

## 4. ASPERGILLUS

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios (cuadro 1.2). Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Kozakiewicz 1989).

### MORFOLOGÍA

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (fig. 4.1) y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Kozakiewicz 1989).

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Kozakiewicz 1989).

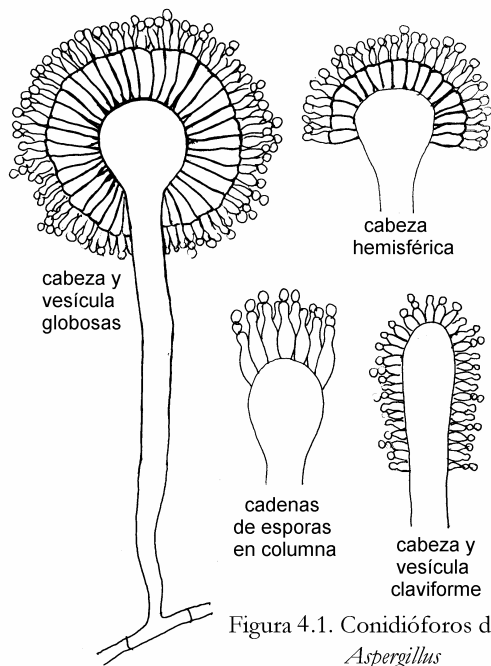


Figura 4.1. Conidióforos de *Aspergillus*

Las características macro y micro-morfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los aspergilos en secciones o grupos como se indica en el cuadro 4.1. Peterson (2000) eliminó las secciones *Versicolores* y *Usti* e incluyó a las especies en la sección *Nidulantes*, además transfirió una parte de la sección *Wentii* a la *Cremeri* y la otra (*Petromyces*) a la *Flavi* en base a las relaciones filogenéticas surgidas de las secuencias de los fragmentos de ADN ribosomal.

Los teleomorfos poseen meiosporos en ascos que pueden producirse en racimos desnudos o dentro de ascomas. Éstos tienen una pared formada por hifas sueltas, un plecténquima o un tejido estromático. Según Kozakiewicz (1989) la

ornamentación superficial de las ascosporas que se observa con el microscopio electrónico de barrido, es una de las características más fidedignas para la identificación de las especies.

Con excepción de *A. fischerianus* (sección *Fumigati*) y especies de las secciones *Aspergilli* y *Nidulantes* que tienen respectivamente, teleomorfos en los géneros *Neosartorya*, *Eurotium* y *Emericella*, no se observan formas perfectas en las condiciones habituales de trabajo (Klich & Pitt 1992). Los esquemas de las especies que comúnmente se encuentran en los alimentos se muestran en la clave del capítulo 10.

**Cuadro 4.1.** Características de los grupos/secciones de *Aspergillus* (Klich & Pitt 1992, Kozakiewicz 1989)

SECCIÓN	GRUPO	CONIDIOS	MÉTULA	VESÍCULA	CONIDIÓFORO	OTROS
<i>Aspergilli</i>	<i>A. glaucus</i>	verde, rugoso	no	globosa a espatulada	liso	cleistotecio amarillo o anaranjado, osmófilo
<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>	blanco	si	globosa	liso	esclerocio
<i>Cervini</i>	<i>A. cervinus</i>	anaranjado	no	globosa	liso	-
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	amarillo	si	globosa	liso o rugoso,	esclerocio amarillo
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	verde claro	no	claviforme	liso	-
<i>Cremeri</i>	<i>A. cremeri</i>	verde, pardo	si/no	globosa	liso	cleistotecio crema, osmófilo
<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i>	pálido, canela	si	espatulada	liso, pardo	células de Hülle
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	verde, pardo	si/no	globosa	rugoso	esclerocio
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	verde azulado	no	espatulada	liso	-
<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	verde oscuro	si	espatulada	liso, pardo	ascosporos rojos, células de Hülle
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	negro	si/no	globosa	liso	esclerocio
<i>Ornati</i>	<i>A. ornatulus</i>	aceituna, verde amarillento	no	espatulada	liso	-
<i>Restricti</i>	<i>A. restrictus</i>	verde oscuro, no forma de tonel	no	piriforme	liso	osmófilo
<i>Sparsi</i>	<i>A. sparsus</i>	aceituna, pardo	si	globosa a piriforme	rugoso	-
<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	canela, pardo	si	globosa	liso	-
<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	gris aceituna	si	oval	liso, pardo	-
<i>Versicolores</i>	<i>A. versicolor</i>	verde	si	variable	liso	células de Hülle
<i>Wentii</i>	<i>A. wentii</i>	beige	si	variable	liso a rugoso	-

SECCIÓN	TELEOMORFO	SECCIÓN	TELEOMORFO
<i>Aspergilli</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>
<i>Cremeri</i>	<i>Chaetosartorya</i>	<i>Ornati</i>	<i>Hemicarpenales, Scleroleista, Warcupiella</i>
<i>Flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>	<i>Wentii</i>	<i>Petromyces</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>		

### IDENTIFICACIÓN

Tradicionalmente se hace en base a las características macro y micromorfológicas en diversos medios de cultivo incubados a distintas temperaturas (Klich & Pitt 1992), debido a la necesidad de conocer el contaminante para orientar la búsqueda de micotoxinas en un producto. Se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para la identificación de los hongos contaminantes de granos y otros productos vegetales (Banks *et al.* 1992) y técnicas moleculares en base al polimorfismo del ADN nuclear y mitocondrial, el polimorfismo de tramos de fragmentos amplificados (AFLP), el polimorfismo de tramos de fragmentos de restricción (RFLP) y el polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) para estudios a nivel intra- e inter-específico (Geiser *et al.* 2000, Scott & Straus 2000, Voetz & Rath 2002).

### CULTIVOS

La mayoría de las especies crecen sobre Czapek-Levadura pero los aspergilos osmófilos, particularmente los miembros de las secciones *Aspergilli* y *Restricti*, se desarrollan sobre Czapek-20% Sacarosa (cap. 3). La temperatura de incubación corriente es de 25°C pero para algunos miembros de la

sección *Fumigati* es conveniente 37°C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en unas dos semanas las esporas están totalmente maduras (Kozakiewicz 1989).

Para el aislamiento se usan medios selectivos (Rosa de Bengala, Rosa de Bengala-Diclorán) con inhibidores de la proliferación bacteriana y del desarrollo exuberante de algunos mohos dando oportunidad a todas las esporas de originar una colonia aunque restringida, si el número no es demasiado grande (cap. 3). Si solamente interesa determinar la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* se suele sembrar sobre el medio AFAP que es selectivo para dichas especies (Pitt & Hocking 1997). Con el fin de identificar los aspergilos se suele sembrar en placas de Malta-Glucosa, Czapek-Levadura, Czapek-Glicerol o Czapek-20% Sacarosa incubando a 5, 25 y 37°C registrando las características macro y micro-morfológicas para acceder a la clave.

El volumen de medio vaciado en la caja de Petri influye sobre el diámetro de las colonias y otras características macroscópicas por ejemplo, en Czapek-Levadura, un espesor mayor hace que *A. flavus* produzca más esclerocios y el reverso de la colonia sea más oscuro mientras *A. terreus* esporula menos. Un volumen mayor de Malta-Glucosa mejora el crecimiento micelial de *A. terreus* y *A. versicolor* en detrimento de la esporulación. Algunas de las razones para tal comportamiento son una mayor disponibilidad de nutrientes y un cambio más lento en la actividad del agua o el pH (Okuda *et al.* 2000).

Con el fin de comprobar que los medios utilizados son adecuados para observar la velocidad de crecimiento y las características macro y microscópicas, es conveniente sembrar cepas obtenidas de una colección de referencia (Okuda *et al.* 2000). La degeneración de las cepas (pleomorfismo) es un problema de muchos hongos, los cuales sufren cambios morfológicos como colonias algodonosas, reducción de la esporulación y modificaciones de los conidióforos, asociado a la pérdida de la capacidad de producir toxinas cuando se los mantiene durante mucho tiempo mediante sucesivos repiques (Klich & Cleveland 2000). Una manera de recuperarlos es cultivarlos en trozos de cayote estériles u otros frutos.

La temperatura, a la cual el material amohosado es transportado al laboratorio y mantenido antes de su análisis, puede influir en la flora aislada a continuación. Si unos granos con alta humedad se mantienen a 12°C se facilitará el aislamiento de los penicilios aunque anteriormente hayan predominado los aspergilos. Por otra parte, sobre los materiales con baja actividad de agua será más frecuente el aislamiento de *Aspergillus* (Moss 1991).

