

CONFIRMACION DE LA AUSENCIA DE AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ y G₂ EN EL HUITLACOICHE (*USTILAGO MAYDIS*)

Héctor Aguilera, Saúl Villa-Treviño y Fernando Walls*

Contribución conjunta del Instituto de Química (No. 322) y del Departamento de Genética y Biología Celular del Instituto Politécnico Nacional.

Recibido, junio 26 de 1970.

El "huitlacoiche" (náhuatl, *huitlacotzin* de *huitlatl*, excremento, residuo, tumor y *cotzin*, dormir)¹ es un hongo que crece en las mazorcas de maíz, y que en México se utiliza como alimento. Debido a que recientemente uno de los autores** tuvo conocimiento de que se suponía que este hongo contenía aflatoxinas, nos interesó estudiarlo para comprobar si esta suposición era cierta o no.

En un primer experimento se utilizó una cantidad moderada de hongos, que se molieron y secaron en corriente de aire. Luego, se extrajeron con MeOH, el extracto metanólico se evaporó a sequedad y de él se hicieron varios extractos: del hexánico, se obtuvieron aceites que se identificaron como mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos C₁₆ y C₁₈, saturados y con dos o tres dobles ligaduras (IR, Fig. 1; rnm, Fig. 2; EM, Fig. 3). Al analizar este producto se detectó una zona fluorescente, que hizo pensar que tal vez sí hubiera aflatoxinas. Del extracto con acetato de etilo se aisló ácido p-hidroxibenzoico, y en las aguas madres se encontraron mezclas que daban más de 20 manchas en la cromatopla. Se detectaba, entre ellas, la misma zona fluorescente encontrada anteriormente. Finalmente, con acetona caliente, se extrajeron hidrocarburos que por espectrometría de masas se identifica-

* Becado por la Dirección General del Profesorado de la UNAM.

