columnaris		X		
A. orizae	X	X		
A. parasiticus	X	X	X	X
A. parasiticus var. globus	X	X	X	X
Otras especies de los géneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Rhizopus</i>				
A. niger	X			
A. wentii	X			
A. ruber	X			
A. ostianus	X		X	
P. puberrulum	X	X	X	X
P. citrinum	X			
Rhizopus spp.	X			

Fuente: (7, 46)

El A. flavus es un hongo mesofílico que requiere para su crecimiento una humedad relativa del 80-90%, siendo la mínima para crecimiento y germinación de las esporas 80%, y para la esporulación del 85%, lo que indica que el crecimiento ocurre en un rango más amplio de humedad que la esporulación. (46)

Por lo tanto, puede concluirse que la humedad mínima necesaria dependerá del tipo de hongo y del sustrato empleado. (7)

6. Temperatura y tiempo. El A. flavus, como se mencionó anteriormente, es un hongo mesofílico que tiene las siguientes temperaturas límites de crecimiento:

Mínima	5 a 8°C
Optima	36 a 38°C
Máxima	44 a 46°C

Estas temperaturas mínimas y máximas, se ven afectadas por la humedad, concentración de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y otros factores. (8, 46)

Para el caso del cacahuate, se ha observado que los tiempos necesarios para producir aflatoxinas a diferentes temperaturas varía, por ejemplo:

TEMPERATURA	TIEMPO
30°C	5 - 7 días
25°C	7 - 9 días
20°C	11 - 13 días

El factor más importante que controla la producción de aflatoxina B₁ en relación con la G₁, es la temperatura: (46)

Menos de 18°C	1: 1
25°C	2: 1
28°C	4: 1
Más de 32°C	12: 1

7. Oxígeno y dióxido de carbono. El crecimiento de hongos en sustratos naturales no sólo depende de la disponibilidad de humedad y temperaturas favorables, sino también de las condiciones atmosféricas en el microclima alrededor del sustrato. A pesar de que los hongos son aeróbicos, la mínima cantidad de oxígeno requerido para la germinación de las esporas, crecimiento vegetativo y esporulación, pueden variar grandemente. Son también variables las tolerancias a altas concentraciones de dióxido de carbono. (20)
- Reduciendo la cantidad de oxígeno, decrece la formación de aflatoxinas. No se detectaron aflatoxinas en cacahuates, -- cuando éstas eran almacenadas durante seis semanas a 15°C en un ambiente con 40% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno, y es totalmente inhibido en un ambiente a 25°C, con 60% de dióxido de carbono y humedad relativa de 86-92%. (46)
8. Interacción con otros microorganismos. El Aspergillus flavus, frecuentemente se encuentra asociado con muchos otros microorganismos en granos y semillas almacenados, por lo que la posibilidad de competición por el sustrato, entre ellos; bajo condiciones favorables puede restringir o reducir la cantidad de aflatoxina formada. El A. flavus o los hongos competidores -- pueden absorber o degradar las aflatoxinas después de su formación en el sustrato. Se han encontrado aproximadamente -- 1000 microorganismos incluyendo levaduras, mohos, bacterias, actomicetes, algas y esporas fúngicas capaces de degradar a las aflatoxinas. (20)

TOXICOLOGIA DE LAS AFLATOXINAS

La importancia del problema de las aflatoxinas desde el punto de vista de salud pública y protección de alimentos, se puede sintetizar de la siguiente manera: (47)

1. Como ya se mencionó anteriormente, de todas las sustancias - existentes, tanto naturales como artificiales, las aflatoxi--nas presentan la mayor carcinogenicidad oral sobre un gran nú--mero de animales y el hombre.
2. Las aflatoxinas son productos metabólicos de un organismo vi--vo (hongo), que existe en el sistema ecológico natural, por -lo que es imposible erradicarlo completamente del sistema.
3. Los hongos productores de aflatoxinas están ampliamente dis--tribuidos en zonas tropicales y subtropicales, lo que indica que la población de estas zonas tiene un gran problema. Los resultados de ciertos estudios epidemiológicos, demuestran es--ta posibilidad.
4. Productos agrícolas de gran consumo a nivel mundial, como el trigo, maíz, arroz, etc., son los mejores sustratos para es--tos hongos.
5. Se ha reportado que las aflatoxinas no sólo presentan el ma--yor poder carcinogénico como efecto crónico, sino que también presentan efectos fatales en infantes y niños pequeños.
6. Se han presentado casos en los que la aflatoxina B₁, y su me--tabolito M₁, aparecen en la leche materna de aquellas mujeres que han consumido alimentos contaminados por hongos.
7. Así mismo, se ha encontrado aflatoxina B₁, en productos deri--vados de animales que han sido alimentados con forrajes conta--minados (leche de vaca, huevos, carne). La cantidad de afla--toxinas presentes en dichos productos depende de la cantidad de éstas en la dieta.
8. Una de las razones más importantes para efectuar estudios muy intensos sobre las aflatoxinas, además de las anteriores, pue--de encontrarse en los resultados de varios estudios epidemio--

lógicos efectuados para encontrar la relación entre el contenido de aflatoxinas en alimentos contaminados y la incidencia de hepatomas en el hombre. Aunque debido a que en el caso del hombre no se puede experimentar, es muy difícil conocer las causas reales de incidencia de cáncer en el hombre, aún más cuando se tiene una dieta muy variada.

Las propiedades tóxicas de las aflatoxinas se manifiestan de diferente manera, de acuerdo a:

- a. El sistema de prueba adoptado
- b. Dosis dada.
- c. Duración de la exposición.
- d. Diferencias de especie de animales. (6)

La mayoría de los estudios sobre metabolismo de mamíferos se han concentrado en la aflatoxina B₁, porque es la más potente y además es la toxina fúngica más común (26). En orden decreciente de potencia, le siguen la aflatoxina G₁, B₂ y G₂. (25)

Los animales que más han sido usados para este tipo de estudios son los patos y las ratas, pero en la actualidad se usan gran variedad, lo que ha llevado a conocer que exista diferencia en cuanto a susceptibilidades entre las diferentes especies (25). Con base a los estudios anteriores, algunas especies se dividieron en tres grupos: (47)

1. Extremadamente susceptibles: patos, conejos, gatos, truchas y cerdos.
2. Moderadamente susceptibles: perros, ovejas, conejillos de indias.
3. Resistentes: mono, pollo, rata, ratón y hamsters.

En el Cuadro No. 5, se observan las distintas susceptibilida-

des de algunas especies de animales frente a la aflatoxina B₁.

CUADRO No. 5

VALORES MEDIOS DE DOSIS LETALES (LD₅₀) PARA AFLATOXINAS, DADA COMO UNA SOLA DOSIS A DIFERENTES ANIMALES

<u>E S P E C I E</u>	<u>LD₅₀ (mg/kg de peso corporal)</u>
Patos	0.3 - 0.6
Puercos	0.6
Truchas	0.8
Perros	1.0
Conejillos de indias	1.4 - 2.0
Borregos	2.0
Changos	2.2
Ratas	5.5 - 17.9
Pollos	6.3
Ratón	9.0
Hamsters	10.2

Fuente: (8)

Además de la especie, la susceptibilidad a las aflatoxinas, - también depende del sexo, la edad y las vías de administración.

En cuanto al sexo, se han hecho diferentes estudios en los - cuales los resultados indican que los machos son mucho más susceptibles que las hembras. También se ha observado que los animales de mayor edad presentan una menor susceptibilidad. (25)

Las vías de administración más comúnmente empleadas son la - oral y la intraperitoneal, con esta última los signos de intoxicación

ción aparecen con mayor rapidez, el valor de DL₅₀, es menor. (25)

Toxicológicamente, las aflatoxinas se pueden considerar como: Tóxico potente, carcinogénico, teratogénico y mutagénico.