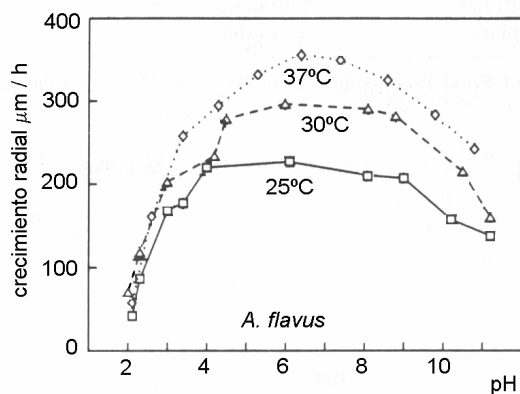


Figura 4.2. Efecto del pH y temperatura sobre la velocidad de crecimiento radial.

#### AMBIENTE

La ubicuidad de los aspergilos es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre sustratos con diverso contenido de humedad. La colonización de los granos durante el almacenamiento, por *Aspergillus* y otros mohos, se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente intergranular se eleva por sobre el 70%, sin que se desencadene aún el fenómeno de brotación (Eguiazú 1984).

El rango de temperatura para el crecimiento va desde 0-5°C para *A. glaucus* hasta 50-55°C para *A. fumigatus*, estando el óptimo entre 30-33°C para la mayoría de las especies. Si unos granos

con un contenido de humedad del 15% no fueron afectados por los aspergilos durante un año es porque la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 5-10°C (Kozakiewicz 1989). La figura 4.2 muestra el efecto del pH del medio y la temperatura de incubación sobre la velocidad de

crecimiento radial de la colonia de *A. flavus* (Wheeler et al. 1991), y en el cuadro 4.2 se observan los valores de temperatura y actividad de agua para el crecimiento de algunas especies de aspergilos.

**Cuadro 4.2.** Temperatura y actividad de agua requeridas para el desarrollo de algunas especies de *Aspergillus* y *Eurotium* (Lacey 1989).

ESPECIES	TEMPERATURA °C		ACTIVIDAD DE AGUA	
	RANGO	ÓPTIMO	MÍNIMO	ÓPTIMO
<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	6 - 45	35 - 37	0,78	0,95
<i>A. candidus</i>	3 - 44	25 - 32	0,75	0,90 - 0,98
<i>A. fumigatus</i>	10 - 55	40 - 42	0,85	0,98 - 0,99
<i>A. restrictus</i>	9 - 40	30	0,71	0,96
<i>A. versicolor</i>	4 - 39	25 - 30	0,78	0,95
<i>E. amstelodami</i>	5 - 46	33 - 35	0,71 - 0,73	0,93 - 0,96
<i>E. chevalieri</i>	5 - 43	30 - 35	0,71	0,93 - 0,95
<i>E. repens</i>	7 - 40	25 - 27	0,75	0,93 - 0,95
<i>E. rubrum</i>	5 - 40	25 - 27	0,70	0,93

### MICOTOXINAS

Son varios los metabolitos secundarios de los aspergilos que son considerados micotoxinas: aflatoxinas, esterigmatocistina y otros (cuadro 1.1), algunos de los cuales también son producidos por especies de penicilios, por ejemplo ácido ciclopiazónico y ocratoxinas (Smith & Ross 1991).

Es común que las condiciones óptimas para el crecimiento de las especies toxinógenas no coincidan con las que facilitan la producción de micotoxinas. Así, mientras el desarrollo óptimo de *A. flavus* ocurre a 36°C con una actividad del agua de 0,95, la producción de aflatoxinas es favorecida por una temperatura de 33°C a una actividad de 0,99, aunque pueda ser formada aún a 15°C con una actividad del agua de 0,95. Por otra parte, con una actividad del agua óptima *A. versicolor* produce la mayor cantidad de esterigmatocistina a pH 5,6 (Moss 1991). Aunque el pH sea fácil de medir es difícil de controlar porque a medida que crece el hongo cambia el pH del sustrato.

Tanto en el campo como en el almacenamiento los factores ambientales no son constantes, por lo que puede ocurrir que habiendo un desarrollo fúngico apreciable, no se encuentre la cantidad de micotoxina esperada. Debido a su estabilidad las micotoxinas pueden persistir aún cuando hayan muerto las esporas. Además influyen los requerimientos nutricionales de la especie particular. Por ejemplo una escasa disponibilidad de Zn, elemento necesario para biosíntesis de aflatoxinas, puede determinar la baja incidencia de este metabolito en algunos sustratos (Moss 1991). En general, el aumento de los metabolitos secundarios es una respuesta al "stress". Si éste es causado por un biocida en concentración subletal, provoca un aumento de la biosíntesis de micotoxinas (Widstrom 1992).

La asociación entre los hongos del grupo *A. flavus* y la planta de maíz en el campo no termina con la cosecha pues se encontraron aflatoxinas en los rastrojos, además de esclerocios (Widstrom 1992). La contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas de *Aspergillus* se debe a la invasión del hongo saprobita oportunista sin capacidad patogénica, así las cepas de *A. flavus* suelen infectar antes de la cosecha a semillas de algodón, maníes o granos de maíz en crecimiento (Lillehoj 1992). Los insectos están asociados a la presencia de aflatoxinas en granos debido a que pueden actuar como vectores, pero las larvas no son inmunes al efecto tóxico. La aplicación de insecticidas limita el daño por insectos, pero no suele eliminarlos ni evita la infección fúngica de los granos (Widstrom 1992).

Las interacciones con otros microorganismos pueden afectar la producción de micotoxinas. *Brevibacterium linens* y *Streptococcus lactis* inhiben la síntesis de aflatoxinas pero la estimulan *Lactobacillus plantarum* y *Acetobacter aceti* (Moss 1991). Se observa una disminución de la cantidad de aflatoxinas cuando

*A. flavus* crece en un cultivo mixto con *Penicillium oxalicum* u otros hongos, y una alteración de la relación  $G_1/B_1$  en el caso de *A. parasiticus* (Widstrom 1992). Por su parte *A. flavus* afecta a la capacidad de formación de toxinas de *A. ochraceus* o *A. versicolor* (Devi & Polasa 1987). Además los *Aspergillus* inhiben la producción de toxinas por otros géneros en cultivos mixtos (Reddy & Reddy 1992) mientras que *Trichoderma viride* impide la formación de aflatoxinas (Bilgrami & Sinha 1992).

El problema de las micotoxinas en las aves condujo al uso de arcillas y otros alúminosilicatos mezclados con el alimento para la absorción de aflatoxinas en el tracto digestivo del animal, pero no es útil para todas las toxinas y además, afectan la nutrición pues eliminan algunos oligoelementos y vitaminas. Posteriormente se propició el uso de oligosacáridos,  $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,6 glucano y manano, extraídos de las paredes de *Saccharomyces cerevisiae* para proteger a las aves de los efectos adversos de las micotoxinas (Huwig *et al.* 2001). Los alimentos producidos por extrusión suelen contener menos toxinas que los materiales crudos así como los granos pretratados con álcalis (Scudamore 1996).

Con el fin de conocer la situación de peligro se buscan las micotoxinas en los productos alimenticios y forrajeros, pero muchas veces hay que comenzar por el aislamiento e identificación de los mohos para preveer cuales toxinas podrían estar presente. El análisis cuantitativo de las micotoxinas se hace mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por espectrofotometría, fluorometría o espectrometría de masas, cromatografía en capa fina (TLC) con densitometría de las manchas fluorescentes o coloreadas (Steyn *et al.* 1991) y los inmunoensayos. Estos últimos son muy sensibles debido a que hay una interacción altamente específica entre el anticuerpo y la toxina, por lo que tales análisis pueden hacerse con poca purificación de la muestra.

Un método relativamente sencillo es el ensayo conocido por sus siglas inglesas ELISA, que se lleva a cabo en una placa de microtitulación cuyos pocillos están recubiertos con el anticuerpo anti-toxina específico inmovilizado. La toxina es extraída con metanol-agua, y hexano si es necesario. Una alícuota de la capa acuosa se mezcla con igual volumen de una solución de toxina conjugada con una enzima, generalmente peroxidasa. Al agregar la mezcla al pocillo, tanto la toxina libre como la conjugada compiten para unirse al anticuerpo y sólo una porción de las mismas se unen. Luego de lavar se agrega la solución que contiene sustrato de la enzima y se generará color en un tiempo determinado, con una intensidad inversamente proporcional a la cantidad de toxina presente en la muestra o el testigo. Se detiene la acción enzimática, se lee la densidad óptica de los pocillos con la muestra, los testigos y el blanco, y se calcula la concentración de la toxina (Candlish 1991).

