INVESTIGACION DE AFLATOXINAS EN SEMILLA DE UVA

JUANITA SCHMIDT DE GIL.

SUMMARY

Different methods have been applied to the investigation of aflatoxins in seeds of grapes stored before drying. The presence of aflotoxin hasn't been detected in spite of the fact that samples have been chosen among the portions infected with molds.

ANTECEDENTES

El problema de las aflatoxinas, comenzó en 1960, cuando en las granjas británicas se produjo gran mortandad de pavipollos y patitos (1). La enfermedad responsable de la muerte de estos animales fce denominada "Turkey X", por desconocersse su causa.

Los síntomas manifestados por los pavipollos y patitos, (2) así como por gatos, (3) cerdos y otros animales, (4) fueron lesiones hepáticas. La autopsia revelaba hemorragias y necrosis blancas del hígado y congestión renal. Los síntomas en gatos se diferenciaban muy poco del envenenamiento causado por *Senecio jacobea* (3).

Se observó que todos los alimentos suministrados a los animales afectados contenian harina de maní procedente de Brasil

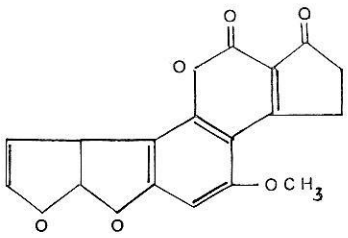
Algunos investigadores, (5, 6) elaboraron métodos biológicos de determinación de la sustancia tóxica contenida en estos alimentos concentrando previamente los extractos unas docientas cincuenta veces.

Se sospechó que la sustancia tóxica, era un metabolismo de un hongo. Se hicieron cultivos identificándose al *Aspergillus flavus* LINK *ex* FRIES. Al total del material tóxico derivado de dicho hongo se le dió el nombre de aflatoxina, sin conocerse aún su naturaleza química. Las diferentes fracciones del material tóxico han sido nombradas en forma diferente por varios investigadores. El sistema más usado es el que llama aflatoxinas B a las que producen fluorecencia azul al U.V. y aflatoxinas G a las que producen fluorecencia verde.

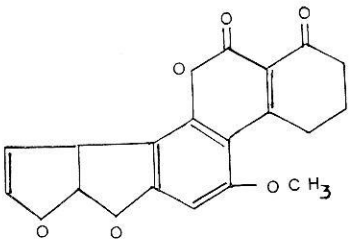
Naturaleza de las aflatoxinas

En extractos de cultivos de hongos se han encontrado de 6 a 15 sustancias fluorecentes en diferentes hongos. Se han propuesto

para la aflatoxinas estructuras derivadas del difurano cumarina. (7) Basándose en métodos químicos y en observación de los espectros al ultravioleta, BUCHI y col. (8) establecieron las siguientes fórmulas

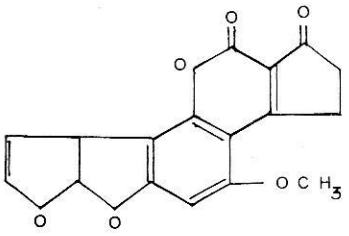


AFLATOXINA B

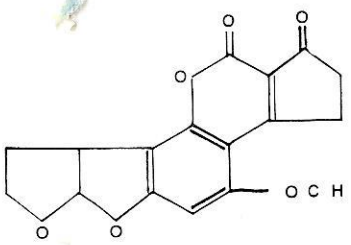


AFLATOXINA G

Además de otras fórmulas, (9) algunos autores propusieron y demostraron las siguientes estructuras:



AFLATOXINA B_1



AFLATOXINA B_2

Ambas sustancias aparecen en T.L.C. como dos manchas con fluorecencia azul con Rf muy cercanos. Actualmente se han separado también aflatoxinas G_1, G_2, M_1 y M_2.

Efectos biológicos

Los efectos biológicos debidos a las aflatoxinas son parte de un conjunto más amplio de síntomas llamado "micotoxicosis" y definida por FORGACS como envenenamiento por toxinas de origen fungoso. (11) JOFRE (12) describió hongos que crecen en granos almacenados en invierno, responsables de aleukia alimentaria. Se aislaron de los palos de gallinero y de las patas de pollos que sufrian sindrome hemorrágico (13) varias razas de *Aspergillus* y *Penicillium.*

En cuanto a los efectos biológicos de las aflatoxinas en particular han sido descriptos por varios investigadores, y son:

a) Actividad carcinogenética en animales (14, 15), lo que hace pensar en un posible efecto en la producción de cáncer humano (16).
b) Hepatomas en gatos (3), cerdos (4), ovejas, perros (1) y en chas de arco iris (15). Inyecciones de aflatoxinas en ambriones de pollo, producen la muerte del embrión (17, 18).
c) Inhibición de la incorporación de leucina C (14), en las proteinas de varias preparaciones de tejido hepático (19).
d) Producción de vacuolación y destrucción de células de rinón en monos (19) y ternera (20).
e) Tienen efecto sobre la división mitótica en células enmbrionarias de hígado humano.
f) Marcada inhibición de la síntesis de DNA con timidina.

