

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LAS AFLATOXINAS EN VINOS

Alberto AVENOZA AZNAR
Jesús PALACIOS REMONDO

I. ANTECEDENTES

El problema de las «micotoxicosis» (enfermedades producidas por micotoxinas) en hombres y animales aparece ya en los principios de la historia y constituye un relato triste de ignorancia, enfermedad, muerte y pérdidas económicas.

Pero un incidente datado en 1960 marca el cambio en la actitud general hacia las micotoxicosis, concentrando una mayor atención al problema. Como consecuencia de ello y desde entonces, han aparecido más de CINCO MIL publicaciones sobre aflatoxinas y otras micotoxinas. La súbita aparición en aquel año de la denominada «turkey-x-disease», debida a su etiología completamente desconocida, y cuyos efectos en Inglaterra se tradujeron en la muerte de cientos de miles de «pavipollos», dió lugar a una ingente cantidad de correspondencia en las columnas de la prestigiosa revista «Veterinary Record».

Tan sólo un año después se describía la enfermedad como una entidad definida. BLOUNT, W.P. (1961). Se extrae el principio tóxico que la origina, se describen las características químicas preliminares y se asocia dicho principio con el *Aspergillus flavus* en muestras de cacahuetes.

Hasta aquel momento la toxina no tenía denominación, pero en 1962, el «Interdepartamental Working Party on Groundnut Toxicity Research» propone el nombre vulgar de AFLATOXINA. El mismo año, un grupo holandés (UNILEVER), describe el aislamiento de la misma toxina, que denomina FB₁, Van der ZIJDEN, A.S.M. (1962), otro de Países Bajos, DE IONGH, H et al. (1962), y otro Inglés, NESBITT, B.F. et al. (1962), separan dos componentes de la aflatoxina: el componente «B», que presenta fluorescencia azulada, y el componente «G», cuya fluorescencia es verdosa (ambas bajo luz ultravioleta de 365 nm.).

Poco después la denominada como «B» se subdivide en dos componentes relacionados: la B₁ y la B₂, culminando las investigaciones con la síntesis de la aflatoxina B₁ por BUCHI, G. et al. (1965-7), del M.I.T. de Massachusetts. ASAO et al. (1965), BUCHI, G. et al. (1966) y BUCHI et al. (1967).

Posteriormente, y a raíz del descubrimiento de las propiedades carcinogénicas que presentan las aflatoxinas, se entra en la nueva era de la determinación analítica de la incidencia y nivel de las micotoxinas en alimentos susceptibles, a la vez que en la búsqueda de entidades químicas específicas producidas por agentes micóticos.

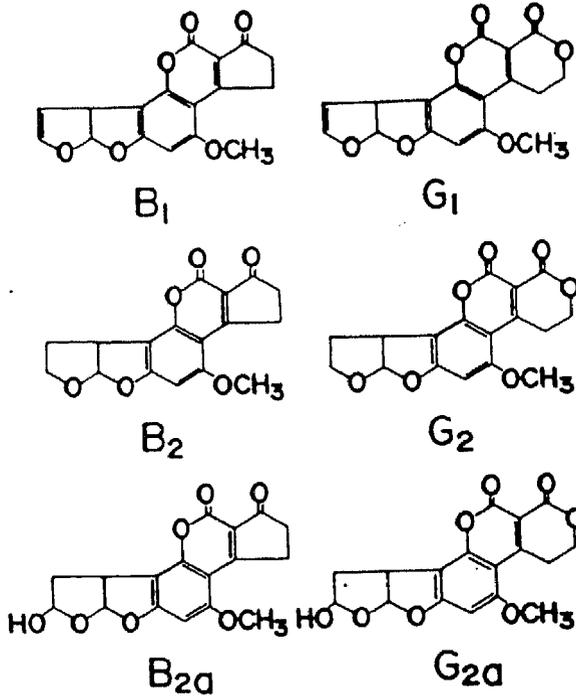


Fig. 1.- Estructura química de seis aflatoxinas.

II. OBJETO DEL TRABAJO

Ha sido, lógicamente, el carácter mortal de alguno de sus metabolitos, tóxicos para las especies animales y humana, el motor esencial que ha impulsado la realización de este trabajo.

No obstante, la abundancia de literatura sobre el tema, llama la atención la ausencia de publicaciones relativa a la presencia de agentes micotóxicos en «vinos».