La evaluación de la carcinogenicidad de las aflatoxinas por la IARC (International Association Research on Cancer), la WHO (World Health Organization), FDA (Food and Drug Administration) y otros grupos, ha llevado a formular estrictas regulaciones limitando la cantidad de aflatoxina permitida en alimentos. (40)

La carcinogenicidad de una o más aflatoxinas ha sido demostrada en ratas, ratones, trucha arcoiris, salmón, marmotas, mono rhesus y patos entre otros. Excepto en estudios con ratones, la carcinogenicidad que aparece a través del tracto gastrointestinal enfatiza el riesgo probable de ingerir alimento contaminado. (40)

El principal órgano atacado por las aflatoxinas es el hígado, pero también puede ocurrir infiltración de grasa y necrosis en corazón y riñón. Se han reportado algunos casos de necrosis en bazo y páncreas. Los monos intoxicados presentan como característica principal, edema cerebral y en perros se ha encontrado edema en la vejiga biliar y hemorragias. (40)

Se ha demostrado que la aflatoxina B₁, posee cierta actividad anticoagulante, la cual probablemente se deba a su regulación con las cumarinas. Compuestos que contienen anillos de cumarina, se unen a la albúmina del suero y la introducción de un grupo hidrofóbico a un compuesto de cumarina, parece aumentar su poder anticoagulante. (25)

Como ya se mencionó con anterioridad, el efecto de las aflatoxinas en animales es absolutamente variable, depende del sexo, de la edad, de la especie, de la condición nutricional, del nivel de dosis, de la frecuencia y de la composición de la dieta. (8)

Aunque las aflatoxinas son consideradas principalmente como -hepatotoxinas, pueden observarse otros signos, como son:

1. Coagulación deteriorada.
2. Interacción con requerimientos nutricionales.
3. Inmunidad deteriorada.
4. Disminución de la función renal.
5. Cirrosis.
6. Cáncer. (8)

Por medio de estudios bioquímicos realizados, se ha encontrado que la aflatoxina B₁, disminuye la incorporación de timidina y leucina radioactivos en cultivos celulares, indicando una interferencia con los ácidos nucleicos y la biosíntesis de proteínas. La inhibición de las síntesis nuclear de ADN y ARN y las transcripciones genéticas, aparecen inmediatamente después de que el compuesto es administrado. (8, 45)

Los efectos tóxicos de las aflatoxinas caen dentro de dos categorías: (24)

1. Toxicidad aguda: El principal órgano atacado es el hígado, pero también ocurren infiltraciones de grasa y necrosis en corazón y riñón. (24)
2. Toxicidad crónica y cáncer: Los efectos tardíos de una dosis grande única o pequeñas dosis repetitivas de aflatoxinas incluyen regeneración de hepatocitos, proliferación de ductos biliares y algunas veces, fibrosis en ciertas especies; sin embargo, el efecto tardío es el desarrollo de hepatocarcinomas y ocasionalmente renal o de colon y otros carcinomas. (40)

TOXICIDAD EN HUMANOS

En cuanto a la toxicidad de las aflatoxinas en humanos, es im

portante mencionar que la experimentación directa con el hombre es imposible, los datos que se tienen proceden necesariamente de las investigaciones epidemiológicas. La investigación epidemiológica requiere de la acumulación de datos que generalmente carecen de los recursos necesarios y rigurosos controles demandados por la mayoría de los estudios científicos, por lo que las "incidencias" de ben ser cuidadosamente evaluadas. (40)

En la mayoría de las sociedades, los alimentos mohosos, a excepción de algunas fermentaciones controladas, son rechazados por razones asépticas (presentan colores, olores y sabores desagradables, siendo este alimento destinado para animales). Consecuentemente, la mayoría del trabajo original sobre las aflatoxinas fueron hechos con animales. (13)

En cuanto a lo anterior, la información existente muestra que la probabilidad de encontrar alimentos que presenten un contenido de aflatoxinas capaces de producir efectos inmediatos es muy pequeña, y en caso de encontrarse estos alimentos, como ya se mencionó, son rechazados, a excepción de los lugares en donde existe gente que muere de hambre y en aquellas culturas en donde los alimentos se contaminan intencionalmente. (13)

Las evidencias existentes sobre los efectos subletales de las aflatoxinas, provienen de los casos en los que productos de cacahuete contaminado fueron empleados como fuente de proteínas para tratamiento de la enfermedad conocida como kwashiorkor. (13)

La mayoría de las aflatoxicosis que se han reportado, se ha presentado en niños pequeños, en adultos los casos conocidos son más escasos, esto probablemente debido a las diferencias existentes en el metabolismo producidas por la edad. (13)

Estudios epidemiológicos se han concentrado en la posible relación entre la ingestión de aflatoxinas y cáncer hepático primario. La interpretación de esos estudios presenta una serie de di-

ficultades: (13)

1. La ingestión promedio de las poblaciones estudiadas, no reflejan la distribución y niveles individuales de la exposición, principalmente si esta población no es homogénea.
2. La identificación del cáncer, el registro y los censos, usualmente son pobres en áreas con una elevada incidencia de hepatomas.
3. Posibles factores desconocidos, como otras micotoxinas, o el efecto de la dieta como factor predisponente, no son considerados.

Un caso importante de aflatoxicosis fue reportado en 1974 en la India, en la que se presentó un importante brote de hepatitis. Este duró dos meses y se confinó a áreas rurales y poblaciones en las que se alimentaban básicamente de maíz. Clínicamente, esta enfermedad estuvo marcada por un pequeño período de fiebre asociado con vómito y anorexia, seguido de ictericia. De 397 pacientes, - 106 murieron. A la muerte precedió una hemorragia gastro-intestinal masiva. Los hombres fueron más afectados que las mujeres y - los niños casi no se vieron atacados. Se encontraron muestras de maíz con contenido de aflatoxinas que oscilaban entre 6.25 y 15.6 ppm., y la aflatoxina B₁ fue identificada en algunos sueros. También se ha sugerido que la enfermedad conocida como "cirrosis de - niños de la India", podría deberse, en parte, al envenenamiento - por aflatoxinas.

En Tailandia en 1971, se presentaron varias aflatoxicosis, - que sugirieron la importancia que este envenenamiento podía tener en el futuro. El síndrome de encefalopatía y degeneración grasa - de las vísceras, es un problema endémico en el noreste de Tailandia, un área con elevado consumo de arroz y bajo consumo de proteí - nas. Las autopsias de varios pacientes, mostraron la presencia de aflatoxinas.

El elevado poder carcinogénico de las aflatoxinas y no sólo - su elevada toxicidad, es lo que ha hecho que en las últimas décadas, se haya estudiado con tanta intensidad para tratar de prevenir mayores problemas relacionados con la salud pública. (25)

Por medio de los estudios realizados sobre la relación de las aflatoxinas y el cáncer en humanos, se puede concluir tentativamente lo siguiente: (40)

1. Niveles de ingestión crónica aproximan más la incidencia de - cáncer que dosis ocasionales.
2. Los hombres parecen ser más susceptibles que las mujeres cuando consumen aflatoxinas.
3. Climas que favorecen el crecimiento de A. flavus, concomitante con prácticas pobres de almacenamiento de alimentos, tienden a incrementar la proporción de hepatomas, indicando relación causa-efecto.
4. Sobre un amplio rango, hay una relación lineal entre la incidencia de cáncer y el logaritmo del nivel de aflatoxinas ingerido, particularmente en varones.

