

**Alexandre Ricardo
Pereira Schuler**

Mestre em Ciência
(Química Orgânica)-UFRJ
Coordenador do Curso de Graduação em
Química Industrial da UFPE

Óscar Mauricio Bernal Gómez

Zootecnista,
Universidad Nacional de Colombia,
Maestría en Nutrición,
área de concentración:
Ciencia de los alimentos, Recife- PE,
Brasil

Resumen

PALABRAS CLAVE:
Micotoxinas, Toxicología,
Degradación, Cáncer, Alimentos

En el presente trabajo son discutidos desde el punto de vista teórico, los últimos avances en el área de aflatoxinas: estructura, propiedades químicas, biosíntesis, activación del citocromo p-450, aflatoxina B1 y ácidos nucleicos, relación entre aflatoxina B1 y el gen p53; factores que favo-

recen los brotes de aflatoxicosis, síntomas clínicos y efectos tóxicos. También son abordados los temas de detoxificación enzimática, métodos químicos, físicos y microbiológicos de degradación e inactivación de estos agentes.

Aflatoxins. A review

Summary

KEYWORDS:
Micotoxins, Toxicology,
Degradation, Cancer, Foods

In this report are discussed from a theoretical point of view, the newest advances in the aflatoxins area: structure, chemical properties, biosynthesis, p-450 citocrom activation, aflatoxin B1 and nucleic acids, the relationship between the aflatoxin B1 and the p53 gen, fac-

tors that favor aflatoxicosis outbreaks, clinical symptoms and toxic effects. Topics such as enzymatic detoxification, chemical, physical and microbiological methods of degradation and inactivation of these agents are also addressed.

donde la
incidencia de
cáncer hepático
es alta, las
aflatoxinas están
presentes,
habitualmente,
en la
alimentación
humana

INTRODUCCIÓN

Los primeros estudios sobre aflatoxinas fueron hechos en 1960 en Inglaterra, debido a la muerte de aproximadamente 100.000 pavos, los cuales consumieron torta de maní que provenía de Brasil y Nigeria. Las aves morían en el período de una semana, siendo sus síntomas la pérdida del apetito, disminución de la movilidad, debilidad de las piernas y lesiones necróticas en el hígado (Martins, 1979).

Cuatro años después de la identificación de las aflatoxinas, se demostró su ocurrencia en varios alimentos, destinados no solamente para animales, sino también para humanos. En Malasia un levantamiento en varios productos como maní sin cáscara y tortas de maní, ajonjolí, coco, soya y maíz en un total de 69 muestras, indicó que apenas 25 de las mismas estaban exentas de aflatoxinas (Lim & Yeap, 1966).

Investigaciones en el mundo entero revelaron que el maní y sus derivados son susceptibles a la acción de las micotoxinas. En Canadá en 1970, 26 % de las muestras presentaron una contaminación por encima del patrón establecido por la OMS, de 30 ppb de aflatoxinas B₁ y G₁ (Gelda & Luyt, 1977). En Argentina, 47 % de las muestras variaron entre 100 y 1.000 ppb de aflatoxinas totales (Varsavsky & Sumer 1977). Crowter citado por Fonseca (1969), describió su presencia en salvados con índice de toxicidad altos, llegando hasta 4.000 ppb de AFB₁ e 3.000 ppb de AFG₁.

Oettle, 1965, citado por Butler (1974) formuló la hipótesis de la asociación entre la presencia de carcinoma hepático y el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas en áreas del África Sub-Sahariana y en el Sudoeste Asiático; regiones del planeta con alta incidencia de esta enfermedad, sugiriendo que factores como hepatitis viral, infestación por parásitos, hemossiderosis, *kwashiorkor* o la ingestión de alcaloides tóxicos de la pirridolizina contribuyen con la aparición de las neoplasias del hígado. En Kenia, Suazilandia, Tailandia y Mozambique, donde la incidencia de cáncer hepático es alta, las aflatoxinas están presentes, habitualmente, en la alimentación humana. La carcinogenicidad de las aflatoxinas ha sido demostrada en varias especies animales. AFB₁ induce tumores malignos en rata, ratón doméstico, mono, pato, salmón y trucha; el hígado es el órgano blanco para este compuesto. Algunos tumores en el pulmón también fueron observados en ratón doméstico. En ratas aparecieron tumores renales e intestinales, cuando fueron tratados con AFB₁. La AFB₁ produce efectos carcinogénicos en muchas especies después de exposiciones a dosis bajas (1 mg/kg) en la dieta). Las AFG₁ e AFB₂ son también reportadas como inductoras de tumores hepáticos en algunas especies animales.

El objetivo de este trabajo es divulgar conocimientos científicos básicos sobre las aflatoxinas y

proporcionar una alternativa de estudio que busca la disminución de los riesgos para la salud humana y animal; de la misma manera, intenta proporcionar una herramienta para disminuir las pérdidas económicas en la industria de alimentos concentrados y de los granos, en general.

REVISIÓN DE LITERATURA

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos principalmente, en el final de la fase exponencial y en inicio de la fase estacionaria de crecimiento, sin embargo, no son sustancias metabólicamente esenciales para los microorganismos (Butler, 1974). El término micotoxina tiene su origen del griego "MYKOS" que significa hongo y del latín "TOXICOM" que significa veneno. Las aflatoxinas son producidas por hongos del género Aspergillus: A. flavus Link y A. parasiticus Speare (Bastos, comunicación personal, 1997).

1. BIOQUÍMICA DE LAS AFLATOXINAS

A través de cromatografía de capa delgada, Sargeant *et al.* (1961) determinaron las diferentes aflatoxinas y su fluorescencia en luz ultravioleta. Una fracción presentó fluorescencia azul (*blue*) y otra verde (*green*); fueron designadas como Aflatoxina B e Aflatoxina G,

respectivamente. Independientemente, Van Der Zidjen *et al.* 1962 y De longh *et al.* (1962), aislaron dos componentes fluorescentes con fórmulas empíricas similares. Hartley *et al.* (1963) aislaron cuatro compuestos fluorescentes a la luz ultravioleta, utilizando el mismo método analítico, los cuales fueron designados como aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ en orden decreciente de Rf. Butler, 1974, indica que vacas alimentadas con torta de maní contaminada con aflatoxinas excretaron un factor tóxico en la leche con el mismo efecto biológico que la aflatoxina B₁, ese compuesto fue denominado toxina de la leche (*milk toxin*). Holzapfel *et al.* (1965), identificaron otros dos compuestos de la orina de ovejas que fueron alimentadas con una ración contaminada con una mezcla de aflatoxinas, similares a la toxina de la leche y designadas como aflatoxinas M₁ e M₂, respectivamente.

1.1 Estructura de las aflatoxinas

Las aflatoxinas son cumarinas ligadas a una unidad bifurano más un anillo de pentanona (AFB) o lactona (AFG) (Steyn *et al.*, 1980). Las estructuras son presentadas en la recopilación de Butler (1974), (figura 1).