Por otra parte, la cromatografía de afinidad usando una columna con anticuerpos monoclonales permite obtener un eluato con la toxina pura para hacer la determinación por fluorometría o espectrofotometría. Se combina la toxina dando un derivado fluorescente para la confirmación de identidad (WHO 2001).

## AFLATOXINAS

Estas toxinas contienen un núcleo cumarina fusionado a un bifurano y a una estructura pentanona en el caso de aflatoxinas B, que está sustituida por una lactona de seis miembros en aflatoxinas G. Estos metabolitos secundarios cuyas fórmulas se observan en la figura 4.3, son producidos por una ruta biosintética común con la esterigmatocistina, a partir de un precursor policetónico (Klich & Cleveland 2000).

*A. flavus*, *A. pseudotamarii* y algunas cepas de *A. caelatus* producen aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* forman además aflatoxinas  $G_1$  y  $G_2$  (Peterson *et al.* 2000, Ito *et al.* 2001). Las cepas africanas y argentinas de *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* producen también aflatoxina  $G_1$  (Cotty & Cardwell 1999, Novas & Cabral 2002). El porcentaje de cepas productoras de toxinas es mayor en *A. parasiticus* que

en *A. flavus* (Widstrom 1992). *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* crecen moderadamente a 42°C pero no desarrollan *A. pseudotamarii* ni *A. caelatus* (Ito et al. 2001).

Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (celestes y verdosa) observada bajo luz UV mientras que los subíndices 1 y 2 indican componente mayor y menor respectivamente. En estado puro son polvos cristalinos que se descomponen al alcanzar el punto de fusión (B<sub>1</sub> 268-269°C, B<sub>2</sub> 286-289°C, G<sub>1</sub> 244-246, G<sub>2</sub> 237-240, M<sub>1</sub> 299°C, M<sub>2</sub> 330°C) (Detroy et al. 1971). Estas toxinas se encuentran con más frecuencia sobre oleaginosas aunque también en cereales, especialmente los de zonas cálidas. Las aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> son el producto metabólico hidroxilado de las B y G. Alrededor del 1% de la aflatoxina B<sub>1</sub> consumida con el forraje es excretada en leche como M<sub>1</sub> (Moss 1991).

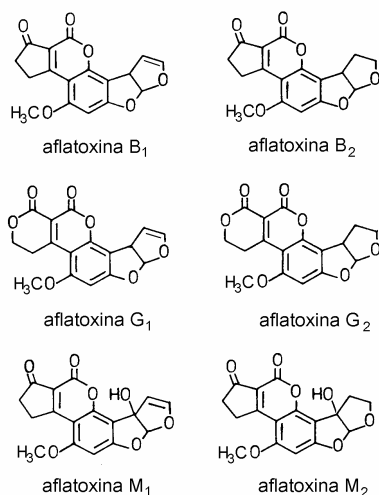


Figura 4.3

En condiciones óptimas *A. flavus* produce al cabo de 15 días, unos 300 ng de aflatoxinas por mL de medio YES (15% de sacarosa y 2% de extracto de levadura), a 30°C y actividad del agua de 0,990 (Gqaleni et al. 1997). No se ha encontrado aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub>, en ausencia de B<sub>1</sub> (Henry et al. 1998). El nitrato reprime la síntesis de algunos intermediarios de aflatoxinas en *A. parasiticus* (Feng & Leonard 1998) pero favorece la producción de esclerocios de *A. flavus*. A pH 4 o menor la formación de esclerocios se reduce un 50% mientras la producción de aflatoxinas es máxima (Calvo et al. 2002).

El rango de temperatura para la producción de aflatoxinas va de 7,5-12 a 40-41°C según los hongos y las condiciones experimentales. Una humedad relativa menor del 85 % detiene el crecimiento de los hongos productores de estas toxinas, lo que corresponde a un contenido de humedad del maíz de 16 % y una actividad del agua igual a 0,85. La elaboración de las toxinas se produce poco después de la infección de las mazorcas a la temperatura ambiente y en dos días puede alcanzar una concentración de 200 ng/g, llegando a 2.000 ng/g luego de nueve días a 26-34°C. Se observa una gran variación de la contaminación fúngica, transmitida por insectos, entre los granos de una misma mazorca y entre las mazorcas de un mismo cultivo. El estrés hídrico de la planta asociado con altas temperaturas es la principal causa de contaminación, también contribuyen una escasa disponibilidad de fuente nitrogenada en el suelo así como un exceso de la misma (Widstrom 1992).

La exposición a las aflatoxinas es difícil de evitar porque no es sencillo prevenir el crecimiento fúngico en los granos y otros productos. Los límites a la concentración de aflatoxinas para proteger la salud humana y animal establecidos por distintos países e instituciones son variables. Por ejemplo Canadá aceptó el límite de 50 ng de aflatoxina M<sub>1</sub>/L de leche, propuesto por la Comisión Codex sobre Contaminantes y Aditivos Alimentarios (FAO-WHO) pero no Brasil, pues sufriría un gran impacto económico si se aplicara. Un ng/kg de peso corporal/día de aflatoxina B<sub>1</sub> o aún menos contribuye al riesgo de contraer cáncer hepático (Codex 2001). La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos estableció como límites máximos la concentración de 20 µg/kg para granos y otros forrajes destinados a la crianza animal y vacas lecheras, 100 µg/kg para granos destinados a ganado y cerdos reproductores así como gallinas ponedoras, 200 µg/kg para granos empleados en el engorde de cerdos y 300 µg/kg para los destinados al engorde de la hacienda (GIPSA 1998).

El uso de un nivel máximo de contaminación reduce la ingesta promedio de toxinas por la población, aunque la aplicación de un límite de 20 µg de aflatoxinas/kg resulta en el rechazo de un 4%

de las muestras con un nivel de 0,9 µg/kg mientras que un límite de 10 µg/kg impide la aceptación del 6,2% de las muestras con valores entre 0,3 y 0,6 µg/kg. Si todos los lotes con una contaminación superior a 20 µg/kg se eliminaran de una dieta "europea" la ingesta diaria estimada promedio sería 19 ng/persona por día, mientras que con una dieta "oriental" sería 125 ng/persona por día (Henry *et al.* 1998).

Las aflatoxinas se consideran cancerígenos hepáticos humanos. La más potente es la toxina B<sub>1</sub> y mientras que la M<sub>1</sub> tiene una potencia diez veces menor (Henry *et al.* 1998). Las aflatoxinas tienen acción sinérgica con el virus de la hepatitis B, por lo que la reducción de la ingesta de estas toxinas disminuye la tasa de cáncer de hígado en individuos portadores del virus (Herrman & Walker 2000). Se detectaron aflatoxinas en el 38% de las muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos con ictericia en Nigeria y se han descrito muertes de niños con encefalopatía hepática aguda en Malasia cuyas muestras postmortem contenían estas toxinas (Henry *et al.* 1998). En un estudio se observó que la leche de 14 madres tailandesas sobre un total de 60, contenía un promedio de 23 ng de aflatoxina M<sub>1</sub>/L con un rango entre 4 y 6.372 ng/L (Changbumrung *et al.* 1999).

La exposición a las aflatoxinas también se produce por el polvo suspendido en el aire, generado durante la cosecha en el campo (67 ng/m<sup>3</sup>), la descarga de los granos (92 ng/m<sup>3</sup>), la limpieza de los silos (4849 ng/m<sup>3</sup>) y las operaciones de alimentación animal (421 ng/m<sup>3</sup>) (Selim *et al.* 2002). Los polvos contaminados están asociados a un aumento de la incidencia de tumores de las vías respiratorias superiores (Henry *et al.* 1998). Los valores de la DL<sub>50</sub> oral para perro, rata, mono, laucha y pollo son 1, 5-7, 2-8, 3-9 y 7-8 mg de aflatoxina B<sub>1</sub>/kg de peso corporal, respectivamente (Wyatt 1991, Wannemacher *et al.* 1991).

La descontaminación de granos enteros de maíz con una humedad del 16%, mediante amoníaco al 2% durante una hora a 55 atmósferas de presión y 40-45°C destruye hasta el 93% de las toxinas (Martínez *et al.* 1994). El tratamiento de un sustrato contaminado con hipoclorito de sodio al 0,5-1% a pH 4 degrada las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> a toda temperatura, mientras que la cantidad de B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> decrece al calentar, desapareciendo ambas a 100°C. El tratamiento con bisulfito de sodio al 1% tiene poco efecto sobre aflatoxina B<sub>1</sub> a 20°C pero solamente persiste el 10% a 100°C. Igual cantidad residual se observa luego del tratamiento a 20°C con persulfato de amonio al 0,1%, y a 60°C con agua oxigenada al 0,1%. La molienda húmeda reduce la concentración de toxinas en el almidón de maíz a 1% del valor que tenía en los granos (Tabata *et al.* 1994) y la seca a 10%. El tostado de los maníes disminuye el contenido de aflatoxinas en un 50-80%. Por otra parte, la aflatoxina M<sub>1</sub> se concentra 3 a 6 veces durante la elaboración de los quesos (Henry *et al.* 1998).