METABOLISMO, EXCRECION Y DISTRIBUCION

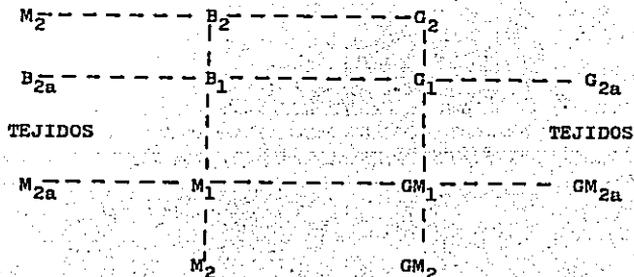
Las aflatoxinas son metabolizadas primariamente por la función microsomal del sistema oxidasa, localizados principalmente en el retículo endoplasmático de las células del hígado pero también presentes en riñones, pulmones, piel y otros órganos. Estas enzimas metabolizan oxidativamente una gran variedad de compuestos extraños, dando como resultado la destoxicación por formación de varios derivados hidroxilados, los cuales se conjugan con sulfatos o ácido glucurónico para formar glucurónicos o ésteres disulfatos solubles en agua, los cuales son excretados por la orina o bilis.

(40)

Durante el curso del metabolismo, se pueden generar metabolitos altamente reactivos, los cuales tienen la capacidad de reaccionar covalentemente con varios centros nucleofílicos en macromoléculas celulares, tales como DNA, RNA y proteínas. Esta activación posee un peligro biológico para la célula y constituye una plausible teoría por la cual ciertos compuestos presentan efectos tóxicos y carcinogénicos. (40)

Las transformaciones metabólicas de la aflatoxina B₁, se muestran en el Cuadro No. 6:

CUADRO No. 6
TRANSFORMACIONES METABOLICAS DE LA AFLATOXINA B₁



Fuente: (6)

La excreción y distribución de la aflatoxina B₁, es importante en términos de monitorear la exposición a aflatoxinas, determinando los restos en tejidos y así poder estudiar el mecanismo del metabolismo de las aflatoxinas.

La vía de excreción depende de los animales y la dosis (12), pero en general, cuando las aflatoxinas son administradas a animales, el compuesto puro o sus derivados aparecerán en la orina, las heces fecales y la leche. (45)

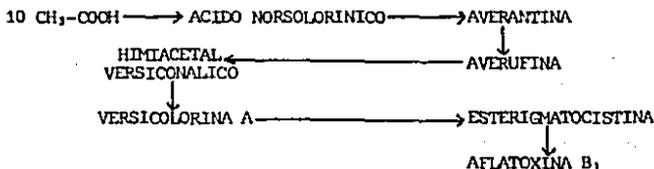
Algunos estudios han demostrado que en el hígado, riñones y - médula ósea, se concentra más la aflatoxina, que en el encéfalo, - músculo y grasa corporal. Las aflatoxinas se difunden por todos - los tejidos corporales, indicando rápida absorción, pero lenta eli- minación. (45)

BIOSINTESIS DE AFLATOXINAS

La aflatoxina B₁, es el metabolito que es producido en mayor cantidad por los hongos aflatoxigénicos y los estudios que se han hecho sobre su biosíntesis muestran que el esqueleto básico de las moléculas de las toxinas, deriva de unidades de acetato vía la ruta de policétido y que la metionina contribuye con el grupo metil- metoxi. (6, 29)

En el Cuadro No. 7, se puede observar la ruta propuesta para la biogénesis de aflatoxinas.

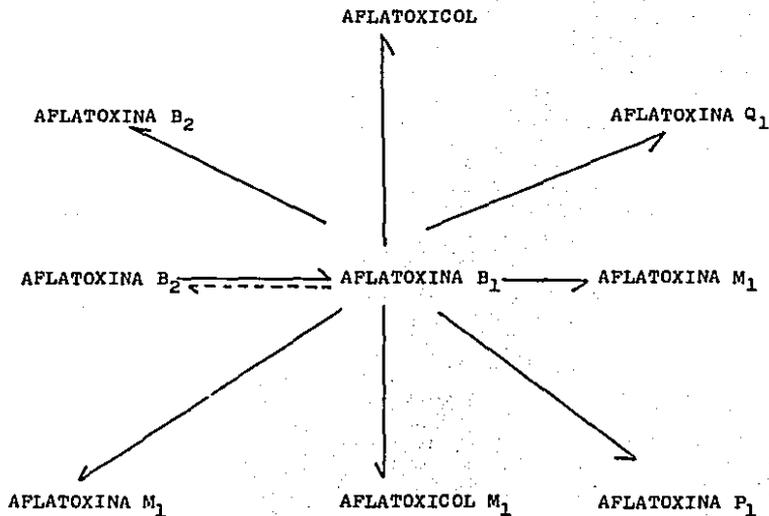
CUADRO No. 7
RUTA PROPUESTA PARA LA BIOGENESIS DE LAS AFLATOXINAS



Fuente: (6)

Estudios que se han hecho sobre los pasos posteriores de la biosíntesis de aflatoxinas en A. flavus, utilizando compuestos marcados con C_{14} , indican que la aflatoxina B_1 es convertida en la mayoría de las otras aflatoxinas, ya sea por oxidación y/o hidroxilación (8), la excepción es la aflatoxina M_1 , que resulta del metabolismo del animal. En el siguiente cuadro, se observan las rutas metabólicas de la hidrólisis de aflatoxina B_1 .

CUADRO No. 8
RUTAS METABOLICAS DE LA HIDROLISIS DE AFLATOXINA B_1



Fuente: (6)

ASPECTOS ANALITICOS

Se han desarrollado dos métodos principales para el análisis de las aflatoxinas: El análisis fisicoquímico y los análisis biológicos, estos últimos se usan para determinar el nivel de toxicidad efectiva en caso de sospecha de contaminación, pero son muy largos y no dan buenos resultados con respecto a la distinción de los diferentes tipos de aflatoxinas presentes. Para la medición exacta del tipo, o cantidad de aflatoxina presente en un determinado producto, se usan los análisis fisicoquímicos, que se basan en la -- fluorescencia que las aflatoxinas y otras micotoxinas presentan -- cuando son expuestas a la luz ultravioleta de onda larga.

Debido a la diferente naturaleza de los alimentos contamina-- dos, muchos métodos de extracción y purificación se han propuesto y cambian continuamente, aunque la mayoría son simples modificaci^o nes de los primeros métodos. (24)

Son cuatro los principales métodos que existen para el análisis de micotoxinas: (24, 37)

1. Detección. Con estos métodos se pueden identificar correctamente muestras no contaminadas (no se tienen falsos negati--- vos), es de bajo costo, pueden detectar pequeñas cantidades -- de toxina y da pocos resultados positivos falsos. Algunos de estos métodos son la cromatografía en capa fina para aflatoxi^{na} y zearalenona.
2. Pruebas confirmatorias. Identifican correctamente las mues-- tras contaminadas (no da resultados positivos falsos) y puede identificar pequeñas cantidades de toxinas, aquí se usan méto^{do} dos como espectrometría de masas.
3. Cuantitativo. Es preciso (es reproducible) y exacto (buena -- recuperación). Dentro de estos métodos se encuentra la crom^a tografía en placa de capa fina o la cromatografía de gases.

4. Campo. Son métodos rápidos y de fácil ejecución, como en el caso de la prueba de minicolumna y la de la prueba de la luz negra.

Los pasos básicos en el análisis de micotoxinas son:

1. Muestreo: Uno de los principales requisitos para un correcto análisis es el obtener una muestra representativa, puesto que si no lo es, los resultados pueden tener un poco o ningún valor, aunque las demás etapas se efectúen correctamente. Esta se puede hacer mecánica o manualmente.
2. Preparación de Muestras: Para obtener muestras representativas, algunas veces es necesario moler, mezclar y submuestrear.

