

Tesis de Posgrado

Estudio del comportamiento de diferentes variedades de maní en relación a la producción de aflatoxinas por *Aspergillus Parasiticus*

Vaamonde, Graciela

1978

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vaamonde, Graciela. (1978). Estudio del comportamiento de diferentes variedades de maní en relación a la producción de aflatoxinas por *Aspergillus Parasiticus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1549_Vaamonde.pdf

Cita tipo Chicago:

Vaamonde, Graciela. "Estudio del comportamiento de diferentes variedades de maní en relación a la producción de aflatoxinas por *Aspergillus Parasiticus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1549_Vaamonde.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES
VARIEDADES DE MANI EN RELACION A LA PRO-
DUCCION DE AFLATOXINAS POR "ASPERGILLUS
PARASITICUS"



Ref. 1549
et. 2

Tesis presentada para optar al título de

DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1978

Deseo agradecer a la Dra. Edith
Varsavsky, bajo cuya dirección
se realizó esta Tesis, todo lo que
por su capacidad científica y sus
valores humanos, ha sabido brin-
darme durante la realización del
presente trabajo.

Agradezco muy especialmente al Dr. Pedro Cattaneo su constante apoyo y su inapreciable colaboración que permitió la realización de parte de esta Tesis.

Agradezco:

- Al Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología por facilitarme la realización de este trabajo, parte de cuya experimentación se realizó en el Laboratorio de Micotoxinas de dicho Instituto.

- Al Dr. Alfredo Agustín Moro, Jefe del Departamento de Biología del Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología, y al personal profesional y técnico de ese Departamento por su cordialidad y su constante apoyo.

Agradezco también:

- Al Ing. Agr. Edgardo H. Giandana de la Estación Experimental de Manfredi (INTA) por el envío de las muestras de maní de variedades argentinas, por su asesoramiento y sus oportunas sugerencias.
- Al Ing. Agr. L. A. Zaputovich por el envío de las muestras de maní del Paraguay.
- Al Dr. Jorge Wright por la valiosa bibliografía que puso a mi disposición y por el asesoramiento y colaboración prestados en todo momento.
- A la Dra. Elsa Banchemo (INTA) por su interés en este trabajo y la información facilitada a través de los documentos de la Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas a la cual concurrí como delegado de nuestro país.
- Al Sr. Miguel Calzadilla del Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología y a Jorge C. Rey por la realización de las fotografías.
- A mis compañeros de la Cátedra de Bromatología por su amistad.

P A R T E I

I N T R O D U C C I O N

I - RECONOCIMIENTO DEL PROBLEMA DE LAS MICOTOXINAS

II. - LAS AFLATOXINAS

- Propiedades
- Presencia natural en productos agrícolas
- Aspectos sanitarios y toxicológicos
 - a) Efectos nocivos sobre diversas especies animales
 - b) Las aflatoxinas como un peligro potencial para la salud humana.
- Medidas de prevención y control para reducir la contaminación por aflatoxinas
- Control por medios genéticos: búsqueda de variedades resistentes

I. RECONOCIMIENTO DEL PROBLEMA DE LAS MICOTOXINAS

Tal como lo señala uno de los documentos elaborados en la Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA* sobre Micotoxinas¹ realizada en Nairobi (Kenya) en septiembre de 1977, si bien hace muchos siglos que se conocen las alteraciones del sabor y la calidad de los alimentos debido a la presencia de mohos, transcurrió mucho tiempo para que se reconocieran ampliamente los posibles efectos tóxicos de la ingestión de productos mohosos.

Existen antecedentes bastante remotos de enfermedades producidas por la ingestión de alimentos enmohecidos. Una de ellas, el ergotismo, debido al consumo de centeno contaminado por Claviceps purpurea, ha aparecido en Europa y el Lejano Oriente desde la Edad Media hasta principios del presente siglo, causando en algunos casos numerosas muertes. Los metabolitos tóxicos del hongo responsable del ergotismo fueron indentificados como alcaloides en 1875.

Entre 1941 y 1947 se produjo en ciertas regiones de Rusia una grave epidemia de otra enfermedad denominada leucopenia tóxica alimentaria. (alimentary toxic aleukia: ATA). En este caso la causa fué la ingestión de cereales, especialmente mijo y trigo, que habían permanecido en el campo durante el invierno y habían sido contaminados por hongos del género Fusarium. Las informaciones indicaron que en algunas comunidades se produjo la defunción del 10% de la población a causa de esta enfermedad.

A pesar de que los científicos rusos escribieron mucho sobre la leucope-

* Programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente.

nia tóxica alimentaria y la identificación de los hongos responsables, en general no despertaron la atención acerca de las posibles consecuencias sobre la salud que podrían derivar de la presencia de estos y otros hongos en los alimentos. A comienzos de la década de 1960 una combinación de circunstancias hizo cambiar la actitud adoptada frente a los mohos en los alimentos humanos y animales. En ese año se produjo en Inglaterra una enfermedad que afectó a las aves de corral, especialmente pavos, causando la muerte de millares de estos animales. Por su etiología desconocida se la denominó originalmente "enfermedad X de los pavos" (turkey X disease), pero al poco tiempo se produjeron otros brotes similares que afectaron a patos y faisanes. Estudiando la incidencia de esta enfermedad en diversas zonas del Reino Unido se encontró que el factor común en la alimentación de los animales afectados era harina de maíz proveniente de Brasil². Muestras de este componente se analizaron para detectar compuestos tóxicos o presencia de plantas venenosas sin resultados satisfactorios, pero se observó la presencia de hifas en más del 20% de los trozos de maíz de las muestras que habían resultado tóxicas. Este fué el primer indicio que llevó a sugerir la presencia de una toxina de origen fungal en la harina de maíz³, si bien no fué posible aislar ningún hongo a partir de esas hifas que evidentemente estaban muertas.

Por la misma época se tuvo noticia de otros brotes de enfermedad en cerdos y ganado vacuno, aparentemente causados por un factor tóxico

en la dieta que también contenía harina de maníes brasileños. Preparando raciones con esta harina se logró reproducir el síndrome tóxico en patos jóvenes que resultaron ser la especie más sensible de las que se probaron en el laboratorio. Esto fué la base de un método biológico que resultó útil para detectar la presencia de la toxina aún no identificada en las primeras etapas de la investigación de este problema, que concitó de inmediato el interés de los científicos de diferentes partes del mundo.

Pronto se confirmó que el problema no estaba confinado a un área geográfica determinada, ya que muestras de maní de diferentes orígenes que fueron analizadas también resultaron tóxicas para los patos.

Se empezó a trabajar intensivamente en el aislamiento e identificación de la toxina. En base a las sugerencias de Austwick³ acerca del probable origen fúngico de la misma, Sargeant y col⁴. comenzaron a aislar hongos y analizar extractos de los cultivos y así obtuvieron, a partir de maníes provenientes de Uganda, la primera cepa productora de la toxina, que fue identificada como Aspergillus flavus Link ex Fries⁵. De los extractos se pudieron aislar, en principio, dos tipos de componentes tóxicos que fueron denominados aflatoxinas B y G. Más tarde se determinó que cada una de estas fracciones constaba de dos componentes que se reconocieron como aflatoxinas B₁, B₂ G₁ y G₂. Su estructura química fué determinada en el Massachusetts Institute of Technology⁶.

El aliciente para estos trabajos y los que siguieron fué el hallazgo

de que las tortas de maní tóxicas producían cáncer de hígado en ratas. Estudios de alimentación en el laboratorio permitieron comprobar que la aflatoxina B₁ es uno de los carcinógenos naturales más potentes que se conocen. Esto trajo gran preocupación por los posibles peligros para la salud humana que pudieran derivar de la ingestión de maní o sus derivados, aún con concentraciones reducidas de aflatoxinas.

El hecho de que el problema de las aflatoxinas no se limita a un solo producto quedó demostrado por apariciones simultáneas, casi en la misma época, de cáncer de hígado en truchas de criaderos comerciales de diversas regiones de Estados Unidos⁷. El origen de la enfermedad en este caso se pudo situar en las tortas de semilla de algodón empleadas en la preparación de alimentos deshidratados, de las cuales se lograron aislar aflatoxinas y demostrar que éstas eran el agente carcinógeno. Pronto se iniciaron estudios para buscar aflatoxinas en otros productos agrícolas.

Se estableció que muchas cepas de Aspergillus flavus producen aflatoxinas, no sólo cuando infectan maníes sino también otros tipos de productos (especialmente cereales, nueces, semillas de oleaginosas) y que los granos expuestos a la contaminación son usados luego para alimento del hombre, el ganado y los animales de granja. La identificación de las aflatoxinas como metabolitos fúngicos causantes de enfermedad en diversas especies animales y el hecho de que representaran un peligro potencial para el ser humano llevaron a la intensificación inmediata del esfuer

zo científico desplegado para identificar hongos productores de sustancias tóxicas (denominadas micotoxinas) que pudieran ser causantes de otras enfermedades (micotoxicosis). El desarrollo de una metodología analítica de fácil aplicación en todos los casos constituyó un paso importante en el estudio de este problema. Se pudo demostrar que muchas otras especies de hongos comunes pueden elaborar en los alimentos sustancias con una gran variedad de efectos tóxicos, desde necrosis dérmica a lesiones hepáticas o hemorragias, a veces con aguda letalidad. En cultivo de laboratorio se han aislado numerosas toxinas producidas por hongos que contaminan productos agrícolas. Sin embargo, se han encontrado hasta el presente sólo unos pocos metabolitos fúngicos cuya presencia en los alimentos humanos o animales, naturalmente contaminados, puede ser significativa. Se los menciona en la Tabla 1, indicando las especies productoras. A excepción de las aflatoxinas, que han sido objeto de numerosísimos trabajos, el conocimiento que se tiene actualmente acerca de las otras micotoxinas es parcial y muy disperso. Hacen falta todavía muchas investigaciones en los diversos aspectos que abarca el problema de las micotoxinas para poder lograr su efectivo control.

II. LAS AFLATOXINAS

La denominación aflatoxina es un término genérico que se refiere a uno o más de los cuatro metabolitos principales producidos por ciertas cepas de hongos del grupo Aspergillus flavus. Se trata de las aflatoxinas B₁,

B_2 , G_1 y G_2 . En general, la aflatoxina B_1 es la que aparece en mayor concentración en los productos contaminados, G_1 en concentraciones intermedias, B_2 y G_2 en concentraciones menores, pero las concentraciones relativas varían entre márgenes muy amplios, según la cepa del hongo, el sustrato y las condiciones de crecimiento. Algunos hongos producen solamente las toxinas de tipo B. En las determinaciones analíticas se suelen indicar las concentraciones de aflatoxina B_1 o bien de aflatoxinas totales.

Propiedades químicas y físicas de las aflatoxinas

Además de las cuatro aflatoxinas que aparecen comúnmente en los alimentos, se conocen hasta el momento dieciseis compuestos relacionados, algunos de los cuales (por ejemplo las aflatoxinas M_1 y P_1), son metabolitos de la aflatoxina B_1 encontrados en tejidos y fluidos biológicos de distintas especies animales y otros han sido aislados de cultivos de Aspergillus flavus sobre diferentes sustratos. Son compuestos heterocíclicos (difuranocumarinas), cuyas estructuras se pueden observar en la Figura 1.

Las aflatoxinas son solubles en solventes moderadamente polares, tales como metanol, cloroformo y acetona, pero son prácticamente insolubles en solventes no polares, como hexano y éter de petróleo. No son solubles en agua.

La propiedad más importante es la intensa fluorescencia que presen-

tan estos compuestos cuando se los observa con luz ultravioleta. La unidad central de 5-metoxi-cumarina, común a todos ellos, parece ser la responsable de esta propiedad y de la absorción al UV, así como también su fotosensibilidad, ya que en soluciones diluidas son muy inestables a la luz.

La nomenclatura generalmente aceptada sigue el patrón de la separación de estos compuestos por cromatografía en capa delgada (técnica comúnmente utilizada para su determinación). Así se han denominado con la letra B las que tienen fluorescencia azul (blue) y G las que presentan fluorescencia verde (green). Los subíndices dentro de cada grupo se refieren a la relativa movilidad cromatográfica. Es decir R_f de $B_1 > R_f$ de B_2 y R_f de $G_1 > R_f$ de G_2 . . . Las propiedades físicas de estos compuestos han sido determinadas⁸ y junto con los estudios de espectroscopía ultravioleta, infrarrojo y resonancia magnética nuclear de los compuestos aislados y sus productos de reducción, así como la comparación con cumarinas sintéticas, indicaron que la estructura de furano-cumarina está presente en todos ellos. Esta estructura fué confirmada por síntesis en 1966, por Büchi y col.⁹ Son compuestos muy estables, solamente destruidos por alcalis fuertes. El tratamiento alcalino en la etapa de refinación de los aceites las inactiva; por lo tanto, aún partiendo de semillas contaminadas, no constituyen un problema en el aceite si éste se refina.

La aflatoxina B_1 es la más importante, no sólo porque es la que generalmente aparece en mayor cantidad en los alimentos contaminados, sino

también porque es la más tóxica. La LD 50 de aflatoxina B₁ para patos de un día es aproximadamente 0,5 mg/Kg. Es interesante notar que cambios relativamente pequeños en la estructura química pueden modificar la actividad biológica. Por ejemplo: el dihidro derivado de B₁, la aflatoxina B₂, tiene bastante menor toxicidad; su LD50 es 1,70 mg/Kg. Vale decir que el punto de insaturación en la aflatoxina B₁ es un importante factor de contribución a la potencia tóxica de la sustancia. La adición de un grupo hidroxilo entre los anillos de furano de la aflatoxina B₁, para formar la M₁ no altera su toxicidad, mientras que la adición de este mismo grupo al anillo de furano terminal, en la aflatoxina B_{2a} reduce marcadamente la toxicidad, dando una LD50 > 30 mg/Kg. Igualmente en la serie de aflatoxinas G, los cambios en el anillo terminal de cinco miembros también reducen la toxicidad, siempre referida al pato de un día. La LD50 para aflatoxina G₁ es 0,8 mg/Kg, para aflatoxina G₂ 3,4 mg/Kg y > 30 mg/Kg para G_{2a}.

Presencia natural de las aflatoxinas en productos agrícolas

Una gran diversidad de vegetales están sujetos a contaminación por hongos productores de aflatoxinas. El Aspergillus flavus se encuentra universalmente distribuido en el medio ambiente y en todo el mundo se han señalado alimentos humanos y animales contaminados por aflatoxinas. Algunos de los más importantes alimentos vegetales de consumo humano (por ejemplo las semillas de oleaginosas y los cereales que apor-

tan cantidades considerables de proteínas y calorías a la ración alimenticia) son susceptibles a la contaminación por aflatoxinas. De todas las plantas que se cultivan en el mundo para la obtención de alimentos y piensos, el maní y el maíz son las que poseen el más alto riesgo potencial de contaminación. En algunas muestras de maní y maíz la concentración de aflatoxina B₁ ha llegado a ser de varios miles de $\mu\text{g}/\text{Kg}^{10}$, valor sumamente elevado si se tiene en cuenta que los niveles máximos permitidos en la mayoría de los países que tienen reglamentación oscilan alrededor de 20-30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

En el caso del maní es importante la obtención del "aislado" proteico, empleado para suplementar cierto tipo de alimentos. Se ha comprobado que la proteína, que constituye aproximadamente el 50% de la harina, cuando se la separa de los azúcares, del aceite y de la fibra, lleva consigo la mayor parte (81%) de la aflatoxina presente en la harina. Por tal motivo este proceso hace que la aflatoxina se concentre en el "aislado" proteico.¹¹

Además del maní y del maíz, que son consumidos por poblaciones muy numerosas, también se han encontrado aflatoxinas en semilla de algodón, coco, diversos cereales (sorgo, trigo, cebada, mijo, avena, etc), arroz, soja, girasol, nueces, almendras, avellanas, pistacho, café, cacao y hasta en algunas frutas (higos).

La frecuencia y magnitud de la contaminación por aflatoxinas varía según los factores geográficos y estacionales y las condiciones de reco-

lección y almacenamiento del producto. La presencia de aflatoxinas depende en gran medida de la temperatura, la humedad relativa, el contenido de humedad del sustrato, la madurez de la semilla y la accesibilidad de las esporas fungales a través de la cubierta protectora de la semilla o legumbre. Los niveles más altos y la mayor incidencia de contaminación se registran en las regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones ambientales son las óptimas para el desarrollo de los hongos toxicogénicos, pero también se han encontrado aflatoxinas en alimentos producidos en zonas templadas.

Aspectos sanitarios y toxicológicos

a) Efectos nocivos de las aflatoxinas sobre diversas especies animales.

Numerosas investigaciones que se han llevado a cabo con aflatoxinas purificadas han demostrado su acción como agentes tóxicos para varios sistemas biológicos, incluidas varias especies de mamíferos, aves y peces. Estos efectos en los mamíferos se manifiestan principalmente en el hígado.

La susceptibilidad a los efectos tóxicos de las aflatoxinas varía considerablemente con la edad (los animales jóvenes son más susceptibles), el sexo (las hembras son más resistentes que los machos), el estado nutricional y, fundamentalmente, con la especie. Las diferencias en las respuestas a las aflatoxinas en diferentes animales se atribuyen a su metabolismo diferencial.

La respuesta tóxica depende también de la dosis administrada y de la duración de la exposición al tóxico, existiendo una toxicidad aguda que puede provocar la muerte por ingestión de una dosis elevada y una toxicidad crónica capaz de causar daños histológicos característicos con dosis pequeñas administradas repetidamente.

Las muertes de pavos, patitos y otras aves que llevaron al descubrimiento de las aflatoxinas como agentes causantes atestiguan la toxicidad aguda de estas micotoxinas para las citadas especies. El modo de acción de las aflatoxinas en su fase aguda y subaguda ha sido extensamente estudiado. Clifford y Rees¹² encontraron una inhibición de la incorporación de aminoácidos a las proteínas, trabajando "in vitro" con homogenatos de hígados de rata y demostraron que la aflatoxina B₁ se une al DNA, unión que también se observó "in vivo", utilizando aflatoxinas marcadas. De esta forma se inhibe la síntesis del RNA mensajero, al inhibir la acción de la RNA polimerasa dependiente del DNA. Lo que se observa es una marcada disminución de la síntesis de proteínas, la cual sería responsable de la necrosis hepática.

Respecto de la toxicidad crónica, como ya se ha señalado, la exposición a dosis subletales durante un período prolongado induce tumores hepáticos malignos en varias especies animales¹³⁻¹⁶. Las primeras investigaciones realizadas sobre la harina de maíz contaminada revelaron que las ratas alimentadas con dietas conteniendo aflatoxinas desarrollaron tumores ma-

lignos en un período de seis meses. La trucha "arco iris" es otra especie particularmente sensible a los efectos carcinogénicos de la aflatoxina B₁. Estudios de la relación entre dosis y respuesta a la aflatoxina han demostrado que la potencia de inducción de cáncer relativa a otros carcinógenos es sorprendente. Con dosis de 0,2 $\mu\text{g}/\text{día}$, lo que representa una ingestión total de 100 μg , todas las ratas de un lote tenían tumores en el hígado luego de 476 días. Esto fué lo que provocó gran alarma respecto del peligro potencial para la salud humana que puede representar la presencia de estas sustancias en los alimentos, cuestión que hasta el presente no ha sido totalmente dilucidada.

Si bien los episodios de toxicidad aguda debidos a las aflatoxinas pueden ocasionar pérdidas económicas por la muerte de gran cantidad de animales, los efectos de la ingestión de cantidades que no producen síntomas patológicos agudos dan lugar también a pérdidas considerables. Cuando los animales son alimentados con forrajes contaminados en menor grado se ven afectados en diversas formas. Por ejemplo, los cerdos, novillos y terneros alimentados con dietas que contienen aflatoxinas acusan diferencias significativas de aumento de peso, rendimiento del forraje y peso de los órganos en comparación con animales alimentados con dietas exentas de aflatoxinas¹.

Vacas lecheras alimentadas con cantidades de aflatoxinas desde moderadas hasta altas excretan en la leche cantidades detectables de un metabolito de la aflatoxina B₁, la aflatoxina M₁, que ha resultado ser igualmen-

te hepatotóxica para los animales de experimentación. La presencia de aflatoxina M_1 en la leche puede significar un peligro potencial especialmente para los niños, ya que los individuos jóvenes de la mayoría de las especies son los más sensibles a sus efectos tóxicos. La concentración de esta sustancia en la leche depende de la cantidad de aflatoxina ingerida y del tiempo transcurrido entre la ingestión y el ordeño¹.

Entre las aves, los pollos son más resistentes que los patos o los pavos, pero algunas razas son menos resistentes que otras.

Estudios experimentales han demostrado que las aflatoxinas pueden acumularse en ciertos órganos y tejidos de los animales que las ingieren, los cuales podrían representar un peligro potencial para el consumidor, pero hasta el presente no se tienen noticias de la presencia de aflatoxinas en muestras de tejidos, órganos o músculos de vacunos o porcinos, ni de carne de pollo o huevos, tomadas en mercados.

La ingestión de aflatoxinas puede causar también efectos secundarios, como ser una hipersensibilización a diversas enfermedades. Entre los procesos infecciosos que se acentúan con el consumo de aflatoxinas se cuentan las candidiosis, la coccidiosis y la salmonelosis en los pollos. Se han demostrado efectos inmunosupresores de las aflatoxinas en estudios con animales: pavos alimentados con dietas que contenían $250 \mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxina pierden parte de la inmunidad adquirida contra el cólera aviar¹, pero no se sabe hasta qué punto la ingestión crónica de estas sustancias

puede alterar los mecanismos inmunogénicos.

Es decir, la disminución de los ritmos de crecimiento, la menor eficiencia en el aprovechamiento de los alimentos y la mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas pueden ser consecuencia de alimentos contaminados por aflatoxinas y quizás sean la causa principal de las pérdidas económicas que las aflatoxinas ocasionan en la producción pecuaria.

b) Las aflatoxinas como un peligro potencial para la salud humana

Hay ciertas evidencias de que los seres humanos en ciertas áreas del mundo donde las condiciones climáticas y el tipo de alimentación son propicios también ingieren cantidades significativas de estas toxinas. Sin embargo, con el estado actual de los conocimientos sobre el tema, no es posible aún determinar exactamente los riesgos para la salud humana que puedan derivar de este tipo de contaminación. Todavía no se ha establecido en qué extensión el hombre está expuesto a las aflatoxinas, ni la forma en que responde a su acción. La mayoría de los datos disponibles sobre aflatoxicosis provienen del campo de la medicina veterinaria o resultan de los estudios experimentales acerca de la toxicidad de los metabolitos fúngicos para diversas especies de animales. El conocimiento acerca de otras micotoxinas es todavía mucho más incompleto. Los estudios realizados indican que el potencial de las micotoxinas como compuestos tóxicos es considerable y es muy probable que futuras investigaciones más específicas establezcan una función causal de las micotoxinas en ciertas enfermedades del hom-

bre. Para ello sería necesario el examen de gran número de muestras de alimentos para detectar micotoxinas (tanto en términos de incidencia como de nivel de contaminación) y la interpretación de estas informaciones en relación con los datos toxicológicos que se conocen por estudios con animales de laboratorio. La variada naturaleza de la dieta humana, las probables interacciones con otros factores ambientales y la falta, por el momento, de datos epidemiológicos significativos se combinan para hacer de ésta una tarea bastante difícil.