** Saúl Villa, en un reciente viaje a Inglaterra.

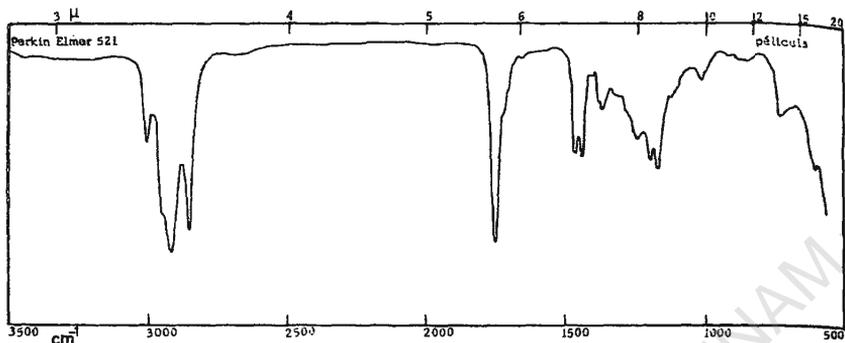


Figura 1

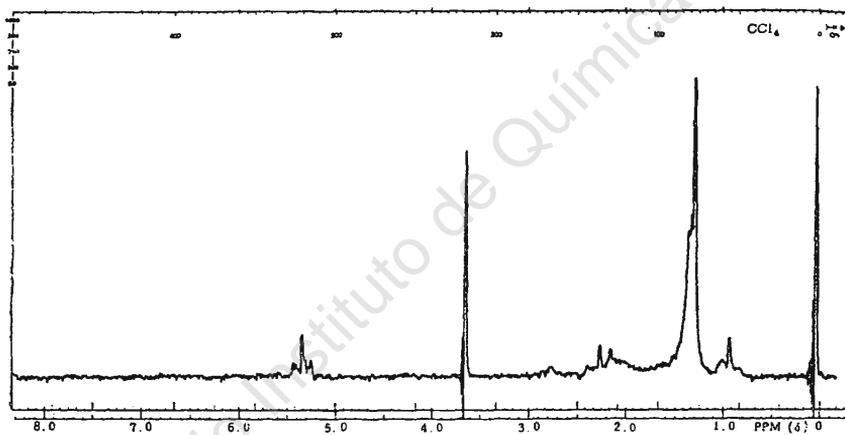


Figura 2

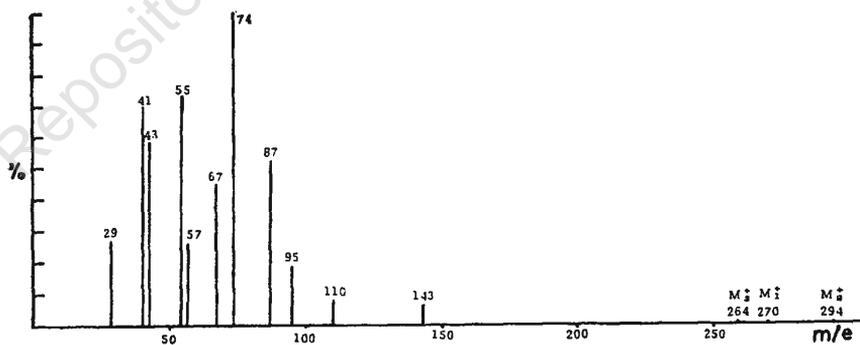


Figura 3

ron con $C_{21}H_{44}$, $C_{23}H_{48}$ y $C_{25}H_{52}$, IR, Fig. 4; rmn, Fig. 5; EM, Fig. 6.

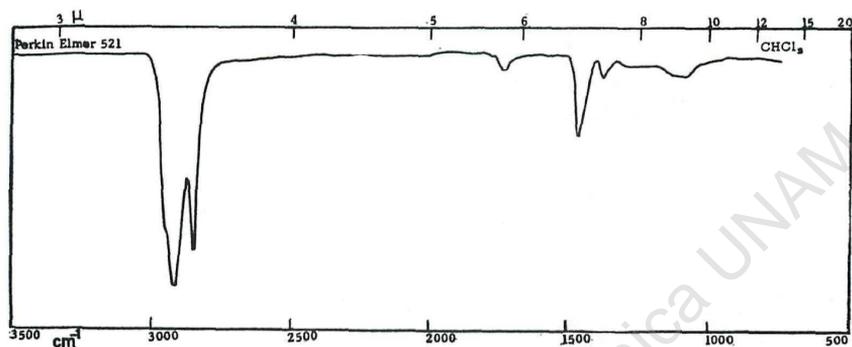


Figura 4

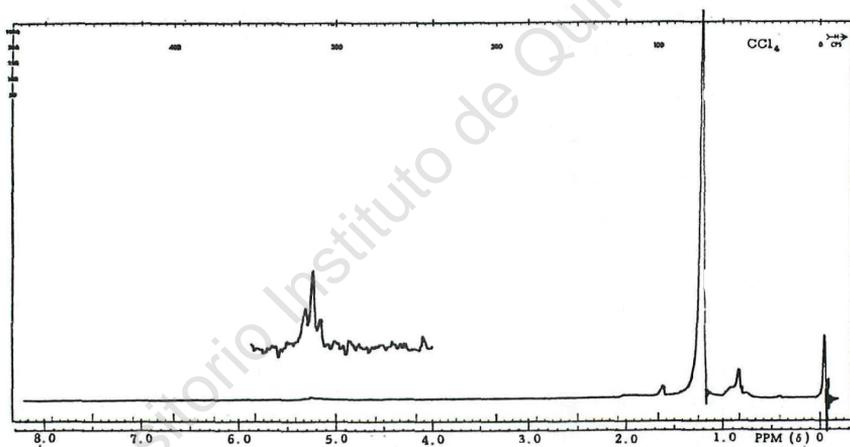


Figura 5

La siguiente extracción, de una cantidad mayor de *Ustilago maydis* se dedicó, exclusivamente, a encontrar el mejor método de extracción de la zona fluorescente.