Durante el análisis, la elección del solvente para la extracción de aflatoxinas depende de la naturaleza de la muestra y de las características y concentraciones de las sustancias interferentes que son extraídas simultáneamente. En general se usan dos tipos de sistemas solventes: uno polar (metanol, acetona o acetonitrilo) y otro hidrófobo (cloroformo o diclorometano), con suficiente agua para mojar las muestras sólidas. El agregado de tierra de diatomeas al extracto primario permite obtener un filtrado claro. Para la purificación del mismo se puede hacer un pasaje por una columna de gel de sílice, una multifuncional con absorbentes de fase reversa e intercambio iónico, o una de inmunofinidad (Steyn *et al.* 1991). En la cromatografía en capa fina se trabaja con testigos externos e internos para salvar las modificaciones de los R<sub>f</sub> causadas por factores imponderables (Betina 1985).

La detección de las toxinas se pueden llevar a cabo por cromatografía en capa fina uni o bidireccional haciendo la valoración por fluorodensitometría, o luego de fotografiar con un filtro que elimine la luz UV analizar las imágenes en la computadora mediante un programa adecuado (Steyn *et al.* 1991). La técnica de cromatografía líquida de alta resolución da resultados más exactos midiendo la absorbancia a 366 nm o la fluorescencia (Truckses 2001).

Los métodos pierden sensibilidad si se trata de analizar simultáneamente varias toxinas y no es posible usar una sola técnica para todos los substratos sin pérdida de la especificidad. Además, la elección del procedimiento analítico puede influir en los resultados obtenidos. La distribución irregular de las micotoxinas en los productos naturales obliga a usar un plan de muestreo apropiado (Steyn *et al.* 1991). Un ejemplo de programa de muestreo para el análisis de aflatoxinas en maníes (Whitaker 1994) es el siguiente:

1. molienda de la 1° muestra de 22 kg
2. toma de una submuestra de 1,1 kg
3. análisis duplicados del extracto (1A y 1B)
4.  $\bar{x}$  = promedio de 1A y 1B
5. aceptado si  $\bar{x} < 8 \mu\text{g}/\text{kg}$ , rechazado si  $\bar{x} > 45 \mu\text{g}/\text{kg}$ , si  $\bar{x}$  intermedio sigue en 6
6. molienda de la 2° muestra de 22 kg
7. toma de una submuestra de 1,1 kg
8. análisis duplicados del extracto (2A y 2B)
9.  $\bar{y}$  = promedio de 1A, 1B, 2A y 2B
10. aceptado si  $\bar{y} < 12 \mu\text{g}/\text{kg}$ , rechazado si  $\bar{y} > 23 \mu\text{g}/\text{kg}$ , si  $\bar{y}$  intermedio sigue en 11
11. molienda de la 3° muestra de 22 kg
12. toma de una submuestra de 1,1 kg
13. análisis de los duplicados del extracto (3A y 3B)
14.  $\bar{z}$  = promedio de 1A, 1B, 2A, 2B, 3A y 3B
15. aceptado si  $\bar{z} \leq 15 \mu\text{g}/\text{kg}$ , rechazado si  $\bar{z} > 15 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

El siguiente método de exploración mediante minicolumnas permite detectar 10 o más  $\mu\text{g}$  de aflatoxinas totales /kg en maíz colorado y blanco, y maní crudo descascarado (AOAC 1995).

- *Preparación:* Tomar tubos de vidrio de 6 x 200 mm con un extremo de diámetro reducido, olocar un tapón de lana de vidrio y agregar en el siguiente orden: 5-7 mm de sulfato de calcio anhidro (malla 20-40), 5-7 mm de silicato de magnesio activado (florisil, malla 100-200), 18-20 mm de gel de sílice (malla 70-230), 8-10 mm de alúmina neutra (malla 80-200), 5-7 mm de sulfato de calcio anhidro (malla 20-40). Cubrir con otro tapón de lana de vidrio presionando con una varilla de vidrio.
- *Extracción:* Moler 50 g de muestra con 100 mL de metanol-agua (8+2) durante 1 minuto en licuadora. Filtrar por papel de poro grueso y recoger 15 mL de filtrado.
- *Purificación:* Agregar al extracto 15 mL de solución salina. Ésta contiene cloruro de sodio 6 g, acetato de zinc 6 g, ácido acético 0,15 mL, agua 40 mL. Agitar enérgicamente 10 segundos. Filtrar 15 mL a un tubo con tapa y agregar 3 mL de benceno, agitar suavemente 10 segundos y decantar.
- *Cromatografía:* Transferir 1 mL de la capa superior a la minicolumna dejando drenar por gravedad. Agregar 3 mL de cloroformo-acetona (9+1) y dejar drenar. Examinar con luz ultravioleta larga. La presencia de una banda fluorescente celeste en la capa de florisil indica aflatoxinas, otros colores se interpretan como negativo.

La siguiente técnica permite la extracción, purificación y cromatografía en capa fina de aflatoxinas que puede utilizarse para maíz y maní (AOAC 1995).

- *Extracción:* 25 g de muestra molida u homogeneizada con 100 mL de metanol-agua (85+18), agitar 30 minutos y filtrar.
- *Desengrasada:* Tratar 50 mL del filtrado en ampolla de decantación con 50 mL de cloruro de sodio al 10 % y 25 mL de hexano, agitar, dejar separar las fases y eliminar la capa superior.
- *Partición:* Agitar el filtrado desengrasado en ampolla de decantación con 25 mL de cloroformo, repetir con igual volumen. Combinar los extractos clorofórmicos, evaporar el solvente en baño de agua.



- *Purificación:* Preparar una columna con 0,5 g de gel de sílice 60 y 0,75 g de sulfato de sodio anhidro arriba, o bien usar una columna descartable de 6 mL rellena con 0,5 g de gel de sílice (gránulos 40  $\mu\text{m}$ ). Lavar con 3 mL hexano y luego 3 mL diclorometano, usando vacío. Disolver el residuo en 3 mL de diclorometano y agregarlo. Enjuagar con dos porciones de 1 mL de diclorometano y añadirlas a la columna. Lavar con 3 mL de hexano, 3 mL de éter etílico anhidro y 3 mL de diclorometano. Eluir las aflatoxinas con tres porciones de 2 mL de cloroformo-acetona (9+1). Reunir los eluatos y evaporar el solvente.
- *Cromatografía:* Disolver el extracto en 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Sembrar 5, 10 y 10  $\mu\text{L}$  de muestra en placa de gel de sílice G60, previamente activada una hora a 110°C, y 2, 5, 7 y 10  $\mu\text{L}$  del testigo de concentración conocida, además de 5  $\mu\text{L}$  del testigo sobre una de las siembras de 10  $\mu\text{L}$  de la muestra; correr con cloroformo-acetona (9+1 volúmenes). Dejar evaporar el solvente en una campana y terminar de secar en una estufa a 50°C. Observar bajo luz UV 366 nm para ver la fluorescencia de las manchas con la misma apariencia y Rf que el testigo. Los valores de Rf se encuentran alrededor de 0,40, 0,36, 0,32 y 0,29 para las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> respectivamente (Bullerman 1987).
- *Fluorodensitometría:* Explorar las manchas de la muestra y los testigos de aflatoxinas, con excitación a 366 nm y filtro de 420 nm. Calcular la concentración de cada toxina en base a las respuestas del densitómetro, los volúmenes sembrados, la dilución de la muestra y la concentración de los testigos.
- *Registro y valoración:* Fotografiar con un filtro que elimina toda luz por debajo de 380 nm. Guardar la imagen en la computadora y analizar el área e intensidad de las manchas con el programa adecuado. Expresar el resultado como  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de muestra, en base a los valores obtenidos, los volúmenes sembrados, la dilución de la muestra y la concentración de los testigos.
- *Reacción:* Rociar con ácido sulfúrico-agua (1+3). Las aflatoxinas cambian la fluorescencia azul o verde a amarillo.
- *Testigo:* Contiene 500 ng de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>/mL y 150 ng de B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>/mL. Las soluciones de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se valoran en espectrofotómetro siendo los respectivos coeficientes de absorción molar, 19.800, 20.900, 17.100 y 18.200, en benceno-acetonitrilo (98+2) a 350 nm. Los pesos moleculares, en igual orden, son 312, 314, 328 y 330. Se calcula el factor de corrección del espectrofotómetro haciendo una curva de calibración con soluciones de dicromato de potasio (AOAC 1995).