Los pasos 3, 4 y 5 involucran separación química, su finalidad es separar la toxina de interés de cualquier otra sustancia - que pueda interferir con la detección final de esa micotoxina.

3. Extracción: Se puede hacer con un agitador o licuadora o por medio de Soxhlet, y su finalidad es separar la toxina de los compuestos insolubles en el disolvente, dependiendo del producto analizado. (37)
4. Purificación: Sirve para remover los lípidos, carbohidratos y pigmentos del extracto de la muestra (46), se puede hacer - por varios métodos, como son:
 - a. Usando un sistema de separación líquido-líquido, por medio de embudos de separación, utilizando disolventes como metanol, agua y éter de petróleo, o bien, metanol, agua y cloroformo o cloroformo solo. (37, 46)
 - b. Cromatografía en columna. Que puede ser usando diferentes empaques y disolventes, por medio de este sistema se consigue obtener un extracto más puro, que aquel utilizando un sistema de separación líquido-líquido. (46)

- c. Purificación por medio de metales divalentes (plomo, hierro, cobre). (37)
5. Separación final: Sirve para separar la toxina de los compuestos que aún permanecen en el extracto de la muestra que pudieran interferir con la detección de la toxina.

Se pueden usar varios métodos:

- a. Cromatografía en capa fina.
- b. Cromatografía gas-líquido.
- c. Cromatografía líquido-líquido.
- d. Cromatografía en minicolumna.

La cromatografía en capa fina es la más comúnmente empleada, en ella se pueden utilizar diferentes empaques, así como diferentes disolventes desarrolladores. El valor de R_f o grado de resolución de las aflatoxinas, está grandemente influenciado por las variaciones de las propiedades del gel, humedad relativa y otras variables. Así mismo, es esencial el uso de patrones puros, tratados en las mismas condiciones. (16)

En los tres pasos anteriores, las micotoxinas son separadas - por su solubilidad en un disolvente o una mezcla de disolventes. - Esta propiedad no sólo sirve para separar las micotoxinas de los materiales que puedan interferir, sino para también separarlas -- unas de otras. (37)

6. Detección y cuantificación: Existen varios métodos tanto para la detección como para cuantificación, entre los más comúnmente empleados están: (24)
- a. Medición de la fluorescencia en cromatografía de capa fina.
 - b. Medición de fluorescencia en solución.
 - c. Absorción ultravioleta en solución.
 - d. Cromatografía gas-líquido.

Existe también la evaluación visual. La fluorescencia exhibida por las aflatoxinas y otras micotoxinas bajo la acción de luz ultravioleta, es utilizada en métodos muy sensibles. La menor cantidad de aflatoxina B₁ que da fluorescencia visible, es de 0.0004 mg. Con base a lo anterior, la toxicidad de las aflatoxinas fue calificada según el nivel encontrado:

NIVEL DE AFLATOXINA B ₁	CATEGORIAS
Más de 1.0 ppb.	Muy alta
Entre 0.25 y 1 ppb.	Alta
Entre 0.25 y 0.05 ppb.	Media
Menos de 0.05 ppb.	Baja o negativa

El orden relativo de intensidad de fluorescencia en cromatografía en capa fina con sílica gel, es el siguiente: B₂, G₂, B₁ y por último la G₁.

Existe también la evaluación objetiva, usando métodos fluorodensimétricos o densitométricos. (46)

7. Confirmación: Su principal propósito es la identificación de compuestos químicos, entre los métodos confirmatorios que se usan con más frecuencia están: (37)
 - a. Cromatografía en capa fina.
 - b. Pruebas biológicas.
 - c. Espectrometría de masas.
 - d. Métodos químicos. (10)

El método de análisis de micotoxinas que se usa más, es la cromatografía de capa fina, que presenta muchas ventajas sobre otros métodos, como es la facilidad de realización, disponibilidad del material en el laboratorio, precisión de los resultados y rapidez entre otros.

A pesar de lo anterior, el método de cromatografía es y está

sujeto a ciertas variables, entre ellas se encuentran: exposición a la luz, error en la lectura de los platos, interferencias fluorescentes y oxidación de las aflatoxinas por otras sustancias. (26)

Para evitar el error por comparación visual en las lecturas de la cromatografía en capa fina, las interferencias y reacciones químicas debido a la oxidación de las aflatoxinas, se usa la cromatografía de líquido a alta presión, que puede ser de dos tipos: - (25)

1. Fase normal (ej. sílica activada)
2. Fase reversa. (ej. C_{18})

Varios investigadores han reportado que la cromatografía de líquidos a alta presión de las aflatoxinas sobre pequeñas partículas, 5-10 micrómetros, de columnas de sílica gel porosa, es un método preciso y controlable para la resolución de las aflatoxinas. Basándose en la información obtenida en estos estudios, parece que el tipo de solvente de elución y el sistema de detección, son variables importantes que influyen tanto la resolución de las aflatoxinas y la sensibilidad de su detección. (32)

METODOS DE CONTROL DE AFLATOXINAS

Los estudios que se han hecho acerca del control de micotoxinas en su mayoría se enfocan al control de aflatoxinas, sobre todo en cacahuete, pero aún así, algunos de estos controles pueden aplicarse a otro tipo de cosechas.

Como ya se mencionó con anterioridad, la aflatoxicosis en animales y en el hombre es causada por la ingestión de alimentos contaminados, y esta contaminación puede ser controlada ya sea previniendo el crecimiento de los hongos o bien, por destoxicación de los alimentos contaminados. (25)

La destoxificación sólo debería considerarse como una medida de emergencia, puesto que se puede evitar con medidas preventivas durante el cultivo, cosecha, secado, almacenamiento y procesamiento. (46)

Se han adoptado medidas preventivas para reducir la incidencia de contaminación, pero una vez que se conocieron cuáles son las condiciones adecuadas, únicamente fue posible prevenir en parte la contaminación, pues las condiciones ambientales, tales como el clima, no pueden ser controladas. (47)

PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR HONGOS

La contaminación puede tener lugar mientras las plantas están creciendo, durante la cosecha o durante el almacenamiento o procesamiento.

A pesar de que el A. flavus y el A. parasiticus son principalmente hongos que se desarrollan durante el almacenamiento, en la actualidad se cree que la infección inicial puede tener lugar durante el desarrollo de la planta. Consecuentemente, si los esfuerzos para minimizar el crecimiento de los hongos no son suficientes, se tendrán que tomar precauciones en contra de:

- a. Infección por hongos en el campo.
- b. Daños físicos durante la cosecha y transporte.
- c. Proliferación del hongo durante el almacenamiento y procesamiento, así como el almacenamiento de los productos terminados. (18, 20, 21)

El hongo ataca a los cacahuates principalmente mientras se están desarrollando en la tierra, antes de la cosecha y siempre que hay condiciones ambientales favorables para su desarrollo y crecimiento. El contenido de humedad de la vaina y el grano, las condiciones fisiológicas del grano, la temperatura ambiente, el período

de tiempo en el que las vainas permanecen en la tierra después de la maduración, las condiciones de secado, el tiempo de almacenamiento y aireación durante el mismo y la actividad de los insectos, son los principales factores que determinan el grado de proliferación de los hongos. La especie de hongo que se desarrolla en un ambiente dado, depende de la humedad, temperatura, presencia de organismos competidores y la naturaleza y estado fisiológico del grano y/o vaina. Estos y otros factores gobiernan el metabolismo del hongo y su capacidad para la utilización del grano y vaina para su crecimiento y producción de metabolitos. (40)

Mucho de la deteriorización del grano por la invasión de hongos puede evitarse reduciendo la humedad en granos y vainas rápidamente, de manera que se minimicen los cambios indeseables en sus propiedades sensoriales (21). Se puede usar secado artificial, con aire forzado y temperatura, hasta obtener niveles de humedad adecuados (9-10%), y si se almacena en donde tenga un equilibrio con 70% de humedad relativa, se puede prevenir cualquier deterioro por hongos. (20)

DESCONTAMINACION DE PRODUCTOS

Estos métodos deben satisfacer los siguientes criterios:

1. Debe ser económico para que los productos descontaminados puedan ser vendidos a precios competitivos.
2. Debe ser una operación relativamente simple y rápida.
3. Debe remover todas las trazas de toxina activa y los residuos químicos no deben constituir un peligro para la salud.
4. La calidad nutricional no debe ser alterada.