Se encontró que extrayendo directamente con hexano el polvo seco, se obtenía casi toda la sustancia fluorescente. Empleando una cantidad mucho mayor de extracto hexánico, se trató de encontrar algún método para obtener la zona fluorescente en forma pura;

esto no fue posible ya que siempre estuvo contaminada con otras sustancias de igual Rf. Sin embargo, se ensayó farmacológicamente la sustancia, encontrando resultados negativos. En vista de ello, se puede afirmar que el *Ustilago maydis* no contiene aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

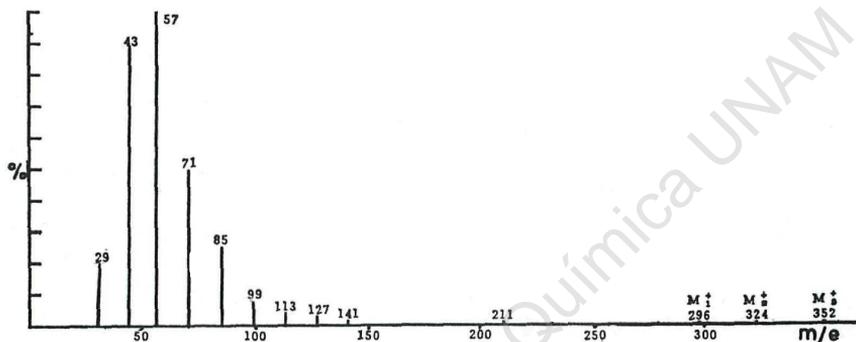


Figura 6

PARTE EXPERIMENTAL*

El huitlacoche (*Ustilago maydis*) se encuentra en los mercados, donde se vende con todo y mazorca de maíz, cubierto por sus hojas. Fácilmente se puede ver la deformación causada por los hongos. Se adquirieron cantidades variables de mazorcas, entre 10 y 150 Kg, de las que se separaron los hongos, desechando el resto de la mazorca. Los hongos se picaron y secaron en una estufa a 40° con circulación de aire. El material seco se pulverizó en una licuadora. Se extrajeron con 8 l de MeOH, 400 g de polvo (equivalente a 26 Kg de mazorcas), calentando a ebullición durante 8 horas. Se filtró el disolvente y se evaporó a sequedad. El residuo aceitoso se extrajo con hexano (2 l). Se evaporó a sequedad, obteniéndose 0.5 g de aceite claro, transparente, que se destiló a 160° y 0.15 mm. Los espectros en el IR (Fig. 1), de rnmn (Fig. 2) y de masas (Fig. 3) muestran que se trata de una mezcla de ésteres metílicos

* Ver nota en la página 24.

de ácidos grasos con cadenas C_{16} a C_{18} , saturados, o con dos y tres dobles ligaduras. No se investigaron más.

El residuo de la extracción metanólica del hongo, se extrajo con acetato de etilo (2 l). Al evaporar el disolvente, se obtuvieron 2.14 g de residuo, que se cromatografiaron en 200 g de sílice. De las primeras fracciones obtenidas con B-100, se obtuvo un sólido (0.7 g) que se purificó por sublimación, y que se identificó como ácido *p*-hidroxibenzóico (p. f. 214° ; IR idéntico al reportado;² rmn idéntico al reportado;³ EM, M^+ 138. Se hizo su éster metílico con diazometano: IR, idéntico al reportado;⁵ rmn, idéntico a la reportada.⁶

En las siguientes fracciones de la cromatografía anterior, se obtuvieron varios ácidos grasos, entre los que se identificaron, por su EM (Fig. 7), ácidos palmítico y esteárico.