La técnica siguiente permite la búsqueda de aflatoxina M<sub>1</sub> en muestras de leche mediante cromatografía en capa fina (AOAC 1995).

- *Extracción:* Agitar 25 mL de leche líquida a temperatura ambiente, con 5 mL de solución saturada de cloruro de sodio (aprox. al 25%) y 60 mL de cloroformo, durante un minuto. Dejar decantar, si fuera necesario centrifugar para romper la emulsión, y separar la fase inferior. Agregar 5 g de sulfato de sodio anhidro, agitar varias veces y filtrar midiendo el volumen recogido.
- *Purificación:* Preparar una columna con 1 g de gel de sílice 60 (malla 70-230) mezclado con cloroformo y drenar. Cubrir con 1 g de sulfato de sodio anhidro mezclado con cloroformo y drenar el solvente sobrenadante. Agregar el filtrado en porciones, enjuagar con cloroformo y añadirlo, eliminar los eluatos. Lavar la columna con 10 mL de tolueno-ácido acético (9+1), 10 mL de hexano y 25 mL de hexano-éter etílico-acetonitrilo (5+3+2) y descartar los lavados. Eluir la aflatoxina M<sub>1</sub> con 20 mL de cloroformo-acetona (4+1), evaporar casi a sequedad, transferir cuantitativamente a un tubo de teflón con tapa usando cloroformo y evaporar el solvente.
- *Cromatografía:* Disolver el residuo en 100  $\mu\text{L}$  de benceno-acetonitrilo (9+1). Sembrar dos alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  cada una. Depositar 5  $\mu\text{L}$  del testigo sobre una de las manchas de muestra y

además sembrar 5 y 10  $\mu\text{L}$  de la solución testigo (aprox. 250 ng/mL). Desarrollar con cloroformo-acetona-isopropanol (87+10+3). La valoración fluorodensitométrica o el análisis de la fotografía se hace como en la técnica anterior. Esta toxina tiene una fluorescencia celeste.

- *Testigo*: La valoración del testigo se hace como en la técnica anterior, considerando que el coeficiente de extinción molar de aflatoxina  $M_1$  en benceno-acetonitrilo (9+1) es 18.815 y su peso molecular 328.

#### OCRATOXINA A

Es un derivado dihidroisocumarínico ligado a fenilalanina (fig. 4.4). La toxina pura es un polvo cristalino blanco con punto de fusión a 169°C. Emite fluorescencia verde que cambia al celeste en presencia de un álcali. La forma ácida es soluble en solventes orgánicos polares y la sal sódica en agua (Steyn 1971). Es inestable a la luz, sin embargo la solución etanólica es estable por más de un año si se mantiene en la oscuridad y al frío. Es bastante estable al calor y persiste el 35% de la cantidad inicial luego de tratar cereales contaminados durante

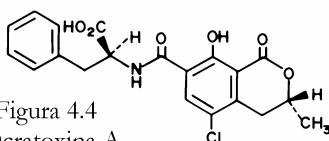


Figura 4.4  
Ocratoxina A

3 horas en autoclave. Los oxidantes fuertes, ácidos fuertes y bases fuertes la destruyen (West & Bullerman 1991).

En áreas cálidas las ocratoxinas son formadas por especies de *Aspergillus*, pero en climas más fríos por cepas de *Penicillium*. Las especies productoras se encuentran en las secciones *Circumdati* (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomis*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulfureus*), *Flavi* (*A. alliaceus*, *A. albertensis*), *Nigri* (*A. niger*, *A. carbonarius*) y *Aspergillus* (*Eurotium herbariorum*) (Bayman *et al.* 2002). El valor mínimo de actividad del agua, para la producción de toxinas, está entre 0,83 y 0,87 para aspergilos, con un óptimo de 0,99 a 24°C, mientras que el rango de temperatura a la actividad del agua óptima está entre 12 y 37°C (WHO 1990).

La ocratoxina A es una sustancia que provoca adenoma y cancer renal en los animales de experimentación. El Comité de Expertos sobre Aditivos y Contaminantes de Alimentos de FAO/OMS estableció una ingesta semanal tolerable máxima de 0,1 mg por kg de peso corporal (Herrman & Walker 2000). Los límites en Europa son 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en cereales y 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en derivados (Trucksess 2001). La cantidad de ocratoxina A presente en los granos de café es reducida drásticamente durante la manufactura del café soluble. Una pequeña porción de toxina es eliminada durante la limpieza de los granos, pero la más significativa ocurre durante el tostado quedando sólo el 16%. Teniendo en cuenta que se extrae aproximadamente un 80% en la infusión, un pocillo con 150 mL de café podría contener unos 8 ng (Blanc *et al.* 1998).

Entre el 50 y 80% de la toxina ingerida por animales y humanos se encuentra en cereales y derivados donde alcanza niveles de 30 a 27.500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Ribelin *et al.* 1978). Se han detectado residuos de hasta 58-1.878  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en carnes de animales sacrificados inmediatamente después de consumir forraje contaminado (WHO 1990). El tiempo medio de eliminación en mono es de 510 horas y de 120 horas en cerdo y ratas, pero aún a las dos semanas de la ingesta se la detecta en plasma de rata (Fuchs & Hult 1992). La dosis letal oral ( $DL_{50}$ ) de ocratoxina A en pollo es 2-3,4 mg, en pavo 5,9 mg, en perro 0,2-3 mg, en cerdo 1-2 mg, en rata 21-30 mg y en laucha 46-58 mg /kg de peso corporal (Krogh 1991, Benford *et al.* 2001).

La ocratoxina A se hidroliza en el rumen dando ocratoxina  $\alpha$  que es excretada en leche y orina (Ribelin *et al.* 1978). La ocratoxina B es el metabolito menos tóxico de los aspergilos y carece del cloro en la posición 5 de la porción isocumarínica. En los substratos naturales también se suelen encontrar

ésteres de las ocratoxinas y los de la A resultan tan tóxicos como la toxina ácida. La producción de toxinas para preparación de testigos se suele hacer cultivando en el medio YES (Steyn 1971).

Los substratos después de acidificar se extraen con cloroformo y se atrapan en una columna de tierra de diatomeas impregnada de una solución acuosa básica, una vez eluidas se cromatografían en capa fina donde son detectadas por su fluorescencia. También se suelen purificar por partición entre el solvente y una solución básica. El límite de detección de esta técnica es 12 µg/kg mientras la cromatografía líquida de alta resolución tiene un límite de detección diez veces menor. La prueba ELISA detecta 10 pg de ocratoxina A/pocillo, con solamente 0,5% de reacción cruzada con la ocratoxina B (WHO 1990).

Los problemas analíticos principales en cromatografía en columna son la coelución con compuestos interferentes y los cambios en el tiempo de retención. La purificación por inmunoafinidad, seguida por cromatografía líquida de alta resolución en columna de fase reversa con detección de fluorescencia, permite recuperar entre el 90-100% de la toxina presente en concentraciones entre 0,04 a 10 µg/kg (Saelzer et al. 2002). Un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS) permite detectar niveles de 0,02 µg de ocratoxina A/kg, con la transformación de la toxina en el éster metílico (Trucksess 2001).