1.2 Propiedades químicas

Las propiedades químicas de las aflatoxinas están resumidas en la tabla 1.

Figura 1

Estructuras de las aflatoxinas. Simbología: B₁: aflatoxina B₁, B₂: aflatoxina B₂, G₁: aflatoxina G₁, G₂: aflatoxina G₂, B_{2a}: Aflatoxina B_{2a}, G_{2a}: aflatoxina G_{2a}, M₁: aflatoxina M₁, M₂: aflatoxina M₂, GM₁: aflatoxina GM₁ y Aflatoxicol

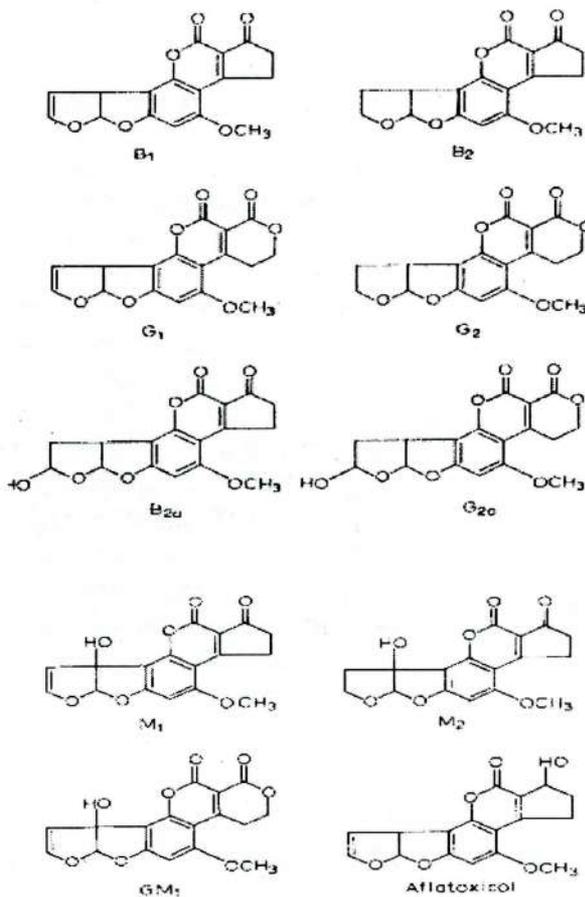


TABLA 1
Propiedades químicas de las aflatoxinas

Aflatoxina	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Punto de Fusión (C)	Absorción 362-363 nm	Emisión de Fluorescencia (nm)
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	21,800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	23,400	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	16,100	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	21,000	450
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	19,000	425
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	21,000	—
GM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	344	276	12,000	—
B _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240	20,400	—
G _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	190	18,000	—
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	314	230-234	14,100	425

Fuente: Butler, 1974

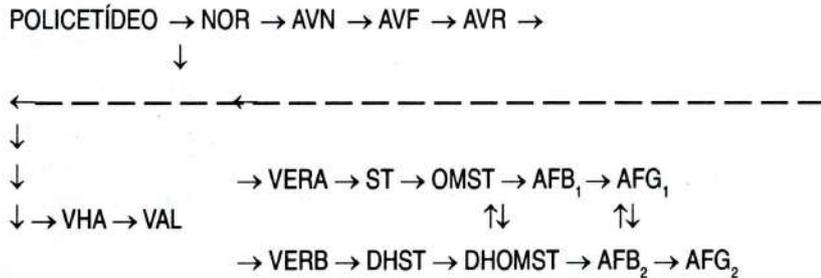
1.3 Biosíntesis de las aflatoxinas

Está propuesto que el primer paso para la generación de una cadena precursora de policétidos de la AFB₁, involucra la polimerización de una unidad de acetato y nueve unidades de malonato con la pérdida de CO₂ a través de la Policétido Sintetasa PCS, de modo análogo a la biosíntesis de ácidos grasos (Bhartnagar *et al.*, 1992; Dutton, 1988). Una hipótesis alternativa y más plausible es la síntesis de una

unidad iniciadora de hexanato de 6 carbonos por una ácido-graso sintetasa AGS, cuando es extendida por la PCS sin más cetoreducción para generar un decátido de 20 carbonos, la norantrona (Townsend *et al.*, 1991). En este esquema, la norantrona es oxidada a antraquinona del ácido norsolorínico (NA) por una oxidasa hipotética. Las demás etapas propuestas están resumidas en la figura 2 (Trail *et al.*, 1995).

Figura 2

Esquema de la biosíntesis de las aflatoxinas. McCormick *et al.* (1987) y Dutton *et al.* (1985) modificado por Trail *et al.* (1995)



Donde:

NOR:	Ácido Norsolorínico	VERA:	Versicolorina A
AVN:	Averantina	VERB:	Versicolorina B
AVF:	Averufanina	ST:	Esterigmatocistina
AVR:	Averufina	OMST:	Orto - metil - Esterigmatocistina
VHA:	Versiconal Acetato Hemiacetal	DHOMST:	Dihidro - Orto - metil esterigmatocistina
VAL:	Versiconal	AFB ₁ :	Aflatoxina B ₁
DHST:	Dihidro - esterigmatocistina	AFB ₂ :	Aflatoxina B ₂
AFB ₁ :	Aflatoxina B ₁	AFG ₁ :	Aflatoxina G ₁
AFG ₁ :	Aflatoxina G ₁	AFG ₂ :	Aflatoxina G ₂

1.4 Activación del Citocromo P- 450 por las aflatoxinas

Las oxidasas de acción mixta se asocian con una hemoproteína llamada Citocromo P-450 (Guenge- rich, 1988). Muchas drogas xenobióticas y metabolitos celulares endógenos son químicamente modificados con procesos asociados con el Citocromo P-450 en los microsomas del retículo endoplasmático (Caldwell *et al.*, 1983). Los microsomas son estructuras que sólo se obtienen experimentalmente, mediante procesos de centrifugación diferencial de homogenizados de tejidos, y si bien concentran estructuras como membranas del

retículo endoplasmático, los microsomas no existen como tales en la célula.