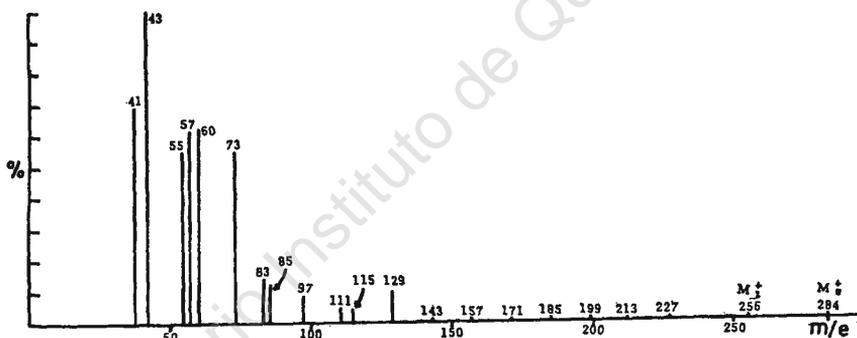


Figura 7

Finalmente, entre un número grande de sustancias, que dan 23 manchas en las cromatoplasas, se encontró una zona fluorescente, que era lo que se buscaba.

El siguiente esfuerzo se encaminó a encontrar las mejores condiciones para obtener el compuesto fluorescente, y la forma de purificarlo. Así se encontró que era mejor extraer directamente con hexano al polvo finamente dividido: se obtenía la mayor cantidad de sustancia fluorescente, sin extraer un gran número de sustancias solubles en MeOH o AcOEt.

Se extrajeron 2 Kg de *Ustilago maydis* secos, bien pulverizados (provenientes de 28 Kg de hongos, provenientes, a su vez, de 120 Kg de mazorcas de maíz), con 10 l de hexano, calentando a ebullición durante 10 horas. Se filtró y el hexano se evaporó al vacío, dejando 52 g de residuo sólido, que en cromatoplasmas, además de la zona fluorescente, muestra muchas manchas.

A 10 g del extracto anterior se le agregaron 2 g de Girard T y 40 ml de AcOH y se calentó en el baño de vapor durante 3 horas. Se eliminó el AcOH en el rotavapor, agregando al final dos veces benceno, dos etanol y una hexano. El residuo aceitoso oscuro se sacudió con hexano y agua hasta emulsionarlo; luego se extrajo con hexano en un extractor continuo Sandoval.⁷ De la fracción hexánica se obtuvieron 1.5 g de residuo que se cromatografiaron en 850 g de alúmina, empezando a eluir con hexano, subiendo la polaridad hasta B-AcOEt. De las fracciones 69 a la 78 (de 250 ml cada una), en las que la zona fluorescente quedó eluida, se obtuvo 1 g de residuo que se cromatografió en 250 g de alúmina ácida Woelm, eluyendo con la misma gama de disolventes, y observando en luz ultravioleta la migración de la zona fluorescente. De las fracciones 50 a 63, (B-AcOEt 95-5) se obtuvo la zona fluorescente. Al evaporar a sequedad se obtuvieron 41 mg, que en cromatoplasma mostraban 5 manchas, además de la fluorescente, muy próximas entre sí. Se volvieron a cromatografiar en 90 g de alúmina ácida Woelm, y de las fracciones eluidas con B-AcOEt 90-10, se obtuvieron 4.5 mg de una sustancia cerosa amarilla correspondiente a la mancha fluorescente, impurificados con otra sustancia cuya presencia se puede determinar en cromatoplasmas bidimensionales: al revelar con una solución de 2,4-dinitrofenil hidrazina en ácido sulfúrico diluido, el centro de la mancha fluorescente adquiere un color naranja.

Se tomaron otros 10 g del extracto hexánico, se disolvieron en hexano y se sacudieron fuertemente con una solución acuosa de 4 g de KHCO_3 , extrayendo la emulsión en un extractor continuo.⁷ De la fase hexánica se obtuvieron 4 g de residuo que se cromatografiaron en 500 g de alúmina. De las fracciones eluidas con B-AcOEt 95-5 se obtuvieron 150 mg de la zona fluorescente impurificada por tres sustancias. Se cromatografiaron en alúmina Woelm,

obteniéndose 11 mg de sustancia fluorescente impura, que se cromatografiaron bidimensionalmente en cuatro cromatoplasmas Merck. Recordando la mancha sólo en la periferia, se obtuvieron 3 mg con los que se pudo determinar el IR (Fig. 8).