Un método de análisis de las ocratoxinas ácidas (AOAC 1995) comprende los siguientes pasos:

- *Extracción:* Tratar 25 g de granos finamente molidos con 12,5 mL de ácido fosfórico 0,1 M y 125 mL de cloroformo, agitar 30 minutos y filtrar por papel cubierto con 5 g de tierra de diatomeas en un Büchner. Todo el material de laboratorio debe estar libre de residuos de detergentes o jabones alcalinos, para evitar pérdidas por formación de sales, precipitación o adsorción sobre el vidrio
- *Purificación:* Mezclar 25 mL del extracto con 20 mL de hexano y pasar por una columna preparada con 1 g de tierra de diatomeas (previamente lavada con agua y secada a 150°C) + 0,5 mL de bicarbonato de sodio al 1,25 %. Agregar 35 mL de cloroformo y guardar ambos eluatos para recuperar los ésteres. Eluir las ocratoxinas A y B con 35 mL de cloroformo-ácido fórmico (99+1). Evaporar el solvente. Transferir cuantitativamente el residuo a un tubo con tapa a rosca usando cloroformo y evaporar.
- *Cromatografía:* Disolver el extracto con 300 µL de benceno-ácido acético (99+1) y sembrar 3, 5, 7 y 10 µL sobre la placa de gel de sílice G60. También depositar 10 µL sobre la mancha de 10 µL testigo de ocratoxinas A y B (1-5 µg/mL) y sembrar 3, 5, 7 y 10 µL del testigo. Correr con benceno-metanol-ácido acético (18+1+1). Evaporar el solvente a temperatura ambiente bajo extractor y observar con luz UV. Las ocratoxinas A y B se encuentran en ese orden aproximadamente a Rf 0,65 y 0,5 (Betina 1985).
- *Reacción:* Rociar con bicarbonato de sodio al 5 % p/v en etanol-agua (2+10), secar a temperatura ambiente y colocar bajo UV larga. La fluorescencia aumenta y cambia al azul.
- *Cuantificación:* Fotografiar con un filtro que elimina toda luz por debajo de 380 nm y guardar la imagen en la computadora. Analizar el área e intensidad de las manchas con el programa adecuado para obtener la concentración de toxinas en el extracto. Expresar el resultado como µg de ocratoxina /kg de muestra.
- *Fluorodensitometría:* En el caso de ocratoxina A los valores espectrales óptimos son 310 - 340 nm para la excitación y 440 - 475 nm para la emisión.
- *Testigo:* Contiene 1-5 µg de cada toxina/mL. Las soluciones de ocratoxina A y su éster etílico se valoran en espectrofotómetro cuyos coeficientes de absorción molar a 333 nm, en benceno-acético (99+1), son 5.550 y 6.200, y los pesos moleculares 403 y 431. Los coeficientes de ocratoxina B y su éster etílico, a 320 nm, son 6.000 y 6.500, y sus pesos moleculares 369 y 397 respectivamente (AOAC 1995).

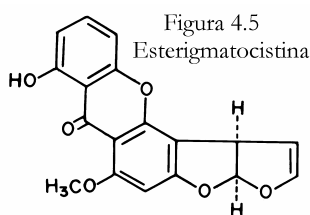
Para obtener los ésteres de las ocratoxinas A y B se procede de la siguiente manera (AOAC 1995):

- *Purificación:* Evaporar a sequedad los eluatos separados durante la purificación de las toxinas ácidas y disolver el residuo en porciones de hexano (total 25 mL) que se pasan por una columna de 2 g de tierra de diatomeas + 1,25 mL de bicarbonato de sodio al 0,3% p/v en metanol-agua (7+3). Forzar la elución mediante vacío sin dejar que se seque la columna. Agregar 25 mL de hexano-benceno (9+1) previamente equilibrado con 1,25 mL de la solución metanólica de bicarbonato de sodio y descartar los eluatos. Eluir con 50 mL la capa superior de la mezcla solvente obtenida de la siguiente manera: agitar 50 mL de benceno-hexano (2+8) con 5 mL de metanol-agua (7+3), descartar la capa inferior, agregar 2,5 mL de ácido fórmico, agitar y descartar la fase inferior. Evaporar el eluato a sequedad. Transferir cuantitativamente el residuo a un tubo con tapa usando cloroformo y evaporar el solvente.
- *Cromatografía:* Se realiza de igual manera que con las toxinas ácidas. El éster etílico de la ocratoxina A y el de la B se encuentran en ese orden aproximadamente a Rf 0,8 y 0,7 (Betina 1985).

#### ESTERIGMATOCISTINA

La esterigmatocistina (fig. 4.5) es un intermediario en la síntesis de aflatoxina B<sub>1</sub> y consta de un núcleo xantona unido a una estructura bifurano, como se aprecia en la figura 4.5 (Klich & Cleveland 2000). Se descompone al llegar al punto de fusión (265°C). La esterigmatocistina tiene un peso molecular de 324 y su coeficiente de absorción molar en benceno a 325 nm es 15.200 (AOAC 1995).

La producción de esterigmatocistina se observa en un rango de hongos que incluye *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Chaetomium*, *Farrowia* y *Monocillium*. Entre los aspergilos productores se encuentran *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. caespitosus*, *A. multicolor*, *Emericella nidulans*, *Em. quadrilineata*, *Em. rugulosa*, *Em. varicolor*, *Em. unguis* y otras especies, *Eurotium amstelodami*, *Eu. chevalieri*, *Eu. repens* y *Eu. rubrum* (Klich & Cleveland 2000). El nitrato favorece la producción de esterigmatocistina pero no el amonio. Se forma 10 a 15 mg/L de medio, a 30, 33 o 37°C aunque varía el tiempo, alcanzando el pico al 4º, 5º y 6º día respectivamente. A 27°C demora aún más, produciéndose sólo 1,5 mg/L (Feng & Leonard 1998).



Esta toxina es un mutágeno *in vivo* y un carcinógeno humano potencial, por lo que el Departamento de Salud del Reino Unido estableció que no debe detectarse en los alimentos considerando que el límite de detección de las técnicas analíticas es 3 µg/kg (Dept. Health 1998). La dosis letal oral (DL<sub>50</sub>) para pollo, rata y laucha es 10-14, 120-166 y 800 mg/kg de peso corporal, respectivamente (Wyatt 1991, Wannemacher *et al.* 1991).

Para extraer esta toxina se usa comúnmente acetonitrilo-agua y las grasas se eliminan por partición con hexano, o bien en una columna de florisil (silicato de magnesio). Esta toxina muestra un color rojo ladrillo bajo luz UV de 366 nm, pero luego del tratamiento con cloruro de aluminio tiene fluorescencia amarilla (Steyn *et al.* 1991).

Una técnica para su determinación se describe a continuación (AOAC 1995).

- *Extracción:* Tomar 25 g de muestra finamente molida y agregar 90 mL de acetonitrilo y 10 mL de solución de cloruro de potasio al 4% en agua. Agitar durante 30 minutos y filtrar.
- *Desengrasado:* Transferir 50 mL de filtrado a una ampolla de decantación y agregar 25 mL de hexano. Agitar y dejar separar las fases. Descartar la superior y repetir el tratamiento con otros 25 mL de hexano.

- *Partición*: Agregar 10 mL de agua y 25 mL de cloroformo. Agitar, decantar y recoger la capa inferior. Repetir la operación con 10 mL de cloroformo. Reunir los extractos clorofórmicos y evaporar el solvente en baño de agua.
- *Purificación*: Preparar una columna con 2,5 g de sulfato de sodio anhidro, 5 g de gel de sílice (gránulos 0,063-0,2 mm) y 7,5 g de sulfato de sodio anhidro arriba. Lavar con unos 10 mL de ciclohexano y drenar sin bajar el solvente del nivel de la capa superior. Transferir cuantitativamente el residuo disuelto en la menor cantidad necesaria de benceno. Eluir con 100 mL de ciclohexano-acetato de etilo (4+1). Evaporar el solvente del eluato.
- *Cromatografía*: Transferir el residuo cuantitativamente con cloroformo a un tubo con tapa y evaporar a sequedad. Disolver en 0,5 mL de benceno y sembrar en placa de gel de sílice 60, una vez 1  $\mu$ L y 10  $\mu$ L, dos veces 5  $\mu$ L. Sobre la misma placa depositar 1, 2, 5 y 10  $\mu$ L del testigo conteniendo aproximadamente 5  $\mu$ g/mL de benceno, además depositar 5  $\mu$ L sobre la mancha con igual volumen de la muestra. Desarrollar con benceno-metanol-ácido acético (90+5+5). Observar la fluorescencia rojo ladrillo de la esterigmatocistina con luz UV larga a un Rf aproximado de 0,75 (Scott *et al.* 1970).
- *Revelado*: Secar la placa en la campana de extracción y rociar con solución alcohólica de cloruro de aluminio al 20%. Colocar a 80°C durante 10 minutos y observar con luz UV corta la fluorescencia amarillo claro.
- *Cuantificación*: Se hace por fluorodensitometría ya que en medio alcalino absorbe a 380 nm y emite a 520 nm (Maness *et al.* 1976) o por análisis mediante computadora, de la fotografía tomada con un filtro para eliminar toda luz UV.

#### ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO

Es un compuesto cristalino, ópticamente activo, higroscópico, peso molecular 336,39 y punto de fusión a 246°C cuya fórmula se observa en la figura 4.6. Da color rojo anaranjado con cloruro férrico y púrpura azulado con el reactivo de Erlich (Holzapfel 1971). La dosis letal oral (DL<sub>50</sub>) para pollos y ratas es 12 y 36-63 mg/kg de peso corporal, respectivamente (Wyatt 1991). Esta neurotoxina que también afecta a hígado y riñón, tiene una acción sinérgica con aflatoxinas u ocratoxina A (Trucksess 2001).