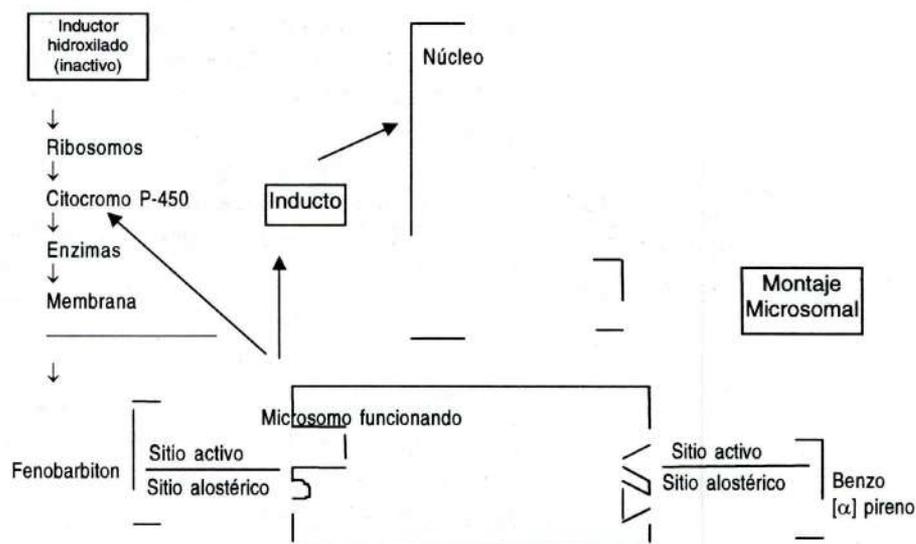
El potencial reductor de las reacciones del Citocromo P-450 es mediado por la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADP) reducida. La hemoproteína oxidada se liga con un sustrato y sufre una reducción electrónica con formación de un complejo de oxígeno molecular. El complejo aporta energía para la activación molecular del sustrato con formación de intermediarios electrofílicos, que pueden reaccionar con sitios nucleofílicos en el ácido nucleico. Un epóxido pasa por los átomos de

carbono del terminal furano, siendo considerada como la actividad intermediaria del Citocromo P-450 mediante oxidación, con la formación del subsecuente número de derivados estables que incluyen las aflatoxinas M₁, P₁, Q₁ e B_{2a}. En presencia de agentes apropiados como ácido glucorónico, sulfatos y del glutatión, los derivados hidroxilados pueden formar complejos que son excretados. Si bien el sistema Citocromo P-450 funciona para detoxificar agentes xenobióticos como las aflatoxinas, éste también produ-

ce un intermediario activo ligado al DNA. Fue demostrada una inequívoca relación entre Citocromo P-450 y toxicidad de las aflatoxinas (Caldwell, 1985).

El control del flujo de eventos en el complejo Citocromo P-450 entre detoxificación y activación del intermediario ligado al DNA representa una etapa verdaderamente excepcional, aunque existan algunas informaciones pertinentes, las funciones básicas vinculadas al proceso son en general ambiguas (Lillehoj, 1992), (figura 3).

Figura 3
Complejo Microsomal Citocromo P-450 (Lillehoj, 1992)



Etapas estructurales de los compuestos biológicamente activos aportan una importante influencia en el proceso del Citocromo P-450. El encuadre de la molécula del sustrato en el agregado microsoma-

mal define los átomos de carbono disponibles para la oxidación. Han sido identificados un número de activadores e inhibidores microsoma-

La AFB₁ ha sido asociada al cáncer de hígado

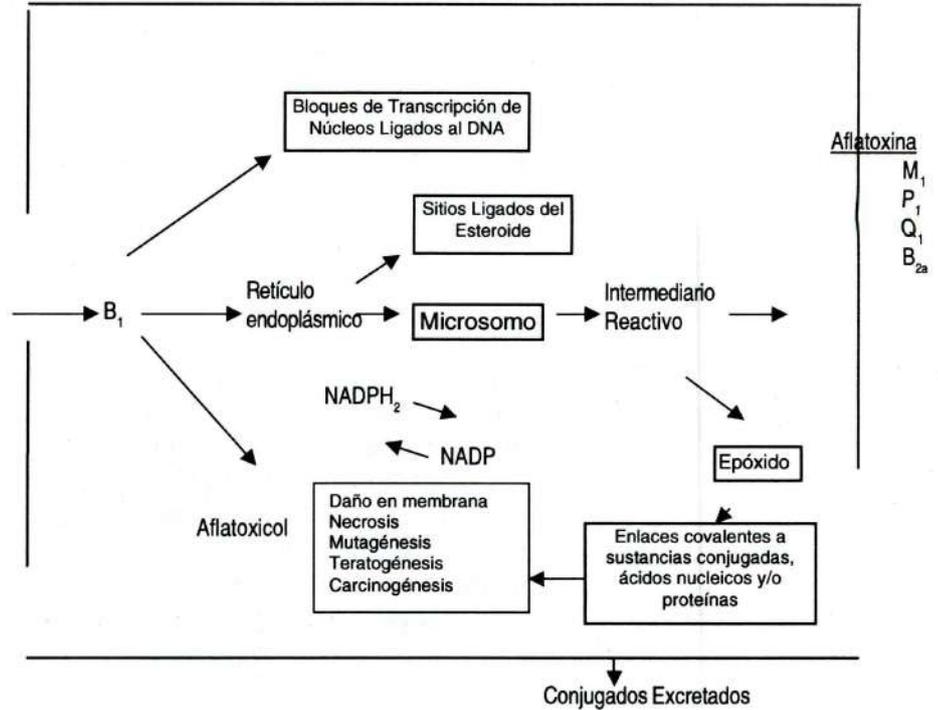
enzimático del agregado microsomal que pueden modificar la especificidad catalítica de la unidad. La actividad microsomal puede modificar ésta por alteraciones de tipo alostérico; por ejemplo, hormonas esteroides pueden funcionar como moduladores alostéricos de la actividad microsomal o actuar como competidores para sitios de reacción xenobiótica. Recientemente ha sido identificada una familia de isoenzimas del Citocromo P-450 con variación asociada a la función. También fue encontrada la base genética, responsable en ratones, de la especificidad del Citocromo P-450 para la producción de cada uno de los conjugados DNA-aflatoxina o el derivado aflatoxina M₁. Patrones variados de especificidad también fueron observados con preparaciones de Citocromo P-450 y aflatoxinas en: 1- Enlaces covalentes con el DNA, 2- Mutación / reversión en *Salmonella typhimurium*, y 3- Inducción errada de reparación S.O.S. bacteriana (Shimada *et al*, 1987).

1.5 Aflatoxina B1 y ácidos nucleicos

Entre las aflatoxinas, la que despertó mayor atención de los investigadores fue la AFB₁, debido a que sus efectos tóxicos son cuantitativamente más importantes que los ocasionados por las otras; su acción inhibidora de la síntesis proteica, como también el hecho

de ser considerada un poderoso agente hepatotóxico, es reconocida como uno de los más potentes cancerígenos químicos (Lapa, 1983). Según Moule (1977), la referida toxina es un potente inhibidor de la síntesis del DNA bloqueando *in vivo* la replicación, transcripción y traducción. El metabolismo celular es afectado en su conjunto, sin embargo, la síntesis de los ácidos nucleicos es afectada en primer plano (debido a la ingestión de pequeñas dosis), mientras que la síntesis de las proteínas es perjudicada más tardíamente. El RNA ribosomal es el más fuertemente inhibido, ya que constituye 80 % del RNA celular total (Frayssinet & Lafarge, 1970). Respecto a la síntesis de DNA, ocurre una inhibición más lenta (Lapa, 1983). Clifford & Ress (1965) concluyeron que la AFB₁, al afectar la célula hepática se acumula en el núcleo, ligándose al DNA e inhibiendo la RNA-polimerasa; luego, ocurre una disminución de la síntesis de RNA. Esta inhibición se observa después de aproximadamente 15 minutos en la reducción de la síntesis proteica. También encontraron que la persistencia de la reducción del RNA mensajero es la causa de la degranulación del retículo endoplasmático. Dianzini (1976) afirmó que los inhibidores de la síntesis proteica pueden provocar daños hepáticos y que la intensidad puede estar relacionada con la cantidad de aflatoxina, como lo indica la figura 4.