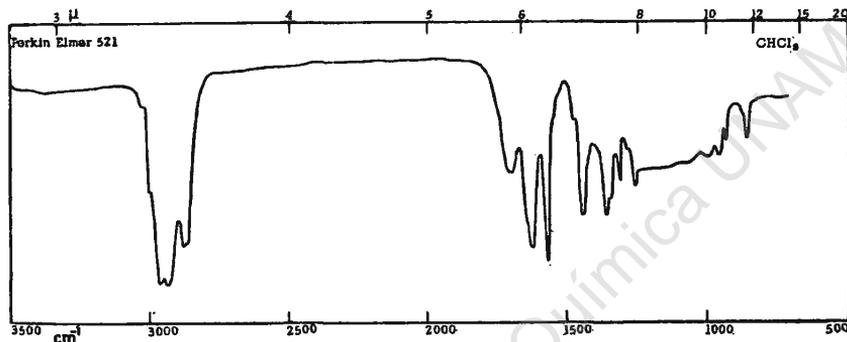


Figura 8

Finalmente, a los 30 g de extracto hexánico restante, se les trató con diazometano para esterificar los ácidos presentes, y después se cromatografiaron en 1 Kg de alúmina. Como en los casos anteriores, se eluyó la zona fluorescente con B-AcOEt 95-5, obteniéndose

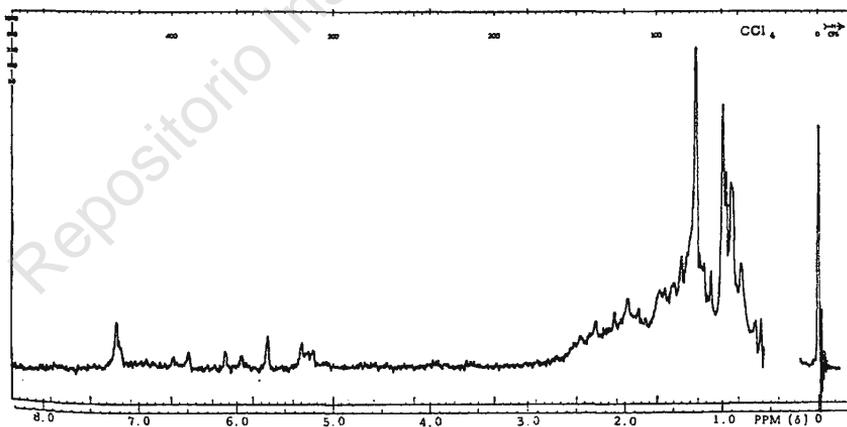


Figura 9

1.2 g, que se recromatografiaron en 130 g de alúmina Woelm ácida, de la que se obtuvieron 116 mg de sustancia que se purificaron en 18 cromatoplasas Merck, desarrollándolas 8 veces seguidas con B-100 y 2 veces con B-AcOEt 95-5. La zona fluorescente se eluyó, obteniéndose 40 mg de mezcla, con la que se determinó la *rmn* (Fig. 9) y el EM (Fig. 10), en el que se observan M^+ 302 y 352.