Respecto de las posibles intoxicaciones agudas en el hombre hay muy pocos datos, pero existe información sobre aparentes aflatoxicosis, cuya manifestación primaria son afecciones agudas del hígado. En uno de los citados documentos¹ se mencionan los siguientes casos:

En el otoño de 1974 tuvo lugar una epidemia de hepatitis mortal en varias aldeas del oeste de la India, que afectó a casi 400 individuos de los cuales pereció un 20%. Se produjeron dos máximos de mortalidad, uno entre enfermos de 5 a 15 años de edad y el otro entre los de más de 30 años. El maíz, que constituye uno de los componentes principales de la alimentación, estaba fuertemente contaminado con aflatoxinas, en concentraciones que iban desde 0,25 mg/Kg hasta 15,6 mg/Kg (promedio 6,0 mg/Kg). La epidemia se inició en octubre, después de la cosecha de maíz, alcanzó un máximo en noviembre y diciembre y declinó en enero, cuando acabaron las existencias de maíz.

Las aflatoxinas podrían estar también relacionadas con una enfermedad que produce encefalopatía y degeneración grasa de las vísceras (especialmente el hígado), conocida como síndrome de Reye, que ocasiona la muerte de centenares de niños al año en Tailandia. Análisis de alimentos en los mercados locales mostraron que la contaminación por aflatoxinas era paralela a la incidencia de la enfermedad, tanto geográfica como temporalmente. El análisis de muestras de la autopsia reveló aflatoxinas en una o más de las muestras en 22 de los 23 casos estudiados, a concentraciones de hasta $83 \mu\text{g}/\text{Kg}$ en el hígado, $123 \mu\text{g}/\text{Kg}$ en las heces, $127 \mu\text{g}/\text{Kg}$ en el contenido gastrointestinal y $8 \mu\text{g}/\text{Kg}$ en la bilis. En muestras de la autopsia de 11 de 15 niños que murieron por otras causas distintas no se encontraron más que trazas de aflatoxinas. También en Checoslovaquia se han informado defunciones de niños con el mismo síndrome. En cinco años se produjeron 27 casos fatales; en todos ellos se detectaron aflatoxinas en muestras de hígado.

En la India, Robinson¹⁷, en 1967, encontró aflatoxinas B_1 y M_1 en leche de las madres de niños lactantes que presentaban cirrosis hepática, como así también aflatoxina M_1 en la orina de los niños.

En 1970 otros autores informaron resultados similares¹⁸. En Filipinas¹⁹ se analizaron más de 500 muestras de manteca de maní manufacturada localmente y se hallaron altamente contaminadas, en algunos casos con más de $500 \mu\text{g}/\text{Kg}$. El análisis de orina de sujetos que habían ingerido

este producto reveló la presencia de aflatoxina M_1 .

Los posibles efectos de la ingestión crónica de pequeñas dosis de aflatoxinas se han investigado en estudios epidemiológicos realizados en cinco países: Tailandia, en el sudeste asiático, y Swazilandia, Mozambique, Uganda y Kenya, en Africa. Los resultados ponen de manifiesto una correlación positiva, sumamente significativa, entre las dosis ingeridas y la frecuencia de cáncer primario de hígado. La ingestión de aflatoxinas se determinó analizando alimentos preparados, listos para servir en la mesa, como así también alimentos conservados en las casas u obtenidos en el mercado. Aunque estos estudios demuestran que existe una relación entre la ingestión de aflatoxina y el cáncer primario de hígado, diversos factores complican su interpretación como causa y efecto. Se requiere mayor número de estudios de tipo epidemiológico para poder confirmar estas observaciones. De todos modos, el Grupo Especial de la OMS sobre Micotoxinas que se reunió en Ginebra en marzo de 1977 entre sus recomendaciones expresa: "Aunque investigaciones ulteriores han de esclarecer varias cuestiones, puede afirmarse que una alta exposición a la aflatoxina plantea un problema de salud pública, por lo cual procede, por razones de prudencia, aplicar medidas preventivas para reducir el consumo de aflatoxina en las poblaciones muy expuestas cuando las condiciones locales lo permitan".

Medidas de prevención y control para reducir la contaminación por aflatoxinas

Los posibles riesgos para la salud humana y animal y los problemas económicos relacionados con la contaminación de alimentos y piensos por aflatoxinas han movido a varios países a establecer programas de regulación en algunos productos nacionales e importados. Se han establecido límites de tolerancia para las aflatoxinas en diversos productos sujetos al comercio internacional, especialmente cereales y semillas de oleaginosas. Recientemente Estados Unidos y Canadá han rechazado cargamentos de cereales por tener niveles de contaminación superiores a los aceptados por esos países .

La primera recomendación acerca de los niveles de aflatoxinas aceptables en los alimentos data de 1966²⁰, cuando el Grupo Asesor sobre Proteínas (PAG) integrado por miembros de FAO y OMS estableció un valor de 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para manifes empleados en la obtención de suplementos proteicos destinados a ciertas áreas con problemas de malnutrición. Este nivel pareció demasiado alto a los expertos de la FDA, que posteriormente recomendaron un valor máximo de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en los programas de control a partir de las cosechas de 1969. Actualmente dieciocho países, entre los que se cuentan Estados Unidos, Canadá, Holanda, Alemania, Japón, Italia, Francia, Brasil, etc., tienen una reglamentación, o bien directivas que prescriben los límites máximos admisibles de aflatoxinas en alimentos

humanos o animales. Los productos controlados varían de un país a otro, el más frecuente es el maíz y sus tortas de prensado que se destinan a la alimentación animal. Los niveles admitidos varían de un país a otro, por ejemplo en Dinamarca la tolerancia es "cero" (el alimento debe estar libre de aflatoxinas). De hecho, el límite inferior de la concentración de aflatoxinas depende de la sensibilidad del método analítico oficialmente adoptado, que generalmente es de $5 \mu\text{g}/\text{Kg}$. En Inglaterra se acepta como guía $50 \mu\text{g}/\text{Kg}$ para productos que se importan, destinados a la alimentación animal; las tolerancias para alimentos destinados a consumo humano están aún sometidas a discusión .

En base a las informaciones que se poseen hasta el momento acerca de la incidencia de las aflatoxinas, puede decirse que éstas constituyen un problema mundial, y es por eso que diversos países se están ocupando actualmente de su prevención y control.

La contaminación con aflatoxinas puede producirse durante el cultivo, la recolección, el almacenamiento o el transporte de los productos agrícolas. Las medidas preventivas pueden aplicarse en diferentes puntos de la producción, comercialización, elaboración y distribución y requieren el conocimiento de los factores que, de una u otra forma, pueden influir en el desarrollo de los hongos y la producción de sus toxinas.

La contaminación en el campo, antes de la cosecha, no es muy frecuente pero se ha observado para ciertos cultivos como ser maíz, maíz, semilla de algodón, pistacho y almendras. En estos casos parece ser importante la presencia de cáscaras intactas que cumplen una función protectora de la semilla. El adecuado tratamiento de los suelos puede ayudar a prevenir la contaminación; se ha visto que la incidencia de las aflatoxinas es mayor cuando el maíz se siembra en terrenos en los que durante años anteriores se ha sembrado también maíz, mientras que disminuye si el maíz se alterna con otros cultivos como ser sorgo, maíz, etc.

Otro factor importante es la cosecha en la época adecuada, cuando las semillas han alcanzado la madurez, ya que cuando están inmaduras tienen mayores contenidos de humedad y por lo tanto son más susceptibles a la contaminación fúngica. El método de recolección también puede incrementar el riesgo, si no se emplean equipos adecuados para evitar el daño mecánico de los frutos.

Otro punto importante es el control de los insectos que pueden contribuir a incrementar la contaminación, ya sea transportando esporas o por el simple hecho de que los granos atacados quedan más expuestos a la penetración de los hongos existentes en el suelo o en el aire.

Entre los factores ambientales que influyen en la contaminación fúngica de las cosechas el más importante es la humedad relativa (RH) de

la atmósfera, que determina el contenido de humedad del producto a una temperatura dada. La humedad en equilibrio a una dada RH depende a su vez de la composición química del sustrato. Por lo tanto, en cada producto es diferente la humedad relativa que determina el nivel crítico de humedad para el desarrollo de hongos. El secado de los productos por debajo de ese nivel crítico es fundamental si se desea evitar la proliferación de hongos después de la cosecha. Esta es una etapa clave en cuanto a la prevención del problema. La demora en secar los frutos hasta niveles de humedad inocuos puede incrementar notablemente el riesgo de contaminación por aflatoxinas, sobre todo en el caso de productos como el maní, que por haber estado en contacto con la tierra pueden estar contaminados por Aspergillus flavus. Cuando se lo cosecha, el maní tiene un contenido de humedad de aproximadamente 35-40%. En esta etapa sus tejidos son fisiológicamente activos y los hongos saprófitos no desarrollan en este medio. A medida que disminuye la humedad cesa la actividad fisiológica de las semillas y, a un contenido de humedad de 20-25%, se tornan mucho más vulnerables al ataque de los hongos. En condiciones ambientales favorables los frutos pierden humedad fácilmente hasta niveles bajos (8-9%). Si esto sucede en 3 ó 4 días es poco probable el desarrollo de hongos y la formación de toxinas. Si el maní se cosecha en épocas de mucha humedad el secado tiene que prolongarse tanto que resulta inevitable su contaminación por mohos. Existen diversos métodos de secado

que permiten acelerar la pérdida de humedad y evitar la proliferación fúngica. El secado artificial sería aconsejable en ciertas regiones de climas muy húmedos, pero todavía no tiene aplicación masiva, dado sus elevados costos.

Durante la etapa de almacenamiento, sobre todo si se efectúa a granel, es fundamental mantener las cosechas en perfectas condiciones de higiene y no permitir que se rehumedezcan. En lo posible conviene mantener las estructuras de almacenamiento secas y a temperatura y RH constantes. Los gradientes térmicos en el interior de los lotes de granos almacenados causan la acumulación de la humedad y su condensación en ciertas zonas en las cuales se produce enmohecimiento. En el caso de productos como el maíz, se ha observado que unos pocos granos con muy alta concentración de aflatoxinas al mezclarse con el resto pueden hacer que todo el lote resulte peligrosamente contaminado. En esta etapa también es conveniente el control de insectos, que pueden depositar esporas sobre los granos y, por otra parte, contribuyen a elevar los niveles de humedad. Idénticas consideraciones tienen lugar respecto de la etapa del transporte de los productos agrícolas, que puede tener lugar antes o después de su almacenamiento. Algunos productos que se recolectan en zonas tropicales se transportan a granel en embarcaciones a las plantas elaboradoras. Si el viaje es prolongado y se realiza en condiciones de humedad y temperatura elevadas puede tener lugar el crecimiento de hongos y la pro-

ducción de toxinas.

En los últimos años se ha tratado de controlar la proliferación de hongos en los cereales mediante el empleo de fungicidas, pero en este caso el peligro reside en la presencia de residuos tóxicos. A pesar de las numerosas investigaciones realizadas, al parecer ningún tratamiento ha dado buenos resultados cuando se lo ha aplicado en gran escala.

También existen métodos de detoxificación para eliminar aflatoxinas de ciertos alimentos, especialmente semillas de oleaginosas y sus harinas. Estos métodos pueden ser físicos (separación manual o electrónica de granos dañados, descoloridos, etc), químicos (empleo de agentes oxidantes o extracción de las toxinas con solventes) o biológicos (degradación de aflatoxinas por microorganismos). Ninguno de los procedimientos descritos para la detoxificación de productos contaminados ha sido completamente satisfactorio para su aplicación industrial. Se están realizando investigaciones en tal sentido, pero cualquier procedimiento para ser aceptado, además de eliminar las toxinas presentes, debe mantener el valor nutritivo del alimento y no alterar sus cualidades organolépticas. Por eso se insiste en las medidas de prevención, para evitar en lo posible la necesidad de detoxificación, considerando que los alimentos susceptibles de contaminación (cereales, coco, maíz, soja, etc.) son promisorias fuentes de proteínas, que en un futuro no muy lejano será necesario utili-

zar para suplementar la dieta de gran parte de la población mundial.

Control por medios genéticos: búsqueda de variedades de semillas
resistentes a la contaminación por aflatoxinas

En los últimos años se ha comenzado a investigar un posible método de control del problema de las aflatoxinas que consiste en la búsqueda de variedades de semillas resistentes a este tipo de contaminación.

Es sabido que mediante la selección en masa de colecciones de germoplasma de variedades de cereales y legumbres, pueden identificarse razas de plantas resistentes al ataque de un hongo determinado.

Respecto de las aflatoxinas, la resistencia puede ser de dos clases:

- a) resistencia de la semilla al ataque de los hongos toxicogénicos
- b) inhibición de la producción de aflatoxinas por los hongos que infectan el grano,

Para que resulte de utilidad práctica, la resistencia debe ir acompañada de buenas características agrícolas de las plantas y también mantener el valor nutritivo del producto.

Existen algunos antecedentes al respecto:

Goldblatt y col²¹. informaron que la semilla de algodón que posee cubierta impermeable (denominada "hard seed") tiene menor tendencia a

permitir el crecimiento de Aspergillus flavus y la producción de aflatoxinas que aquellas semillas que no tienen la cubierta dura. Esto indicaba la posibilidad de que la invasión por el hongo y la producción de aflatoxinas en semillas de algodón pueda controlarse por medios genéticos.

La primera referencia a la posible existencia de variedades de mañ resistentes a la producción de aflatoxinas data de 1967. Rao y Tulpule²² analizaron 60 variedades de mañ provenientes de distintos países e informaron que en una de ellas, la denominada U. S. 26, no se detectaban aflatoxinas luego de inocularla con una cepa toxicogénica de Aspergillus flavus. Estos autores sugirieron que la resistencia podría deberse a que las cepas toxicogénicas de A. flavus requieren trazas de ciertos elementos, tales como Zn, Fe y Mn, para la síntesis de la toxina, los cuales no estarían presentes en las semillas de esa variedad estudiada. La influencia de trazas de ciertos metales sobre la producción de aflatoxinas por cepas de hongos toxicogénicos ha sido luego estudiada por otros autores^{23, 24}.

Sin embargo, los resultados obtenidos por Rao y Tulpule no pudieron ser confirmados por Douppnik²⁵ quien, en 1969, informó que en sus condiciones de trabajo se producían aflatoxinas sobre la variedad U. S. 26. Douppnik no encontró resistencia a la producción de aflatoxinas en 20 variedades (líneas de cultivo) estudiadas²⁶. Luego de inocular las semillas con una suspensión de esporas de A. flavus e incubarlas a 25-27° durante 7

ñas detectó aflatoxinas en todas ellas, en cantidades superiores a 40.000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxinas totales. Sin embargo este autor consideraba conveniente continuar con este tipo de investigación, sobre la hipótesis de que pudiera existir inhibición genética de la producción de toxinas en otras líneas de cultivo.

Nagarajan y Bhat²⁷ estudiaron en maní la influencia de la variedad de la planta y de la cepa toxicogénica sobre la producción de aflatoxinas. Según estos autores existirían ciertas diferencias varietales y también debidas a la cepa del hongo productor. La variación en la producción de toxina estaba ligada a la capacidad inherente del microorganismo para producir la toxina en los medios de cultivo empleados en el laboratorio y en otros sustratos naturales. De modo que una cepa con baja capacidad toxicogénica podría producir sobre alguna de las variedades cantidades no detectables de aflatoxinas, lo cual explicaría los resultados obtenidos por Rao y Tulpule, anteriormente mencionados. También encontraron diferencias entre la producción de toxina por la misma cepa de hongo sobre dos variedades diferentes, que atribuyeron a ciertas características de la composición de la semilla, como podrían ser la presencia de determinadas proteínas o vitaminas. Estos investigadores también concluían que desde el punto de vista de la prevención del problema, sería útil identificar genotipos de maní que inhiban o sólo permitan una limitada producción de aflatoxinas por Aspergillus flavus.

se retardaba respecto de los manifes sin cáscara o partidos. Al cabo de 7 días se observaba muy poca cantidad de aflatoxinas en los manifes no descascarados. Sin embargo, al cabo de 21 días los niveles de aflatoxinas alcanzados en ellos eran tan altos como los observados en los otros lotes que habían sido objeto de estudio (semillas maduras sanas, semillas maduras rotas y semillas inmaduras). Esto significaría que la presencia de cáscaras o tegumentos intactos es sólo una barrera física temporaria para la invasión por A. flavus.

Pettit y col³¹, en Texas, están trabajando con algunas variedades que se consideran relativamente resistentes a la penetración fúngica, entre ellas las encontradas por Mixon y Rogers²⁹. Ellos consideran que puede haber dos barreras potenciales frente al ataque de los hongos toxicogénicos: las vainas (pericarpio) y los tegumentos seminales (testas). Observando con microscopio electrónico los tejidos de las variedades relativamente resistentes encontraron cierta correlación entre las características bioquímicas y morfológicas de dichas estructuras y la extensión de la penetración de A. flavus dentro de los frutos. En el caso de los tegumentos seminales, los caracteres que parecen influir en la velocidad de penetración del hongo son la disposición de las células en una forma muy compacta, la cantidad de los depósitos de cera en la superficie y el contenido de taninos. En el caso de las vainas, la cantidad de células del esclerénquima (tejido compuesto de células con paredes gruesas cuya prin-

principal función es el reforzamiento mecánico), su grado de cohesión y el contenido de lignina parecen ser las características más importantes en lo que se refiere a la resistencia al ataque fúngico.

Investigadores franceses^{32, 33, 34} están realizando estudios del mismo tipo, sobre otras variedades de maíz, con resultados similares, es decir, que las diferencias varietales notadas respecto de la penetración de A. flavus estarían relacionadas con la estructura de la cáscara y del tegumento seminal. Todos los autores coinciden en que estas estructuras deben encontrarse intactas para impedir la penetración del hongo ya que cualquier tipo de ruptura o daño permite al Aspergillus flavus una rápida colonización tanto en las semillas "susceptibles" como en las "resistentes". De todos modos las características de las cáscaras y tegumentos que han sido mencionadas son deseables y se están realizando trabajos de genética para poder transmitir las a las variedades comerciales.

Las posibles diferencias varietales respecto de la producción de aflatoxinas también han sido estudiadas en otros granos, como ser maíz³⁵, soja³⁶ y girasol³⁷. Nagarajan y Bhat³⁵ investigaron además las posibles razones de las diferencias observadas entre dos variedades de maíz (Opaque-2, que presenta resistencia y Deccan Hybrid, mucho más susceptible). Llegaron a establecer que el factor responsable es una proteína de bajo peso molecular, presente en ambas pero en mucho mayor concentración en la variedad resistente.

PARTE II

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

- Objetivos
- Plan de trabajo
- Material empleado
- Estudio de resistencia varietal
 - 1) Análisis de las muestras de las diferentes variedades de maní para determinar posible contaminación natural por aflatoxinas.
 - 2) Inoculación experimental
 - 3) Análisis para la detección de aflatoxinas en las muestras inoculadas.
- Estudio de la micoflora de las variedades de maní analizadas
 - 1) Aislamiento e identificación de los hongos contaminantes
 - 2) Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas del grupo Aspergillus flavus
- Estudio sobre los aceites de semilla de maní contaminada con Aspergillus flavus
 - 1) Aumento de acidez libre de los aceites de semilla de maní contaminada con Aspergillus flavus
 - 2) Influencia del contenido acuoso de la semilla y de la presencia de Aspergillus flavus en los valores de composición acídica de los ácidos libres de aceite de maní.

Objetivos

En base a los antecedentes expuestos en la Parte I, se ha tratado de establecer si alguna de las variedades de maní argentinas y paraguayas que se han estudiado presenta resistencia a la producción de aflatoxinas. Esta propiedad podría ser la base de un efectivo método de control para este importante problema de higiene alimentaria.

Además se ha realizado un estudio sobre la incidencia de los diversos hongos contaminantes de las variedades de maní estudiadas, poniendo especial atención en el aislamiento e identificación de aquellos pertenecientes al grupo Aspergillus flavus, a los cuales se determinó su capacidad toxicogénica.

En otro orden de finalidades, se trabajó con los aceites de extracción obtenidos a partir de semillas no contaminadas y contaminadas con una cepa de hongo toxicogénico, con especial referencia a los valores de número de acidez. Estas experiencias tuvieron por objeto establecer la relación existente entre la presencia de aflatoxinas y el aumento de acidez libre que se observa en los aceites provenientes de semilla contaminada.

Asimismo, partiendo de la base de que todo aumento de acidez en aceites de semilla contaminada procede de la acción de lipasas fúngicas, se ha realizado el análisis de composición acídica (CGL) de los ácidos grasos libres en aceite de semilla contaminada y no contaminada, a fin de indagar la presunta especificidad de tales lipasas.

Plan de trabajo

Se dispuso el siguiente orden de trabajo :

- 1) Realizar el análisis de las muestras de las diferentes variedades de maní para detectar aflatoxinas por cromatografía en placa delgada, a fin de determinar una posible contaminación natural.
- 2) Inocular muestras de las diferentes variedades con una cepa toxicogénica de Aspergillus parasiticus (perteneciente al grupo A. flavus) e incubarlas en condiciones experimentales apropiadas para la producción de aflatoxinas.
- 3) Analizar las muestras inoculadas experimentalmente para detectar la producción de aflatoxinas, a fin de determinar la susceptibilidad o posible resistencia de las variedades estudiadas.
- 4) Como complemento a estos estudios, realizar el aislamiento e identificación de los géneros de hongos que componen la flora fúngica de las variedades de maní analizadas.
- 5) Identificar las especies de hongos pertenecientes al grupo Aspergillus flavus.
- 6) Determinar la capacidad toxicogénica de las cepas aisladas pertenecientes a las especies Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus.
- 7) Obtener los aceites de granos contaminados con A. parasiticus y de granos no contaminados, y realizar el examen analítico de los mismos, con especial referencia a los valores de número de acidez.

- 8) Realizar el examen de composición acídica (CGL) de los ácidos libres de aceites crudos procedentes de semilla contaminada y no contaminada.

Material empleado

La especie cultivada de maní (Arachis hipogaea), perteneciente al género Arachis, estrictamente sudamericano, probablemente se habría originado, según estudios realizados por A. Krapovickas³⁸, en la región de los Andes orientales en Bolivia. Según este autor "el género Arachis es muy complicado" y los trabajos realizados tratando de interpretarlo "difieren todos ellos en la delimitación de las especies y en los caracteres considerados como fundamentales para diferenciarlas".