Figura 4
Metabolismo intracelular de la aflatoxina B₁ (Lillehoj, 1992)



1.5.1 Relación aflatoxina B₁ y Gen p53

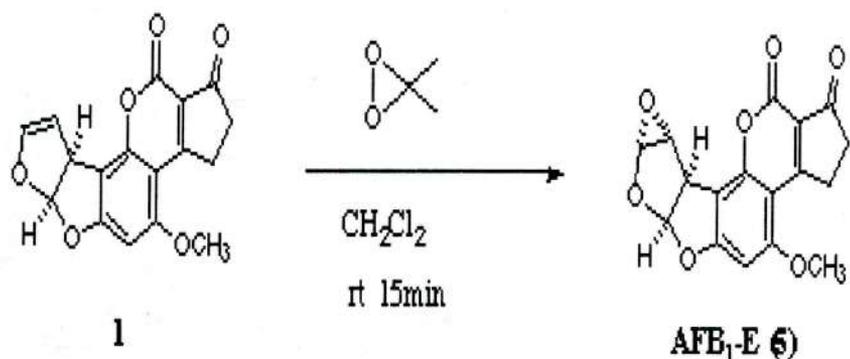
La AFB₁ ha sido asociada al cáncer de hígado, siendo conocido que la AFB₁ ejerce su acción carcinogénica causando un lugar de mutación en el gen p53. Dicha proteína fue llamada "Guardia del Genoma" debido a sus funciones supresoras de tumores; representa un papel crucial en la protección del cuerpo contra el crecimiento canceroso. La mutación del gen p53 es la lesión genética más común en cáncer humano. Se cree

que el punto de mutación causado por las aflatoxinas es responsable de un gran porcentaje de carcinomas hepáticos humanos CHH (Urbanek, 1997).

Para conocer mejor este fenómeno los investigadores estudian activamente las interacciones de la AFB₁ con el DNA.

La forma activa de la aflatoxina B₁ es el Epóxido E - 5 (figura 5).

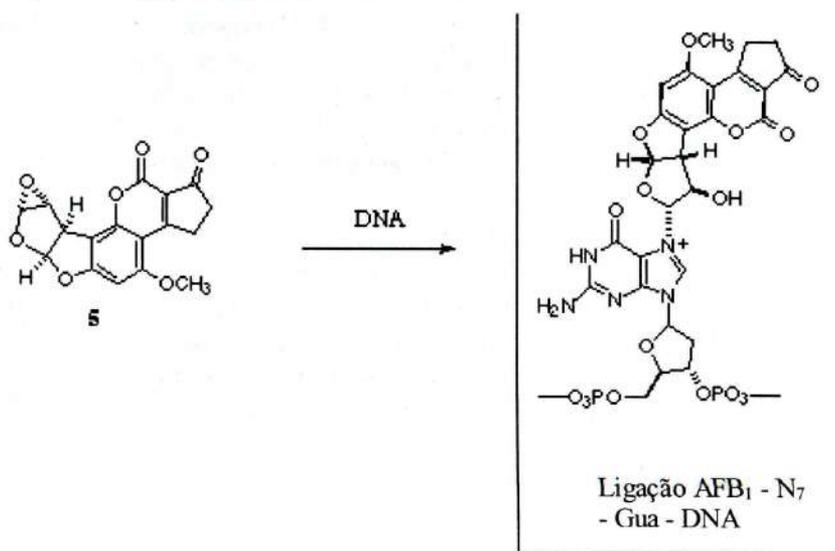
Figura 5
Epóxido E-5 activo de la AFB₁. (Urbanek, 1997)



En 1989, Harris *et al* estudiaron el enlace de equilibrio de la AFB₁ con el oligodeoxinucleótido d(ATG-CAT)₂ usando resonancia magnética nuclear, encontraron que los protones de la AFB₁ fueron más afectados en la presencia del oli-

godeoxinucleótido que en su ausencia. Los protones de las bases nucleotídicas resultaron también afectados, pero en un grado menor. Esto apoya la hipótesis de la intercalación de la AFB₁ y las bases nucleotídicas en la propia doble hélice del DNA (figura 6).

Figura 6
Enlace de equilibrio de la AFB₁ con el Oligodeoxinucleótido d(ATGCAT)₂ (Harris *et al*. 1995)



En el mismo trabajo ellos presentaron experimentos de enlace competitivo con bromuro de etidio y actinomicina D (figura 7), dos conocidos agentes intercalantes, que transfieren la AFB₁ de su lugar de enlace. También estudiaron con resonancia magnética nuclear el enlace covalente de la AFB₁ y las uniones del oligonucleótido arriba citado. Ellos hallaron efectos nucleares *Overhauser* entre la unidad de AFB₁ y la porción d(TGC) d(GCA) del oligodeoxinucleótido. Esta evidencia también conduce al modelo de intercalación de la AFB₁ ligada con el DNA.

2. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LAS AFLATOXINAS

Todos los animales vertebrados son sensibles a la acción de las aflatoxinas, pudiendo ocurrir dos tipos de lesiones: agudas, que son provocadas por la ingestión de dosis relativamente elevadas que ocasionan lesiones hepáticas graves, como necrosis del parénquima, de efecto casi siempre letal; y crónicas, las cuales producen lesiones progresivas, severa depresión del crecimiento corporal, alteraciones histológicas y hepatomas, después de un periodo más o menos prolongado de ingestión de dosis subagudas (Edds, 1973).

2.1 Factores que favorecen los brotes de aflatoxicosis

Los factores más importantes son el tenor de humedad del substrato, humedad relativa y temperatura; la temperatura óptima para el

crecimiento de *A. flavus* es 36 - 38 C, sin embargo, la máxima producción de aflatoxinas está entre 25 - 27 C, así como la sequía en la pre-cosecha de los granos, daños mecánicos hechos por insectos, *estrés* por humedad en las plantas, tiempo húmedo junto con altas temperaturas en la cosecha y variedades de granos susceptibles a la contaminación. La conjunción de estos factores puede haber sido la causa del más grave brote de aflatoxicosis en India en 1974, cuando una severa sequía seguida de abundantes lluvias no estacionales, antes de la cosecha de maíz, fue severamente contaminado con 15,6 ppm de aflatoxinas, causando la muerte de más de 100 personas (Krishnamachari *et al*, 1975).

Otros autores indican una epidemia que involucró lesión hepática severa, la cual "resultó en la muerte de más de 100 personas y sería enfermedad en otras 400" (Singh, 1994). En Kenia, en 1981, sobre condiciones climáticas similares, el consumo de arroz contaminado produjo la muerte de 12 personas debido a aflatoxicosis aguda (Ngnindu *et al*, 1982).