Métodos de determinación

Desde el aislamiento del producto tóxico responsable del "Turkey desease" por ALLCROFT y col. (5) y su posterior hallazgo en maní y derivados (22) se han elaborado en Inglaterra y Estados Unidos numerosas marchas de aislamiento de aflatoxinas. Algunos métodos son aplicables al aislamiento a partir de *Aspergillus flavus* (24, 25), otros adaptados para determinación en maní y derivados (23, 26, 27, 28, 31 y 33) o modificados para analizar semillas de algodón (29, 30), harina de semilla de girasol (32) o aceite de maní (34).

En cuanto al fundamento de casi todos los métodos es desengrasado de la muestra, extracción de las aflatoxinas con solventes adecuados, y determinación por T.L.C. Las variantes de los métodos se refieren al solvente usado para el desengrasado o para la extracción en sí, además de la purificación de los extractos, previa a la T. L. C. (35, 36, 26, 38, 31).

En cuanto a la determinación cuantitativa algunos analistas hacen comparaciones con testigos de toxina pura o muestras de toxicidad conocida (26). Otros se basan en medidas espectrofométricas (8, 10, 28, 37, 38). Un método que se aparta de los mencionados extrae la toxina por diálisis (39) y otro la determina por polarografía oscilográfica (40).

En casi todos los casos se usa T.L.C. con placas de silica gel, pero también se usó óxido de aluminio (34,35) o Kieselgel G (38,28).

MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con semillas de uva almacenadas para la posterior extracción de su aceite. Se han elegido las porciones aparentemente más contaminadas con hongos.

Se aplicó primeramente el método de COOMES, CROWTHER y STEVENS (41) elaborado para harina de maní. Por este medio no se ha detectado la presencia de aflatoxina en las muestras analizadas. Se usó como control una harina tóxica procedente del Tropical Products Institute, London.

Se hicieron ensayos de recuperación agregando a las semillas cantidades conocidas de aflatoxina pura con resultados negativos, por lo que se abandonó la aplicación de este método.

Método usado (42): 25 g de muestra son desengrasados por agitación durante 45 minutos con acetona-agua-ácido acético. Al filtrado se precipita con acetato de plomo. Nuevamente se filtra, se reduce el volumen por evaporación. Se diluye con agua, se agrega 4-5 g de celita. Se mezcla, se filtra, y se extrae una porción alicuota con cloroformo. Se pasa éste por capa de sulfato de sodio anhidro. Luego se concentra el extracto clorofórmico casi a sequedad y se retoma con 0,5 ml de cloroformo.

Se aplican partes alícuotas del extracto de 2, 5, 5 y 10 micro litros en una placa de sílica gel. Sobre una de las manchas de 5 microlitros se aplican 5 microlitros de solución de aflatoxinas standard (1 microgramo de aflatoxina/ml) como standard interno. Se calcula el contenido de aflatoxinas de la muestra analizada, observando en cuál de las manchas aparece la fluorescencia, luego del desarrollo del cromatograma. Se aplica luego una fórmula que tiene en cuenta las diluciones efectuadas y las concentraciones de las soluciones testigo.

RESULTADOS Y DISCUSION

La presencia de aflatoxinas en semillas de uva podría significar su pasaje al aceite elaborado con ellas, de ahí la importancia de esta determinación.

Se han analizado 25 muestras procedentes de tres cosechas sucesivas y de diferentes fábricas, no detectándose las sustancias buscadas. Se debe tener en cuenta que en productos como el maní se ha verificado que la contaminación con hongos y consiguientemente la presencia de aflatoxinas no es uniforme (43). Por lo tanto se proseguirá periódicamente la determinación de aflatoxinas, tratando de barcar otras zonas de almacenamiento.