Genetistas de diversas partes del mundo (W. C. Gregory de Estados Unidos, F. Bouffil de Senegal y V. A. Rigoni de Argentina) señalaron, a principios de la década del cincuenta, la dificultad en mejorar el rendimiento de las variedades en cultivo con las técnicas usuales: selección y cruzamientos intervarietales. Fue por eso que para disponer de una mayor variabilidad genética se organizaron diversos viajes de exploración en el área geográfica en la que se había originado esta oleaginosa, en procura de formas autóctonas con relevantes características agronómicas e industriales³⁹.

En una de esas exploraciones (Rigoni, Krapovickas y Báez) rea-

lizada en 1950, se coleccionó una nueva especie silvestre de maní en la provincia de Jujuy, que fué denominada Arachis monticola y que, cruzada con el maní cultivado, dio descendencia fértil. El material obtenido a través de esos cruzamientos posee características de buen rendimiento y resistencia a diversos factores adversos ⁴⁰. En 1959 las exploraciones adquirieron carácter de colaboración internacional, con una misión integrada por el Dr. Walton C. Gregory de la Universidad de Carolina del Norte (EE. UU.), el Ing. A. Krapovickas y el técnico de la Estación Experimental de Manfredi del INTA J. Pietrarelli. Esta misión tenía el objeto de coleccionar maníes silvestres y cultivados. De los viajes realizados entre 1959 y 1961 por territorio brasileño, paraguayo, boliviano y argentino, se obtuvo material muy valioso, tanto desde el punto de vista económico como científico. Con él se pudo estructurar, sobre bases reales, el género Arachis y establecer los distintos grupos naturales de acuerdo al sistema vegetativo (plantas anuales o perennes), características botánicas y distribución geográfica.

La mayoría de esos ejemplares se encuentran actualmente en los jardines e invernáculos de diferentes Estaciones Experimentales del mundo. En nuestro país, se trata de la Estación Experimental Agropecuaria Manfredi, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, situada en ple-

na región manisera, en la provincia de Córdoba. Según publicaciones informativas de institutos especializados (BIM*, IDIA**), además de las especies silvestres se conservan en Manfredi numerosas líneas de maníes cultivados. Algunas de ellas son muestras extraídas de cultivares conducidos de manera primitiva en lugares de origen, en los que se hallaron poblaciones de maní muy diferentes entre sí y de distinta procedencia. Desde 1944 se realizan en Manfredi trabajos de fitotecnia, tendientes a mejorar el cultivo y a la obtención de nuevas y promisorias variedades. También se llevan a cabo estudios sobre el manejo del cultivo, tratamiento de suelos en relación al maní, genética y taxonomía, y trabajos de fitopatología que comprenden el estudio de las enfermedades que afectan a la planta y la orientación para seleccionar las formas resistentes.

A esta Estación Experimental se solicitó el material necesario para la realización del presente trabajo. Se recibieron muestras de 36 variedades y líneas de cultivo de la cosecha 1974. Entre ellas figuran seis variedades inscriptas actualmente en el Registro Oficial de la Secre_

* Boletín Informativo Manisero, Publicación editada por el Instituto Agro-industrial de Oleaginosas con la colaboración técnica del INTA.

** IDIA, revista editada por el INTA.

taría de Estado de Agricultura y Ganadería de la Nación. La lista de estas variedades y su origen figuran en la Tabla 2.

También se estudiaron 20 variedades paraguayas (Tabla 3), obtenidas a través del Ministerio de Agricultura del Paraguay, cuyas características habían sido previamente estudiadas por Cattaneo y col⁴¹.

Los maníes fueron enviados con cáscara, para minimizar el riesgo de contaminación de las semillas que debían ser inoculadas.

Estudio de resistencia varietal

1) Análisis de las muestras de las diferentes variedades de maní para determinar posible contaminación natural por aflatoxinas.

La determinación de aflatoxinas en las muestras sin inocular tiene por objeto detectar una posible contaminación natural de los granos. Esto indicaría que la variedad en cuestión sería susceptible a la contaminación por aflatoxinas.

En el caso de los maníes, se ha observado repetidamente que la presencia de aflatoxinas tiene una estrecha relación con la calidad de los granos^{42, 43, 44}. Por lo tanto, para realizar estos ensayos se seleccionaron los maníes con vainas rotas, partidos descoloridos, manchados, atacados por insectos o visiblemente enmohecidos, ya que este tipo

dé material es el que, con mayor probabilidad, podrífa encontrarse naturalmente contaminado.

En las muestras analizadas se encontró, por lo general, un porcentaje relativamente bajo de granos de mala calidad.

La detección de aflatoxinas en estas muestras se realizó tal como se detalla en la Parte Experimental. Se obtuvieron resultados positivos para las variedades "Blanco Río Segundo" (324 ppb) y "Manfredi 214" (810 ppb), lo cual indica que estas dos variedades son susceptibles a la contaminación por aflatoxinas.

2) Inoculación experimental

Consistió en inocular una cierta cantidad de semillas de las diferentes variedades de maní con una suspensión de esporas de un hongo toxicogénico conocido, llevar el sistema a las condiciones óptimas para la producción de aflatoxinas, incubarlo durante un lapso adecuado y comparar luego la cantidad de toxinas eventualmente producidas sobre cada variedad.

Selección y tratamiento de las semillas previo a la inoculación experimental

En algunos de los trabajos hallados en la bibliografía^{27, 36, 37} el tratamiento previo de las semillas consiste en rehidratarlas y esterili-

lizarlas en autoclave a 121° durante 15 minutos, antes de inocularlas con la cepa del hongo toxicogénico. De tal manera se inoculan semillas no viables, muertas por calor.

En el presente trabajo las semillas no se esterilizaron previamente. Se trató de reproducir las condiciones naturales en que se encuentran los granos que pueden ser contaminados. Por este motivo se consideró conveniente adoptar otro tipo de tratamiento que mantuviera las semillas vivas, para poder observar sus mecanismos naturales de defensa, si los hubiere.

Al respecto, Diener y Davis⁴⁵ señalaron ciertas diferencias en los valores limitantes de temperatura y humedad relativa (RH) para la producción de aflatoxinas cuando trabajaban con granos esterilizados por calor y no esterilizados. Por ejemplo, en las semillas vivas no observaron producción de toxinas a 16° aún después de 84 días de haber sido inoculadas con una cepa toxicogénica. En cambio, en los manjares estériles se observó la presencia de aflatoxinas a 14° en 21 días. Los autores asociaron esta diferencia con una probable resistencia de los tegumentos intactos de las semillas vivas a la penetración y colonización por el hongo. Esta resistencia parece ser originada por la actividad fisiológica de las semillas viables que previene la invasión de hongos. Estos en

cambio, pueden colonizar rápidamente las semillas tratadas por calor.

Algo similar fué observado en los ensayos previos al presente trabajo: se esterilizaron los manifes en autoclave y se inocularon con las esporas de la cepa toxicogénica. A los tres días de incubación las semillas estaban totalmente cubiertas por una densa masa fúngica. Al inocular en las mismas condiciones las semillas viables, sólo un bajo porcentaje de éstas (aproximadamente 5-6%) presentaba crecimiento visible del hongo. Otros autores han tenido en cuenta esta circunstancia y no aplicaron tratamiento térmico^{21, 26, 35}. Si bien no detallaron, el procedimiento empleado, señalaron que la inoculación de las semillas se realizó "asépticamente".

Ensayos previos permitieron comprobar que la desinfección superficial de las vainas intactas de los manifes con hipoclorito de sodio al 5% resultaba un tratamiento adecuado. Al extraer en forma estéril los granos que se encontraban dentro de las vainas tratadas con hipoclorito y colocarlos en cámara húmeda, tal como se describe en la Parte Experimental, no se observó ningún crecimiento fúngico. Es decir, las semillas dentro de las cáscaras sanas no están contaminadas y pueden ser inoculadas con las esporas del hongo toxicogénico. Solamente en escasas oportu-

nidades se observó, luego del período de incubación de siete días, contaminación con hongos que fueron aislados e identificados en todos los casos como Rhizopus sp. El crecimiento del hongo contaminante no interfería en el desarrollo de la cepa toxicogénica ni en la producción de aflatoxinas.

Microorganismo

Los hongos productores de aflatoxinas pertenecen al grupo Aspergillus flavus, descrito por Raper y Fennell⁴⁶. Este grupo comprende, entre otras, las siguientes especies: Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus, Aspergillus tamarisii y Aspergillus oryzae y variedades tales como Aspergillus flavus var. columnaris y Aspergillus parasiticus var. globosus.

En la mayoría de los trabajos sobre aflatoxinas se mencionan como productoras de las mismas a dos especies de este grupo: Aspergillus flavus Link ex Fries y Aspergillus parasiticus Speare, que serán descritas más adelante.

Algunos investigadores han informado la producción de aflatoxinas por otras especies de Aspergillus y ciertos miembros del género Penicillium. Hodges y col.⁴⁷ informaron que Penicillium puberulum produ-

cía aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. Kulik y Holaday⁴⁸ encontraron que, además de P. puberulum, también producían aflatoxina B₁ Penicillium variable, Penicillium citrinum y Penicillium frequentans (estas dos últimas especies solamente trazas). Los mismos autores señalaron como aflatoxigénicos a ciertas cepas de A. niger, A. wentii y A. ruber.

Otras especies presuntamente involucradas en la producción de aflatoxinas son Aspergillus ostianus Wehmer (miembro del grupo Aspergillus ochraceus⁴⁹), Aspergillus oryzae⁵⁰, Aspergillus wentii⁵¹ y Aspergillus ochraceus⁵².

Estos hallazgos no pudieron ser confirmados en trabajos posteriores. Wilson y col.⁵³, no lograron reproducir los resultados de Hodges, aún trabajando con un subcultivo de Penicillium puberulum de la misma cepa empleada por éste. Wilson y col.⁵⁴, luego de analizar 121 cepas pertenecientes a 29 especies distintas, revelaron producción de aflatoxinas solamente por cepas de Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus. Estos resultados coinciden con los de otros trabajos realizados sobre numerosas cepas de Penicillium y Aspergillus^{55, 56}.

En la literatura se mencionan diversas causas que pudieron haber conducido a estos resultados erróneos⁵⁷.

Las características generales del grupo Aspergillus flavus según Raper y Fennel⁴⁶ son las siguientes:

Cabezas conidiales globosas a radiales o columnares, verde amarillento muy claro, verde amarillento vivo, castaño oliva o castaño.

Conidióforos incoloros, usualmente rugosos, aunque pueden variar de lisos o casi lisos a notablemente rugosos.

Vesículas globosas o subglobosas en la madurez en especies con cabezas grandes, permanecen en forma de clava o de botella en especies con cabezas pequeñas; fértiles sobre la mayor parte de su superficie.

Esterigmas uniseriados o biseriados, con ambas condiciones apareciendo comúnmente en la misma cepa o sobre la misma vesícula.

Conidios en la mayoría de las especies globosos o subglobosos cuando maduran, con rugosidades notorias o casi ausentes y a menudo mostrando considerable variabilidad de tamaño dentro de la especie; en otras especies elípticos y lisos o delicadamente rugosos.

Esclerocias de color castaño rojizo oscuro o castaño púrpura o negras en la madurez, globosas, subglobosas o elongadas verticalmente.

Existe cierta confusión respecto de la ubicación taxonómica de las cepas productoras de aflatoxinas dentro del grupo. Hay un gran número de cepas que tienen determinadas características (esterigmas típicamente biseriados, conidios levemente equinulados, presencia de es-

clerocias y conidióforos de paredes gruesas y rugosas) asociados con Aspergillus flavus. Un segundo grupo con características distintas (esterigmas uniseriados, conidios prominentemente equinulados, ausencia de esclerocias y cleistotecios, conidióforos generalmente con paredes lisas) está asociado con Aspergillus parasiticus. Las dificultades se presentan cuando se trata de cepas que tienen atributos de ambos grupos. Estas especies están estrechamente relacionadas y no siempre son fácilmente distinguibles por no haber marcadas diferencias entre ellas.

Es así como algunas cepas (por ejemplo ATCC 15517) son consideradas por ciertos autores como Aspergillus flavus y por otros como Aspergillus parasiticus⁵⁸. Murakami y col. clasificaron a esta cepa como Aspergillus parasiticus var. globosus⁵⁹.

A veces se utiliza el nombre Aspergillus flavus para designar colectivamente a distintos aislados, cepas o especies pertenecientes al grupo Aspergillus flavus. En este trabajo el término A. flavus será utilizado para nombrar genéricamente a las especies productoras de aflatoxinas.

No todas las cepas de A. flavus y A. parasiticus producen aflatoxinas y entre las cepas productoras existe una amplia variación respecto de la cantidad de aflatoxinas producida "in vitro" sobre sustratos naturales.

Parece ser que las cepas identificadas como A. parasiticus

son productores más potentes de aflatoxinas que A. flavus²⁷.

Las diferentes cepas varían también en cuanto a su capacidad para producir las cuatro aflatoxinas. En general, según los datos hallados en la bibliografía, las cepas de A. flavus producen las toxinas de tipo B pero no las G, mientras que A. parasiticus produce todas^{27,44,60,61}.

Se ha observado⁶² que repetidas transferencias sobre medios sintéticos disminuyen la capacidad de producción de aflatoxinas (la cual puede inclusive llegar a perderse), así como el incremento de la producción a través de repetidas transferencias sobre sustratos naturales. La capacidad de producir aflatoxinas parece ser relativamente estable en algunas cepas (NRRL 2999, Ala-6, Ala-1) cuando crecen sobre una serie de sustratos naturales o sintéticos⁶³.

En el presente trabajo se empleó como microorganismo productor de aflatoxinas Aspergillus parasiticus NRRL 2999 por ser uno de los más potentes productores de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. Esta cepa fue aislada en 1961 de maníes provenientes de Uganda por P. K. C. Autswick³ quien la designó V 3734/10 y la depositó en el Commonwealth Mycological Institute donde se la designó CMI 91019 b. Esta cepa es muy estable y produce consistentemente altos niveles de aflatoxinas, especialmente B₁, aún después de varias transferencias⁶⁴.

El hongo fué cultivado y mantenido en agar papa glucosado.

La composición de este medio figura en la Parte Experimental, donde también se detalla el procedimiento utilizado para obtener el inóculo con una concentración de 10^6 esporas por ml.

Determinación de las condiciones experimentales para la inoculación

Es sabido que la contaminación de un sustrato alimenticio por cepas de hongos toxicogénicos no implica necesariamente la presencia de aflatoxinas. Se ha observado que no hay paralelismo entre el crecimiento abundante del hongo y altas concentraciones de estos metabolitos. Por ejemplo, Diener y Davis⁴⁵ empleando manifes viables como sustrato, observaron profuso crecimiento y esporulación de Aspergillus flavus a temperaturas entre 41 y 45°, pero no formación de aflatoxinas.

La producción de grandes cantidades de toxinas depende no sólo de la capacidad de la cepa para sintetizarlas, sino también de una serie de factores o condiciones de crecimiento entre las cuales las más importantes son la humedad, la temperatura, la composición del sustrato, la presencia de oxígeno y la microflora competitiva.

Para realizar la inoculación experimental se trabajó con un sistema constituido por los manifes pertenecientes a cada variedad y el

hongo toxicogénico, que debió ser colocado en todos los casos en las mismas condiciones. Estas deberían ser, además, las óptimas para la producción de toxinas. Fué preciso establecer, entonces, el contenido de humedad, la temperatura y el tiempo de incubación.

Se trabajó en condiciones de esterilidad, de manera que la flora fúngica competitiva quedó eliminada.

Humedad

Uno de los factores más importantes que determinan el crecimiento del hongo y la producción de aflatoxinas es el contenido de humedad del sustrato o la humedad relativa de la atmósfera que lo rodea.

Aspergillus flavus ha sido clasificado como un hongo mesofito, porque tiene un requerimiento mínimo de humedad para crecer entre 80 y 90% RH.

Austwick y Ayerst³ determinaron la humedad relativa en equilibrio para maníes con diferente contenido de humedad, obteniendo los siguientes valores:

<u>Humedad relativa</u> <u>en equilibrio a</u> <u>30° (%)</u>	<u>Contenido de humedad</u> <u>% en peso</u>	
	<u>Granos</u>	<u>Harina</u>
98	30,5	--
95	20,0	--

<u>Humedad relativa</u> <u>en equilibrio a</u> <u>30° (%)</u>	<u>Contenido de humedad</u> <u>% en peso</u>	
	<u>Granos</u>	<u>Harina</u>
90	14,3	23,5
85	11,3	19,0
80	9,3	16,3
75	8,0	14,0
70	7,0	12,3

Los trabajos realizados por Diener y Davis^{45, 65} señalan como valor limitante para la producción de aflatoxinas en maníes, ya sea viables o esterilizados, un valor de RH de 85% a 30°. Según Autswick y Ayerst³, este valor correspondería aproximadamente a un contenido de humedad de 11%. Para un almacenamiento seguro de los maníes se recomienda disminuir rápidamente el contenido de humedad de las semillas del valor que tienen al ser cosechadas (35-55%) a menos de 9%^{66, 67}.

Cuando se trata de producir aflatoxinas en el laboratorio, haciendo crecer el hongo toxicogénico sobre sustratos naturales, varios autores han observado una buena producción sobre sustratos con un contenido de humedad entre 20% y 25%^{21, 68, 69}.

Se realizó la siguiente experiencia para determinar el contenido de humedad adecuado para el crecimiento del hongo y la producción de toxinas. Se inocularon semillas secas (sin agregado de agua) y con diferentes

cantidades de agua (5ml y 10 ml de agua para 20 gramos de maíz) con una suspensión de esporas de Aspergillus parasiticus NRRL2999 y se incubaron a 25° durante 7 días.

Esta experiencia se realizó con muestras de las variedades "Blanco Río Segundo" y "Colorado Correntino".

Las muestras sin rehidratar no mostraron crecimiento del hongo y al realizar el análisis para detectar aflatoxinas, éste resultó negativo. Evidentemente el contenido de humedad de las muestras estudiadas era inferior al valor limitante para el crecimiento del hongo. La determinación del contenido de humedad, según se describe en la Parte Experimental, realizada sobre muestras de estas dos variedades dio valores de 3,02% (variedad "Blanco Río Segundo") y 5,35% (variedad "Colorado Correntino").

En las muestras hidratadas con 10 ml de agua se observó que al cabo del período de incubación, la mayoría de las semillas habían germinado. El análisis para detectar aflatoxinas dio resultados inconsistentes. En casi todas las muestras la producción de aflatoxinas fué escasa o nula. Esta observación concuerda con lo encontrado por Lindsey y Turner⁷⁰, quienes señalan que los embriones de las semillas de maíz producen sustancias inhibitoras del crecimiento de Aspergillus flavus y Trichoderma viride. Estos investigadores observaron que al colocar semillas intactas,

testas y embriones de maní sobre cajas de Petri con agar Czapek y agar papa inoculado con esporas de A. flavus y T. viride, se producía inhibición del crecimiento de estos hongos alrededor de los embriones. Las sustancias inhibidoras fueron extraídas de los embriones con acetona. Los cuatro compuestos aislados por cromatografía en placa mediante la técnica de bioautografía, fueron analizados y tres de ellos presentaban propiedades de fenoles. Lindsey y Turner sugieren que estas sustancias presentes en los cotiledones juegan un rol activo en la protección de los embriones de la contaminación fúngica. La invasión de hongos antes de que las semillas maduren no es frecuente. Probablemente el período más propicio para la contaminación por mohos esté comprendido desde la remoción de los maníes del suelo hasta antes del secado. De ahí la importancia de un secado rápido por debajo de los valores antes señalados. Los maníes hidratados con 5 ml de agua para 20g de semilla resultaron ser los sustratos más adecuados para la inoculación.

La determinación del contenido de humedad de dos de estas muestras dio los siguientes resultados: para la variedad "Blanco Río Segundo" el valor fue 16,98% y para "Colorado Correntino 23,25%.

Según los datos de la bibliografía³, estos valores de humedad corresponden a valores de RH superiores a 90%, totalmente favorables para la producción de aflatoxinas por Aspergillus flavus en maní.

Temperatura y tiempo

La temperatura parece ser un factor menos crítico que la humedad, tanto para el crecimiento del hongo como para la producción de aflatoxinas. Diener y Davis^{45, 65}, estudiaron las condiciones limitantes para la producción de aflatoxinas en maní. Estos autores, trabajando en condiciones óptimas de RH (98%), señalaron como temperaturas extremas para la producción de aflatoxinas en maníes estériles $13^{\circ} \pm 1^{\circ}$ y $41,5^{\circ} \pm 1,5^{\circ}$. Trabajando con maníes viables la temperatura limitante inferior fue $15^{\circ} \pm 1^{\circ}$.

Estos valores son afectados por la humedad, presencia de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y otros factores.

En cuanto a la temperatura óptima para la producción de la toxina, según Diener y Davis⁴⁵ es de 25° con períodos de incubación de 7 a 9 días.

Schroeder y Hein⁷¹ observaron alta producción de aflatoxinas en maníes y otros sustratos a temperaturas variables entre 20° y 35° con períodos de incubación de 7 a 15 días. También señalaron como temperatura óptima 25° .

Schindler y col⁷², ensayaron diversas temperaturas (2° , 7° , 13° , 18° , 24° , 29° , 35°) con períodos de incubación de 5 días y encontraron

máxima producción de aflatoxinas en medio de cultivo (agar mosto de malta) a 24°. Además observaron que la temperatura óptima para la producción de aflatoxinas no coincide con la temperatura óptima de crecimiento para Aspergillus flavus, que ha sido determinada entre 30° y 35°⁶⁶. La misma observación fue realizada por Sorenson y Col⁷³, trabajando con arroz como sustrato. La temperatura de incubación también influye sobre las cantidades relativas de cada una de las aflatoxinas producidas⁶⁵.

En base a estas informaciones, las muestras convenientemente rehidratadas e inoculadas con la suspensión de esporas de Aspergillus parasiticus NRRL 2999 (10^6 esporas/ml) se incubaron en estufa a 25° ± 1° durante 7 días.

Al cabo de este período las muestras fueron esterilizadas en autoclave (15 minutos a 120°) para inactivar las esporas. Teniendo en cuenta la estabilidad de las aflatoxinas al calor, que ha sido estudiada detalladamente⁷⁴, se estima que la cantidad de estos metabolitos presente en las muestras no se modificó apreciablemente durante el breve tratamiento térmico empleado para destruir las esporas del hongo.

3) Análisis para la detección de aflatoxinas en las muestras inoculadas

El análisis para la detección de aflatoxinas se realizó mediante extracción con solventes y cromatografía en capa delgada, según el método que se detalla en la Parte Experimental.

Las muestras se sometieron en primer lugar al análisis cualitativo, que permitió observar la presencia de grandes cantidades de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ producidas por Aspergillus parasiticus NRRL 2999, en las condiciones anteriormente mencionadas.

El análisis cuantitativo se realizó sobre algunas de las muestras inoculadas y los resultados obtenidos figuran en la Tabla 4.

Como puede observarse, en todas las variedades la cantidad de aflatoxina B₁ producida es del orden de 10^4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ o superior.