2.2 Señales clínicas

Durante el brote de aflatoxicosis aguda en humanos en India, los hombres fueron dos veces más afectados que las mujeres. Los síntomas presentados fueron: ictericia, antecedida de vómitos y anorexia, seguida típicamente por ascitis y edema de las extremidades

inferiores. La mortalidad fue alta (397 afectados, 106 muertos) y la muerte ocurrió repentinamente, casi siempre precedida por hemorragia gastrointestinal masiva (Krishnamachari *et al*, 1975). Los pacientes que murieron en Kenia presentaron síntomas clínicos similares y los cambios patológicos en el hígado fueron característicos de hepatitis tóxica (Ngnindu *et al*, 1982).

Los primeros síntomas clínicos en brotes de aflatoxicosis aguda en vacas, perros, gallinas y cerdos son inapetencia, reducción de la ganancia de peso y malestar general. En algunos animales ocurrió evidencia clínica de lesión hepática, manifestada por ictericia, hemorragia, edema y ascitis. La mortalidad

es usualmente alta y la muerte puede ser precedida por síntomas nerviosos como ataxia y convulsiones (Maracas y Nelson, 1986).

2.3 Efectos tóxicos

Las aflatoxinas son hepatotóxicas, teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas. Fueron establecidas Dosis Letales Medias LD₅₀ (Tabla 1). Niveles bajos de AFB₁, 1,0 e 0,05 ppb, presentes en la dieta pueden causar cáncer hepático en ratas y trucha arco-iris, respectivamente. Las aflatoxinas exhiben efecto *carrier*; esto es, pueden aparecer residuos de las mismas en carne, leche y huevos de los animales que consumieron alimentos contaminados (Stoloff, 1977). Las aflatoxinas también pueden deprimir el sistema inmune de los animales (Steyn, 1980).

Tabla 2
Dosis letales medias LD₅₀ para varias especies animales

Especie	(mg/Kg., oral)
Conejo	0,3
Pato	0,3
Gato	0,6
Trucha	0,8
Perro	1,0
Cobayo	1,4
Oveja	2,0
Mono	2,2
Ratón doméstico	9,0
Hámster	10,2
Pollo	11,5
Rata	7,2 y 17,9, macho y hembra respectivamente
Cáncer	1,0 y 0,05 ppb

(Stoloff, 1977).

3. AUTODETOXIFICACIÓN, DETOXIFICACIÓN, DEGRADACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE AFLATOXINAS

Después de la síntesis de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en un producto contaminado, su detoxificación no es fácil. Los pocos procesos conocidos son anti económicos y, a veces, tornan el producto inadecuado para el consumo humano (Martins, 1979). Por tales motivos se han utilizado métodos físicos, químicos y biológicos para la degradación de aflatoxinas con resultados contradictorios.

3.1 Detoxificación enzimática

Ha sido demostrado que las biotransformaciones de las aflatoxinas son mediadas por enzimas microsomas, que tienen función de hidroxilasas mixtas en el retículo endoplasmático en organismos superiores (Rasic *et al.*, 1991). En preparaciones de microsomas del hígado de muchas especies animales, fue demostrada la transformación de la AFB₁, la más hepatotóxica y hepatocarcinogénica, en un derivado 4-hidroxi (AFM₁) y un producto análogo, la AFGM₁, que se puede formar a partir de AFG₁. Se reportó que AFB₁ y AFG₁ se metabolizan a sus respectivos derivados 2-hidroxi o hemiacetales por NADPH₂ (Patterson, 1973).

También se indica que la detoxificación enzimática de las aflatoxinas en el hígado de conejos, patos, cobayos, gallinas y ratones do-

mésticos, sigue la ruta menor para la formación de AFM₁. Los microsomas del hígado humano son capaces de detoxificar AFB₁ convirtiéndola en AFQ₁. Una vez producida la AFQ₁ no se oxida de modo apreciable en los microsomas del hígado humano y no es muy genotóxica. La hidroxilación 3a de la AFB₁ a AFQ₁ se considera un patrón potente indicativo de detoxificación (Raney *et al.*, 1992).

Otros estudios también han demostrado que el ratón doméstico llega a ser resistente a los efectos carcinogénicos de la AFB₁ y que esto es una expresión de una isoenzima de la glutatona s-transferasa (GST), con alta actividad sobre el epóxido 8-9 de la AFB₁ (Borroz *et al.*, 1991).

Daniels *et al.* (1990) demostraron cambios del potencial de hepatocarcinogenicidad y hepatotoxicidad de la AFB₁ al transformarse en los metabolitos menos tóxicos AFM₁ y AFQ₁ en microsomas de hígado y pulmón de conejo. Sistemas microbiales muestran similitudes con los sistemas animales. Hamid y Smith citados por Patterson (1973) demostraron claramente como está involucrado el sistema enzimático microsomal en la degradación de aflatoxinas en *A. flavus*. La degradación de aflatoxinas por extractos libres de células de *A. flavus* fue aumentada por NADPH el cual es consistente con la actividad de las enzimas en que este cofactor es necesario para acentuar la detoxificación de aflatoxinas en sistemas eucarióticos.

El pH y temperatura fisiológicamente óptimos, conducen a la degradación enzimática de las aflatoxinas

Doyle & Marth (1978) reportaron que la 17-hidroxi-esteroide deshidrogenasa transforma AFB₁ en AFR₀ (un derivado no tóxico). También observaron la máxima actividad degradativa de aflatoxinas por factores intracelulares de los hongos. El pH y temperatura fisiológicamente óptimos, conducen a la degradación enzimática de las aflatoxinas. Las peroxidases aparentemente poseen un papel clave en la degradación o detoxificación de las aflatoxinas. El peróxido de hidrógeno, H₂O₂, aumenta la actividad degradativa de las aflatoxinas, cuando es adicionado a las proteínas obtenidas de micelio de *A. parasiticus*, demostrándose que la peroxidasa puede ser la enzima que posiblemente ayuda en la detoxificación de aflatoxinas. Otros estudios han indicado la acción de la peroxidasa microsomal en la detoxificación de aflatoxinas sin excluir la posibilidad del rol de la Citocromo P-450 Mono-Oxigenasa en la detoxificación enzimática de ellas (Hamid & Smith, 1987).

3.2 Procesos externos de degradación y biodegradación de las aflatoxinas

3.2.1 Métodos físicos

La literatura cita varios factores físicos: radiación gamma y/o humedad (Uralova *et al*, 1987); calor y/o radiación gama (Narvaiz *et al*, 1988); solamente radiación gamma (Patel *et al*, 1989); y luz de diferentes longitudes de onda (Shrivastava *et al*, 1991).