Entre los principales métodos de descontaminación, se encuentran:

- a. Separación física. Se separan todos aquellos granos que están inmaduros, quebrados, rayados o descoloridos, porque el nivel de contaminación por aflatoxinas, está relacionado con la proporción de esos granos dañados (40, 46). Una vez que esto se hace, los granos están prácticamente libres de aflatoxinas, puesto que éstas se encuentran en un pequeño número de granos contaminados (40). Se puede hacer manual o mecánicamente y también existe la "clasificación por aire", que se basa en el principio de que los granos más ligeros o menos densos tienen más posibilidades de estar contaminados. (40)
- b. Extracción de aflatoxinas con disolventes. Los diferentes análisis realizados sobre el contenido de aflatoxina en las diferentes partes del grano de cacahuete, muestran que la mayor concentración se encuentra en el centro del grano. Por esto, la toxina no puede ser efectivamente removida por un simple lavado; sin embargo, existe una posibilidad de descontaminación por medio de la extracción con disolventes. (25)

En el Cuadro No. 9, se pueden observar los disolventes que se pueden utilizar, pues las aflatoxinas son solubles en ellos:

CUADRO No. 9
SOLUBILIDAD DE LAS MICOTOXINAS

Micotoxinas	Acetonitrilo	Hexano	Cloroformo	Metanol	Agua
AFLATOXINAS	+	-	+	+	-
ZEARALENOVA	+	+	+	+	-
OCHRATOXINA	+	-	+	+	-
TOXINA-T ₂	+	-	+	+	-

Fuente: (20)

El uso de disolventes en la extracción ofrece las siguientes ventajas: (46)

- a. Eliminación completa de las aflatoxinas en condiciones adecuadas.
- b. Poca probabilidad de formar otros productos que puedan tener actividad fisiológica adversa.
- c. La extracción puede ser conducida de manera que no afecte las cualidades nutricionales de las proteínas.

Por otro lado, el uso de la extracción por disolventes, presenta las siguientes desventajas:

- a. Necesidad de equipos especiales de extracción y para la recuperación del disolvente. (46)
- b. Como existe una fase acuosa, los nutrientes solubles en ella, también son eliminados. (25)
- c. Costo adicional del proceso. (46)

Entre los disolventes que más se usan, se encuentran: (46)

- a. Acetona-agua.
 - b. Mezclas azeotrópicas de disolventes como hexano-etanol, hexano-metano, acetona-hexano, etc.
 - c. Isopropanol-agua.
3. Inactivación química. De acuerdo con Backwith et. al. (25), "Cualquier inactivación química, deberá reducir el nivel de toxina hasta los límites permitidos, no deberá producir residuos tóxicos y no deberá afectar el valor nutricional de los productos tratados". Básicamente, son tres los métodos que cumplen con estos criterios:

- a. Agentes oxidantes.
 - b. Acidos.
 - c. Bases.
- a. Agentes oxidantes. Las aflatoxinas como tienen un doble enlace en el anillo dihidrofurano, son susceptibles a ser atacados a diferentes formas de oxígeno. Las aflatoxinas B₂, G₂ y M₂, que no poseen este doble enlace son más resistentes. De todos los agentes oxidantes probados, el peróxido de hidrógeno parece el más efectivo. (25)
 - b. Acidos. Ya es conocida, la capacidad que tienen las soluciones acuosas de los ácidos fuertes, de convertir a las aflatoxinas B₁ y G₁ en sus respectivos hemiacetales B_{2a} y G_{2a}, que son menos tóxicos. Como las condiciones para llevar a cabo este proceso son muy drásticas, sólo se recomienda para grandes cantidades de producto contaminado. También elimina considerablemente a las aflatoxinas B₂ y G₂. (25)
 - c. Bases. Es un tratamiento relativamente barato y eficiente, - pueden usarse bases orgánicas e inorgánicas, como es el hidróxido de sodio e hidróxido de calcio.

Un serio problema con los cereales y semillas almacenadas son esos "puntos calientes", que contienen elevados niveles de toxinas, que en ocasiones pueden ser encontrados en un lote, y las bases volátiles como la metilamina y la etilamina, pueden ser usados en tales casos (25), aunque aún no son muy aceptados.

Uno de los agentes más eficientes para la inactivación de -- aflatoxinas en granos contaminados, es el amoníaco. Usando la presión adecuada de amonio, temperatura, humedad de grano y tiempo de tratamiento adecuados, se consiguen prácticamente lotes sin nada de aflatoxinas. (46)

Los estudios de microorganismos como las levaduras, hongos, -

bacterias, actinomicetos y algas, han demostrado que pueden degradar a las aflatoxinas. La Flavobacterium aurantiacum se ha demostrado que remueve irreversiblemente a las aflatoxinas de una solución. (14, 21)

Se puede observar una reducción de la cantidad y calidad de proteína en productos tratados químicamente, particularmente aquellos tratados con hidróxido de sodio (a 100°C) o con metilamina y ozono. (46)

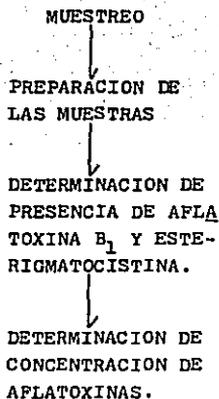
Se han hecho varios estudios para encontrar sustancias que inhiban completamente el desarrollo de los hongos productores de micotoxinas, entre éstos se pueden mencionar:

- a. Se ha encontrado que ciertos alimentos contienen ciertas sustancias que sirven para inhibir naturalmente la producción de aflatoxinas, como las metilxantinas en los frijoles de cacao, o el ácido fítico en la soya. (11)
- b. Usando extracto de cebolla, que tiene ciertas propiedades antibacteriales, se puede inhibir el crecimiento de los hongos productores de aflatoxinas. (41)
- c. La aflatoxina B₁, puede destruirse al hacerla reaccionar con bisulfito de sodio, ya que reacciona con el anillo de furano, produciéndose un compuesto conocido como aflatoxina B₁S, que tiene una toxicidad mucho menor que la original. (23)

MATERIALES Y METODOS.

En la figura II, se muestra el diagrama del desarrollo analítico del estudio:

FIGURA II
DIAGRAMA DEL DESARROLLO ANALITICO DEL ESTUDIO



1. MUESTREO

Se investigaron las marcas comerciales, las cuales se identificaron con claves, de dulce de cacahuete estilo mazapán existentes en el D.F. Se encontraron 18 marcas comerciales. El número de muestras que se analizaron, se eligieron de acuerdo a lo establecido por los Planes de Toma de Muestras para Alimentos Preenvasados del Codex Alimentarius. (15)

Se analizaron por sextuplicado, muestras de cada marca. Las muestras se recolectaron de varios establecimientos, prin-

principalmente en el centro y sur del D.F., con el fin de que pertenecieran a diferentes lotes y así obtener resultados más representativos.