Con motivo de esa escasa bibliografía, será necesario plantearse el problema de la «contaminación artificial» con esporas de hongos toxicogénicos como el *Aspergillus parasiticus* (Speare) sobre uvas procedentes de viñedos de La Rioja, para posteriormente tratar de realizar su fermentación, una vez desarrollado el hongo sobre los racimos mantenidos en compartimentos estancos; seguir el proceso de vinificación y sobre este material intentar extraer las micotoxinas.

Simultáneamente, se tratará de realizar un muestreo sobre viñas de distintos orígenes dentro de la región y ver también la respuesta a la adición de aflatoxinas, para extracción y detección posterior.

III. METODO DE CONTAMINACIÓN, VINIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN

El método seguido en la infección de forma artificial de los racimos de uva, proviene de la adaptación del procedimiento desarrollado por OUGH, C.S., y CORISON, C.A. (1980) para la inoculación artificial de uvas con cultivos puros de *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea*, en orden a determinar la presencia de «patulina» en las uvas así infectadas.

El método de forma esquemática es el siguiente:

- 1º Tratar el material biológico con solución acuosa de hipoclorito sódico al 10% ,
- 2º Lavar con agua estéril.
- 3º Mantener 30-45 segundos en solución de Etanol - 1/NaOH (70%/10gr.l.) a 71° C.
- 4º Lavar con agua estéril.
- 5º Sumergir en una suspensión de esporas de *Aspergillus parasiticus* en agua.
- 6º Incubar en compartimento estanco 10-12 días a temperatura ambiente.
- 7º Vinificación y embotellado.
- 8º Mantener 9 meses la mitad de la muestra a temperatura ambiente y la otra mitad en refrigeración (2-5° C).

IV. METODO ANALITICO

IV-1. Método de Extracción.

Tanto el método de extracción como el de eliminación de interferencias se basan en el método seguido por TAKAHASHI, D.M. (1974).

A la muestra de 100 ml. de vino se añade la cantidad de metanol necesaria para obtener una relación agua/alcohol (4/6), relación idónea que ha demostrado no presentar emulsiones al adicionar diclorometano.

Se realiza la extracción con 100 ml. de Cl_2CH_2 primero y 50 ml. de Cl_2CH_2 después. Se unen ambas fracciones y se lavan con agua destilada. La fase orgánica que se obtiene se seca con sulfato sódico anhidro. El extracto final, una vez filtrado, se concentra y se procede a la eliminación de interferencias.

IV-2. Método para la Eliminación de Interferencias.

La eliminación de interferencias se realizará utilizando la cromatografía de columna.

Se dispone la columna adicionando el soporte por este orden:

1º 5 gr. de sulfato sódico anhidro.

2º 5 gr. de alúmina ácida de actividad Brockmann I

3º 10 gr. de Kieselgel 60

4º 15 gr. de sulfato sódico anhidro.

Se coloca la muestra en la cabeza de la columna y se eluye a máxima velocidad de flujo con 150 ml. de benceno/ácido acético (9/1), seguido por otros 150 ml. de éter etílico/hexano (3/1), y se descartan ambos eluatos.

La aflatoxinas se eluyen con 150 ml. de diclorometano/acetona (3/1). El eluato, así obtenido, se evapora hasta concentrarlo a 2-3 ml.. Se transfiere cuantitativamente a un vial con Cl_2CH_2 y se lleva a sequedad. El extracto seco, se disuelve en 2 ml. de una mezcla acetonitrilo/agua (1/9) y se reserva para su estimación cuali y cuantitativa por cromatografía líquida de alta resolución (H.P.L.C.)

IV-3. Método para la estimación cuali y cuantitativa.

IV-3.1.- Material Instrumental

Equipo cromatográfico A:

- Equipo completo para cromatografía de líquidos HEWLETT-PACKARD. Mod.: 1.048 A
- Columna para cromatografía de líquidos HYPERSIL ODS de 5 micras, para fase reversa.

Equipo cromatográfico B:

- Cromatógrafo de líquidos WATERS ASSOCIATES INC. Mod.: M-6.000
- Detector de fluorescencia Mod.: FS-90 FLUOROMAT.
- Columna para cromatografía de líquidos BONDAPAK-18 de cinco micras, para fase reserva.
- Módulo de compresión radial RCM-100
- Integrador HEWLETT-PACKARD Mod.: HP-3380

IV-3.2- Reactivos

Eluyentes: - Agua

- Acetonitrilo CL (Panreac 261881)
- Acido trifluoroacético RPE (Carlo Erba 411561)
- Standard de aflatoxinas, mezcla de aflatoxinas B y G. Un vial de 5 ml. con las siguientes concentraciones:
 - Aflatoxina B₁.....5 µg/ml.
 - Aflatoxina B₂.....1,5 µg/ml.
 - Aflatoxina G₁.....5 µg/ml.
 - Aflatoxina G₂.....1,5 µg/ml.