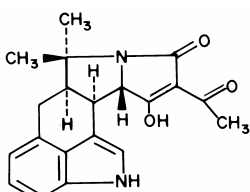


Figura 4.6  
Ácido  $\alpha$  ciclopiazónico

La mayoría de las cepas de *A. flavus* y algunas de *A. caelatus* producen ácido ciclopiazónico junto con aflatoxina B<sub>1</sub> (Peterson *et al.* 2000) y ambas toxinas potencian su acción sinérgicamente (Pier 1991), mientras que la mayoría de las cepas de *A. tamarii* forman ácido ciclopiazónico. En las condiciones óptimas (temperatura 25°C, actividad del agua de 0,996) después de 15 días se producen 4 a 6  $\mu$ g de ácido ciclopiazónico/g de medio YES (pág. 54) y Czapek-Levadura (Gqaleni *et al.* 1997). Suele encontrarse hasta 340  $\mu$ g de toxina/kg de forrajes y 250  $\mu$ g/kg en la superficie contaminada de quesos (Trucksess 2001).

La investigación de ácido ciclopiazónico se suele hacer por cromatografía en capa fina, la placa de gel de sílice 60 a veces es pretratada por inmersión en una solución metanólica de ácido oxálico al 10%. Se emplean varias mezclas solventes para el desarrollo del cromatograma, por ejemplo tolueno-acetato de etilo- diclorometano-ácido fórmico (7+5+5+2) (Gqaleni *et al.* 1997) o cloroformo-isobutilmetilcetona (4+1) y se revela mediante un reactivo para indoles (El-Banna *et al.* 1987). En el análisis por cromatografía líquida de alta resolución se detecta por absorción de luz UV a 284 nm (Ito *et al.* 2001).

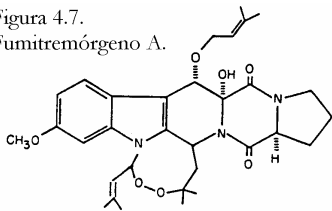
La siguiente técnica permite determinar la presencia de ácido ciclopiazónico en granos (Camag 1998).

- *Desengrasado*: Moler finamente 50 g de muestra y tratar con 300 mL de éter de petróleo durante 4 horas, con agitación suave. Filtrar.

- **Extracción:** Tratar el residuo con 250 mL de cloroformo-metanol (4+1) y 0,5 mL de ácido fosfórico, agitar durante 30 minutos y filtrar.
- **Partición:** Mezclar 50 mL de filtrado con 50 mL de solución acuosa de bicarbonato de sodio 0,5 N, agitar 30 segundos y centrifugar 15 minutos a 1500 rpm para romper la emulsión. Decantar el sobrenadante, neutralizar con ácido clorhídrico y agregar 25 mL de cloroformo. Agitar 15 minutos, luego centrifugar 10 minutos a 800 rpm. Separar la fase inferior y tratar el remanente con otros 25 mL de cloroformo de igual manera. Reunir ambos extractos y evaporar el solvente a 40°C.
- **Cromatografía:** Transferir cuantitativamente el residuo a un tubo con tapa usando diclorometano. Evaporar el solvente y disolver el residuo en 500 µL de cloroformo. En la placa de gel de sílice 60, sembrar 1, 5, 10, 15 y 20 µL de un testigo con aproximadamente 25 ng de ácido ciclopiazónico/ mL, además de 10 y 20 µL de muestra. Desarrollar con acetato de etilo- isopropanol-hidróxido de amonio (10+3+2) y luego secar 15 minutos a 50°C hasta eliminar el olor a amoníaco.
- **Revelado:** Rocíar con reactivo de Erlich (0,5 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 75 mL etanol y 25 mL de ácido clorhídrico concentrado. Secar el aire caliente y observar a los 10 minutos. El ácido ciclopiazónico se tiñe de azul.
- **Valoración:** Se explora con el densitómetro, determinando la absorbancia a 546 nm (lámpara de mercurio). El límite de cuantificación es 25 ng por mancha.

NEUROTOXINAS

Figura 4.7. Fumitremógeno A.



Los fumitremógenos (fig. 4.7) provocan temblores en el ganado que consume forraje contaminado con *A. fumigatus* y *A. caespitosus* (Lacey 1991), además es formado por *N. fischeri* y algunos penicilios. Estos mismos hongos producen una toxina relacionada, verruculógeno (fig. 4.8), que genera iguales síntomas en los animales de laboratorio. *A. terreus* y *A. flavus* forman, respectivamente, territrem (fig. 4.9) y aflatrem (fig. 4.10) ambas causantes de temblores (Smith & Ross

1991, Shiomi *et al.* 1999). La dosis letal oral (DL<sub>50</sub>) de verruculógeno y fumitremógeno en ratón es 2,4 y >5 mg/kg de peso corporal respectivamente (Davis & Diener 1987), la DL<sub>50</sub> oral de aflatrem es 5 mg/kg de peso corporal en ratón (Wilson 1971).

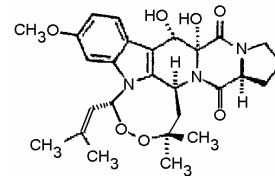


Figura 4.8. Verruculógeno.

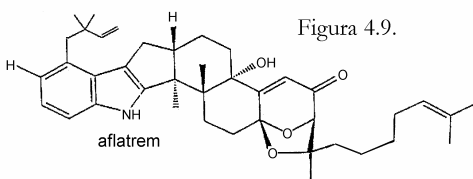


Figura 4.9.

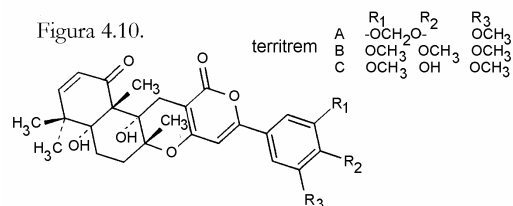


Figura 4.10.

territrem

OTRAS TOXINAS

La citocalasina E (fig. 4.11) es formada por *A. clavatus*, *A. terreus* y otros géneros. La dosis letal oral (DL<sub>50</sub>) para ratas es 9,1 mg/kg peso corporal (Terao & Ohtsubo 1991). La patulina (fig. 5.3) es formada por *A. clavatus* y algunos penicilios, en el capítulo 5 se describe el método de análisis y la toxicidad. La citrinina (fig. 5.4) producida por *A. carneus* y *A. terreus* además de penicilios, es nefrotóxica. El ácido penicílico (fig. 5.5) es una sustancia mutagénica sintetizada por *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum* y *A. sulphureus*, pero también es un metabolito de penicilios.

Griseofulvina es un compuesto tóxico empleado como antibiótico (fig. 5.10) sintetizado por *A. versicolor* y unos pocos penicilios. El ácido secalónico D (fig. 4.12) un compuesto teratogénico formado

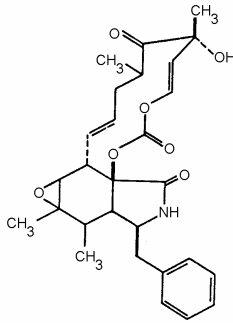


Figura 4.11. Citocalasina E.

por *A. aculeatus* y otros géneros de mohos. La gliotoxina (fig. 4.13) es un metabolito de *A. fumigatus* y los géneros *Gliocladium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Los pigmentos tóxicos viomeleína y xantomegnina (fig. 5.11) son producidos por *A. sulphureus*, *A. auricomus*, *A. melleus*, *A. ochraceus* y otros. La citroviridina (fig. 5.6), un compuesto que suele causar intoxicación aguda, es producida por *A. terreus* y algunos penicilios (Smith & Ross 1991). *A. flavus*, *A. oryzae* y *A. wentii* producen ácido  $\beta$ -nitropropiónico y *A. niger* ácido oxálico (Wilson 1971).

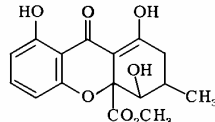


Figura 4.12. Ácido secalónico.

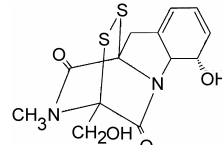


Figura 4.13. Gliotoxina.