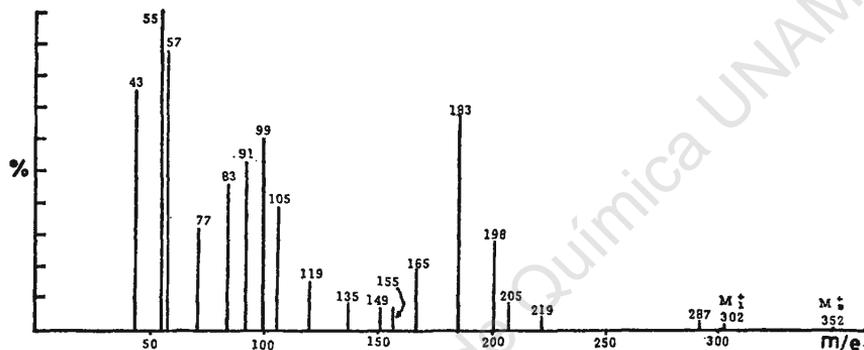


Figura 10

Con el resto se hicieron las pruebas farmacológicas en la siguiente forma: 254 patos Pekin de un día de nacidos, alimentados con purina, se dividieron en 4 grupos de 6 patos cada uno. Al primer grupo, por vía intragástrica, se le suministraron 0.2 ml de sulfóxido de dimetilo (que se utilizó como disolvente). Este grupo fue el grupo testigo. Al segundo grupo se le dio 0.1 ml de Me_2SO conteniendo 12.7 μg de compuesto fluorescente. Al tercer grupo se le suministró 0.1 ml de Me_2SO conteniendo 25.41 μg de compuesto fluorescente y al cuarto 0.1 ml con 50.82 μg . A las 24 horas no se había muerto ningún pato. Al grupo cuatro se les dio 0.1 ml con 308 μg de producto. No murieron. A los tres días se sacrificaron un pato del grupo 1 y uno del 4. No mostraron diferencias en el hígado. A los diez días se sacrificaron todos los patos restantes y los hígados se colocaron en formol y se tiñeron con hematoxilina, con eosina y con Sudán IV. No se observaron diferencias. La dosis letal media de la aflatoxina G es de 39.2 μg y de la G_2 , 172.5 μg .⁸

Mientras tanto, el Prof. George Büchi,* del Instituto Tecnológico de Massachussetts, nos envió pequeñas cantidades de las cuatro aflatoxinas B₁ y B₂ y G₁ y G₂.⁸ La primera comparación fue en las cromatoplasmas, donde se vio que, aun cuando la zona fluorescente era del mismo tono que el de las aflatoxinas G₁ y G₂, el Rf era distinto. Esto se corroboró por los resultados farmacológicos negativos.

RESUMEN

Debido a un informe proveniente de Europa, se trató de establecer la presencia de aflatoxinas en el hongo "huítlacoche"; sin embargo, los únicos productos que se identificaron en los extractos, fueron mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos de 16 ó 18 átomos de carbono, saturados o con dos o tres dobles ligaduras. Se aisló también ácido p-hidroxibenzoico, y otros hidrocarburos que no se caracterizaron, con fórmulas brutas C₂₁H₄₄, C₂₃H₄₆ y C₁₅H₃₂. Finalmente se aisló un producto fluorescente impuro, que no se identificó, que no mostró actividad farmacológica de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ de las que también difiere en su Rf.

ABSTRACT

The fungus "huítlacoche" has been examined for the presence of aflatoxins. However, the only materials identified in extracts consisted of mixtures of methyl esters of fatty acids containing sixteen or eighteen carbons and either fully saturated or possessing two or three double bonds. p-hydroxy-benzoic acid could also be isolated, as well as some uncharacterized hydrocarbons C₂₁H₄₄, C₂₃H₄₆ and C₁₅H₃₂. An impure unidentified fluorescent product was isolated which did not show any pharmacological B₁, B₂, G₁ and G₂ aflatoxins activity. The Rf was also different.

* Agradecemos este amable envío, con el que quedó aclarada la inexistencia de aflatoxinas tóxicas en el *Ustilago maydis*.

BIBLIOGRAFIA

1. A. de Molina, Vocabulario en lenguas castellana y mexicana, XIV, 122f, 4p, 163f. Madrid, 1944; R. Simeon, Dictionaire de la langue náhuatl au Mexicaine, p. 710. Imprimerie National, Paris, 1885.
2. Sadtler, Standard Grating Spectra, 12, espectro 11827.
3. Sadtler, NMR, espectro 3160.
5. Sadtler, Standard Grating Spectra, 4, espectro 3249.
6. Sadtler, NMR, espectro 1191.
7. A. Sandoval, este Boletín, 15, 25 (1963).
8. Aflatoxin. Leo A. Goldblatt. Academic Press, 1969.

Repositorio Instituto de Química UNAM