IV-3.3.- Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

La estimación cuali y cuantitativa ha sido realizada por cromatografía de líquidos de alta resolución (h.p.l.c), utilizando para ello dos equipos cromatográficos.

El equipo cromatográfico A emplea un detector de longitud de onda variable U.V./VIS.. Por su parte, el equipo cromatográfico B utiliza un fluorímetro como detector. Precisamente, la utilización de este último hace necesaria una etapa de derivatización, previa al análisis cromatográfico, donde las aflatoxinas B₁ y G₁, no fluorescentes, se convierten en las correspondientes aflatoxinas B_{2a} y G_{2a}, que presentan fluorescencia. La elevada fluorescencia de las aflatoxinas B₂ y G₂ no resulta afectada por la etapa de hidratación.

IV.3.4.- Derivatización

Del volumen final del extracto muestra (2 ml.), reservado para la estimación cuali y cuantitativa, se utiliza tan sólo la mitad del mismo. (1 ml.)

Se lleva este volumen a sequedad con el rotavapor y, el extracto seco, se trata con 250 µl. de ácido trifluoroacético y 750 µl de buffer fosfato-acetonitrilo. Del volumen final formado, se inyectan 10 µl.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

V.1. Infección artificial

A pesar del esmero con el que se han realizado las distintas operaciones, ha sido inevitable la contaminación por mohos ajenos a las cepas utilizadas; en particular, representantes de la familia *Mucoraceae* y de los géneros *Penicillium* y *Botrytis*.

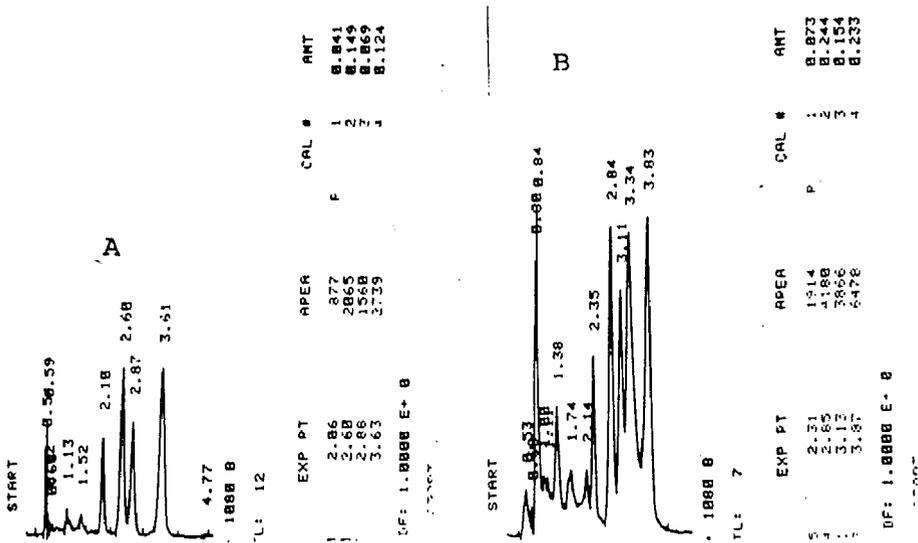
La duración en tiempo hasta conseguir la invasión del 75% de la superficie de las bayas requiere un mínimo de 12 días a temperatura ambiente.

Los puntos de asiento de la colonia aparecen a nivel de pedúnculo, en su unión con la baya y, en el caso de estrías con incisión, en el mismo corte realizado previamente a la siembra de la cepa de *Aspergillus parasiticus*.

V-2. Eliminación de interferencias

La utilización de columnas de cromatografía para la eliminación de interfe-rencias presenta los siguientes inconvenientes:

- a) La duración de la operación es excesivamente larga.
- b) Implica un gran consumo de eluyentes lo que, en definitiva, encarece el análisis.
- c) Le resta cierto interés la imposibilidad de visualizar sobre la misma co-lumna la presencia o ausencia de aflatoxinas.



A pesar de todo, la técnica resulta sumamente interesante en razón a que la eliminación de interferencias es real y mejora sustancialmente la capacidad de detección de los métodos cromatográficos ulteriores.