3.2.2 Métodos químicos

Varios autores han utilizado diversos agentes químicos en la detoxificación de aflatoxinas es decir disminución o eliminación del poder toxigénico de estos agentes: permanganato de potasio, cloramina, amoniaco, hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, ácido cromosulfúrico (Dvorak, 1990); cloro (Samarajeewa *et al*, 1991); agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno, peróxido de benzoilo; bases como metilamina y aldehídos como formaldehído (Natarajan, 1992); aceites de canela y de ajo (Sinha *et al*, 1993); preservantes alimenticios como ácido sórbico, ácido propiónico (Finotti *et al*, 1992); fungicidas como Dicloran, Iprodione, Vinclozilin (Hasan, 1993); fitoalexina, una gliocelina de soya, (Song & Carral, 1993); extracto de ajo y bicarbonato de sodio, metabisulfito de sodio (Sing & Chand, 1993); clobentiazona y triciclazol (Wheeler *et al*, 1989); hidróxido de amonio (Mercado *et al*, 1991); carvacrol (Akgul *et al*, 1991); Xantoxina, Bercapten, Psoralene, Kellina, Visnagina; Aluminosilicato hidratado de calcio y sodio (Huff *et al*, 1992); ácido tánico, ácido cáfico y floriglucinol (Sinha *et al*, 1990).

3.2.3 Métodos microbiológicos

3.2.3.1 Degradación de las aflatoxinas por los propios hongos toxigénicos

Los hongos productores de aflatoxinas como *A. flavus* y *A. parasiticus* presentan amplia distribución en

Los hongos productores de aflatoxinas como *A. flavus* y *A. parasiticus* presentan amplia distribución en la naturaleza y contaminan muchos alimentos y materias primas

la naturaleza y contaminan muchos alimentos y materias primas, volviéndolos no aptos para el consumo (por producción de aflatoxinas) y constituyen una amenaza para la salud humana y animal. Pueden competir entre ellos, ya sea por alteraciones de las condiciones de crecimiento, incluyendo modificaciones del pH y temperatura, para detoxificar toxinas por el propio organismo productor; también pueden detoxificar la propia toxina por manipulación. De hecho se han realizado estudios para demostrar la capacidad de *A. flavus* y *A. parasiticus* (toxigénicos) en degradar aflatoxinas producidas por ellos mismos (Doyle & Marth, 1978).

3.2.3.2 Degradación de las aflatoxinas por cepas atoxigénicas de las mismas especies de hongos

Doyle & Marth (1978) fueron pioneros en estudios de detoxificación de aflatoxinas con cultivos de *A. parasiticus*, cepa toxigénica NRRL 2999 y atoxigénica NRRL 3315. Ellos compararon los dos cultivos y reportaron que la atoxigénica fue menos eficiente en detoxificar aflatoxinas. En otro trabajo se encontró que una variedad atoxigénica de *A. flavus* resultó más efectiva en la detoxificación de aflatoxinas producidas por las toxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en condiciones diferentes de cultivo (Doyle & Marth, 1978). Nakazato *et al.* (1991) demostraron que AFB₁

producida por los hongos toxigénicos *A. flavus* y *A. parasiticus* es transformada o metabolizada por todas las muestras de *A. flavus* no toxigénicas; los metabolitos comunes fueron Af_A y Af_B.

Linajes atoxigénicos de *A. flavus* pueden presentar potencialmente como agentes del control biológico logrando la detoxificación de maíz contaminado por aflatoxinas en la pre y pos cosecha. El uso de un linaje atoxigénico de *A. flavus* llevó a una reducción significativa en la AFB₁ cuando fue inoculada con una toxigénica después de 16 horas de incubación, concluyéndose que las cepas atoxigénicas de *A. flavus* pueden usar en control biológico de contaminación por aflatoxinas (Cotty, 1990).

Durante tres años se adelantó un estudio para evaluar la cepa de *A. parasiticus* (NRRL 13539), no productora de aflatoxinas, como un agente biocompetitivo en el control de contaminación por aflatoxinas en la pre cosecha de maní. Las concentraciones medias de aflatoxinas totales en los granos experimentados fueron de 11, 1 y 40 ppb para las cosechas de los años 1987, 1988, y 1989 respectivamente, comparando con los controles correspondientes que fueron de 531, 96 y 241 ppb, respectivamente. Las poblaciones del suelo de agentes biocompetitivos no fueron mayores que las de cepas salvajes de *A. flavus* y *A. parasiticus* en suelo no tratado (Domer *et al.*, 1987).

3.2.3.3 Degradación de las aflatoxinas por otros microorganismos atoxigénicos

Fueron estudiadas tres especies de *Lactobacillus*, las células demostraron ser efectivas para la prevención del crecimiento de los hongos aflatoxigénicos y los metabolitos bacterianos disminuyeron la cantidad de aflatoxina producida (Karunaratne *et al*, 1990). El tratamiento independiente de quitosano o *Bacillus subtilis* aplicados 48 horas después de la inoculación con *Aspergillus flavus* inhibió la producción de aflatoxinas (Cuero *et al*, 1991).

Fue investigada la influencia de *Rhizopus* e *Neurospora spp* en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, así como la acumulación de AFB₁. Cuando fueron inoculados simultánea pero independientemente, *Rhizopus* e *Neurospora spp* en maní tostado, el *Aspergillus* creció en menor proporción y se observó la formación de micelios y de esporas diferentes de los patrones. La acumulación de AFB₁ durante 6 semanas de incubación fue de 34 % en cultivos mixtos con *Rhizopus spp* y 1,7 % en asociación con *Neurospora* en comparación con los cultivos control. Esto representa una evidencia de que la formación de metabolitos de *Rhizopus* y *Neurospora* determinó la inhibición del crecimiento del hongo y/o producción de AFB₁. (Nout, 1989).

Se hizo un estudio sobre el efecto del extracto del hongo *Rhizopus delemar* en la carcinogenicidad de la AFB₁ en ratas. En el grupo que

recibió *R. delemar* adicionado con AFB₁, los focos hiperplásicos y enzimo-patológicos disminuyeron. El resultado de este experimento mostró que *R. delemar* tiene capacidad intensiva en la inhibición del daño tóxico y la carcinogenicidad en el hígado por la AFB₁, demostrando ser capaz de retardar la aparición de focos alterados y de controlar su desarrollo, impidiendo el aumento de los procesos degenerativos. El *R. delemar* se puede usar como un potente y eficiente controlador de la intoxicación por AFB₁ (Zhu *et al*, 1989).

Cuatro géneros de hongos: *Aspergillus niger*, *Eurotium herbarium*, *Rhizopus spp* y *A. flavus* no productor de aflatoxinas, convirtieron la AFB₁ en Aflatoxicol (AFL), un compuesto no tóxico, pero puede ser una reacción reversible y convertirse en un toxico tan fuerte como AFB₁.

Estos resultados sugieren que la interconversión de AFB₁ y AFL es mediada por enzimas intracelulares de *A. flavus* y de *Rhizopus spp*. En adición, la isomerización de AFL para AFB₁ observada en el medio de cultivo también es sugerida por la disminución de pH (Nakazato *et al*, 1990). En otro trabajo se sugiere que la enzima extraída del micelio de *Rhizopus* puede ser responsable de la actividad de interconversión, pudiendo ser una oxirreductasa dependiente del NADP, en la que la conversión oxidativa de AFL en AFB₁ y la conversión reductora de AFB₁ en AFL siguió los mismos patrones en fracciones obtenidas por permeación de

gel y cromatografía de intercambio iónico (Nakasato *et al.* 1991).