Se trata de concentraciones muy elevadas (el límite máximo sugerido para granos de cereales y oleaginosas oscila alrededor de 20-30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

Las diferencias entre las cantidades de toxina producidas sobre cada variedad no son significativas como para determinar que alguna de ellas sea más susceptible o resistente que otras, ya que aún en aquellas variedades en las que se observó menor producción de toxina los valores detectados fueron sumamente altos.*

* En los sustratos naturalmente contaminados no se detectan niveles tan altos de aflatoxinas. Es muy poco probable que los granos se encuentren en las condiciones ambientales óptimas, como las que fueron establecidas en las presentes experiencias, por lo que la contaminación fúngica natural generalmente no llega a ser tan intensa como la de las muestras inoculadas experimentalmente.

En vista de los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de estas muestras se decidió, para las restantes, realizar solamente el análisis cualitativo, mientras se observaran en las placas cromatográficas manchas fluorescentes de tal intensidad. De esta manera se pudo realizar un "screening" más amplio, es decir, analizar un número mayor de variedades.

En todas las placas se sembró el extracto obtenido de la variedad "Manfredi 218" (sobre la que se había producido la menor cantidad de toxina), a los efectos de realizar la comparación visual de las demás muestras con ésta. En todos los casos la cantidad de aflatoxina producida fue del mismo orden o superior a la de la muestra testigo.

Por lo tanto puede afirmarse que sobre todas las variedades analizadas, en las condiciones del presente trabajo, por lo menos se producían 20.000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxina B_1 , es decir, ninguna de ellas fué capaz de inhibir la producción de aflatoxinas por Aspergillus parasiticus.

Estudio de la micoflora de las variedades de maní analizadas

Además de las condiciones ambientales externas, entre las cuales la temperatura y la humedad se han mencionado como las más importantes, hay otros factores que influyen en la posible contaminación por aflatoxinas de un determinado sustrato. Según Schroeder y Boller ⁴⁴ dos parámetros a tener en cuenta son la prevalencia de cepas productoras de aflatoxinas en la flora fúngica del sustrato y su relativa toxicogenicidad.

En el presente trabajo se ha encarado un estudio de los hongos contaminantes de las variedades de maní analizadas, poniendo especial atención en el aislamiento e identificación de aquellos pertenecientes al grupo Aspergillus flavus.

1) Aislamiento e identificación de los hongos contaminantes

De las semillas de oleaginosas cultivadas, la de maní es considerada la más delicada y susceptible de alteraciones, debido tanto a las condiciones ambientales como por el manipuleo a que se la somete desde que se la extrae de la tierra hasta el momento de la siembra ⁷⁵.

Desde el punto de vista de la contaminación fúngica cabe señalar que, en cada una de las etapas de su obtención, puede ser invadida por diferentes tipos de hongos que, según la clasificación propuesta por Christensen ⁷⁶ para cereales y productos similares, se pueden dividir en tres grupos:

- a) Hongos de campo: son los que invaden el pericarpio de las semillas cuando éstas están desarrollando en el campo. Requieren un elevado contenido de humedad (aprox. 25%) para crecer. Dentro de este grupo se puede mencionar a Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Helminthosporium, etc.
- b) Hongos del almacenamiento: están representados casi exclusivamente por Aspergillus y Penicilium. Crecen a niveles de humedad más bajos que los anteriores (aprox. 15%), es decir, les son propicias las condiciones ambientales típicas de la cosecha y el almacenamiento.
- c) Hongos que atacan sustratos en estado de descomposición avanzada (Fusarium, Papulospora, etc). Requieren niveles de humedad semejantes a los del primer grupo. No interesan demasiado desde el punto de vista del presente trabajo.

Las condiciones ambientales en cada una de las etapas (siembra, cosecha, secado, almacenamiento, transporte) determinan que predomine uno u otro grupo.

En el caso particular del maíz, las semillas cumplen todo el período de formación y madurez bajo tierra, protegidas por una gruesa cáscara que las aísla y resguarda de las oscilaciones bruscas de temperatura y humedad. Una vez alcanzada la madurez se cosecha la planta entera. En esta etapa la semilla es relativamente resistente al ataque de los hongos, si bien en algunas oportunidades se ha observado contamina-

ción por aflatoxinas antes de la recolección, generalmente debido a condiciones ambientales adversas. Por ejemplo, cuando los frutos que han alcanzado la madurez completa se encuentran en estado de ser cosechados pueden sobrevenir días de persistentes lluvias precedidos por un período de sequía. Las semillas, al recibir exceso de humedad, se hinchan y al presionar sobre las paredes la cáscara se raja o se abre, quedando los granos expuestos en contacto con la tierra, lo cual favorece notablemente la contaminación fúngica de los mismos.

Una etapa crítica es la que sigue inmediatamente a la cosecha, cuando las plantas arrancadas se acondicionan para su secado, el cual, según el sistema empleado, puede llevar de pocos días a varias semanas. Una vez removidas del suelo, las semillas comienzan a secarse dentro de la cáscara. Al pasar el fruto de su ambiente subterráneo natural al medio aéreo, las bruscas oscilaciones de humedad, sequedad y temperatura lo predisponen a sufrir diversas alteraciones. Por ejemplo, si recibe intensa radiación solar, con elevada temperatura y aire seco, al resecarse la cáscara se torna quebradiza y ya no cumple su importante función protectora de las semillas.

Con el posterior secado la humedad pasa a ser el principal factor determinante del crecimiento de los hongos y los manifes pueden ser atacados por los "hongos del almacenamiento", que, como se ha visto, son relativamente xerofílicos.

Hay dos sistemas que son comúnmente empleados en nuestro país para el oreado del maíz en el campo, inmediatamente después de la cosecha. Uno es el acondicionamiento en parvines, montículos de tamaño variable y forma cónica para permitir el escurrimiento del agua. El otro sistema es el que se efectúa directamente en el terreno; consiste en formar un cordón reuniendo varias hileras de maíz recién arrancado. Una vez oreado y seco se procede al descapotado (separación del fruto de la planta) o descapotado y descascarado simultáneamente, mediante máquinas especialmente adaptadas. Con este último sistema se exponen muchos más frutos en contacto con el suelo húmedo, aumentando los riesgos de enmohecimiento, como así también los de "manchado", "brotado" y "ar-dido" de los granos.

En esta etapa el maíz puede ser invadido por diversos hongos. Los géneros más frecuentemente mencionados en la bibliografía son Alter-naria, Aspergillus, Fusarium, Cladosporium, Mucor, Penicillium, Rhi-zopus y Trichotecium ^{3, 75, 77}.

Aspergillus, Penicillium y Rhizopus son los hongos invasores post-cosecha que predominan, mientras que entre los hongos de campo, causantes de la podredumbre de raíces y frutos en la planta, se mencionan diversas especies de Fusarium (F. solani, F. oxysporum, F. sporotrichioides), Phoma, Rhizotocnia (R. solani), Sclerotium (S. rolfsii, S.

bataticola), Sclerotinia, Macrophomina (M. phaseoli), etc. ^{3, 77, 78}.

Selección y tratamiento de las semillas para realizar el estudio de la flora fúngica.

Dado que la presencia de hongos es más frecuente en granos de baja calidad (dañados mecánicamente o por insectos, rotos, partidos, descoloridos, etc), para esta parte del trabajo se emplearon, al igual que para el análisis directo de aflatoxinas, este tipo de semillas.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

De las muestras originales de cada variedad se eligieron los frutos deteriorados y los que presentaban cáscaras rajadas o agujereadas por insectos. Se prepararon simultáneamente dos muestras de 20 gramos cada una de semillas extraídas de tales frutos, que fueron colocadas en sendos Erlenmeyers estériles.

Sobre una de estas muestras se realizó directamente el análisis de aflatoxinas, tal como se ha indicado anteriormente, para detectar una posible contaminación natural, con los resultados que ya han sido discutidos.

A la otra muestra se le agregó la cantidad de agua necesaria para permitir el desarrollo de las esporas fúngicas presentes (5ml de agua para 20 gr de maní, que equivalen a 40-50 semillas). La muestra húmeda

se incubó a 25° y se realizaron observaciones periódicas (cada 24 horas) de los hongos que crecían sobre las semillas.

Se aislaron todos los hongos macroscópicamente diferentes. Aquellos que por su aspecto macroscópico podrían pertenecer al grupo Aspergillus flavus fueron purificados mediante resiembras en placas de agar Czapek y, una vez obtenidos al estado de cultivo puro, se estudiaron sus características microscópicas por medio de la técnica de microcultivo (ver Parte Experimental) y se mantuvieron en agar papa para determinar posteriormente su capacidad toxicogénica.

Una vez realizado el aislamiento de los hongos, las muestras de semillas de maíz de las cuales provenían estos microorganismos fueron esterilizadas en autoclave (15 minutos a 120°) y se practicó sobre ellas el análisis cualitativo para la detección de aflatoxinas, para poner en evidencia la presencia de estos metabolitos si alguna de las cepas aisladas los hubiere producido.

Los resultados de estas experiencias figuran en la Tabla 5.

Se puede observar que:

- a) Las dos variedades que habían resultado positivas en el análisis directo de las muestras, mostraron también presencia de aflatoxinas y A. flavus en las muestras húmedas.
- b) Al elevar el contenido de humedad de las muestras a un valor apropiado

para el desarrollo de los hongos y la producción de las toxinas (aprox. 25%), se detectaron aflatoxinas en 15 de las 54 variedades cuyo análisis directo (muestra seca) había resultado negativo.

c) De todas estas variedades, excepto de una, se pudieron aislar hongos pertenecientes al grupo Aspergillus flavus.

d) También se aislaron cepas del grupo A. flavus en algunas muestras en las cuales no se detectó presencia de aflatoxinas.

Identificación de los hongos aislados de las diferentes variedades estudiadas

En las muestras de casi todas las variedades se observaron hongos pertenecientes a los siguientes géneros: Aspergillus, Penicillium y Rhizopus.

Dentro del género Aspergillus se encontraron cepas pertenecientes a los grupos Aspergillus flavus, Aspergillus niger y Aspergillus ochraceus con las frecuencias que figuran en la Tabla 6.

Hay que señalar que las muestras fueron seleccionadas entre los maníes de baja calidad, por lo cual estos datos no pueden tomarse como valores de incidencia real de los diferentes hongos que componen la microflora del maní, pero sí pueden dar una idea aproximada de los tipos de hongos contaminantes y la frecuencia con que se los puede encontrar. Lo que resulta más interesante desde el punto de vista del presente trabajo es el porcentaje bastante alto de muestras contaminadas con hongos potencialmente toxicogénicos (grupo Aspergillus flavus).

2) Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas del grupo "Aspergillus flavus"

En 23 de las 56 muestras analizadas se observó la presencia de Aspergillus pertenecientes al grupo flavus (Tabla 6).

Estas cepas se aislaron a través de sucesivas resiembras en agar papa y la identificación de la especie se realizó por observación de las características microscópicas mediante la técnica de microcultivo (ver Parte Experimental), según la clave de Raper y Fennell⁴⁶.

La cepa productora de aflatoxinas de la muestra de la variedad paraguaya denominada "Negrito" no pudo ser aislada por estar contaminada con Rhizopus. Este contaminante invade totalmente las placas, impidiendo en este caso el aislamiento de Aspergillus.

Por lo tanto se trabajó con 22 cepas aisladas, pertenecientes al grupo Aspergillus flavus.

Según la técnica de Shotwell y col.⁶⁴, empleando arroz como sustrato, se determinó la capacidad toxicogénica de estas cepas con los siguientes resultados:

- a) Un alto porcentaje de las cepas (72,7%) resultaron ser productoras de aflatoxinas, (Tabla 7). Los datos encontrados en la bibliografía respecto del porcentaje de A. flavus toxicogénicos son muy variables;

parece ser que los valores dependen tanto del sustrato como de la región geográfica. Numerosos investigadores han coleccionado cepas del grupo Aspergillus flavus aisladas de sustratos naturales y han determinado la producción de aflatoxinas por estos microorganismos sobre diferentes medios de cultivo. Los porcentajes de cepas toxicogénicas informados en Inglaterra⁷⁹ o Estados Unidos^{80, 81} son mayores que los encontrados, por ejemplo, en la India^{82, 83}.

Un sumario de los datos de investigaciones realizadas en 6 países muestra que de un total de 1390 cepas aisladas pertenecientes al grupo A. flavus, 803, o sea aproximadamente el 60%, resultaron productoras de aflatoxinas⁸⁴.

Se puede concluir que las cepas toxicogénicas son componentes normales de la micoflora del suelo, aire, semillas y forrajes de diversas partes del mundo.

Lo mismo puede afirmarse respecto del maíz que se cultiva en nuestro país y en el Paraguay, en vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

b) Respecto del tipo de aflatoxinas producidas, se ha observado que algunas de las cepas producen aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, mientras que otras solamente producen aflatoxinas B₁ y B₂ (Tabla 8).

Las cepas aisladas de las variedades paraguayas solamente producen toxinas de tipo B.

Como ya se ha mencionado, en general se asocian las cepas productoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ con Aspergillus parasiticus, mientras que la mayoría de las cepas productoras de aflatoxinas B₁ y B₂ (que no producen las toxinas de tipo G) pertenecen a la especie Aspergillus flavus.

Cuando se trata de relacionar el tipo de aflatoxinas producidas con los caracteres morfológicos y culturales de las cepas toxicogénicas aisladas en el presente trabajo, se obtiene buena concordancia con los datos hallados en la literatura.

En efecto: las cepas productoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, según sus características morfológicas y culturales, pertenecen a la especie A. parasiticus, ya que presentan:

- color verde oscuro de los cultivos en agar papa
- esterigmas monoseriados
- conidios prominentemente equinulados

En cambio las cepas productoras de aflatoxinas B₁ y B₂ presentan características de A. flavus:

- colonias color verde claro o verde amarillento
- esterigmas monoseriados o biseriados
- conidios más pequeños, con equinulaciones mucho menos notorias.

Estas características se ilustran en las figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

Las cepas no productoras de aflatoxinas presentan características de la especie Aspergillus flavus.

Resumiendo:

Desde el punto de vista de la contaminación fúngica cabe destacar:

- 1) Presencia de cepas toxicogénicas en el 30% de las muestras analizadas
- 2) Concordancia con lo expuesto en la bibliografía en cuanto a la relación entre caracteres morfológicos y culturales y el tipo de aflatoxinas producidas.
- 3) Presencia de ambas especies toxicogénicas (A. flavus y A. parasiticus) en las muestras de maíz de nuestro país.
- 4) Presencia únicamente de A. flavus en las muestras de maíz paraguayo analizadas.

Estudio sobre los aceites de semillas de maní

1) Sobre el aumento de acidez libre de los aceites de semilla de maní contaminada por "Aspergillus flavus"

Según Hutchinson⁸⁵ los granos, como todo material biológico, se deterioran por estacionamiento (pérdida de poder germinativo, aumento de acidez libre en los componentes grasos y decrecimiento en los contenidos de azúcares no reductores). El incremento de los tenores de humedad y los aumentos de temperatura aceleran el deterioro, especialmente el primero; de ahí que tales procesos puedan ser retardados por secado hasta lograr niveles adecuados de humedad y/o por estacionamiento a bajas temperaturas. Cuando el contenido de humedad del grano está en equilibrio con un valor de RH 75%, las transformaciones rápidas que ocurren se asocian con un crecimiento activo de hongos, de modo tal que el rol de las enzimas propias del grano o semilla como agentes de deterioro pasa desapercibido. Con valores de RH inferiores a 75% en equilibrio con la humedad propia de la semilla, la actividad fúngica disminuye: de ahí que granos que contengan menos de 12% de humedad se conserven sanos por largos períodos. Sin embargo, aún así, ocurre pérdida de poder germinativo, proceso que sucede más rápidamente a medida que aumenta el contenido acuoso, aún en ausencia de hongos.

Se ha probado que trigo estacionado por varios meses en atmósfera de nitrógeno, con tenores acuosos comprendidos entre 13% y

18% y a 20-30°, experimenta pérdida de valor germinativo que se acompaña con un incremento de la acidez libre de la materia grasa que contiene, a pesar de la ausencia de hongos. Se sugiere que la liberación de ácidos grasos se debe, por lo tanto, a la acción de componentes propios del grano y a la de lipasas fúngicas. Cuando el contenido acuoso es inferior al 15% y la temperatura oscila alrededor de 30° ocurre un lento incremento de la acidez libre de la materia grasa, probablemente, en su mayor parte, por acción de lipasas propias del trigo. A mayores contenidos acuosos son las lipasas fúngicas las responsables de la liberación de ácidos grasos.

Las consideraciones expuestas para el caso del grano de trigo se vieron confirmadas durante la realización de este trabajo operando sobre granos de maíz inoculados con esporas de Aspergillus flavus.

En la Tabla 9 figuran los valores de humedad de semilla estacionada de las variedades "Blanco Río Segundo" y "Colorado Correntino". Sobre la misma se determinaron los contenidos en aceites crudos por agotamiento con hexano técnico (ver Parte Experimental) y sobre éstos se determinaron los valores de acidez libre, obteniendo cifras sumamente bajas (0,57 mg KOH/g y 0,78 mg KOH/g, respectivamente).

Desde que para inocular Aspergillus flavus y favorecer su desarrollo debe incrementarse el contenido acuoso, éste se llevó a un valor muy superior a los anteriores. En el caso de la variedad "Blanco

Río Segundo" (la primera que se sometió a esta experiencia) el incremento del contenido acuoso y la inoculación con esporas del hongo fueron simultáneos. Por el contrario, operando con la variedad "Colorado Correntino", se incrementó el valor de contenido acuoso sin adición de esporas y en partida aparte se incrementó el contenido acuoso y se adicionaron esporas en forma simultánea.

En todos los casos se procedió a una incubación durante siete días a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ y posteriormente (previa molienda, en presencia de cantidad suficiente de sulfato de sodio anhidro, ver Parte Experimental), se procedió a la extracción de los aceites crudos con hexano técnico y a la determinación de los valores de rendimiento y de acidez libre, que figuran en la Tabla 9.

Las cifras correspondientes a la variedad "Blanco Río Segundo" señalan que no hubo una significativa variación del rendimiento en aceite, expresado sobre sustancia seca; en cambio, sí ocurrió un notable incremento en el valor de acidez libre del aceite procedente de la semilla contaminada con Aspergillus flavus (~ 12 veces superior).

La experimentación operada sobre la variedad "Colorado Correntino" (incubación a mayor contenido acuoso en ausencia de A. flavus) mostró que el incremento de acidez del aceite de extracción fué muy poco significativo respecto del correspondiente al del aceite de la semilla normal (1,19 vs. 0,78 mg KOH/g).

Por el contrario y para un valor de contenido acuoso similar, el aumento de acidez del aceite procedente de semilla contaminada fué notablemente superior (13,06 mg KOH/g; \sim 16 veces mayor).

Este procedimiento pone bien en claro que el aumento de acidez de los aceites ha sido casi totalmente dependiente de la actividad de lipasas fúngicas.

2) Sobre la influencia del contenido acuoso de la semilla y de la presencia de "Aspergillus flavus" en los valores de composición acídica de los ácidos libres de aceites de maní.

La Tabla 9 reveló que las actividades lipolíticas de A. flavus eran sin duda determinantes de los aumentos de acidez de aceites de maní contaminado con ese microorganismo.

La especificidad de lipasas de distinta naturaleza ha sido de amplia consideración en lo que respecta a su intervención en la liberación de ácidos grasos que integran triglicéridos. Alguna, como la lipasa pancreática, que ha sido obtenida en forma homogénea (PM cercano a 42.000) actúa preferentemente sobre las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos, liberando los ácidos en ellas esterificados y produciendo una acumulación de los 2-monoglicéridos⁸⁶. No todas las lipasas exhiben especificidad significativa en relación a estas posiciones y así, la lipasa del grano de ricino cataliza la hidrólisis simultánea en las tres posiciones y a la

misma velocidad.

Carpenter y col⁸⁷. estudiando la distribución de los ácidos en las moléculas de glicéridos de numerosos aceites expresamente seleccionados, concluyeron que 18:1 y 18:2 se encuentran principalmente esterificados en la posición 2 de la glicerina, la cual resulta ocupada solamente por cantidades menores de otros ácidos. Ello, de acuerdo con la regla que establece que en los aceites vegetales 18:2 se esterifica preferencialmente en la posición 2, mientras los ácidos saturados lo hacen en las posiciones 1 y 3.

Kavanagh y col⁸⁸. mencionan que la mayoría de las lipasas de origen microbiano actúan sobre las posiciones 1, 3 de los triglicéridos y teniendo en cuenta la significativa actividad lipolítica del Aspergillus flavus, resultó de interés verificar si también este microorganismo manifestaba esa misma preferencia.

A tal fin se estudiaron (ver Parte Experimental) las composiciones acídicas de los aceites de extracción (hexano) de semilla de maíz de las variedades "Blanco Río Segundo" y "Colorado Correntino" ya mencionadas, así como (en el caso de la variedad "Colorado Correntino") del aceite extraído de semilla humectada e incubada a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ durante 7 días, y la de los aceites extraídos de semillas de ambas variedades incrementadas en su contenido acuoso e incubadas en presencia de Aspergillus flavus.

Los tres tipos de aceites se liberaron de sus ácidos libres por disolución en éter etílico y neutralización con solución diluída de KOH en etanol (fenolftaleína) y extracción acuosa una vez lograda la neutralidad. De los líquidos acuosos reunidos se liberaron los ácidos por acidificación (heliantina), que se extrajeron por éter etílico en cada caso, examinándolos por CGL a través de sus ésteres metílicos (ver Parte Experimental).

Las Tablas 10 y 11 resumen las composiciones acídicas (% de ácidos totales) de los aceites de semilla tal cual, de los aceites de semilla de ambas variedades procedentes de grano incrementado en contenido acuoso e incubado en presencia de A. flavus y del procedente de grano de la variedad "Colórado Correntino" incrementado en contenido acuoso e incubado en ausencia de dicho microorganismo. También figuran las composiciones acídicas de los respectivos ácidos libres separados de cada aceite en particular.

Puede observarse que las composiciones acídicas de los ácidos libres son, en todos los casos, de mayores concentraciones en ácido palmítico y en ácido esteárico que las de los aceites respectivos.

Asimismo es notoria la mayor concentración en ácido oleico de los ácidos libres aislados de los aceites procedentes de semillas incubadas en presencia de A. flavus, no así en los procedentes de la incubación de semilla incrementada en contenido acuoso y en ausencia de este microorganismo o en la correspondiente a los ácidos libres de los

aceites procedentes de semilla tal cual.

Nótase también la sensible disminución en la concentración de ácido linoleico en las fracciones de ácidos libres de los aceites procedentes de semillas incubadas en presencia de A. flavus. Estas verificaciones experimentales llevan a concluir que la actividad lipolítica conjunta de A. flavus provee cierta especificidad por las posiciones 1, 3 (mayores concentraciones de 16:0, 18:0 y 18:1 y menores de 18:2 en las fracciones de ácidos libres respectivas).