2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de cada marca se clasificaron y codificaron con distintas claves. Se hicieron muestras compuestas, tomando -- 50 g. de cada una de las muestras homogenizadas.

3. DETERMINACION DE MICOTOXINAS

4. DETERMINACION DE CONCENTRACION DE AFLATOXINAS

Se hizo utilizando el Método de Stoloff (44) con variaciones en la eliminación de la fracción grasa. El método consiste -- en:

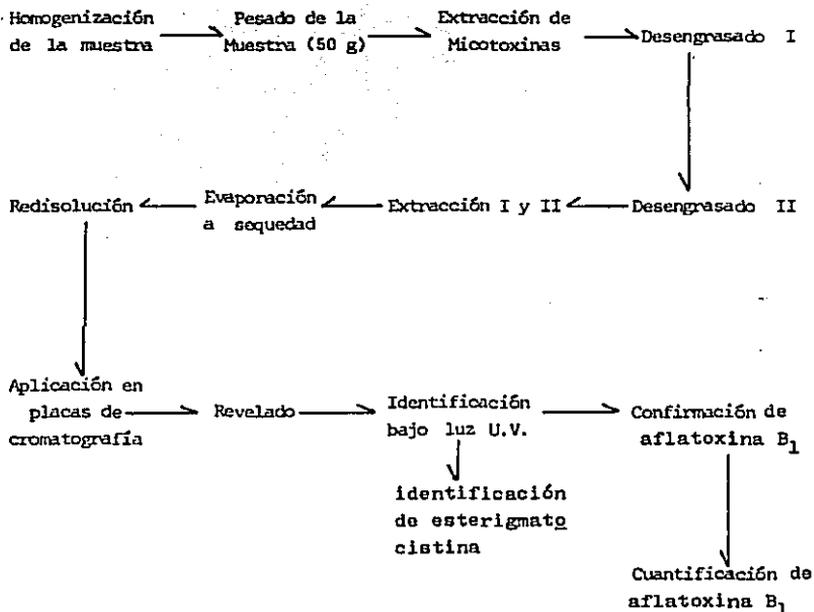
MATERIAL Y REACTIVOS:

1. Disolvente de extracción: Acetonitrilo-cloruro de potasio al 4% (90 + 10)
Cloroformo.
2. Disolvente revelador: Tolueno-Acetato de etilo-Acetona (3:2:1)
3. Disolvente desengrasante: Eter de petróleo.
4. Disolvente aplicador: Benceno-acetonitrilo (98 + 2)
5. Agente decolorante: Cloruro férrico al 1% (pH con hidróxido de sodio al 4%)
6. Prueba de confirmación: Acido sulfúrico al 20%
7. Silica gel 60H (0.25 mm de espesor)
 - a. Material básico de laboratorio.
 - b. Placas de cromatografía en capa fina.
 - c. Cámara para cromatografía.
 - d. Lámpara de luz ultravioleta de onda larga.

METODO

En la siguiente figura, se muestra el diagrama del proceso analítico:

FIGURA III
DIAGRAMA DEL PROCESO ANALITICO



La determinación de micotoxinas; consiste en pesar 50 g. de muestra previamente homogenizada y se extraen en licuadora con una mezcla acetónitrilo-cloruro de potasio al 4%. El filtrado es desengrasado dos veces con 50 ml de éter de petróleo. Esta muestra es decolorada con una solución al 1% de cloruro férrico, con el fin de eliminar todos los pigmentos que pudieran interferir en la identificación de aflatoxinas y obtener resultados falsos. (44)

A la muestra decolorada se le añade un volumen igual de agua y se extraen dos veces las sustancias insolubles en ella --- (micotoxinas) con 50 ml de cloroformo.

A la fase cloroformica se le agrega sulfato de sodio anhidro. El cloroformo anhidro se evapora a sequedad en baño de vapor.

El extracto se redisuelve con 500 microlitros de mezcla acetónitrilo- benceno y se aplican en placa de cromatografía fina (Silica gel 60H) Y se desarrolla en un sistema tolueno-acetato de etilo-acetona, aplicando al mismo tiempo estándar de aflatoxina B₁ (concentración de 25 ppb) en volúmenes de 5, 10 y 25 microlitros para fines comparativos de R_f y de semicuantificación por intensidad de mancha.

Las manchas respectivas se identificaron bajo luz ultravioleta de onda larga. Las muestras positivas, las cuales presentan una fluorescencia azul en el caso de la aflatoxina B₁, se confirman con el rociado de ácido sulfúrico al 20%, ya que las manchas positivas cambian el color de su fluorescencia (de azul a verde limón)

5. ENCUESTA.

Se realizó una encuesta a 200 personas de distinta edad y estrato social con el fin de conocer cuáles eran los niveles -- aproximados de consumo de mazapán. La encuesta consistió en un cuestionario tipo. (Anexo I)

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En los siguientes cuadros, se pueden observar los resultados obtenidos del análisis de los dulces de mazapán:

CUADRO No. 10

MUESTRA	AFLATOXINA B ₁		CONCENTRACION
	Positivo	Negativo*	
1		X	
2		X	
3		X	
4		X	
5	X		10 ppb
6		X	
7	X		8 ppb
8		X	
9		X	
10	X		7 ppb
11		X	
12		X	
13		X	
14		X	
15		X	
16	X		7 ppb
17		X	
18		X	

* De acuerdo al límite de detección del método empleado, la muestra se considera negativa cuando presenta un valor menor o igual a 5 ppb.

CUADRO No. 11

HUESTRA

H I C O T O X I N A S
(ESTERIGHATOCISTINA, AFLATOXINA B₂ Y G₁)

Positivo

Negativo

1		X
2		X
3		X
4	X	
5		X
6	X	
7		X
8		X
9		X
10		X
11	X	
12		X
13		X
14		X
15		X
16		X
17		X
18		X

De acuerdo al cuadro No. 10, se puede observar que el 22.2% de las muestras analizadas resultaron positivas en un rango de concentraciones de 7 a 8 ppb, obtenidas éstas por comparación de la intensidad de mancha producida por cantidades varias de estándar de concentración conocida contra la intensidad de las muestras problema. Para calcular la concentración de micotoxina obtenida, se hizo de la siguiente manera:

Se partió de un estándar de 100 ppb del cual se colocaron en la placa cromatográfica tres volúmenes de 5, 10 y 25 microlitros, las cuales contenían 0.055, 0.01 y 0.025 microgramos de aflatoxina B₁ respectivamente. Al mismo tiempo, se colocaron 10, 20 y 50 microlitros del concentrado de la muestra obtenido al final de la marcha analítica.

Luego de desarrollar la placa en la cámara reveladora y comparar las intensidades de las manchas fluorescentes obtenidas, se conoció aproximadamente la cantidad de aflatoxina presente en la muestra aplicada en la placa. Con base en este valor, se pudo calcular la concentración en partes por billón en la muestra original.

Ej.: La muestra 5 en la mancha correspondiente a 10 microlitros, presentó una intensidad de fluorescencia bajo la luz ultravioleta, similar a aquella producida por los 0.01 microgramos de aflatoxina contenidos en los 10 microlitros de estándar aplicado, esto implica que 10 microlitros tienen esa cantidad de aflatoxina, por lo tanto 500 microlitros (que es la cantidad del concentrado que se obtiene en la marcha analítica) contienen 5 microgramos, que son los contenidos en los 40 g de la muestra (valor corregido después de la extracción inicial).