AGRADECIMIENTO

La autora agradece a The Tropical Products Institute, London por la harina con contenido conocido de aflatoxinas y a The Southern Utilization Research and Development Division U. S. Departament of Agriculture New Orleans por la provisión de una muestra de aflatoxinas, pura.

BIBLIOGRAFIA

1. Blount, W. P., 1961. Turkeys, 9, 52.
2. Asplin, F. D. and Carnaghan, R. B. A., 1961. Vet. Record, 73, 1215.
3. Loosmore, R. M., and Markson, L. M., 1961. Vet. Record, 73, 813.
4. Carnaghan, R. B. A., and Sargeant, K., 1961. Vet. Record, 73, 726.
5. Allcroft, R.; Carnaghan, Sargeant, and O'Kelly, 1961. Vet. Record,
6. Sargeant, Carnaghan, Sheridan, and O'Kelly, 1961. Nature, 192 (4807) 1095.
7. Wogan, Wick, Dunn and Scrimshaw, 1963. Federation Proc., 22 (2) 611.
8. Asao, Büchi, Abdel Kader, Chang, Wick, and Wogan, 1963, J. Am Chem. Soc., 85 (11) 1706.
9. Van der Merve, Fourie, *and* Scott, 1963. Chem. and. Ind., 1660.
10. Sea Bong Chang, Abdel Cader, Wick, *and* Wogan, 1963. Science, 142, 1192.
11. Forgacs, J., 1962. Feedstuffs, 34 (18) 124.
12. Joffe, *A.*, 1962. Mycopathologie Mycologie Appl., 16, 201.
13. Anon., 1962. Nutrirional Rev. 20, 337.
14. Barnes, and Butler, 1964. Nature, 202 (4936) 1016.
15. Ashley, Halver and Wogan, 1965. Fed. Proc. 24, 627.
16. Anon., 1963. J. Am. Med. Assoc., 184, 57.
17. Platt, Stewart, and Gupta, 1962. Proc. Nutr. Soc. (Eng. Scot.), 3021.
18. Verret, Mariac, and Laughlin, 1964. J. of AOAC, 47 (6) 1003.
19. Smith R. H., 1963. Biochem. J., 88 (2) 50 P.
20. Judasz, and Greczi, 1964. Nature, 203 (4947) 861.
21. Legator, and Withrow, 1964. J. of AOAC, 47 (6) 1007.
22. Carnaghan, Allcroft, *and* Sargeant, 1961. Vet. Record, 73, 865.
23. Codner, Sargeant, and Yeo, 1963. Biotechnol. Bioeng., 5 (185) 92.
24. Sargeant, and Cowork, 1961. Vet. Record, 73, 1219.
25. Armbrecht, Hodges, Smith and Nelson, 1963. J. of. AOAC, 46 (5) 805.
26. Nesheim, Banes, Stoloff, and Campbell, 1964. J. of AOAC, 47 (3) 586.
27. Trevor, Coomes, Crowther, and Shone, 1964. Analyst, 89 (1059) 436.
28. Nabney, Nesbitt, 1964. Nature, 203 (4947) 862.
29. Engebrecht, Ayres, and Sinnhuber, 1965. J. of AOAC, 48 (4) 815.
30. Pons, and Goldblatt, 1965. J. of the Am. Oil Chemists' Society, 42 (6) 471.
31. Robertson, Lee, Cucullu, and Goldblatt, 1965. J. of the Am. Oil Chemists' Society, 42 (6) 647.
32. Shui - Chin - Chen, and Leo Friedman, 1966. J. of AOAC, 49 (1) 28.
33. Campbell, and Funkhouser, 1966. J. of AOAC, 49 (4) 730.
34. Genest, and Smith, 1963. J. of AOAC, 46 (5) 817.
35. Broadbent, Cornelius, and Shone, 1963. Analyst; 88 (1044) 214.
36. Coomes, and Sanders, 1963. Analyst, 88 (1044) 209.

37. HARTHEY, NESBITT, and O'KELLY, 1963. Nature, 198 (4885) 1056.
38. NABNEY, and NESBITT, 1965. Analyst, 40 (1073).
39. YAYARAMAN, and PARPIA, 1965. J. of AOAC, 48 (6) 1256.
40. GAJAN, NESHEIM, and CAMPBELL, 1964. J. of AOAC, 47 (1) 278.
41. COOMES, CROWTHER, and STEVENS, 1965. Analyst, 90 (1073) 492.
42. PONS W., 1969. J. of AOAC, 52 (1) 61.
43. SPENSLEY, 1963. Endeavour, 22 (86) 75.