P A R T E I I I

P A R T E E X P E R I M E N T A L

Estudio de resistencia varietal

- 1) Materia prima
- 2) Selección y tratamiento de las semillas
- 3) Preparación del inóculo
- 4) Inoculación
- 5) Análisis para la detección de aflatoxinas

Estudio de la micoflora de las variedades de maní analizadas

- 1) Aislamiento e identificación de los hongos contaminantes
- 2) Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus

- 3) Medios de cultivo empleados

Estudios sobre los aceites de semilla de maní

- 1) Aislamiento de aceites crudos
- 2) Determinación de los valores de acidez libre
- 3) Composiciones acídicas de los aceites
- 4) Composiciones acídicas de los ácidos grasos libres de los aceites crudos

Estudio de resistencia varietal

1) Materia prima

Se dispuso de frutos maduros de maní de 36 variedades diferentes cuyos nombres y origen figuran en la Tabla 2, cosechados en 1974 en la zona manisera de la provincia de Córdoba. Entre las variedades estudiadas figuran las seis inscriptas oficialmente como variedades comerciales y diversas líneas de cultivo que se mantienen en la Estación Experimental de Manfredi del INTA.

Asimismo se dispuso de muestras de 20 variedades del Paraguay, cuyos nombres figuran en la Tabla 3, pertenecientes a la cosecha 1975/76.

2) Selección y tratamiento de las semillas

Los maníes se recibieron con cáscara. En primer término se procedió a un exámen cuidadoso de los frutos, seleccionándolos de diferente manera según la experiencia a que estuvieran destinados.

a) Selección de las semillas para el análisis directo a fin de determinar posible contaminación natural por aflatoxinas

En este caso se trabajó con aquellos frutos que presentaban las cáscaras rotas, rajadas o con signos visibles de haber sido atacadas por insectos. Se colocaron 100 g de las semillas provenientes de tales frutos en Erlenmeyers estériles de 500 ml y se procedió a la detección de

aflatoxinas tal como se detalla más adelante.

b) Selección y tratamiento de las semillas para la inoculación experimental.

Se separaron de cada muestra los frutos que presentaban las cáscaras intactas, los cuales fueron desinfectados superficialmente con una solución de ClO_2 al 5% y enjuagados con agua estéril. Luego se secaron en el ambiente estéril de la cámara de siembra sobre una hoja de papel de filtro previamente esterilizada por exposición a la luz ultravioleta. Las semillas fueron extraídas operando en forma estéril, con pinzas previamente embebidas en alcohol y flameadas en la llama. Se tuvo cuidado de no dañar los tegumentos seminales. Las semillas se colocaron en Erlenmeyers estériles de 500 ml. Se trabajó con 40-50 semillas, según la variedad, lo cual equivale aproximadamente a 20 g de maní.

Para comprobar la esterilidad de las semillas obtenidas de esta manera se tomaron 4 ó 5 maníes de cada variedad y se colocaron en cámara húmeda. Esta consistía en una caja de Petri estéril en cuyo interior se encontraba un papel de filtro del diámetro de la caja.

Se agregó agua estéril en cantidad suficiente para humedecer el papel, de manera de tener un ambiente apropiado para el desarrollo de las esporas fúngicas. Se incubaron en estufa a $25^\circ \pm 1^\circ$

durante 7 días, al cabo de los cuales no se observó ningún tipo de crecimiento fúngico.

3) Preparación del inóculo

Para la inoculación de las diferentes variedades de maní se trabajó con una cepa de Aspergillus parasiticus (NRRL 2999), potente productor de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

El hongo fué mantenido en agar papa y repicado periódicamente (cada 15-20 días) para mantener su viabilidad.

Según los datos hallados en la bibliografía 22, 26, 27 se decidió emplear una suspensión de esporas de una concentración de 10⁶ esporas/ml. Para obtener dicha concentración se trabajó de la siguiente forma: a un cultivo de Aspergillus parasiticus NRRL 2999 en tubo inclinado de agar papa, incubado en estufa a 25° ± 1° durante 7 días, se agregaron 5 ml de solución salina. Con el ansa se desprendieron las esporas, agitando hasta obtener una suspensión homogénea. De ésta se hicieron diluciones decimales sucesivas hasta 10⁻¹¹.

Se realizó el recuento de esporas trabajando con las diluciones 10⁻⁶ a 10⁻¹¹. Se emplearon para cada dilución dos cajas de Petri en cada una de las cuales se colocó 1ml de la dilución correspondiente, cubriendo luego las placas con 12 ml de agar papa. Después

de la incubación a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ durante 3 días se efectuó el recuento de colonias en las placas. Según el promedio de los resultados de cinco ensayos realizados en la forma indicada, la concentración de la suspensión original resultó ser de 10^{10} esporas/ml. Por lo tanto, para todos los ensayos de inoculación se preparó la suspensión de esporas agregando al cultivo de 7 días en agar papa 5 ml de solución salina y se utilizó una dilución 10^{-4} .

4) Inoculación

A los Erlenmeyers con 20 g de maní se agregaron 5 ml de agua destilada estéril para llevar las semillas al contenido acuoso apropiado para el desarrollo del hongo y la producción de aflatoxinas (ver Discusión de la Parte Experimental).

La inoculación se realizó por duplicado para cada variedad agregando a los frascos 1 ml de la suspensión de esporas de 10^6 esporas/ml. Las muestras inoculadas fueron incubadas en estufa a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ durante 7 días. Al cabo de este período se esterilizaron en autoclave a 121° durante 15 minutos para destruir las esporas del hongo y se procedió al análisis para la detección de aflatoxinas.

5) Análisis para la detección de aflatoxinas

Se empleó el método de Walkling y col.⁸⁹ (A. O. A. C. Official Method III, 1975) con algunas modificaciones. Los ensayos se rea-

lizaron por duplicado. Los valores obtenidos en la cuantificación resultaron del promedio de las dos determinaciones.

a) Preparación de la muestra

Tanto en el caso del análisis de aflatoxinas en las muestras sin inocular como en el análisis de las muestras inoculadas los maníes fueron finamente molidos en un molinillo (tipo café).

b) Extracción de las aflatoxinas

En el caso de las muestras no inoculadas se trabajó con 100 g de maní finamente molido a los cuales se agregaron 500 ml de metanol-agua (55:45), 200 ml de hexano y 4 g de ClNa, en Erlenmeyer de 500 ml. Se agitaron durante 30 minutos en agitador mecánico.

En el caso de las muestras inoculadas, por tratarse de 20 g de maní, se agregaron 100 ml de metanol-agua (55:45), 40 ml de hexano y 1 g de ClNa, procediendo de la manera indicada anteriormente.

La mezcla se filtró a través de papel de filtro común y se dejó reposar hasta que se separaron las dos capas. Una alícuota de 25 ml de la capa metanol-agua fué extraída en ampolla de decantación con 25 ml de cloroformo, agitando durante 1 minuto. La capa cloroformica se recogió en un balón haciéndola pasar a través de sulfato de sodio anhidro (10 g) contenido en un papel de filtro. El sulfato de sodio se lavó con dos porciones sucesivas de cloroformo que fueron recogidas en el mismo balón. El extracto cloroformico se evaporó

en evaporador rotatorio hasta sequedad y luego se redisolvió en 250 μ l de cloroformo en el momento de realizar la cromatografía en placa delgada.

c) Detección de aflatoxinas por cromatografía en placa delgada

Preparación de las placas

Se prepararon placas de sílica gel G Macherey-Nagel HR de 0,25 mm de espesor, empleando un aplicador Desaga. Las placas se dejaron reposar a temperatura ambiente (oscuridad). Una vez gelificadas se activaron durante dos horas a 80° y luego se mantuvieron en desecador hasta el momento de usar. En caso de no ser usadas inmediatamente se las volvió a activar antes de usarlas durante media hora a 110°.

Desarrollo del cromatograma

A 2 cm del borde inferior de la placa se realizaron para cada muestra dos siembras de 10 μ l del extracto obtenido en b). Además, en cada placa se realizó una siembra de 10 μ l del patrón cualitativo de aflatoxinas que contenía 0,5 μ g/ml de aflatoxinas B₁ y B₂ y 0,15 μ g/ml de aflatoxinas G₁ y G₂. *

* Enviado por el Dr. Leo Goldblatt, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, N. Orleans, U. S. A.

Sobre una de las dos siembras realizadas para cada muestra se sembraron en forma superpuesta 10 μ l de la solución patrón (patrón interno). El solvente de desarrollo fué benceno-acetona-ácido acético (80:9:10). Se trabajó a temperatura ambiente en cuba sin saturar; el tiempo de desarrollo fue aproximadamente 40 minutos.

Interpretación del cromatograma

Las placas reveladas y secas se examinaron en un cuarto oscuro a una distancia de aprox. 30 cm de una lámpara ultravioleta (Desaga UV 131000).

En las condiciones de trabajo descritas se obtuvo una buena resolución de las aflatoxinas observándose en la siembra del patrón cuatro manchas perfectamente separadas (Figura Nro 7). Las dos manchas superiores presentaban fluorescencia azul (B_1 y B_2), las otras dos tenían fluorescencia verde azulada (G_1 y G_2). Los valores aproximados de R_f fueron: B_1 : 0,53; B_2 : 0,44; G_1 : 0,40; G_2 : 0,34. La siembra que contenía patrón interno permitió comprobar la identidad de las manchas presentes en la muestra con las de la solución patrón.

En el caso de las muestras sin inocular (análisis directo de aflatoxinas para determinar posible contaminación natural), todas, excepto dos, resultaron negativas. Los dos extractos positivos se sometieron al análisis cuantitativo, tal como se detalla a continuación.

Las siembras correspondientes a los extractos de las muestras inoculadas presentaron en todos los casos manchas fluorescentes muy intensas con valores de Rf y colores idénticos a los de las manchas correspondientes a la solución patrón.

En aquellos casos en que se realizó la cuantificación los extractos debieron ser diluidos (1/500 ó 1/1000 según la intensidad de la fluorescencia de las manchas en la placa cualitativa) para proceder a la determinación cuantitativa.

Estimación de la cantidad de aflatoxinas presentes en los extractos

Se empleó el método de comparación visual⁸⁹ y el resultado se expresó en base a la concentración de aflatoxina B₁.

Preparación de las placas

Se procedió a la misma manera que para la determinación cualitativa.

Desarrollo del cromatograma

Los extractos empleados para la determinación cualitativa se llevaron nuevamente a sequedad y en el momento de la siembra se agregó el volumen de cloroformo necesario para llevarlos a la concentración inicial, teniendo en cuenta en todos los casos la cantidad de extracto empleada en el análisis cualitativo. En caso de ser neces-

sario se realizaron las diluciones apropiadas del extracto en cloroformo, pues si la fluorescencia es muy intensa no se puede comparar la intensidad de las manchas de la muestra con las del patrón.

Se sembraron a 2 cm del borde de la placa 2 μ l, 5 μ l y 10 μ l del extracto de la muestra junto con 2, μ l, 5 μ l y 10 μ l de la solución patrón. En este caso se empleó una solución conteniendo 10 μ g/ml de aflatoxina B₁*. Las placas fueron desarrolladas y observadas en las mismas condiciones del análisis cualitativo.

Cálculo de la cantidad de aflatoxina B₁ presente en los extractos.

Se compararon las intensidades de fluorescencia de la mancha de aflatoxina B₁ en la muestra con la mancha del patrón, determinando cuál de las manchas de muestra coincidía con uno de los patrones. La concentración de aflatoxina B₁ en la muestra, expresada en μ g/Kg, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de aflatoxina B}_1 \text{ (} \mu\text{g/Kg) = } \frac{V \cdot C \cdot M}{P \cdot p \cdot d} \cdot \frac{V_x \cdot P}{\quad}$$

donde:

* Facilitada por el Laboratorio de Micotoxinas del Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología, preparada a partir de aflatoxina B₁ pura (Calbiochem).

V_p = μl de solución patrón de aflatoxina B_1 que iguala al extracto de la muestra.

C_p = Concentración de la solución patrón de aflatoxina B_1 en $\mu\text{g/ml}$

M_d = Volumen en μl de la dilución final del extracto de la muestra
(en las condiciones del presente trabajo $M_d = 250 \mu\text{l}$).

V_x = μl de muestra cuya fluorescencia coincide con la del volumen V_p

P = Gramos de la muestra original contenidos en el extracto final.

Estudio de la micoflora de las variedades de maní analizadas

1) Aislamiento e identificación de los hongos contaminantes

Por las razones expuestas en la Discusión, para el estudio de la flora fúngica se emplearon semillas provenientes de frutos deteriorados. Se colocaron aproximadamente 20 g de tales semillas en Erlenmeyer de 500 ml estéril y se les agregó la cantidad de agua necesaria (aprox. 5ml) a fin de llevarlas a un contenido acuoso apropiado para el desarrollo de los hongos contaminantes. Se incubó en estufa a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ y se realizaron observaciones diarias a partir de los tres días de incubación. Cuando se comenzó a observar crecimiento fúngico sobre los granos se fueron separando todos los hongos macroscópicamente diferentes. Mediante la observación de los caracteres culturales (aspecto del crecimiento, forma y color de las colonias, etc) y morfológicos por observación con microscopio estereoscópico, se pudieron identificar los géneros de hongos que se han mencionado en la Discusión.

Una vez realizado el aislamiento de los hongos, las semillas se esterilizaron en autoclave a 121° durante 15 minutos y se realizó la determinación cualitativa de aflatoxinas empleando el método ya descrito, con los resultados que figuran en la Tabla 5.

Identificación de las especies pertenecientes al grupo "A. flavus"

La identificación de la especie se realizó para aquellas cepas de Aspergillus aisladas presumiblemente pertenecientes al grupo A. flavus, observando, además de los caracteres mencionados, sus características microscópicas mediante la técnica de microcultivo. La clasificación se realizó según la clave de Raper y Fennel⁴⁶.

Para realizar cada microcultivo se esterilizó una caja de Petri dentro de la cual se había colocado un disco de papel de filtro en el fondo, una varilla de vidrio en U y un portaobjeto. En otra caja de Petri estéril se vertió agar Czapek hasta formar una capa de 2mm de espesor. Una vez solidificado el agar se recortó con un bisturí estéril un trozo de aproximadamente 1 cm^2 que se colocó en el centro del portaobjeto, apoyado sobre la varilla en U. Se inocularon los cuatro bordes del bloque de agar con el hongo en estudio y se cubrió con un cubreobjeto estéril de mayor tamaño que el trozo de agar. Se agregaron sobre el papel de filtro 2-3 ml de agua estéril para obtener una cámara húmeda. La incubación se realizó en estufa a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$.

Cuando se observó un crecimiento conveniente del hongo, que tiende a adherirse a la superficie del portaobjeto y del cubreobjeto, se separó el cubreobjeto del bloque de agar y se lo colocó sobre un portaobjeto con una gota de líquido de montaje, en este caso lactofe-

nal. Luego se desprendió con cuidado el bloque de agar, quedando una segunda preparación sobre el portaobjeto original, a la cual se agregó una gota de lactofenol-azul de algodón. Se dispuso así de una preparación coloreada y otra sin colorear, que se observaron al microscopio.

Las microfotografías que se pueden observar en las Figs. 2, 3, 4, 5, y 6, fueron tomadas de los cultivos obtenidos mediante esta técnica.

2) Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de "Aspergillus flavus" y "Aspergillus parasiticus"

La capacidad de las cepas aisladas pertenecientes al grupo A. flavus para producir aflatoxinas se probó empleando arroz como sustrato, según la técnica de Shotwell y col⁶⁴. con algunas modificaciones. Cada uno de los hongos en estudio se sembró en un tubo inclinado de agar papa y se incubó a 25° durante 7 días. Al cabo de este período se observaba abundante cantidad de esporas de color verde que fueron suspendidas en 5 ml de solución salina. Un ml de esta suspensión se utilizó en todos los casos para inocular el sustrato. Este consistió en 10 g de arroz contenidos en Erlenmeyer de 250 ml con 5 ml de agua y esterilizado en autoclave a 120° durante 15 minutos. El sustrato inoculado se incubó en estufa a 25° ± 1° durante siete días, al cabo de los cuales se esterilizó nuevamente para destruir las esporas del hongo. En todos los casos se realizó paralelamente el ensayo con el hongo produc-

tor de aflatoxinas empleado para la inoculación (NRRL 2999) a fin de comprobar la eficiencia del método de extracción empleado.

La extracción de las aflatoxinas eventualmente presentes se realizó agregando a los Erlenmeyers 50 ml de cloroformo y dejando la mezcla en reposo durante 24 horas, al cabo de las cuales se filtró y trató con sulfato de sodio anhidro. Este se separó por filtración y el filtrado se sometió al procedimiento de purificación propuesto por Stubblefield y col.⁹¹ para eliminar pigmentos interferentes presentes en los extractos. Se agregó al filtrado 1 g de carbón animal, agitó durante 5 minutos y filtró. Este filtrado fué tratado con 1 g de carbonato cúprico durante 5 minutos y volvió a filtrar. Se observó una notable decoloración de los extractos que pasaron de ser amarillos (más o menos intensos según la cepa del hongo) a prácticamente incoloros. Dichos extractos se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio y se analizaron según la técnica ya detallada para detectar la producción de aflatoxinas con los resultados que han sido comentados en la Discusión.

3) Medios de cultivo empleados

a) Agar papa

Se toman 100 g de papas peladas y cortadas en trozos y se hierven en un litro de agua durante una hora. Se filtra y agrega 1,5% de agar y 2% de glucosa. Se esteriliza en autoclave a 121° durante 20 minutos.

b) Solución salina para la suspensión de esporas

ClNa	0,85 g
Lauril sulfato de sodio	0,01 g
Agua destilada	100 ml

c) Agar Czapek

Nitrato de sodio	2,0 g
Cloruro de potasio	0,5 g
Glicerofosfato de magnesio	0,5 g
Sulfato ferroso	0,01 g
Sulfato de potasio	0,35 g
Sacarosa	30,0 g
Agar	12,0 g
Agua	1 litro
pH 6,8 (aprox.)	

d) Lactofenol

Acido láctico	100 ml
Fenol	100 g
Glicerina	100 g
Agua	100 ml

e) Lactofenol-azul de algodón

Solución saturada de azul de algodón	10 ml
Glicerina	10 ml
Agua	80 ml

Se mezclan partes iguales de esta mezcla y de lactofenol.

Experimentación sobre aceites de semilla de maní

Como se ha expuesto en la Discusión y operando sobre semilla de dos variedades ("Blanco Río Segundo" y "Colorado Correntino") se aislaron los aceites de la semilla original, de la semilla incrementada en su tenor acuoso (contenido determinado experimentalmente) y de esta última inoculada con Aspergillus flavus, previa incubación durante 7 días a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ en los casos de enriquecimiento acuoso e inoculación. Sobre estos aceites se practicaron determinaciones de acidez libre, de composición acídica por CGL y de composición acídica sobre la fracción de ácidos grasos libres presentes en cada uno de ellos. La experimentación se llevó a cabo como sigue:

1) Aislamiento de aceites crudos

Se operó sobre 17 a 24 g (según los casos) de semilla original o de semilla enriquecida en agua o enriquecida en agua e inoculada con Aspergillus flavus. Las semillas empleadas en esta parte del trabajo fueron extraídas en forma estéril de frutos con cáscara intacta, previamente desinfectados en su superficie con ClO_2 5%. Los enriquecimientos en agua se practicaron adicionando 5 ml de agua estéril a 20 g de semilla en Erlenmeyer de 500 ml. La inoculación se realizó agregando 1 ml. de la suspensión de esporas (10^6 esporas/ml) a cada Erlenmeyer. Se empleó el microorganismo productor de aflatoxinas ya mencionado (NRRL 2999). La incubación se realizó en estufa a 25°

+ 1° durante 7 días. Luego de la incubación, en todos los casos la semilla fué finamente molida (consistencia de pasta dados los altos tenores de aceite) y determinó el contenido acuoso operando sobre aprox. 0,5 g de pasta homogénea a 100° y en vacío hasta constancia de peso.

La semilla original (dado su bajo tenor acuoso) se agotó con hexano técnico en equipo Soxhlet ; las semillas enriquecidas en agua y aquellas enriquecidas en agua e inoculadas se adicionaron de cantidad suficiente de sulfato de sodio anhidro a fin de posibilitar el agotamiento con hexano en equipo similar.

Se recuperó el hexano por destilación en baño de agua hirviente eliminando las últimas trazas de este solvente por arrastre con vapor de agua. Los aceites crudos se tomaron por éter etílico y trataron en ampolla de decantación con solución acuosa semisaturada de sulfato de sodio, con sulfato de sodio anhidro, filtró, recuperó el éter y llevó a peso constante a 100° en estufa de vacío. Se calcularon los valores de rendimiento sobre semilla tal cual y sobre semilla seca que fueron mencionados en la Tabla 9.

2) Determinación de los valores de acidez libre

Se determinó aplicando estrictamente la técnica I. U. P. A. C.

11. D. 1, operando sobre 0,5 g de aceite, obteniendo los resultados que juntamente con los referentes a extracción, humedad en semilla y va-

lores de rendimiento figuran en la Tabla 12

3) Composiciones acídicas de los aceites

Se determinaron por CGL sobre ésteres metílicos de los ácidos totales de cada aceite, libres de insaponificable. A tal fin 2 g de aceite se saponificaron por reflujo durante media hora con 25 ml. de solución de KOH al 4% en etanol. Después de enfriar se agregó 50ml de agua y operando en ampollas de decantación se extrajo el material insaponificable con éter etílico (tres extracciones, la primera con 100 ml y las dos siguientes con 70 ml.) Los extractos etéreos se trataron primero con agua y agitación suave (eliminación de la mayor parte de los jabones), se adicionaron gotas de KOH al 1% en etanol (fenolftaleína) para transformar jabones ácidos en jabones neutros y trató nuevamente por agua hasta reacción neutra de los líquidos acuosos al tornasol. Los líquidos acuosos reunidos se adicionaron a la capa hidroalcohólica inicial de jabones, se agregó ClH (1/1 v/v, heliantina) y los ácidos liberados se extrajeron por éter etílico (tres extracciones con 50 ml cada vez). Los extractos etéreos reunidos se trataron varias veces con agua por agitación hasta reacción neutra al tornasol de los líquidos acuosos y la capa etérea se deshidrató con sulfato de sodio, recuperó el solvente y eliminó los últimos restos en caliente mediante una suave corriente de nitrógeno.

Los ácidos totales así obtenidos de cada aceite se esteri-

ficaron con metanol anhidro conteniendo 1,5% en peso de SO_4H_2 concentrado como catalizador⁹².