Las conclusiones del estudio de Faraj *et al.* (1993) muestran una inhibición mutua a 30°C con Índice de Dominancia (ID) de 2 entre *A. flavus* y *A. niger*, *R. oryzae* e *M. racemosus*. Combinaciones de *A. flavus* con *M. racemosus*, *Alternaria alternata* y *Bacillus stearothermophilus* mostraron poca diferencia con el cultivo puro de *A. flavus* en la disminución de las cantidades de aflatoxina producida en granos de maíz después de 10 días de incubación a 30°C. Los tratamientos de 5 días a 30°C, seguido de 5 días a 40°C, respectivamente, presentaron una reducción mayor en la producción de aflatoxinas que aquel de 10 días a 30°C. Combinaciones entre *A. flavus* con *M. racemosus* y *A. flavus* con *Alternaria alternata* presentaron nivel similar

de disminución de aflatoxinas que cultivos puros de *A. flavus*, lo que sugiere que la temperatura de incubación tiene un papel importante en la biodegradación de aflatoxinas. Las asociaciones con *R. Oryzae*, *A. nigery* *Bacillus stearothermophilus* resultaron, también, en mayores reducciones en los niveles de aflatoxinas.

Bernal (1998) estudiando el efecto de los hongos *Mucor racemosus* y *Rhizopus oryzae* sobre la producción de aflatoxinas encontró que el segundo fue más eficiente en su biodegradación que el primero, en agar extracto de malta a 23, 28 y 36 C. También demostró que los metabolitos producidos por *M. Racemosus* y *R. Oryzae*, actúan con mayor eficiencia sobre la AFB1, que sobre las AFB2, AFG1 y AFG2; inclusive pueden estimular su producción.

Referencias

- Akgul A; Kivanc M; Sert S. Effect of Carvacrol on growth & toxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Sci Alim* 1991;11:361-370.
- Bastos STG. Comunicação pessoal, Professor Depto de Micologia. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. 1997.
- Bernal GOM. Influencia da Temperatura na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* URM 2580 e na sua biodegradação por *Mucor racemosus* e *Rhizopus oryzae*. Tese de Grau para obter o título de Mestre. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Curso de Mestrado em Nutrição, Recife, 1998. 62p.
- Bhatnagar D, Ehrlich KC, Cleveland TE. Oxidation reduction reactions. En: Biosynthesis of secondary metabolites. New York: Town Publishers, 1992. p. 255-286.
- Borroz KI, Ramsdell HS, Eaton D L. *Toxicol Let* 1991;58:97-106.
- Butler WH. Aflatoxin. En: Purchase IFH. Micotoxins. Amsterdam: Elsevier, 1974. p. 1-28.
- Caldwell J. Conjugation mechanisms of xenobiotic metabolism: mammalian aspects. En: Paulson GD, Caldwell J, Huston DH, Menn JJ. ed. Xenobiotic conjugation chemistry. Washington: American Chemical Society, 1985. p.2.

- Clifford JI; Rees KR. The action of aflatoxin B1 on the rat liver. *Biochem J*1965;102:65-75.
- Cotty PJ. Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cotton seed. *Plant Dis* 1990;74:233-235.
- Cuero G; Duffuse M; Osuji G; Pettit R. Effects of chitosan and two microbial agents. *J Agricult Sci* 117;1991:165-170.
- Daniels JM; Lui L; Stewart RK; Massey TE. *Carcinogenesis*11;1990:823-828.
- De Longh H; Koelmsmind W; Brobst S. Investigation of the factor in groundnut meal responsible for "turkey x disease". *Biochim Biophys Acta*65;1962:548-551.
- Dianzini MV: Toxic liver injury by protein synthesis inhibitors. In: Popper H; Schaffner G; Stratton NY. Progress in liver disease. New York: Grune Stratton, 1976. p.232-245.
- Domer JW; Cole RJ; Blankenship PD. Use of a biocompetitive agent to control preharvest aflatoxin in drought stressed peanuts. *J Food Protec*1987;55:888-892.
- Doyle MP; Marth EH. Aflatoxin is degraded at different temperatures and pH values by Mycelia of *Aspergillus parasiticus*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*1978;6:95-100.
- _____. Aflatoxin is degraded by fragmented and intact mycelia of toxigenic *Aspergillus parasiticus* grown 5 to 18 days with and without agitation. *J Food Protec*1978;41:549-555.
- Dutton MF. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiol Rev*1988;52:274-295.
- Dvorak M. Possibilities of chemical detoxification of aflatoxin. *Vet Med Praha*1990;35:37-42.
- Edds GT. Acute aflatoxicosis: a review. *J Am Vet Med Ass*1973;162:304-309.
- Faraj MK; Smith JE; Harran G. Aflatoxin biodegradation: effects of temperature and microbes. *Mycol Res* 1993;97:1388-1392.
- Finotti E; Fabbri AA; Panfili G; Fanelli C. Effect of different fungistatic compounds on aflatoxin production. *Micol Ita*1992;21:21-26.
- Fonseca H.; Contribuição ao estudo da aflatoxina no amendoim (*Arachis hypogaea*) da colheita à industrialização. Tese de Livre Docência Esalq/USP. São Paulo 1998. p.1969.
- Frayssinet C; Lafarge C. Action de l'aflatoxine sur la cellule hepatiche du rat. *Cahier Nutr Diet*1970;5:67-69.
- Gelda CS; Luyt LJ. Survey of total aflatoxin content peanuts, peanut butter and others foodstuffs. *Annal Nutr L'aliment*1977;31:477-483.
- Guengerich FP. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res*1988;48:2946-2952.
- Hamid AB; Smith JE. Degradation of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *J Gen Microbiol*1987;113:2023-2029.
- Harris CC. *Toxicol Lett*1995;1:82-83.
- Hartley RD; Nesbitt BF; O'Kelly J. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*1963,195:1056-1058.