## REFERENCIAS

- AOAC International. 1995. Official Methods of Analysis. cap. 49. Washington.
- Banks J *et al.* 1992. Towards the immunological detection of field and storage fungi. pp. 247-252 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Bayman P *et al.* 2002. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. Applied and Environmental Microbiology 68: 2326-2329.
- Benford D *et al.* 2001. Ochratoxin A. JECFA 47, WHO, Ginebra
- Betina V. Thin layer chromatography of mycotoxins. Journal of Chromatography **334**: 211 - 276, 1985
- Bilgrami KS, Sinha KK. 1992. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. pp. 59-86 en: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar D *et al.*, editores. Marcel Dekker, New York.
- Blanc M *et al.* 1998. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. J. Agric. Food Chem. 46: 673-675.
- Bullerman LB. 1987. Methods for detecting mycotoxins in foods and beverages. pp. 571-598 en: Food and Beverage Mycology. Beuchat L, editor. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Calvo AM *et al.* 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66: 447-459.
- Camag. 1998. Determination of cyclopiazonic acid in foodstuffs. A.30.3 Application notes. Instrumental Thin Layer Chromatography. ([http://www.camag.ch/pdf\\_dat/a-30\\_3e.pdf](http://www.camag.ch/pdf_dat/a-30_3e.pdf))
- Candlish AAG. 1991. The determination of mycotoxins in animal feeds by biological methods. pp. 223 - 246 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Changbumrung S *et al.* 1999. Aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> in breast milk. J. Nutr. Assoc. Thailand 33: 42.
- Codex Alimentarius Commission. 2001. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Session 33, La Haya, Países Bajos.
- Coty PJ, Cardwell KF. 1999. Divergence of west african and north american communities of *Aspergillus* section *flavi*. Applied and Environmental Microbiology 65: 2264-2266
- Davis ND, Diener UL. 1987. Mycotoxins. pp. 517-571 en: Food and Beverage Mycology. Beuchat LR, editor. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.
- Dept. Health. 1998. Statement on surveillance for the mycotoxin sterigmatocystin. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Reino Unido.
- Detroy RW *et al.* 1971. Aflatoxin and related compounds. pp. 4-178 en: Microbial Toxins vol. 6. Ciegler A *et al.*, editores. Academic Press, New York.
- Devi QR, Polasa H. 1987. Interference in toxin production among toxigenic *Aspergillus* species. Journal of Stored Products Research 23: 149-150.
- El-Banna AA *et al.* 1987. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. System. Appl. Microbiol. 10: 42-46.
- Eguiazú GM. 1984. Comportamiento de almacenaje del girasol III. Grasas y Aceites 35: 325-329.

- Feng GH, Leonard TJ. 1998. Culture conditions control expression of the Genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. Applied and Environmental Microbiology 64: 2275-2277.
- Fuchs R, Hult K. 1992. Ochratoxin A in blood and its pharmacokinetic properties. Fd. Chem. Toxic. 30: 201-204.
- Geiser DM *et al.* 2000. Molecular and analytical tools for characterizing *Aspergillus* and *Penicillium* species at the intra and interspecific levels. pp. 381-394 en: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
- GIPSA. 1998. Aflatoxin. (<http://www.usda.gov/gipsa/newsroom/backgrounders/b-aflatox.htm>)
- Gqaleni N *et al.* 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. Applied and Environmental Microbiology 63: 1048-1053.
- Henry S *et al.* 1998. Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Aflatoxinas. Series 40. World Health Organization, Ginebra 1998 (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je16.htm>)
- Herrman JL, Walker R. 2000. Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (<http://www.fao.org/docrep/x2100t/x2100t04.htm>)
- Holzapfel CW. 1971. Cyclopiazonic acid and related toxins. pp. 435-457 en: Microbial Toxins vol. 6. Ciegler A *et al.*, editores. Academic Press, New York.
- Huwig A *et al.* 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters 122: 179-188.
- Ito Y *et al.* 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycological Research 105: 233-239.
- Klich MA, Cleveland TE. 2000. *Aspergillus* systematics and the molecular genetics of mycotoxin biosynthesis. pp. 425-434 en: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
- Klich MA, Pitt JI. 1992. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.
- Krogh P. 1991. Porcine nephropathy associated with ochratoxin A. pp. 627 - 645 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. Journal of Applied Bacteriology, Symposium supplement. 11S - 25S.
- Lacey J. 1991. Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops. pp. 363-397 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Lillehoj EB. 1992. Aflatoxin: genetic mobilization agent. pp. 1-22 en: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar D *et al.*, editores. Marcel Dekker, New York.
- Maness DD *et al.* 1976. Fluorescence behavior of sterigmatocystin. J. Agric. Food Chem. 24: 261- 263.
- Martinez AJ *et al.* 1994. Distribution of ammonia/aflatoxin reaction products in corn following exposure to ammonia decontamination procedure. Food Additives and Contaminants 11: 659 - 667.
- Moss MO. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. pp. 37-56 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Novas MV, Cabral D. 2002. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus*. Plant Disease 86: 215-219.
- Okuda T *et al.* 2000. Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. pp.83-99 en: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
- Peterson SW *et al.* 2000. Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamarii* and *A. caelatus*. pp. 447-458 en: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
- Pier AC. 1991. The influence of mycotoxins on the immune system. pp. 489-497 en: Mycotoxins and



- Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. Fungi and Food Spoilage. 2º ed. Blackie Academic & Professional, Londres.
  - Reddy GL, Reddy SM. 1992. Production of roridin by *Myrothecium roridium* in mixed culture. Indian Journal of Microbiology 31: 281-284.
  - Ribelin WE *et al.* 1978. The toxicity of ochratoxin to ruminants. Can. J. comp. Med. 42: 172-176.
  - Saelzer R *et al.* 2002. Implementación de una metodología analítica para determinar ocratoxina A en vinos chilenos por HPLC. COLACRO (www.noticias-técnicas.com)
  - Scott PM *et al.* 1970. Detection of mycotoxins by thin layer chromatography: application to screening of fungal extracts. Applied Microbiology 20: 839-842.
  - Scott J, Straus N. 2000. A review of current methods in DNA fingerprinting. pp. 209-224 en: Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
  - Scudamore KA. 1996. Ochratoxin A in animal feed – effects of processing. Food Additives and Contaminants 13 suppl.: 39-42.
  - Selim MI *et al.* 2002. Levels and distribution of aflatoxin B<sub>1</sub> in grain dust. NASD. <http://www.cdc.gov/nasd/docs/d001301-d001400/d001376.html>
  - Shiomu K *et al.* 1999. Meroterpenoids with various biological activities produced by fungi. Pure Appl. Chem. 71: 1059-1064.
  - Smith JE, Ross K. 1991. The toxigenic Aspergilli. pp. 101-108 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
  - Steyn PS. 1971. Ochratoxin and other dihydroisocoumarins. pp. 179-205 en: Microbial Toxins vol. 6. Ciegler A *et al.*, editores. Academic Press, New York.
  - Steyn PS *et al.* 1991. Detection and quantification of mycotoxins by chemical analysis. pp. 165 – 221 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
  - Tabata S *et al.* 1994. Degradation of aflatoxins by food additives. Journal of Food Protection 57: 42-47.
  - Terao K, Ohtsubo K. 1991. Biological activities of mycotoxins: field and experimental mycotoxicoses. pp. 455-497 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
  - Trucksess MW. 2001. Mycotoxins. Journal of AOAC International 84: 202-211.
  - Voetz M, Rath F. 2002. Identification and quantification of ochratoxin synthesizing fungi on cereals using real time PCR. p. 22. Abstracts. American Society of Brewing Chemists, Annual Meeting, Tucson, AZ.
  - Wannemacher RW *et al.* 1991. Toxicity of trichothecenes and other mycotoxins in laboratory animals. pp 499-552 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
  - West DI, Bullerman LB. 1991. Physical and chemical separation of mycotoxins from agricultural products. pp. 777-783 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
  - Wheeler KA *et al.* 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology 12: 141-150.
  - Widstrom NW. 1992. Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. pp. 23-58 en: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, editores. Marcel Dekker, New York.
  - Whitaker TB. 1994. Detecting aflatoxin contaminated commodities: sampling, sample preparation and analysis. VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Buenos Aires. pp. 1 – 60
  - WHO 1990. Selected Mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. Environmental Health Criteria 105. World Health Organization, Ginebra.
  - WHO. 2001. Aflatoxin M<sub>1</sub>. Food Additives Series 47. World Health Organization, Ginebra
  - Wilson BJ. 1971. Miscellaneous *Aspergillus* toxins. pp. 208-295 en: Microbial Toxins. Volumen 6: Fungal Toxins. Ciegler A *et al.*, eds. Academic Press, Nueva York.
  - Wyatt RD. 1991. Poultry. pp. 553-605 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.