Si atendemos a la definición de que 1 ppb es 0.01 microgramo por cada gramo, entonces la muestra tendrá 0.1 microgramos por cada gramo, lo que es 10 ppb.

En un 16.6% se encontró contaminación por otras micotoxinas, posiblemente de esterigmatocistina, así como de aflatoxina B₂ y G₁.

Como es sabido, el límite de aflatoxina B₁, permitido por la S.S. (Secretaría de Salud) y la F.D.A. (Food and Drug Administration) es de 5 ppb, como máximo, mientras que para una --- mezcla de micotoxinas es de 30 ppb; de acuerdo a los resultados de los análisis, la concentración de aflatoxina de las muestras positivas, exceden a aquella permitida por las organizaciones - anteriores, por lo que representan un riesgo importante para los consumidores, siendo éste mayor, si se considera la presencia de otro tipo de micotoxinas.

Durante el estudio, se llevó a cabo una encuesta, la cual - ya fué mencionada en párrafos anteriores, la cual se realizó entre gentes de distinta edad y sexo, y los resultados demuestran que existe una población mayor de menores que los consumen, los adultos los consumen con mucho menor frecuencia y cantidad. En cuanto al sexo, no se encontró ninguna preferencia particular.

La frecuencia con la que se consumen va desde muy ocasional - mente hasta diario, siendo los menores aquellos que llegan a cumplirlo con mucha frecuencia (nunca lapsos mayores de una semana). En cuanto al nivel de consumo, la mayoría de la población - encuestada, no llega a consumirlos en grandes cantidades, el resultado máxima que se obtuvo fueron dos mazapanes seguidos, ya - que por ser una golosina muy dulce y que produce una sensación - de sequedad, la cual es provocada por el cacahuate, hace que su consumo en grandes cantidades no se acostumbre.

De acuerdo a la encuesta anterior, es importante hacer notar, que aunque los efectos agudos provocados por intoxicación con mazapán contaminado no son muy frecuentes e incluso no exigen, los efectos a largo plazo que pueden provocar, representan un gran peligro, sobre todo para los menores de edad.

Ya se mencionó en qué consiste el proceso de elaboración - del dulce de cacahuete estilo mazapán, así como los ingredientes que éstos tienen, una vez analizados se puede concluir que los lugares en donde es más factible la contaminación es definitivamente durante el almacenamiento, aunque no se descarta por completo la posibilidad de una contaminación durante el proceso debido a una inadecuada calidad sanitaria del mismo, provocada por una falta de limpieza del equipo, lo cual hace que se sugiera como un medio preventivo, la buena limpieza constante - del equipo, así como control de calidad constante de la materia prima, sobre todo del cacahuete.

Para evitar la contaminación durante el almacenamiento, es necesario que se mantengan las condiciones adecuadas para que - de esta manera las posibilidades de obtener un producto contaminado sean mínimas. Es importante estar realizando pruebas de detección de micotoxinas para así poder eliminar a tiempo cualquier foco de infección.

Se mencionó en el capítulo anterior que la destoxificación sólo debería considerarse como una medida de emergencia, puesto que existen métodos preventivos para cada uno de los pasos que forman el proceso de elaboración del mazapán.

Dentro de los métodos de prevención es importante mencionar que el cacahuete debe estar en buen estado físico, porque, como ya se mencionó, si el cacahuete se encuentra en mal estado, es decir, roto o maltratado, se facilita la contaminación por hongos y como consecuencia, la producción de las micotoxinas por ellos. Aquí cabe mencionar, que algunas de las industrias que producen este dulce, no lo fabrican como el único producto de cacahuete, sino que en algunos casos lo producen para aprovechar el desperdicio de cacahuete, pues al no estar entero y sin maltratar, no lo pueden ocupar en aquellos productos que lo requieren en buen estado general y en cambio, como para el mazapán se usa molido, no presenta ningún problema usar cacahuete maltratado o roto.

Esto viene a ser un problema, pues como se dijo, este tipo de cacahuete va a ser más susceptible a la contaminación por distintos microorganismos.

En cuanto al método de análisis que se usó, es un método de detección múltiple, en el que se pueden detectar cantidades muy pequeñas (hasta 5 ppb) de diferentes micotoxinas, presentando una posibilidad de error mínima. Por otro lado, un método que se puede realizar sin mayores problemas, pues es de rápida realización y utiliza equipo sencillo.

CONCLUSIONES

1. Se realizaron los análisis de detección de micotoxinas, encontrando un 38.8% de muestras positivas contaminadas principalmente con aflatoxina B₁ y esterigmatocistina (que es uno de los precursores de la aflatoxina B₁).
2. Las muestras analizadas que resultaron positivas, presentaron una concentración entre 7 y 8 ppb, la cual excede a la permitida por la Secretaría de Salud y a la Food and Drug Administration, por lo cual representan un peligro de intoxicación a largo plazo, ya que la aguda requiere de concentraciones más elevadas.
3. Se sugiere que el punto del proceso de elaboración del dulce en el cual es más probable que se realicen las contaminaciones en el almacenamiento, aunque no se descarta la posibilidad de que pueda ocurrir durante los otros puntos del proceso, si no se realiza un buen control de calidad y se tiene una buena calidad sanitaria.
4. Como medio de control de la contaminación por hongos productos de aflatoxinas y otras micotoxinas, se sugiere que:
 - a. El producto que se va a almacenar para ser usado posteriormente, sea analizado y seleccionado para así evitar en lo que se pueda, la formación de focos de contaminación.
 - b. Durante el almacenamiento se deberán tener las condiciones necesarias, dependiendo del tipo y tiempo de almacenaje.
 - c. Durante el proceso de elaboración, se deberán tener unas condiciones sanitarias muy buenas.
 - d. Realizar análisis de detección de micotoxinas tanto a la

materia prima como al producto terminado.

- e. Utilizar materia prima, sobre todo el cacahuate, en las mejores condiciones posibles.
5. El método utilizado para la detección de micotoxinas presenta ciertas ventajas sobre otros métodos, como es su precisión (5 ppb), rapidez y facilidad de realización, así como el empleo de equipo de laboratorio sencillo.
6. Es importante que siempre se usen métodos preventivos y sólo en emergencias se usen los métodos de destoxificación, puesto que aparte de que éstos son más caros, pudieran variar las características sensoriales del producto final.
7. Estudios anteriores, han demostrado que son varios los productos que pueden presentar contaminación por diferentes tipos de micotoxinas, por lo que en un momento dado, no sólo el cacahuate es fuente de toxinas, lo cual hace que el peligro de una intoxicación aumente notablemente.

ANEXO I

ENCUESTA

1. Lugar en donde se realizó la encuesta: _____
2. Edad del encuestado: _____
3. Sexo del encuestado: _____
4. Le gusta el mazapán de cacahuate: SI___ NO___
5. En caso de que le guste, con qué frecuencia lo consume:

6. Cuántos consume habitualmente: _____

BIBLIOGRAFIA

1. Abad, F.G. y Herrera, F.J. Propuesta de un Programa de Prácticas en Toxicología de Alimentos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. U.N.A.M. 1982
2. Abdollahi, A. and Buchanan, R.L. Regulation of Aflatoxin Biosynthesis: Characterization of Glucose as an Apparent Inducer of Aflatoxin Production. J. of Food Sci. 46: 143-146 (1981)
3. Abramson, D., Sinha, R.N. and Mills, J.T. Mycotoxins and Odor Formation in Moist Cereal Grain During Storage. Cereal Chem. 57(5): 346-351
4. Anónimo. Naturally Occuring Toxicants in Foods. J. Ed. Sci. 40: 215-221 (1979)
5. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Published by AOAC Washington, D.C. 26: 5-7 (1975)
6. Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Wiseman, D.W. and Marth, E.H. Aflatoxin. Toxicity to Dairy Cattle and Occurrence in Milk and Mild Products - A Review. J. Fd. Protec. 45(8): 752-777 (1982)
7. Arévalo, G. Desarrollo de Aflatoxinas en Productos Alimenticios. Grasas y Aceites. 34(83): 115-124 (1983)
8. Argumedo, L.M. Determinación de Aflatoxinas en Muestras de Maíz de los Molinos para Nixtamal del Distrito Federal. Licenciado en Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Universidad Iberoamericana. México, D.F. 1984
9. Ashoor, S.H. and Chu, F.S. Technical Communications. New Confirmatory Test for Aflatoxins B₁ and B₂. J.A.) A.C. 58(3): 346-351 (1980)