- Hasan HAH. Fungicide inhibition of aflatoxins, diatoxyscirpenol and zearalenone production. *Folia Microbiol* 1993;38:295-298.
- Holzappel CW; Steyn PS; Purchase IFH. Aflatoxin in sheep urine. *Tetrahedon Letters* 1965;25:817-820.
- Huff WE; Kubena LF; Harvey RB; Philips TD. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity aflatoxin and ochratoxin. *Poultry Sci* 1992;71:64-69.
- Karunaratne A; Wezenberg E; Bullerman LB. Inhibition of mold growth & aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *J Food Protec* 1990;53:8230-8236.
- Krishnamachari KA; Bhat RV; Nagarajan V; Tilak TBG. Investigations into an outbreak of hepatitis on parts of western India. *Indian J Med Res* 1975;63:1036-1049.
- Lapa MAG. Influência da aflatoxina b1 sobre a resposta à desnutrição protéica. Tese para obtenção do grau de doutor. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Curso de Pósgraduação em Ciência dos Alimentos, Área De Nutrição Experimental, 1983. 75p.
- Lillehoj EB. Aflatoxin: genetic mobilization agent. In: Bhatnagar D; Lillehoj EB; Arora DK. Handbook of applied mycology vol. 5: mycotoxins in ecological systems, New York, 1992. p.6.
- Lim HK; Yeap GS. The occurrence of aflatoxin in Malaya import oil cakes and groundnut kernels. *Malayan Agric J* 1966;45:232-246.
- Marasas WFO; Nelson PE. Micotoxicology. Albany: Pennsylvania State University 1986. p.27.
- Martins MJR. Determinação de aflatoxinas em amendoim e derivados por cromatografia em camada delgada. Tese para obtenção do grau de Mestre. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Exactas e da Natureza. Recife, 1979. 86p.
- McCormick SP; Bhatnagar D; Lee LS. Averufanin Is an aflatoxin b1 precursor between averatin and averufina in the biosynthetic pathway. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:14-16.
- Mercado CJ; Real MPN; Del Rosario RR. Chemical detoxification of aflatoxin containing copra. *J Food Sci* 1991;56:733-735.
- Moule Y. Mécanisme d'action des mycotoxins. *Annal Nutr L'aliment* 1977;31:803-810.
- Nakasato M; Morozumi S; Saito K; Fujinuma K; Nishima T; Kasai N. Interconversion of aflatoxin and aflatoxicol by several fungi. *Appl Environ Microbiol* 1991;56:1465-1470.
- _____. *Eisei Kagaku* 1991;37:107-117.
- _____. Enzymatic interconversion of aflatoxin b1 and aflatoxicol by *Rhizopus* spp. *Eisei Kagaku* 1991;37:288-295.
- Narvaiz P; Kottliam M; Lescano G; Kaupert N. Comparación de los efectos del calor e irradiación en *Aspergillus parasiticus*. *Rev Argent Microbiol* 1988;20:155-161.
- Natarajan KR. Chemical inactivation of aflatoxins in peanut protein ingredients. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1992;11:217-227.
- Ngindu A; Kenya PR; Ocheng DM; Omondi TN. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxins poisoning in Kenya. *Lancet* 1982;1:1346-1348.
- Nout MJR. Effect of *Rhizopus* and *Neurospora* spp on growth of *Aspergillus flavus* and a *Parasiticus* and accumulation of aflatoxin B1 in groundnut. *Mycol Res* 1989;93:518-523.

Patel VD; Govindarajan P; Dave PJ. Inactivation of aflatoxin b1 by using the synergistic effect of hydrogen peroxide and gamma radiation. *Appl Environ Microbiol*1989;55:465-467.

Paterson DSP. *Food Cosmetol Toxicol* 1973;11:287-294.

Raney KD; Shimada T; Kim D; Groopman JD; Harris TM; Guengerich FP. *Chem Res Toxicol* 1992;5:202-210.

Rasic JL; Skrinjar M; Markov S. *Mycopathol*1991,113:117-119.

Samarajeewa U; Sen AC; Fern OSY; Ahmed EM. Inactivation of aflatoxin b1 in corn meal, copra meal and peanuts by chlorine gas treatment. *Food Chem Toxicol*1991;29:41-47.

Sargeant K; Sheridann A; O'Kelly J. toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 1967,192:1096-1097.

Shimada T; Nakamura SI; Imaoka S; Funae Y. Genotoxic and mutagenic activation of aflatoxin b₁ by several forms of constitutive forms of cytochrome p-450 in rat liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol*1987,91:13-19.

Shrivastava AK; Ranjan KS; Ansari AA. inhibition of aflatoxin synthesis by light in liquid culture and food grains. *J Food Sci Technol*1991;28:189-190.

Sing SH; Chand L. Inhibition of aflatoxin production by garlic extract and sodium bicarbonate. *Crop Res* 1993;6:149-154.

Singh VP. Aflatoxin biotransformations biotransformation aspects. In: Singh VP. ed. Biotransformations: microbial degradation of health risk compound. Amsterdam: Elsevier, 1995. p.51-63.

Sinha KK; Sinha AK; Prasad G. The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxina production by *Aspergillus flavus*. *Lett Appl Microbiol*1993;16:114-117.

_____. Prevention of aflatoxin production in some cereals and oil seed by natural plant constituents. *Irish J Food Sci Technol*1990;14:109-120.

Song DK; Karr AL. Soybean phytoalexin, glyceolin, prevents accumulation of aflatoxin b1 in cultures of *Aspergillus flavus*. *J Chem Microbiol*1993;19:1183-1194.

Steyn PS; Vlegaar R; Vessels PL. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. In: Steyn PS. The biosynthesis of micotoxins: a study in secondary metabolisms. New York: Academic Press, 1980. p.104-155.

Stoloff L. Aflatoxins an overview. In: Rodricks JV; Hesseltine CW; Mehlman CH. Mycotoxins in human and animal health. Park Forest South IL: Pathotox Publishers, 1977. p.7-28

Townsend CA; McGuire SM; Brobst SW; Graybill TL; Pal K; Barry CE. Examination of tetrahydro and dihydrobisfuran formation. In: Petroski RJ; McCormick SP. Aflatoxin biosynthesis: from whole cells to purified enzymes. New York: Plenum Press, 1991. p.141-154.

Trail F; Mahanti N; Linz J. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology*1995;141:755-765.

Uralova M; Patzeltova M; Havlik F. The influence of the irradiation regime upon mycotoxins production under experimental conditions. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1987;31:293-298.

Urbaneck R. Syntheses and mechanistic studies of the potent mycotoxin aflatoxin B1 organic. Seminar Organic Abstract (Postscript Version). <http://www.chem.umn.edu/Studsem/Urbaneck3497/Urbabs.html>. Size 10k. 28-May- 1997.

Van Der Zidjen ASM; Koelmsmind WAA; Bolding J. Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey x disease. *Nature* 1962;195:1060-1062.

Varsavsky E; Somer SE. Determination of aflatoxins in peanuts. *Annal Nutr L'Alimen* 1977;31:539-544.

Wheeler MH; Bhatnagar D; Rojas MG. Chlobenthiazole and tricyclazole inhibition of aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus Flavus*. *Pestic Biochem Physiol* 1989;35:315-323.

Zhu CR; Du MJ; Lei DN; Wan LQ. A study on the inhibition of aflatoxin b1 induce hepatocarcinogenesis by *Rhizopus delemar*. *Mater Med Polona* 1989;21:87-91.

Agradecimientos

CNPq Conselho Nacional de Ciencia de Ciencia e Tecnologia. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Organo Financiador de Investigaciones adscrito al Gobierno Central Brasileño.

PEC-PG Programa Estudante Convenio – Pos Graduação. Programa Estudiante Convenio Postgrado entre los gobiernos de Brasil y de Colombia.