El cromatograma B se obtiene a partir de una muestra que no ha sido sometida a la etapa de eliminación de interferencias. Aparecen en él una serie de picos, ajenos a los correspondientes a las aflatoxinas.

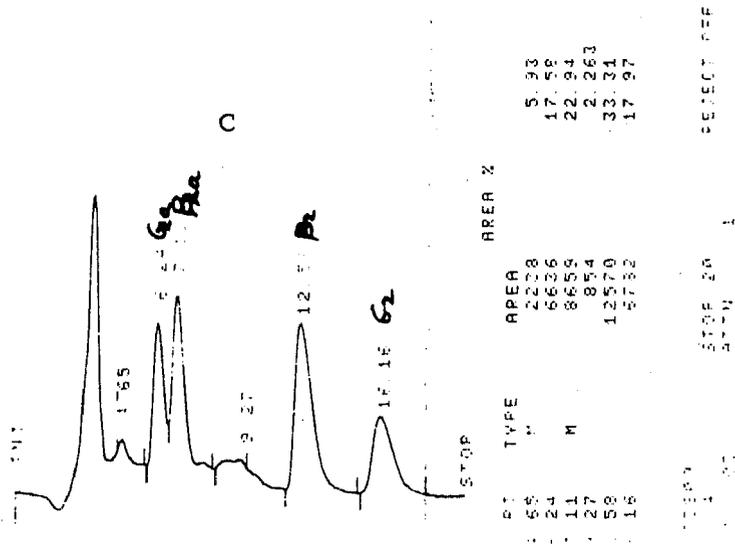
En cambio, la muestra con la que se ha conseguido el cromatograma A ha sufrido el proceso completo de extracción y eliminación de interferencias. El resultado es suficientemente claro ya que el cromatograma es excelente por cuanto han desaparecido por completo los picos extraños. (Cf. Figura 4).

V-3. Estimación cuali y cuantitativa por H.P.L.C.

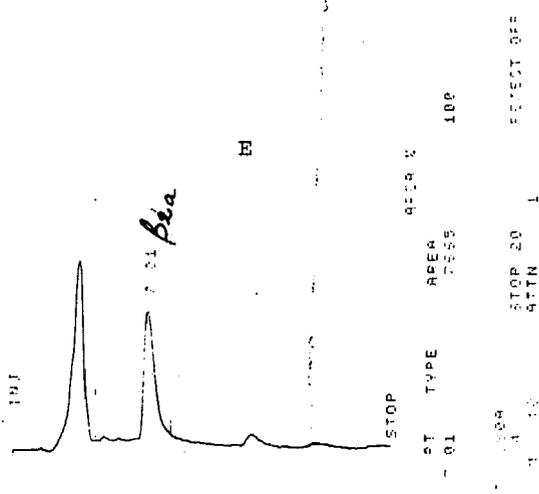
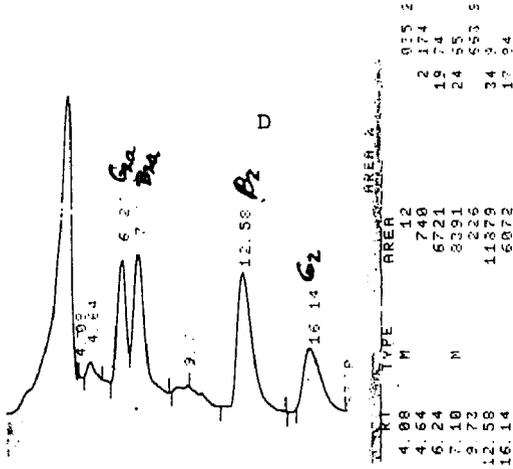
En primer lugar, interesa destacar el hecho de la no detección de aflatoxinas en ninguna de las 40 muestras de vinos tomados al azar en el mercado y procedentes de bodegas particulares, cooperativas y bodegas de empresas del área inscrita en el actual territorio de la Comunidad Autónoma de La Rioja.