Las composiciones acídicas se establecieron utilizando un equipo Perkin Elmer Vapor Fractometer Mod. 154, equipado con detector de ionización de llama, columna de vidrio Pyrex de 3m de largo y 4,5 mm de diámetro interno con material de relleno formado por Chromosorb W lavado ácido (60-80) y adipato de etilenglicol poliéster como fase fija (15% sobre relleno total). Se operó a 194°, empleando Nitrógeno "4 Bandas" como fase móvil, con presión de entrada de 18 psi y con inyecciones de aprox. 10 μl de solución de ésteres al 10% en éter etílico. Los componentes acídicos se identificaron a través de la medición de los tiempos de retención de los picos de los cromatogramas y las evaluaciones cuantitativas se resolvieron por triangulación. Las respuestas cuantitativas fueron previamente verificadas por examen CGL de mezclas de ésteres metílicos de composición conocida en ácidos grasos, y por examen de mezclas que contenían ácidos linoleico y linoléico (18:2 y 18:3) simultáneamente por CGL y por examen espectrofotométrico luego de isomerización alcalina (A. O. C. S. Method Cd 7-58, 1960), obteniendo valores suficientemente concordantes. Las Figuras 8, 10 y 12 reproducen los cromatogramas de los aceites crudos, de aceites de semilla de la variedad "Colorado Correntino" (de semilla original, de semilla incrementada en su contenido acuoso y de semilla inoculada).

4) Composiciones acídicas de los ácidos grasos libres de los aceites crudos

Los remanentes de los aceites crudos (alrededor de 5-6 g de cada uno) se disolvieron en 100 ml de éter etílico recientemente destilado, transfirió a una ampolla de decantación, agregó 10 ml de agua destilada, gotas de fenolftaleína y lentamente, solución de KOH al 1% en etanol 96%, hasta reacción alcalina franca. Se agitó suavemente y dejó decantar la fase acuosa de jabones que se separó previa filtración por embudo con papel de filtro (previamente mojado con agua) para evitar el pasaje de restos de fase etérea emulsificada. Sucesivamente el líquido etéreo se trató tres veces más con pequeñas porciones de agua para agotar los jabones formados. Los líquidos acuosos alcalinos reunidos se acidificaron con ClH (1/1, v/v; heliantina) extrayendo los ácidos liberados (tres extracciones con éter etílico). Los extractos etéreos se lavaron con agua en ampolla, trataron por sulfato de sodio anhidro, filtraron, recuperó el solvente por destilación en baño de agua hirviente y los ácidos residuales se liberaron de las últimas trazas en corriente de gas nitrógeno. Se esterificaron con metanol en la forma ya mencionada y los ésteres metílicos se examinaron por CGL empleando el equipo y las condiciones expuestas.

Las figuras 9, 11 y 13 reproducen los cromatogramas correspondientes a los ésteres metílicos de los ácidos libres del aceite de semilla original, del aceite de semilla incrementada en contenido acuoso y

del aceite de semilla inoculada con Aspergillus flavus para la variedad "Colorado Correntino".

Los resultados de las evaluaciones cuantitativas de estos cromatogramas han sido comentados en la Discusión y figuran en la Tabla 11.

T A B L A S Y F I G U R A S

TABLA 1 - Micotoxinas que se han encontrado como contaminantes naturales de productos agrícolas y especies de hongos que las producen.

<u>Toxina</u>	<u>Producida por</u>
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<u>Aspergillus flavus</u> , <u>A. parasiticus</u>
Ocratoxina A	<u>A. ochraceus</u> , <u>Penicillium viridicatum</u> .
Patulina	<u>P. expansum</u> , <u>P. urticae</u> , <u>P. patulum</u> , <u>P. claviforme</u>
Citrinina	<u>P. viridicatum</u> , <u>P. citrinum</u>
Acido penicílico	<u>P. viridicatum</u>
Cearalenona	<u>Fusarium sp</u> (ej.: <u>F. roseum</u>)
Tricotecenos	<u>Fusarium sp.</u> (<u>F. tricinctum</u>), <u>Cephalosporium sp.</u> , <u>Trichoderma sp.</u> , <u>Stachybotrys atra</u> , etc.
Alcaloides del cornezuelo de centeno	<u>Claviceps purpurea</u>

TABLA 2 - Variedades argentinas de maní analizadas para determinar resistencia varietal a la producción de aflatoxinas

<u>Designación</u>	<u>Origen</u>
Blanco Santa Fe (1)	Selección sobre población local
Blanco Río Segundo (1)	" " " "
Colorado Manfredi (1)	" " " "
Colorado Correntino (1)	" " " "
Colorado Irradiado (1)	Obtenido mediante mutaciones por rayos X
Mf. 66 XM 36	" " " " "
Mf. 67 XM 19	" " " " "
Manfredi 68 (1)	Originada por hibridación entre Negro 4 x Fla 249-40-B 3
Manfredi 167	Originada por hibridación entre Colorado Manfredi x (Manfredi Champañ x Mf. 6 en F ₃)
Manfredi 214	Originada por hibridación entre Blanco Río Segundo x Colorado Manfredi
Manfredi 263	Originada por hibridación entre Blanco Río Segundo x Cruceño
Manfredi 270	Originada por hibridación entre Mf. 140 x Colorado Manfredi
Manfredi 280	Obtenida por hibridación entre Colorado Manfredi x (Blanco Río Segundo x Violáceo Perú)
Manfredi 281	Originada por hibridación entre Manfredi Champañ x (Macspan x Colorado Manfredi).

(1) Variedades inscriptas, actualmente en cultivo por los agricultores.
(Las restantes corresponden a líneas, posibles nuevas variedades).

TABLA 2 - (Continuación)

Manfredi 283	Originada por hibridación entre Manfredi 68 x Guaycurú Rosado
Manfredi 284	Idem, ídem
Manfredi 285	Idem, ídem
Manfredi 218	Originada por hibridación entre Blanco Río Segundo x Colorado Manfredi.
Manfredi 215	Idem, ídem
Manfredi 240	Originada por hibridación entre Colorado Manfredi x (Manfredi Champaquí x Manfredi 6) *.
Manfredi 183	Idem, ídem
Manfredi 248	Idem, ídem
Var. 55-437	Blanco Santa Fe resistente a sequía
Manfredi 236	Originada por hibridación entre Colorado Manfredi x (Mf. Champaquí x Manfredi 6).
Manfredi 235	Idem, ídem
Manfredi 257	Idem, ídem
Manfredi 239	Idem, ídem
Manfredi 190	Idem, ídem
Manfredi 251	Idem, ídem
Manfredi 226	Originada por hibridación entre Colorado Manfredi x (Colorado Mf. x (Blanco Mf. x <u>A. monticola</u>))
Manfredi 225	Idem, ídem

* Manfredi 6 es el producto de cruzamiento entre Macspan x Colorado Manfredi.

TABLA 2 - (Continuación)

Manfredi 282	Originada por hibridación entre Manfredi Champaquí x (Macspan x Colorado Manfredi).
Mf. 68 XM 5	Procede de material irradiado con rayos X de la variedad Colorado Manfredi.
Mf. 68 XM 4	Idem, ídem
Mf. 68 XM 60	Idem, ídem
Manfredi 261	Originada por hibridación entre Blanco Río Segundo x Veteado del Perú.

TABLA 3 - Variedades paraguayas de maní analizadas para determinar
resistencia verietal a la producción de aflatoxinas

1) Colorado (1)	11) Tainan N° 4
2) Blanco Grande (1)	12) Colorado 2 (MOREL)
3) Negro Grande (1)	13) Colorado Grande
4) Negrito (1)	14) Tainung N° 2
5) Híbrido (1)	15) Tainan N° 9
6) Israel	16) Tainung N° 3
7) Say-yu-ŷ	17) 713
8) Florigiant	18) 711
9) 704	19) Florispan
10) 830	20) Bayoco

(1) Se cultivan tradicionalmente en Paraguay.

TABLA 4 - Cantidad de aflatoxina B₁ producida por "Aspergillus parasiticus" NRRL 2999 sobre diferentes variedades de maní

<u>Variedad</u>	<u>Aflatoxina B₁</u> <u>µg/Kg</u>
Blanco Santa Fe	121.000
Blanco Río Segundo	48.000
Manfredi 68	64.800
Colorado Manfredi	32.400
Manfredi 236	162.000
Manfredi 218	24.300
Manfredi 225	97.200

TABLA 5 - Presencia de "Aspergillus flavus" e influencia del contenido acuoso en la producción de aflatoxinas sobre diferentes variedades de maní.

Variedad	Procedencia	Aflatoxinas en muestra seca (sin inocular)	Aflatoxinas en muestra húmeda (sin inocular)	Presencia de hongos del grupo <u>A. flavus</u>
Blanco Sta. Fe	Arg.	-	+ (B ₁ B ₂ G ₁ G ₂)	+
Blanco Rfo Seg.	"	+	+ (B ₁ B ₂ G ₁ G ₂)	+
Manfredi 68	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Colorado Mf.	"	-	-	-
Colorado irradiado	"	-	+ (B ₁ B ₂ G ₁ G ₂)	+
Colorado Co-rrentino	"	-	-	-
Mf 66 XM 36	"	-	-	-
Mg 67 XM 19	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Manfredi 167	"	-	-	-
Manfredi 214	"	+	+ (B ₁ B ₂ G ₁ G ₂)	+
Manfredi 263	"	-	-	-
Manfredi 270	"	-	-	-
Manfredi 235	"	-	-	-
Manfredi 236	"	-	-	-
Manfredi 280	"	-	-	-
Manfredi 283	"	-	-	-
Manfredi 183	"	-	-	-
Manfredi 190	"	-	-	-
Manfredi 215	"	-	-	-
Manfredi 218	"	-	-	-
Manfredi 225	"	-	-	+
Manfredi 226	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Manfredi 239	"	-	-	-
Manfredi 240	"	-	-	-
Manfredi 248	"	-	-	-
Manfredi 251	"	-	-	-
Manfredi 257	"	-	-	+
Manfredi 261	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+

TABLA 5 - (Continuación)

Variedad	Procedencia	Aflatoxinas en muestra seca (sin inocular)	Aflatoxinas en muestra húmeda (sin inocular)	Presencia de hongos del grupo <i>A. flavus</i>)
Manfredi 281	Arg.	-	-	-
Manfredi 282	"	-	-	-
Manfredi 284	"	-	-	+
Manfredi 285	"	-	-	+
Var. 55-437	"	-	-	-
Mf. 68 XM 4	"	-	+ (B ₁ B ₂ G ₁ G ₂)	+
Mf. 68 XM 5	"	-	-	-
Mf. 66 XM 60	"	-	+ (B ₁ B ₂ G ₁ G ₂)	+
Colorado	Parag.	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Blanco grande	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Negro grande	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Negrito	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+ (no se pudo aislar)
Híbrido	"	-	-	+
Israel	"	-	-	-
Say yu-í	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Florigiant	"	-	-	-
704	"	-	-	+
830	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Tainan N° 4	"	-	-	-
Colorado 2	"	-	-	-
Colorado grande	"	-	-	-
Tainung N° 2	"	-	-	-
Tainan N° 9	"	-	-	-
Tainung N° 3	"	-	-	-
713	"	-	-	-
711	"	-	-	-
Florispan	"	-	+ (B ₁ B ₂)	+
Bayoco	"	-	-	-

TABLA 6 - Frecuencia de aislamiento (% de muestras positivas) de los hongos contaminantes de diferentes variedades de maní

<u>Hongo</u>	<u>Nº de muestras positivas *</u>	<u>%</u>
<u>Aspergillus flavus</u>	23	41,0
<u>Aspergillus niger</u>	18	32,1
<u>Aspergillus ochraceus</u>	2	3,5
<u>Penicillium sp.</u>	31	55,3
<u>Rhizopus sp.</u>	24	42,8

* Nº total de muestras: 56

TABLA 7 - Porcentaje de las cepas aisladas pertenecientes al grupo "Aspergillus flavus" que resultaron ser productoras de aflatoxinas

	<u>Nº de cepas aisladas</u>	<u>%</u>
<u>A. flavus toxicogénicos</u>	16	72,7
<u>A. flavus no toxicogénicos</u>	6	27,3
Total	22	100,0

TABLA 8 - Capacidad toxicogénica de las especies pertenecientes al grupo "Aspergillus flavus" aisladas de diferentes variedades de maní.

<u>Variedad</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Especie</u>	<u>Aflatoxinas producidas</u>
Blanco Santa Fe	Arg.	<u>A. parasiticus</u>	B ₁ B ₂ G ₁ G ₂
Blanco Río seg.	"	<u>A. parasiticus</u>	B ₁ B ₂ G ₁ G ₂
Manfredi 68	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
Col. irradiado	"	<u>A. parasiticus</u>	B ₁ B ₂ G ₁ G ₂
Mf. 67 XM 19	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
Manfredi 214	"	<u>A. parasiticus</u>	B ₁ B ₂ G ₁ G ₂
Manfredi 225	"	<u>A. flavus</u>	Ninguna
Manfredi 226	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
Manfredi 257	"	<u>A. flavus</u>	Ninguna
Manfredi 261	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
Mf. 68 XM 4	"	<u>A. parasiticus</u>	B ₁ B ₂ G ₁ G ₂
Mf. 66 XM 60	"	<u>A. parasiticus</u>	B ₁ B ₂ G ₁ G ₂
Manfredi 284	"	<u>A. flavus</u>	Ninguna
Manfredi 285	"	<u>A. flavus</u>	Ninguna
Colorado	Parag.	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
Blanco grande	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
Negro grande	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
Híbrido	"	<u>A. flavus</u>	Ninguna
Say yu-í	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
704	"	<u>A. flavus</u>	Ninguna
830	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂
Florispan	"	<u>A. flavus</u>	B ₁ B ₂

TABLA 9 - Influencia del contenido acuoso y de la presencia de "Aspergillus flavus" sobre valores de contenido en aceite y de acidez libre en granos de dos variedades de maní.

Var.	Determinaciones	Semilla normal	Semilla con humedad incrementada	Semilla con humedad incrementada y contaminada con <u>A. flavus</u>
Blanco Río Segundo	Humedad %	3,02	-	16,98
	Aceite % semilla tal cual	45,48	-	35,73
	Aceite % semilla seca	46,89	-	43,05
	Acidez en aceite (mg KOH/g)	0,57	-	6,91
Colorado Correntino	Humedad %	5,35	22,87	26,66
	Aceite % semilla tal cual	40,84	34,68	30,96
	Aceite % semilla seca	43,18	44,96	42,21
	Acidez en aceite (mg KOH/g)	0,78	1,19	13,06

TABLA 10 - Influencia de la presencia de "Aspergillus flavus" sobre
la composición acídica (% de ácidos totales) de los ácidos
libres del aceite de maní, variedad "Blanco Río Segundo"

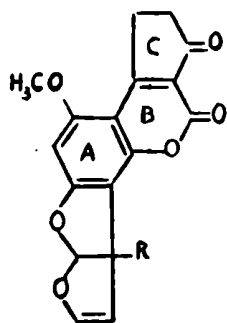
	Aceite de semilla tal cual	Aceite de semilla húmeda con <u>A. flavus</u>	Acidos libres de semilla tal cual	Acidos libres de semilla húmeda con <u>A. flavus</u>
12:0	-	-	-	-
14:0	-	-	0,1	-
16:0	11,5	12,3	13,5	14,6
18:0	1,2	0,7	2,0	2,5
18:1	38,9	39,6	38,3	45,1
18:2	42,0	40,8	40,1	29,8
20:0	0,5	0,5	0,5	0,7
20:1	1,2	1,0	0,7	0,7
21:1	-	-	0,1	-
22:0	3,7	3,7	3,6	4,6
24:0	1,0	1,4	1,1	2,0

TABLA 11 - Influencia del contenido acuoso y de la presencia de "Aspergillus flavus" sobre la composición acídica (% de ácidos totales) de los ácidos libres del aceite de maní, variedad Colorado Correntino.

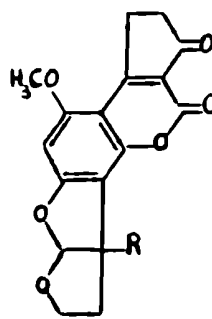
	Aceite de semilla tal cual	Aceite de semilla húmeda	Aceite de semilla húmeda con <u>A. flavus</u>	Acidos libres semilla tal cual	Acidos libres semilla húmeda	Acidos libres semilla húmeda con <u>A. flavus</u>
12:0	-	-	-	Vest.	0,2	-
14:0	-	-	-	0,1	0,2	-
16:0	11,0	11,8	12,3	15,6	14,3	15,3
18:0	1,0	0,9	1,1	1,7	1,5	1,1
18:1	38,1	38,6	38,8	37,7	39,0	44,9
18:2	43,5	43,5	40,9	39,0	38,8	30,9
20:0	0,8	0,3	0,4	0,3	0,3	0,6
20:1	1,3	1,3	1,2	0,8	0,4	1,4
21:0	-	-	-	-	Vest.	-
21:1	-	-	-	0,1	0,2	-
22:0	3,5	3,3	4,3	3,1	4,0	4,7
24:0	0,8	0,3	1,0	1,6	1,1	1,1

TABLA 12 - Extracción de aceites crudos de maní tal cual e inoculado con
"Aspergillus flavus"

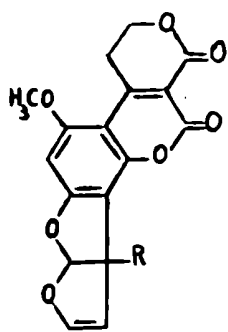
	Blanco Rfo Segundo		Colorado Correntino		
	Grano tal cual	Grano de > cdo. ac. con A. <u>flavus</u>	Grano tal cual	Grano de > cdo. ac.	Grano de > cdo. ac. con A. <u>flavus</u>
En extrac. (g)	18,80	22,78	19,44	22,40	23,25
Aceite crudo obt. (g)	8,55	8,14	7,94	7,77	7,20
Agua % en semilla	3,02	16,98	5,35	22,87	26,66
Aceite % semilla seca	46,89	43,05	43,18	44,96	42,21
Acidez libre (mg KOH/g)	0,57	6,91	0,78	1,19	13,06



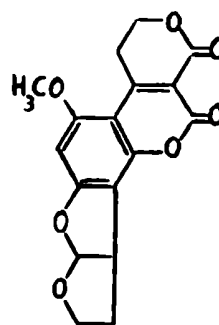
Aflatoxina B : R=H
 Aflatoxina M₁¹ : R=OH
 Aflatoxina P₁¹ : igual
 a B₁, pero CH₃O en el
 anillo A es reemplaza-
 do por OH



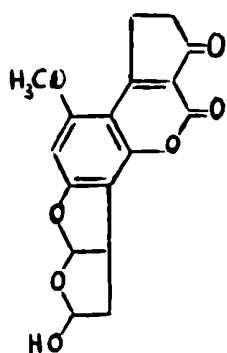
Aflatoxina B₂ : R=H
 Aflatoxina M₂² : R=OH



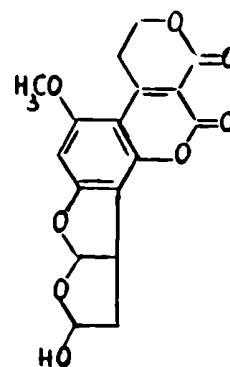
Aflatoxina G₁ : R=H
 Aflatoxina GM₁¹ : R=OH



Aflatoxina G₂



Aflatoxina B_{2a}



Aflatoxina G_{2a}

FIGURA 1 : Estructura de las aflatoxinas



FIGURA 2 - Aspergillus flavus. Cabeza conidial joven con esterigmas en una sola serie. x 500 (Aislada de maní variedad Mf 67 XM 19).



FIGURA 3 - Aspergillus flavus. Cabeza conidial con esterigmas biseriados x 500 (Aislado de maní variedad "Florispán").



FIGURA 4 - Conidios de A. flavus x 500



FIGURA 5 - Conidios de Aspergillus parasiticus x 500

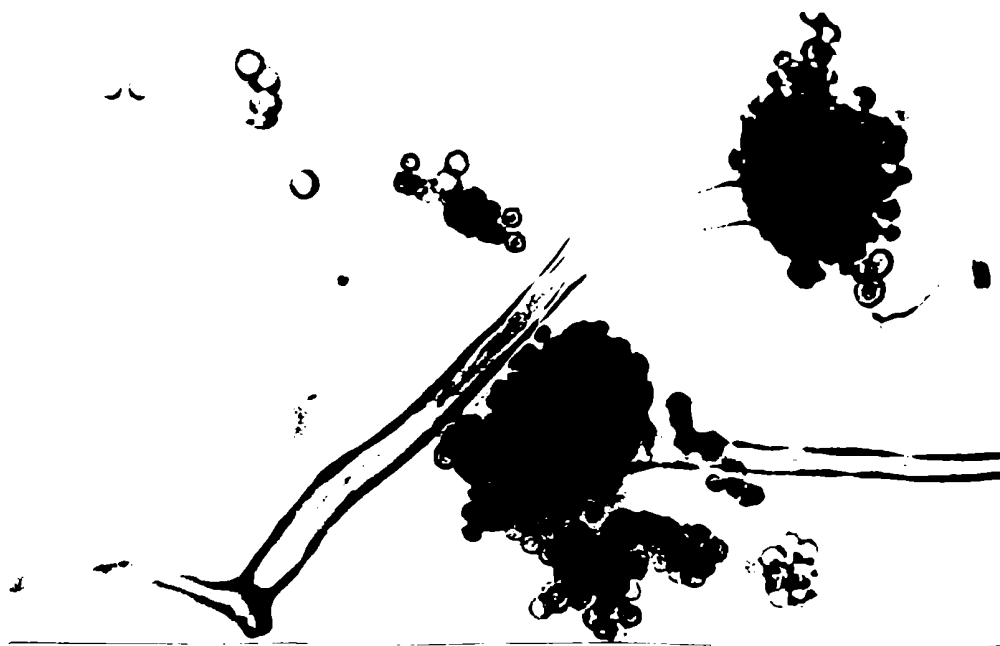


FIGURA 6 - Cabezas conidiales y esporas de Aspergillus parasiticus (x 400). Cepa aislada de maní variedad "Manfredi 214".

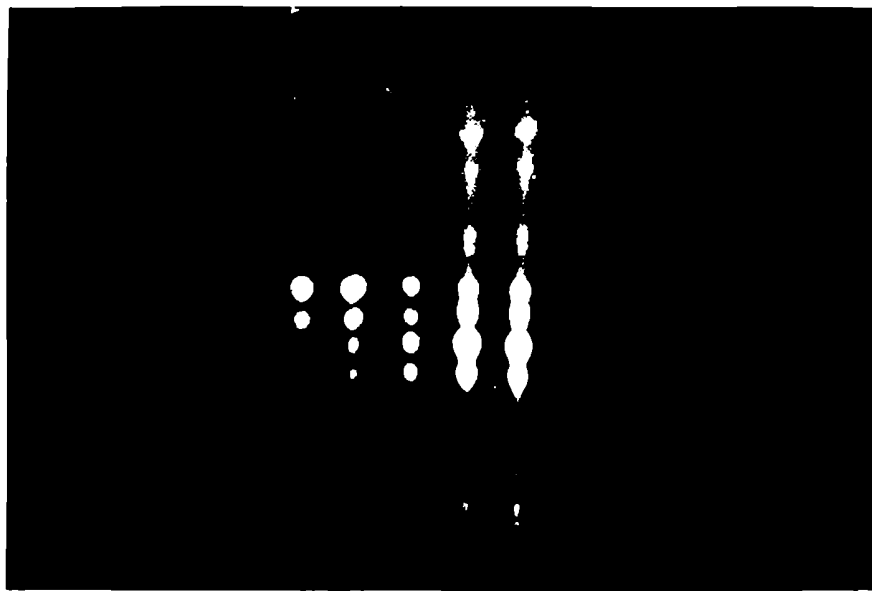


FIGURA 7 - Cromatografía en capa delgada para detectar aflatoxinas producidas por A. flavus y A. parasiticus sobre arroz.