10. Batt, C., Solberg, M. and Ceponis, M. Inhibition of Aflatoxin Production by Carrot Root Extract. *J. Fd. Sci.* 45: 1210-1213 (1980)
11. Beuchat, L.R. Food and Beverage Mycology. AVI Publishing - Company Inc. Westport, Connecticut. 1978
12. Blanco, M. Determinación Cuantitativa de Aflatoxinas en Productos Procesados de Cacahuete. Tesis de Licenciatura. Universidad La Salle. U.N.A.M. México, D.F. 1982
13. Campbell, T.C. and Stoloff, L. Implication of Mycotoxins for Human Health. *J. Agr, Food Chem.* 22(6): 1006-1015 (1974)
14. Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E. and Hall, H.H. - Microbial Detoxification of Aflatoxin. *Appld. Microb.* 4(6): 934-939 (1976)
15. Codex Alimentarius. Planes de Toma de Muestras para Alimentos Preenvasados. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Organización Mundial de la Salud.
16. Communications to the Editor. Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem.* 85: 1706-1707 (1979)
17. Cuadernos Técnicas de la FAO. Prevención de las Micotoxinas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Cuaderno No. 10. 1979
18. Dam, R., Tam, S.W. and Satterlee, L.D. Aflatoxins Destruction and By-Products Isolation from Artificially Contaminated --- Grains. *Cereal Chem.* 54(3): 705-714 (1976)
19. Fraser, J. Control of Carcinogens in Food. *Fd. Technol. N. Zealand.* 18(6): 13-20 (1983)
20. Goldblatt, L.A. Chemistry and Control of Aflatoxin. *Pure - and Applied Chemistry.* 21(3): 331-353 (1970)
21. Goldblatt, L.A. Control and Removal of Aflatoxin. *J.A.O.C.S.* 48: 605-610 (1971)

22. Goldblatt, L.A. Aflatoxin: Scientific Background, Control - and Removal Implications. Academic Pres. New York.
23. Hagler, W.M., Hutchons, J.E. and Hamilton, P.B. Destruction of Aflatoxin B₁ with Sodium Bisulfite: Isolation of the Major Product Aflatoxin B₁S. J. Fd. Protec. 46(4): 295-300 (1983)
24. Heathcote, J.G. and Hibbert, J.R. Aflatoxins: Chemical and - Biological Aspects. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam - Oxford - New York. 1978
25. Hesseltine, C.W., Shotwel, O.L., Ellis, J.J. and Stabblefield, R.D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Bacteriol - Rev. 30(4): 795-805 (1976)
26. Hurst, W.J. and Toomey, P.B. Determination of Aflatoxin in - Peanut Products Using Reverse Phase HPLC. J. of Cromatographic. Sci. 16: 372-373 (1978)
27. Lieu, F.X. Production and Stability of Aflatoxins, Penicillic acid and Patulin in Several Substrates. J. Fd. Sci. 42(5): 1222-1224 (1977)
28. Lyncho, G.P. Mycotoxins in Feedstuffs and their Effect on - Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 55(9): 1243-1255 (1972)
29. Maggon, K.K., Gupta, S.K. and Venkitasubramanian, T.A. ---- Biosynthesis of Aflatoxins. Bacteriol. Rev. 41: 822-855. - (1980)
30. Marth, E.H. and Doyle, M.P. Update on Molds: Degradation of Aflatoxins. Fd. Technol. 81-87 (1979)
31. Osborne, B.G. Mycotoxins and the Cereals Industry. A Review. J. Fd. Technol. 17: 1-9 (1982)
32. Pons, W.A. Resolution of Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ by -- High Pressure Liquid Chromatography. J. of the AOAC 59(1): 101-105 (1976)

33. Przybylski, V. Formation of Aflatoxin Derivarives on Thin - Layer Chromatographic Plates. J.A.O.A.C. 58(1): 163-164 - (1975)
34. Rao, V.A., Saraswathy, S., Maggon, K.K. and Venkitasubramanian, R.A. Bioenergetics of Aflatoxin Biosynthesis in Aspergillus parasiticus. J. Fd. Sci. 45: 1031-1035 (1980)
35. Reiss, J. Mycotoxins in Food Stuffs. Cereal Chem. 55(4): - 421-423 (1978)
36. Rodricks, J.V. and Stoloff, L. Determination of Concentration and Purity of Aflatoxin Standards. J.A.O.A.C. 53(1): 92-95 (1970)
37. Romer, T. Methods of Detecting Mycotoxins in Mixed. Feeds - and Feed Ingredints.
38. Rosiles, R. Las aflatoxinas en las Tortillas. Veterinaria - Méx. U.N.A.M. 10: 37-44 (1979)
39. Rosiles, R. y Pérez, A. Consideraciones Generales sobre algu nas Micotoxinas en Alimentos para Animales Domésticos durante los años 1977 a 1980. Veterinaria Méx. U.N.A.M. 12: 229-233 (1981)
40. Shank, R.C. Mycotoxins and N-Nitroso Compounds. Enviromental Risks. C.R.C. Press. Vol. I y II. 1981
41. Sharma, A., Tewari, G.M., Shrikhande, A.J., Padwall-Desai, - S.R. and Bandyopadhyay, C. Inhibition of Aflatoxin-Producing fungi by Onion Extracts. J. Fd. Sci. 44: 1545-1547 (1979)
42. Stack, M.E. and Pohland, A.E. Collaborative Study of a Method for Chemical Confirmatory of the identity of Aflatoxin. ---- J.A.O.A.C. 58(1): 110-113 (1975)
43. Steyn, M. and Rabie, C.J. Production of Sterigmatocystin. - J.A.O.A.C. 58(3): 622-623 (1975)
44. Stoloff, L., Nesheim, S., Yin, L., Rodricks, J.V., Stack, M. and Campbell, A.D. A multimycotoxin Detection Method for --

- Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone Sterigmatocystin and ----
Patulin. J. Assoc. Official Anal. Chem. 54: 91-97 (1971)
45. Tadeu, P.C., Antillón, A.R. y Rosiles, R.M. Aflatoxicosis en
Aves Domésticas. Estudio Recapitulativo. Vet. Mex. 11: 13-
22 (1980)
46. Tango, J.S. Aflatoxina. Boletim do Instituto de Tecnologia
de Alimentos. 37: 37-95 (1974)
47. Uraguchi, K. and Yamazaki, M. Toxicology, Biochemistry and -
Pathology of Mycotoxins. Kodansha, L.T.D. (Tokyo) John Siley
and Sons. (New York) (1978)
48. Uribe, Z.S. Investigación de aflatoxinas en Cacahuates Mexi-
canos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. U.N.A.M.
México, D.F. (1977)
49. Watson, D.H. and Lindsay, D.G. A Critical Review of Biological
Methods for the Detection of Fungal Toxins in Food and -----
Foodstuffs. J. Sc, Fd. Agric. 33: 59-67 (1982)