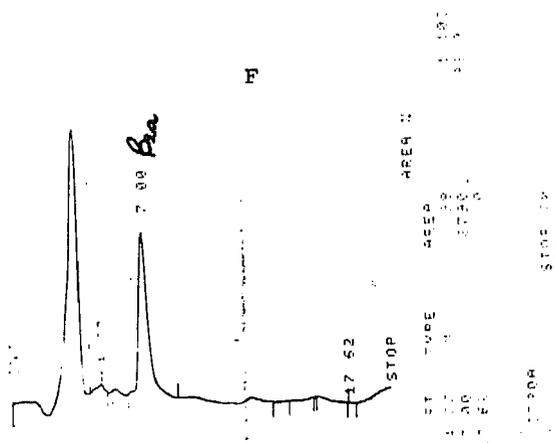
Se comprueba que los resultados de los análisis, deducidos de los cromatogramas realizados, son negativos en todas las muestras, tanto en aquellos en lo que se ha utilizado un detector único U.V./VIS. como en las que se emplearon los dos tipos de detectores (U.V./VIS. o fluorímetro).

Por otra parte, la figura 5 presenta los cromatogramas correspondientes a vinos obtenidos a partir de uva cuyos racimos fueron contaminados artificialmente con cepas toxicogénicas (NRRL 2999) de *Aspergillus parasiticus* y que posteriormente fueron sometidas al proceso de vinificación.



LAS AFLATOXINAS EN VINOS





Los cromatogramas C y D, se corresponden con los extractos de las muestras de vino blanco, elaborado con uvas de la variedad «viura», mantenidas durante 9 meses a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (2-5° C) respectivamente.

Por su parte, los cromatogramas E y F, se corresponden con los extractos de las muestras de vino tinto, elaborado con uvas de las variedades «garnacha y tempranillo», mantenidas durante 9 meses a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (2-5°C) respectivamente.

De la observación de estos cromatogramas se deduce una conclusión importante. Los análisis de las muestras correspondientes al vino tinto presentan únicamente el pico característico de la aflatoxina B₁. No así los análisis obtenidos con los extractos de las muestras de vino blanco que dan lugar a cromatogramas en los que se detectan las cuatro aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂).

A primera vista, es un resultado sorprendente. Sin embargo, cabría la explicación de que, por una parte, los vinos blancos contienen una cantidad muy escasa de taninos, pigmentos y otros componentes que pueden constituirse en agentes de oxidación que probablemente den lugar a la degradación de las aflatoxinas.

En segundo lugar y, de alguna manera, apoyando la explicación anterior, se demuestra que la aflatoxina B₁ es más resistente a la degradación que el resto de las aflatoxinas, con lo que podría justificarse su persistencia incluso en los vinos tintos.

Finalmente, llama la atención el que a pesar del tiempo transcurrido (9 meses) entre la vinificación y el momento de realizar los análisis persisten las aflatoxinas en la masa de la muestra, lo cual sugiere la conveniencia de tener en cuenta este problema especialmente cuando se trate de cosechas que en el momento de la vendimia hayan predominado las lluvias. Este hecho, unido a las altas temperaturas, da lugar a la polución de los racimos por mohos de toda índole, inclusive el *Aspergillus parasiticus*.

REFERENCIAS

- WYLLIE, T.D. y MOREHOUSE, L.G. eds.
«*Mycotoxic Fungi, Mycotoxins and Mycotoxicoses*».
Marcel Dekker, New York, (1978).
- COLE, R.J. y COX, R.H.
«Handbook of Toxic Metabolites», Academic Press.
New York (1981)
- ASAO, T., BUCHI, G. y col.
J. Am. Chem. Soc., **87**, 882-6 (1965)
- BLOUNT, W.P.
Turkeys **9** (2), 52, 55-8, 61, 77, (1961)
- BUCHI, G.; FOULKES, D.M. y col.
J. Am. Chem. Soc. **88**, 4534-6 (1966)
- BUCHI, G.; FOULKES, D.M. y col.
J. Am. Chem. Soc. **89**, 6745-53, (1967)
- DAVIS, N.D. y DIENER, U.L.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63** (1), 107-9, (1980)
- DE IONGH, J.; BEERTHUIS, R.K. y col.
Biochim. Biophys. Acta **65**, 548-51, (1962)
- NESBITT, B.F.; O' KELLY, J. y col.
Nature (London) **195**, 1062-3, (1962)
- OUGH, C.S. y CORISON, C.A.
J. Food. Sci. **45** (3), 476-8, (1980)
- TAKAHASHI, D.M.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **57**, 875-9 (1974)
- TAKAHASHI, D.M.
J. Chromatogr. **131**, 147-56, (1977)
- TAKAHASHI, D.M.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **60** (4), 799-804, (1977)
- VAN der ZIJDEN, A.S.M.; KOELENMID, W.A.A.B. y col.
Nature (London) **195**, 1060-2, (1962).