A: Extracto de un cultivo de A. flavus (produce aflatoxinas B_1 y B_2).

B: Idem A con patrón interno.

C: Solución patrón de aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 .

D: Extracto de un cultivo de A. parasiticus (produce aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2).

E: Idem D con patrón interno.

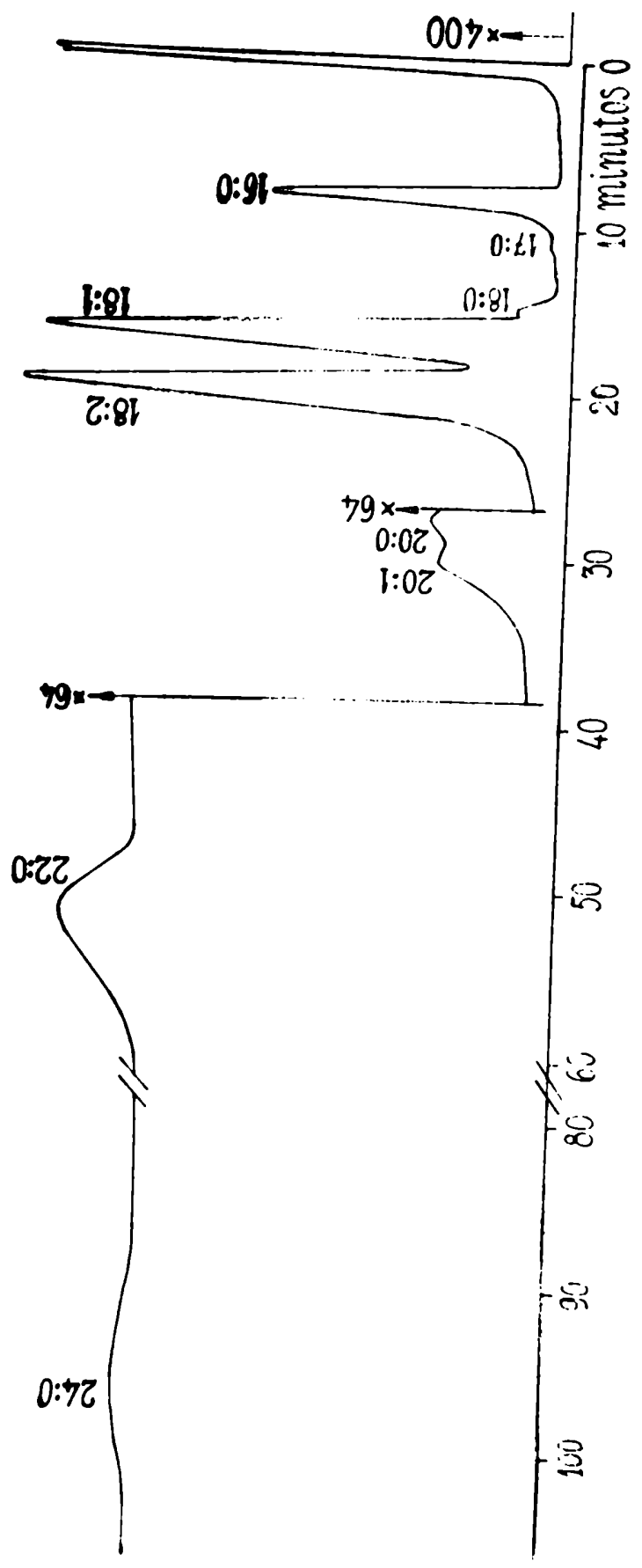


FIGURA 8 - Aceite de semilla (contenido acuoso 5, 35%) de maní, variedad "Colorado Correntino".
Cromatografía gas líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales.

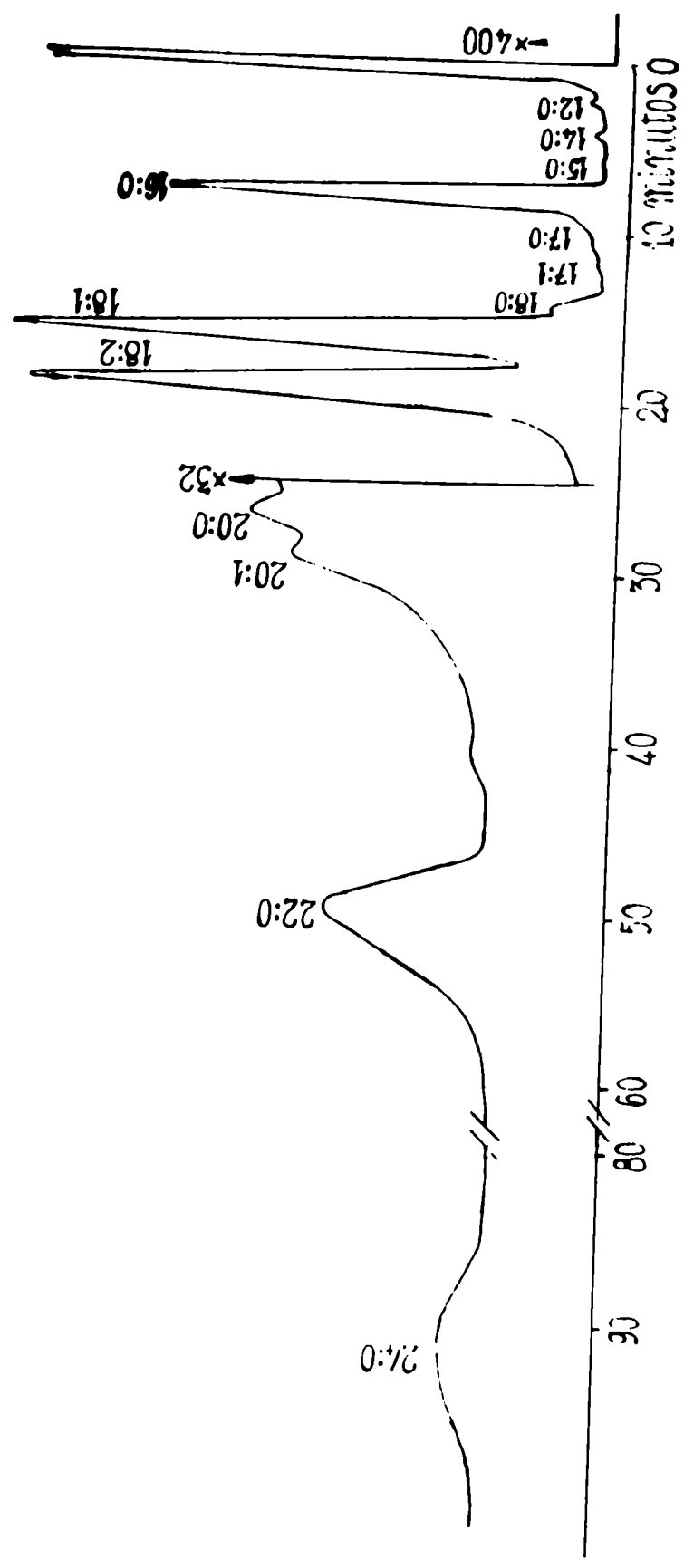


FIGURA 9 - Aceite de semilla (contenido acuoso 5, 35%) de maní, variedad "Colorado Correntino".
Cromatografía gas líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres.

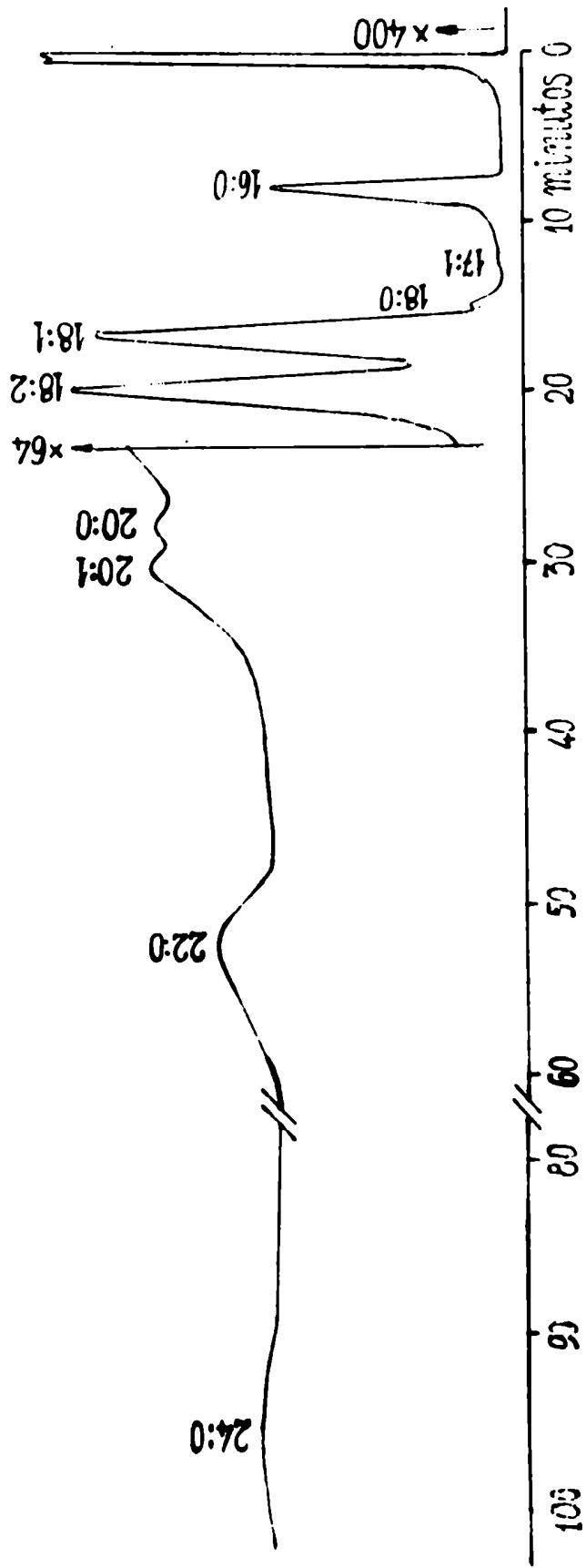


FIGURA 10 - Aceite de semilla humectada e incubada (contenido acuoso 22, 87%) de maní, variedad "Colorado Correntino". Cromatografía gas líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales.

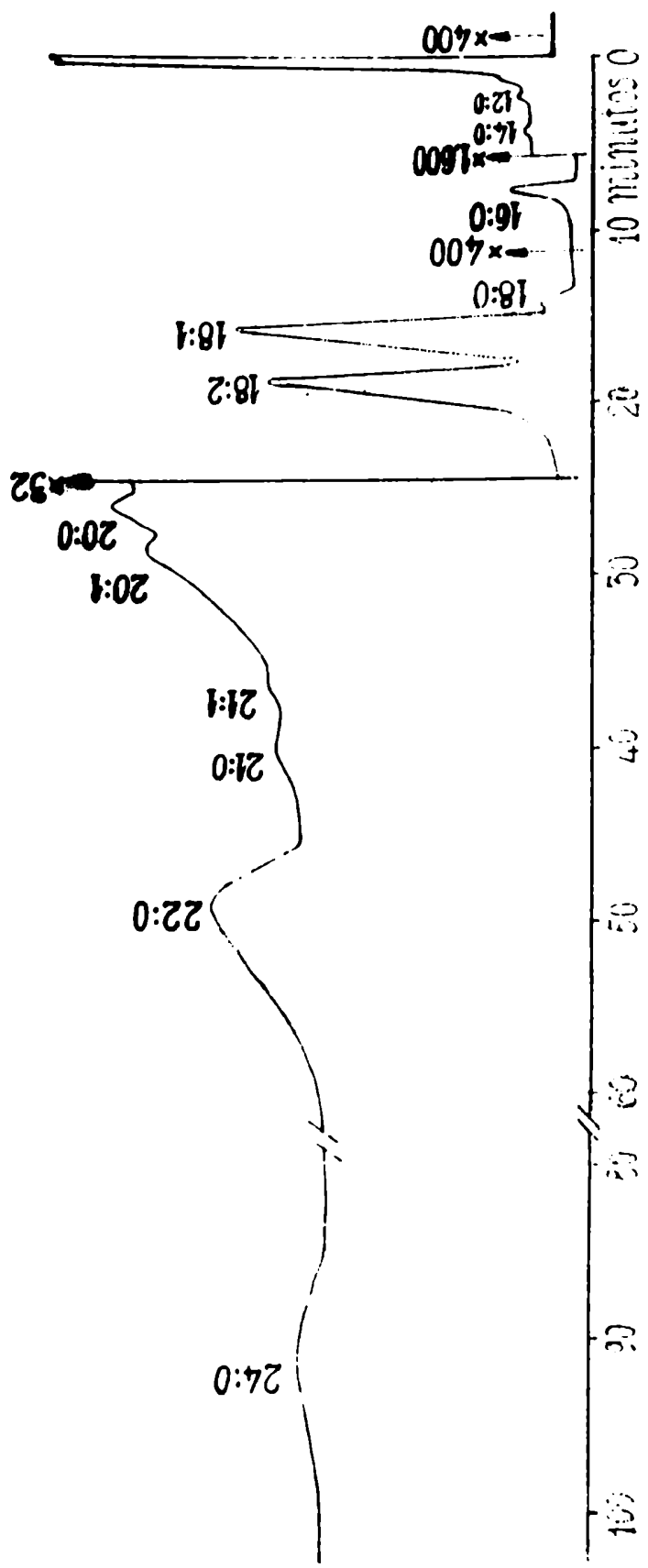


FIGURA 11 - Aceite de semilla humectada e incubada (contenido acuoso 22, 87%) de maní, variedad "Colorado Correntino". Cromatografía gas líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres.

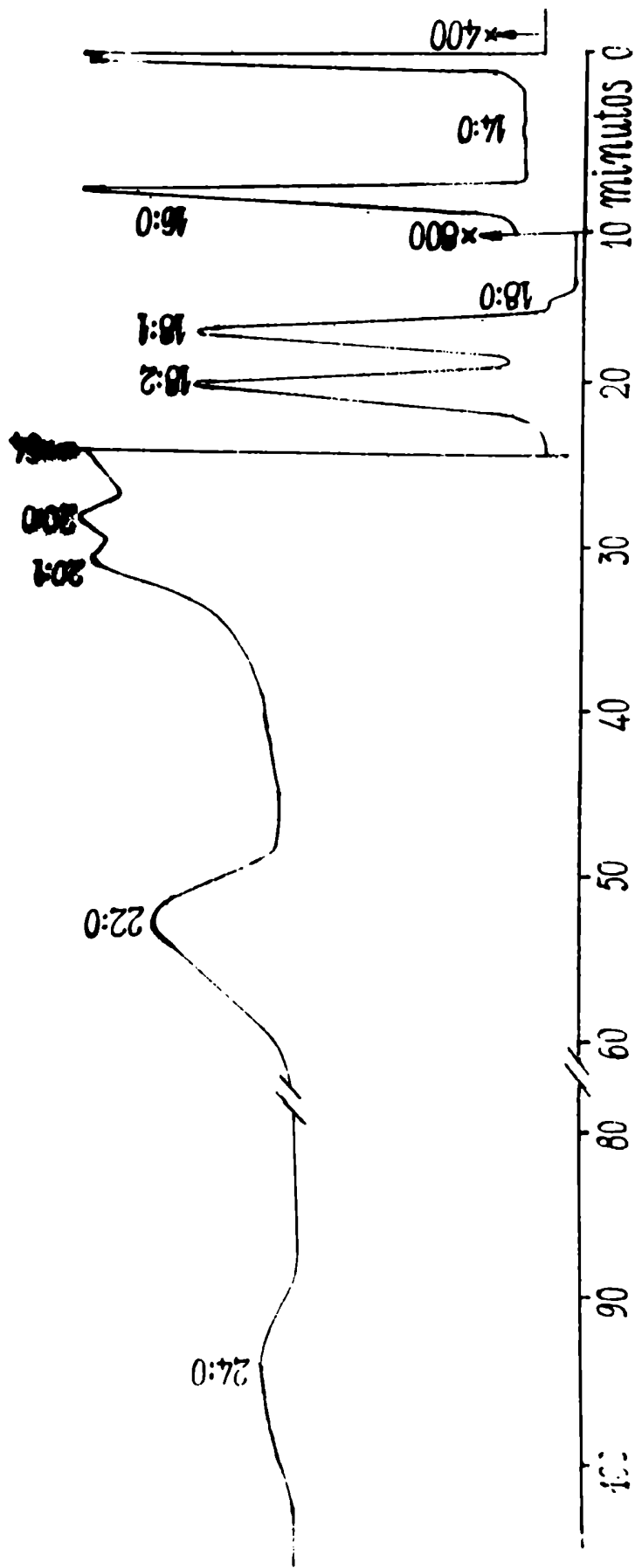


FIGURA 12 - Aceite de semilla humectada, inoculada con A. flavus e incubada (contenido acuoso 26, 66%) de maní, variedad "Colorado Correntino". Cromatografía gas líquida de los ésteres metílicos de los ácidos totales.

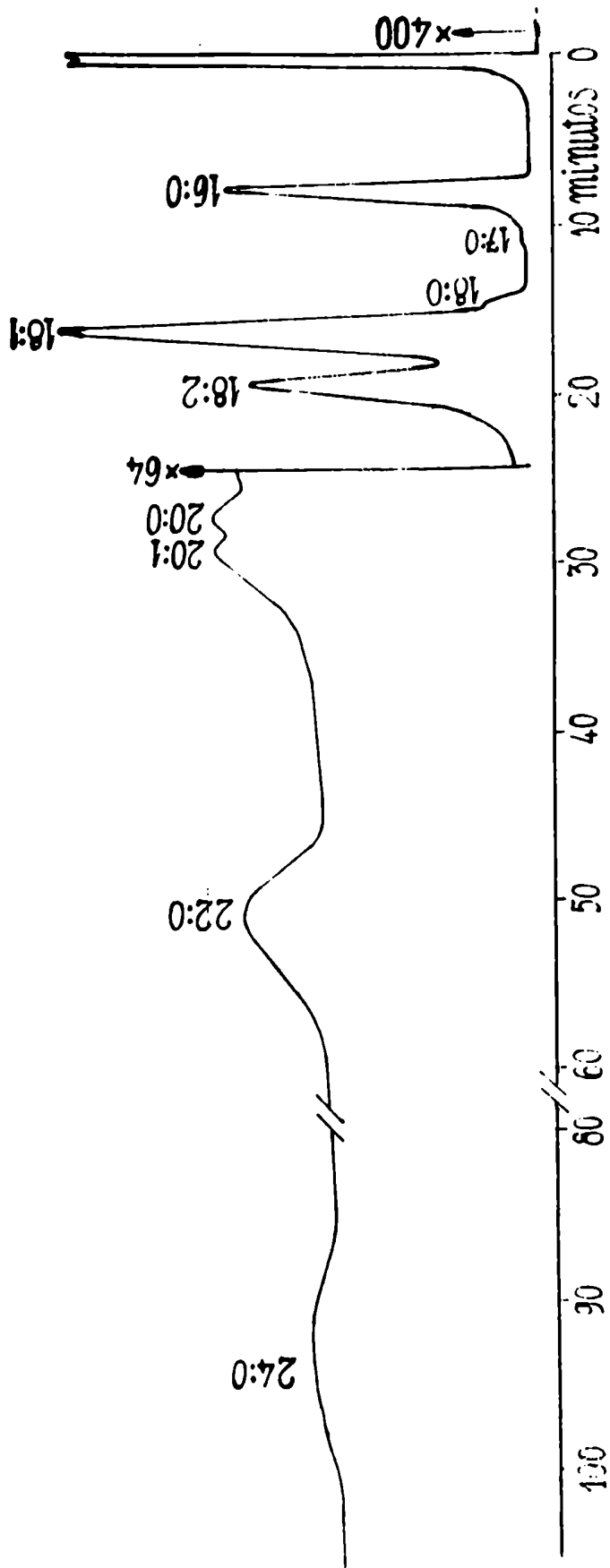


FIGURA 13 - Aceite de semilla humectada, inoculada con A. flavus e incubada (contenido acuoso 26,66%) de maní, variedad "Colorado Correntino". Cromatografía gas líquida de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres.

P A R T E I V

C O N C L U S I O N E S

El presente trabajo constituye una iniciación en el estudio del comportamiento de las diferentes variedades de maní que se cultivan en nuestro país y países vecinos, en relación a la producción de aflatoxinas por Aspergillus flavus. A modo de introducción se presenta un panorama del estado actual de los conocimientos relativos al problema de las micotoxinas, con especial referencia a las aflatoxinas. Estos metabolitos producidos por ciertas cepas de hongos del grupo Aspergillus flavus, contaminantes comunes de diversos productos agrícolas, han demostrado poseer toxicidad aguda y crónica, generalmente localizada en el hígado, para diversas especies animales. Desde que se descubrió su elevado poder carcinógeno se las considera también un peligro potencial para la salud del hombre. Existen ciertas evidencias epidemiológicas que señalan una correlación positiva entre la ingesta de aflatoxinas y la incidencia de cáncer primario de hígado en poblaciones muy expuestas a esta contaminación (ciertas regiones de Africa y sudeste asiático). El conocimiento de los riesgos que puede entrañar para la salud humana la presencia de aflatoxinas en los alimentos no es ni mucho menos completo, pero los datos disponibles al presente han movido a los funcionarios de salud pública y autoridades de control alimentario de muchos países a instituir programas de investigación y control. Se insiste en que la mejor forma de controlar el problema es la prevención para evitar la proliferación de los hongos y la concomitante producción de sus toxinas. En este aspecto se ha comenzado a encarar en los últimos años la búsqueda de va-

riedades de semillas comercialmente aceptables que presenten resistencia a la contaminación por aflatoxinas, ya sea por impedir la penetración y colonización por parte de los hongos toxicogénicos o por no ser un sustrato adecuado para la elaboración de sus metabolitos tóxicos.

El objetivo primordial de este trabajo ha sido determinar si entre las variedades de maní que se cultivan en nuestro país y países vecinos existe alguna con esta característica, es decir, capaz de inhibir la producción de aflatoxinas. Para ello, las 56 variedades que han sido objeto de este estudio fueron inoculadas con esporas de un hongo reconocido como potente productor de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas se procedió a la incubación de las muestras inoculadas y posterior detección de las aflatoxinas producidas sobre cada variedad por los métodos analíticos corrientemente empleados (extracción con solventes y cromatografía en capa delgada). Como complemento de estos estudios se ha realizado un análisis de la flora fúngica de las diferentes variedades de maní a fin de determinar la prevalencia de cepas productoras de aflatoxinas y su capacidad toxicogénica. Por otra parte, se ha trabajado con los aceites crudos de extracción procedentes de semilla contaminada con Aspergillus flavus y de semilla no contaminada, con especial referencia a sus índices de acidez libre y exámenes de composición acídica por CGL de los ácidos grasos libres. Esta parte de la experimentación tu-

vo por objeto establecer la relación existente entre la presencia de aflatoxinas y el aumento de acidez libre que se observa en los aceites provenientes de semilla contaminada e indagar la presunta especificidad de las lipasas fúngicas involucradas.

La experimentación llevada a cabo permite extraer las siguientes conclusiones:

- 1) El análisis para detectar aflatoxinas realizado directamente sobre muestras de las diferentes variedades (sin inoculación previa) reveló que dos de las mismas se encontraban naturalmente contaminadas (a niveles de $324 \mu\text{g}/\text{Kg}$ en un caso y $810 \mu\text{g}/\text{Kg}$ en el otro).

Esto demuestra que existe cierto grado de contaminación natural en el maní cultivado en nuestro país, lo cual concuerda con resultados de trabajos anteriores ^{43, 93}.

Es sabido que el maní es uno de los cultivos más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas, cuya presencia se ha señalado en esta planta en las regiones productoras de todo el mundo. No obstante, cabe señalar que los niveles de contaminación mencionados fueron encontrados en maníes de baja calidad (rotos, descoloridos y atacados por insectos).

La inoculación experimental de las 56 variedades con una cepa toxigénica y la subsiguiente detección de aflatoxinas permitió comprobar que:

- 2) Las semillas que presentaban los tegumentos dañados eran más susceptibles a una rápida colonización fúngica que aquellas que conservaban sus cubiertas intactas.
- 3) El crecimiento de los hongos también depende de la actividad fisiológica del sustrato. Si éste es activo se limita relativamente el desarrollo de los hongos saprófitos, como puede ser Aspergillus flavus; si es fisiológicamente inactivo, como en el caso de productos viejos o sometidos a tratamiento térmico, los hongos colonizan más fácilmente el sustrato y desarrollan rápidamente, produciendo sus toxinas. En el caso de semillas en la etapa de germinación, directamente se observó inhibición del crecimiento de los hongos contaminantes. Esto explicaría el hecho de que la contaminación antes de la cosecha, si bien se ha observado, es rara. Son las etapas de secado y almacenamiento las que ofrecen mayores oportunidades para la contaminación fúngica.
- 4) Ninguna de las variedades analizadas es capaz de inhibir la producción de aflatoxinas en las condiciones del presente trabajo. Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de toxina producida por el hongo sobre cada una de ellas. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que existan variedades de maíz resistentes. Los trabajos realizados en esta materia han sido hasta ahora bastante limitados. Son necesarias nuevas investigaciones en es-

te aspecto, potencialmente promisorio, para poder determinar la existencia de semillas resistentes a la producción de aflatoxinas, que a la vez conserven su valor nutritivo y presenten buenas características agrícolas. En la búsqueda de posibles fuentes de resistencia sería interesante, por ejemplo, estudiar el comportamiento de las especies de maní silvestre que se conocen en nuestro país, al menos de aquéllas que dan híbridos fértiles con las variedades cultivadas.

El aislamiento e identificación de los hongos contaminantes y la determinación de su capacidad toxicogénica permitió establecer que:

- 5) Es frecuente la presencia de hongos del grupo Aspergillus flavus (se encontraron en el 41,0% de las muestras). Las cepas pertenecientes a este grupo se identificaron como Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus.
- 6) Un alto porcentaje (72,7%) de las cepas de este grupo eran productoras de aflatoxinas, vale decir que las cepas toxicogénicas son componentes comunes de la micoflora de los maníes que se cultivan en nuestro país y en el Paraguay.
- 7) Las cepas pertenecientes a la especie A. flavus solamente producían aflatoxinas B_1 y B_2 , mientras que los hongos identificados como A. parasiticus producían aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 .

27, 44, 58.

Estos resultados concuerdan con lo expuesto en la bibliografía en cuanto a la relación entre características morfológicas y culturales y el tipo de aflatoxinas producidas.

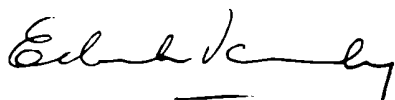
- 8) . La presencia de Aspergillus flavus no implica necesariamente la contaminación con aflatoxinas, pero cabe señalar que estos hongos significan un peligro potencial de toxicidad en los alimentos. Las experiencias realizadas demuestran que estos microorganismos no elaboran sus toxinas cuando el contenido acuoso de los granos es bajo (inferior a 9%), como fue el caso de las muestras de maíz analizadas sin inocular. Al elevar experimentalmente el contenido de humedad de esas muestras que en el análisis directo habían resultado negativas, se observó la proliferación de los hongos y la producción de sus toxinas.
- 9) Se comprueba una vez más que con un cuidadoso control de las condiciones de almacenamiento de los granos, en especial de su contenido de humedad, puede disminuirse el riesgo de contaminación con hongos capaces de producir aflatoxinas.

Durante la experimentación se pudo confirmar que cuando la semilla de maíz se acondicionaba de modo que su contenido acuoso permitiese, a una dada temperatura, un desarrollo óptimo de Aspergillus flavus, se producía un aumento significativo del valor de acidez libre de los aceites seminales.

Se pudo establecer:

- 1) Ni el incremento de contenido acuoso ni la inoculación con A. flavus introducían cambios significativos en los contenidos de aceite seminal.

- 2) El incremento de contenido acuoso de la semilla y posterior incubación en ausencia de A. flavus no producía incremento significativo de los valores de acidez libre de los aceites seminales, vale decir que tales condiciones no aumentaban significativamente la actividad lipolítica propia del grano.
- 3) El incremento de contenido acuoso y la incubación en presencia de A. flavus provocaba un aumento considerable del valor de acidez libre del aceite seminal.
- 4) Del examen de composiciones acídicas (CGL) de los aceites crudos, de los aceites crudos procedentes de grano incrementado en contenido acuoso e incubado y de este último inoculado con A. flavus, se pudo deducir que la acción lipolítica introducida por el hongo reúne cierta especificidad en el sentido de liberar a mayor velocidad los ácidos esterificados en las posiciones 1 y 3 de los glicéridos.



B I B L I O G R A F I A

- 1) - Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas, Nairobi, Kenya, 19-27 septiembre 1977. MYC 4-a "Perspectiva global sobre las micotoxinas".
- 2) - R. Allcroft y R. B. A. Carnaghan, "Toxic products in groundnuts: biological effects", Chem. & Ind., pag 50 (1963).
- 3) - P. K. C. Austwick y G. Ayerst, "Groundnut microflora and toxicity", Chem. & Ind., pag. 55 (1963).
- 4) - K. Sargeant, R. B. A. Carnaghan y R. Allcroft, "Toxic products in groundnuts: chemistry and origin", Chem. & Ind., pag. 53 (1963).
- 5) - K. Sargeant, A. Sheridan, J. O'Kelly y R. B. A. Carnaghan, "Toxicity associated with certain samples of groundnuts", Nature, 193, 1096 (1961).
- 6) - T. Asao, G. Büchi, M. M. Abdel Kader, S. B. Chag, E. L. Wick y G. N. Wogan, "The structures of aflatoxins B₁ and G₁", J. Am. Chem. Soc., 87, 882 (1965).
- 7) - E. Borker, N. Insalata, C. P. Levi y J. S. Witzeman, "Mycotoxins in feeds and foods", Adv. Appl. Microbiol., 8, 315 (1966).
- 8) - B. J. Wilson y W. Hayes, "Microbial toxins" en "Toxicants occurring naturally in foods", National Academy of Sciences, Washington D. C., 1973, pag. 391.

- 9) - G. Büchi, D. Foulkes, M. Kuromo y G. F. Mitchell, "The total synthesis of racemic aflatoxin B", J. Am. Chem. Soc., 88, 4534 (1966).
- 10) - Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas, Nairobi, Kenya, 19-27 septiembre 1977. MYC 4-b "Aspectos sanitarios y toxicológicos de las micotoxinas".
- 11) - K. R. Nagarajan, K. C. Rhee, C. M. Cater y K. F. Mattil, "Distribution of aflatoxins in various fractions separated from raw peanuts and deffated peanut meal", J. Am. Oil Chem. Soc., 52, 41 (1975).
- 12) - J. I. Clifford y K. R. Rees, "The action of aflatoxin B₁ on the rat liver", Biochem. J., 102, 65 (1967).
- 13) - W. H. Butler y J. M. Barnes, "Carcinogenic action of groundnut meal containing aflatoxin in rats", Food Cosmet. Toxicol., 6, 135 (1968).
- 14) - M. C. Lancaster, F. P. Jenkins y J. L. Philp, "Toxicity associated with certain samples of groundnuts", Nature, 192, 1095. (1961).
- 15) - R. B. A. Carnaghan, "Hepatic tumors in ducks fed a low level of toxic groundnut meal", Nature, 208, 308 (1965).
- 16) - R. O. Sinnhuber, J. H. Wales, W. E. Engebrecht, D. F. Amend, W. D. Kray, J. C. Ayres y W. E. Ashton, "Aflatoxins in cotton seed meal and hepatoma in rainbow trout", Fd. Proc., 24, 627 (1965).

- 17) - P. Robinson, "Infantile cirrhosis of the liver in India", Clin. Pediatr., 6, 57 (1967).
- 18) - I. Amla, S. Kumari, V. Sreenivasa, P. Jayaraj y H. B. Parpia, "Role of aflatoxin in Indian childhood cirrhosis", Indian Pediatr., 7, 262 (1970)
- 19) - T.C. Campbell, J.P. Caedo, J. Bulatoo-Jayme, L. Salamat y W. Engel, "Aflatoxin M₁ in human urine", Nature, 227, 403 (1970).
- 20) - Anónimo, "Alarm about aflatoxins", Nature, 212, 1512 (1966).
- 21) - L.A. Goldblatt, R. Y. Mayne, G. A. Harper, A. O. Franz, Jr. y L. S. Lee, "Retardation of the elaboration of aflatoxin in cottonseed by impermeability of the seedcoats", Crop Sci., 9, 147 (1969).
- 22) - K. S. Rao y P. G. Tulpule, "Varietal differences of groundnut in the production of aflatoxin", Nature, 214, 738 (1967).
- 23) - E. B. Lillehoj, W. J. García y M. Lambrow, "Aspergillus flavus infection and aflatoxin production in corn: influence of trace elements", Appl. Microbiol., 28, 763 (1974).
- 24) - P. B. Marsh, "Effects of trace metals on the production of aflatoxins by Aspergillus parasiticus", Appl. Microbiol., 30, 52 (1975).

//...

- 25) - B. Doupnik, Jr., "Aflatoxins produced on peanut varieties previously reported to inhibit production", Phytopathology, 59, 1554 (1969).
- 26) - B. Doupnik, Jr. y D.K. Bell, "Screening peanut breeding lines for resistance to aflatoxin accumulation", J. Amer. Peanut Res. Educa. Assoc., 1, 80 (1969)
- 27) - V. Nagarajan y R. V. Bhat, "Aflatoxin production in peanut varieties by Aspergillus flavus Link and Aspergillus parasiticus Speare", Appl. Microbiol., 25, 319 (1973).
- 28) - N. Lisker, A. Z. Joffe y Z.R. Frank, "Penetration of Aspergillus flavus and some other fungi into pods of various peanut varieties", Oleagineux, 25, 347 (1970).
- 29) - A. C. Mixón y K. M. Rogers, "Peanuts resistant to seed invasion by Aspergillus flavus", Oleagineux, 28, 85 (1973).
- 30) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by Aspergillus flavus in sterile peanuts", J. Am. Oil Chem. Soc., 44, 259 (1967).
- 31) - R. E. Pettit, R. A. Taber, P. J. Ives, E. L. Thurston, O. D. Smith y T. E. Boswell, "Peanut pods: structural differences among cultivars as revealed by scanning electron microscopy", Proceedings of the Workshop on Plant Science Applications of the SEM, IIT Research Institute, pág. 505 (1976).

- 32) - Ch. Zambettakis, "Etude de la contamination de quelques variétés d'arachide par Aspergillus flavus", Oleagineux, 30, 162 (1975).
- 33) - Ch. Zambettakis y A. Bockelee-Morvan, "Recherches sur la structure du tégument séminal de la graine d'arachide et son influence sur la pénétration de l'Aspergillus flavus", Oleagineux, 31, 219 (1976).
- 34) - P. Gillier y A. Bockelee-Morvan, "Sélection de l'arachide en vue de la résistance a la rosette et a l'Aspergillus flavus", Compte rendu de la semaine d'etude Agriculture et Hygiene des Plantes, Gembloux, Sept. 1975, pag. 47.
- 35) - V. Nagarajan y R. V. Bhat, "Factor responsible for varietal differences in aflatoxin production in maize", J. Agr. Food Chem. 20, 911 (1972).
- 36) - V. Nagarajan, R. V. Bhat y P. G. Tulpule, "Aflatoxin production in some varieties of soybeans (Glycine max L.)", Experientia, 29, 1302 (1973).
- 37) - V. Nagarajan, R. V. Bhat y P. G. Tulpule, "Aflatoxin production in sunflower (Helianthus annuus) seed varieties", Curr. Sci., 43, 603 (1974).
- 38) - A. Krapovickas, "Consideraciones acerca del maní cultivado", IDIA, N°145, pág. 71 (1960).

- 39) - W. F. Kugler, "Origen del maní y la creación de variedades", Boletín Informativo Manisero, N° 16, pag. 5 (1969).
- 40) - J. R. Pietrarelli, "Nuevo viaje de exploración para coleccionar maníes silvestres y cultivados", Boletín Informativo Manisero, N° 12, pag. 6 (1968).
- 41) - G. Karman de Sutton, L. A. Zaputovich, M. H. Bertoni y P. Cattaneo, "Aceites de semilla de maní de producción paraguaya. Composición química", Anales Asoc. Quím. Argentina, 59, 417 (1971).
- 42) - J. S. Tango, "Aflatoxina", Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, N° 34, Marzo 1974, pag. 37.
- 43) - E. Varsavsky, S. E. Sommer, A. H. Frade y M. A. Donadio, "Contaminación de granos de maní por aflatoxinas", Ciencia e Investigación, Tomo 32, pág. 162 (1976).
- 44) - H. W. Schroeder y R. A. Boller, "Aflatoxin production of species and strains of the Aspergillus flavus group isolated from field crops", Appl. Microbiol., 25, 885 (1973).
- 45) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by Aspergillus flavus in stored peanuts", J. Am. Oil Chem. Soc., 47, 347 (1970).
- 46) - K. B. Raper y D. I. Fennell, "The genus Aspergillus", Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1965.
- 47) - F. A. Hodges, J. R. Zust, H. R. Smith, A. A. Nelson, B. H.

- Armbrecht y A. D. Campbell, "Mycotoxins: aflatoxin isolated from Penicillium puberulum", Science, 145, 1439 (1964).
- 48) - M. M. Kulik y C. E. Holaday, "Aflatoxin: a metabolic product of several fungi", Mycopathol. Mycol. Appl., 30, 137 (1966).
- 49) - P. M. Scott, W. van Walbeek y J. Forgacs, "Formation of aflatoxins by Aspergillus ostianus Wehmer", Appl. Microbiol., 15, 945 (1967).
- 50) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus" en "Aflatoxin-Scientific background, control and implications", Ed. L. A. Goldblatt, Academic Press, New York, 1969, pag. 16.
- 51) - H. W. Schroeder y M. J. Verret, "Production of aflatoxin by Aspergillus wentii Wehmer", Can. J. Microbiol., 15, 895 (1969).
- 52) - W. van Walbeek, P. M. Scott y F. S. Thatcher, "Mycotoxins from food-borne fungi", Can J. Microbiol., 14, 131 (1968)
- 53) - B. J. Wilson, T. M. Harris y A. W. Hayes, "Mycotoxin from Penicillium puberulum", J. Bacteriol., 93, 1737 (1967).
- 54) - B. J. Wilson, T. C. Campbell, A. W. Hayes y R. T. Hanlin, "Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the Aspergillus flavus group", Appl. Microbiol., 16, 819 (1968).
- 55) - P. B. Mislivec, J. H. Hunter y J. Tuite, "Assay for aflatoxin

- production by the genera Aspergillus y Penicillium", Appl. Microbiol., 16, 1053 (1968).
- 56) - C. W. Hesseltine, O. L. Shotwell, J. J. Ellis y R. D. Stubblefield, "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus", Bacteriol. Rev., 30, 795 (1966).
- 57) - B. J. Wilson y W. Hayes, "Microbial toxins" en "Toxicants occurring naturally in foods", National Academy of Sciences, Washington D. C. (1973).
- 58) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus" en "Aflatoxin-Scientific background, control and implications," Ed. L. A. Goldblatt, Academic Press, New York, 1969, pag. 14.
- 59) - H. Murakami, K. Owaki y S. Takase, "An aflatoxin strain ATCC-15517", J. Gen. Appl. Microbiol., 12, 195 (1966).
- 60) - C. W. Hesseltine, O. L. Shotwell, M. L. Smith, G. M. Shannon, E. E. Vandegraft y M. N. Goulden, "Laboratory studies of the formation of aflatoxins in forages", Mycologia, 60, 304 (1968).
- 61) - R. A. Taber y H. W. Schroeder, "Aflatoxin-producing potential of the Aspergillus flavus-oryzae group from peanuts", Appl. Microbiol., 15, 140 (1967).
- 62) - B. H. Armbrrecht, F. A. Hodges, H. R. Smith y A. A. Nelson, "Mycotoxins. I. Studies on aflatoxin derived from contaminated

- peanut meal and certain strains of Aspergillus flavus",
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. , 46, 805 (1963).
- 63) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus" en "Aflatoxin-Scientific background, control and implications", Ed. L. A. Goldblatt, Academic Press, New York, 1969, pág 23.
- 64) - O. L. Shotwell, C. W. Hesseltine, R. D. Stubblefield y W. G. Sorenson, "Production of aflatoxin on rice", Appl. Microbiol. , 14, 425 (1966) .
- 65) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus" en "Aflatoxin-Scientific background, control and implications", Ed. L. A. Goldblatt, Academic Press, New York, 1969, pág. 28.
- 66) - B. Jarvis, "Factors affecting the production of mycotoxins", J. Appl. Bacteriol. , 34, 199 (1971).
- 67) - ARS 20-16, "Preventing mycotoxins in farm comodities", Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (1968).
- 68) - L. J. Ashworth, H. W. Schroeder y B. C. Langley, "Aflatoxins environmental factors governing occurrence in Spanish peanuts", Science, 148, 1228 (1965).
- 69) - E. Banchemo, M. A. Sala, y L. Gasoni, "Aislamiento e identificación de hongos en alimentos balanceados para aves y su ca-

- pacidad aflatoxicogénica", Primer Congreso y IV Jornadas Argentinas de Microbiología, Buenos Aires (1976).
- 70) - D. L. Lindsey y R. B. Turner, "Inhibition of growth of Aspergillus flavus and Trichoderma viride by peanut embryos", Mycopathologia, 55, 149 (1975).
- 71) - H. W. Schroeder y H. Hein, "Aflatoxins: production of the toxins "in vitro" in relation to temperatures", Appl. Microbiol., 15, 441, (1967).
- 72) - A. F. Schindler, J. G. Palmer y W. V. Eisenberg, "Aflatoxins production by Aspergillus flavus as related to various temperatures", Appl. Microbiol., 15, 1006 (1967).
- 73) - W. G. Sorenson, C. W. Hesseltine y O. L. Shotwell, "Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by Aspergillus flavus", Mycopathol. Mycol. Appl., 33, 49 (1967).
- 74) - T. J. Coomes, P. C. Crowther, A. J. Feuill y B. J. Francis, "Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin", Nature, 209 (1966).
- 75) - M. J. Frezzi, "La semilla de maní y sus problemas", Boletín Informativo Manisero, N° 12, pag. 4 (1968).
- 76) - C. M. Christensen, "The molds and man", Mac Graw Hill Paperbacks, 1965, pag. 131.
- 77) - M. J. Frezzi, "Enfermedades del maní", IDIA, N° 225, pag. 45, (1966).
- 78) - M. H. Abdalla, "Mycoflora of groundnut kernels from the Sudan",

Trans. Br. Mycol. Soc., 63, 353 (1974).

- 79) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus" en "Aflatoxin-Scientific Background, control and implications", Academic Press, New York, 1969, pag. 20.
- 80) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Aflatoxin production by isolates of Aspergillus flavus", Phytopathology, 56, 1390 (1966).
- 81) - R. A. Boller y H. W. Schroeder, "Aflatoxin-producing potential of Aspergillus flavus-oryzae isolates from rice", Cereal Sci. Today, 11, 342 (1966).
- 82) - K. S. Rao, T. V. Madhavan y P. G. Tulpule, "Incidence of toxigenic strains of Aspergillus flavus affecting groundnut crop in certain coastal districts of India", Indian J. Med. Res., 53, 1196 (1965).
- 83) - C. Gopalan, "Investigations on aflatoxin toxicity", Nutrition Document R. 3/Add. 33, PAG (WHO/FAO/UNICEF), July 1965 Meeting, Rome.
- 84) - U. L. Diener y N. D. Davis, "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus" en "Aflatoxin-Scientific background, control and implications" , Ed. L. A. Goldblatt, Academic Press, New York, 1969, pág. 22.
- 85) - J. B. Hutchinson, "Production and application of enzyme preparations in food manufacture", SCI Monograph Nº 11, Society of Chemical Industry, London, 1961, pag. 137.

//...

- 86) - J. R. Whitaker, Principles of enzymology for the food sciences, Marcel Dekker, Inc., New York, 1972, pág. 484.
- 87) - D. L. Carpenter, J. Lehman, B. S. Mason y H. T. Slover, "Lipid composition of selected vegetable oils", J. Am. Oil Chem. Soc. 53, 713 (1976).
- 88) - T. E. Kavanagh, G. A. Reineccius, P. G. Keeney y W. Weissberger, "Mold induced changes in cacao lipids", J. Am. Oil Chem. Soc., 47, 344 (1970).
- 89) - A. E. Walthing, G. Bleffert y M. Kiernan, "An improved rapid physicochemical method for aflatoxin in peanuts and peanut products", J. Am. Oil Chem. Soc., 45, 880 (1968).
- 90) - G. Smith, "Introducción a la micología industrial", Ed. Acribia, 1963, pág. 288.
- 91) - R. D. Stubblefield, O. L. Shotwell y G. M. Shannon, "Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂: separation and purification", J. Am. Oil Chem. Soc., 45, 686 (1968).
- 92) - T. P. Hilditch y P. N. Williams, "The chemical constitution of natural fats", Chapman & Hall, London, 1964, pag. 688.
- 93) - E. Varsavsky, S. E. Sommer y A. L. A. de Cabrera, "Aflatoxinas: su detección en maní y suelos de la provincia de Córdoba", Rev. Asoc. Arg. Microbiol., 5, 3 (1973).