

24  
2ej.



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES METODOS DE EXTRACCION DE ZEARALENONA, MICOTOXINA PRODUCIDA POR Fusarium, spp.

## T E S I S

Que para obtener el Título de  
BIOLOGO

p r e s e n t a

LORENA CAMPOS HERRERA



México, D. F.

1987



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Página
Resumen .....	1
INTRODUCCION.....	3
Zearalenona.....	5
Síntomas de la Zearalenona.....	10
Procesos de detoxificación.....	13
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Método de Stoloff.....	16
Método de Bennett.....	20
Método de Thomas.....	25
Cromatografía de capa fina.....	28
Preparación de las placas.....	29
Aplicación de la zearalenona y criterios de interpretación.....	31
Preparación del estándar de zearalenona.....	34
Cantidad de zearalenona en tortillas.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
Método de Stoloff.....	38
Método de Bennett.....	40
Método de Thomas.....	42

Comparación de los tres métodos.....	42
Detección de zearalenona en tortillas.....	47
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	50
Apéndice.....	55

## RESUMEN

La contaminación del maíz por hongos tanto en el campo como en el almacenamiento, hace que los derivados de dicho cereal para consumo humano y animal contengan micotoxinas.

Estas toxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Fusarium* spp. Estas micotoxinas resisten temperaturas hasta de 170 °C sin presentar alteraciones, de manera que al cocer los alimentos no se destruyen totalmente.

Se han reportado graves daños en los animales que se alimentan con material contaminado, que van desde diarreas simples hasta protrusiones vaginales y la muerte.

El estudio del problema se enfocó a la zearalenona que es una lactona del ácido resorcílico provocando un efecto estrogénico en hembras de cerdo, produce quistes ováricos, protrusión vaginal y del recto, hemorragias internas y esterilidad en los machos.

Por otro lado es importante estudiar los métodos para poder determinar el más recomendable para la detección y cuantificación de dichas toxinas. En este estudio se hace una comparación con tres métodos de extracción, tomando en cuenta factores importantes para realizarlos como son índice mínimo de recuperación de la toxina, tiempo que se lleva en realizar cada método, riesgo para manejar cada técnica, así como determinar el costo de cada método .

Con objeto de estudiar el estado en que se encuentran las tortillas en el Distrito Federal, se analizaron las diferentes delegaciones del Distrito federal, para poder determinar cuál de ellas era la más representativa, escogiendo la delegación Cuauhtémoc.

## INTRODUCCION

Al ser México uno de los países donde se consume más maíz, ya sea en grano, tortilla, tamales, atoles, harinas y golosinas, es de vital importancia analizar las condiciones en que se encuentra dicho cereal.

Existen varios factores que pueden afectar la calidad de los granos almacenados: el contenido de humedad, la temperatura, el tiempo de almacenamiento, la actividad de insectos y ácaros, el material extraño y la presencia de hongos. Este último origina cambios en el grano que disminuyen la calidad del mismo, debido generalmente a la reducción del poder germinativo, al ennegrecimiento parcial o total de los granos, al calentamiento, a cambios bioquímicos, a la pérdida de peso y a la producción de micotoxinas (Christensen y López, 1962).

Los hongos de los géneros Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Alternaria, entre otros, atacan los cultivos tanto en el campo, como en el almacén y producen toxinas llamadas micotoxinas, que son metabolitos secundarios de los hongos, las cuales tienen efectos tóxicos agudos o crónicos (Mirocha et al., 1980).

En 1882, Micchener reportó una enfermedad en caballos, sugiriendo que era provocada por el consumo

de alimento contaminado por hongos, pero no se le dio importancia.

En 1934 en Illinois, E.U., encontraron 5 000 caballos muertos, por la que llamaron "enfermedad del maíz mohoso" (Graham, 1936). Sippel y colaboradores en 1953 reportaron el envenenamiento de 1 000 cerdos en la región suboccidental de Estados Unidos y en el año de 1953 una mortalidad de 533 cerdos, en la misma región.

Burnside et al., en 1957, publicaron los resultados de una investigación en la cual aislaron trece cepas de hongos de un tipo de grano que se sospechaba tóxico; de dichas cepas nueve fueron Aspergillus flavus y una Penicillium rubrum. Las cepas fueron cultivadas por separado en maíz húmedo esterilizado en autoclave, y se dieron a cerdos, los cuales murieron en pocos días, debido a la acción de micotoxinas.

En 1960, en Inglaterra, 100 000 pavos murieron por causas desconocidas. Posteriormente se encontró que una toxina producida por A. flavus era la responsable de dichas muertes (Christensen y López, 1962).

El problema de las micotoxinas puede ser mayor en países o regiones donde los granos son almacenados con alta humedad, lo que permite la invasión por



hongos productores de toxinas (Christensen y Kaufmann, 1969). Los alimentos contaminados con micotoxinas usados para animales constituyen un problema importante para las explotaciones pecuarias debido al efecto tóxico de estos compuestos en los organismos animales y al empobrecimiento nutricional de los alimentos contaminados (Rosiles y Pérez, 1981).

El problema de las micotoxinas en alimentos para animales como ganado bovino, porcino, caprino y avícola se debe a un mal almacenamiento de los mismos, en lugares húmedos o mal acondicionados. Cuando los alimentos y forrajes están mal ensilados, es decir, con un llenado o prensado deficiente, crecen los hongos y se presenta la contaminación con micotoxinas (Rosiles y Pérez, 1981).

#### ZEARALENONA

La zearalenona o toxina F-2 es un metabolito producido por diferentes especies del género Fusarium.

Las especies de Fusarium son comunes y abundantes en la naturaleza, presentándose en forma de saprobios, esto es, nutriéndose de materia orgánica en descomposición, o bien de vegetación deteriorada de todas clases, causando daños en las

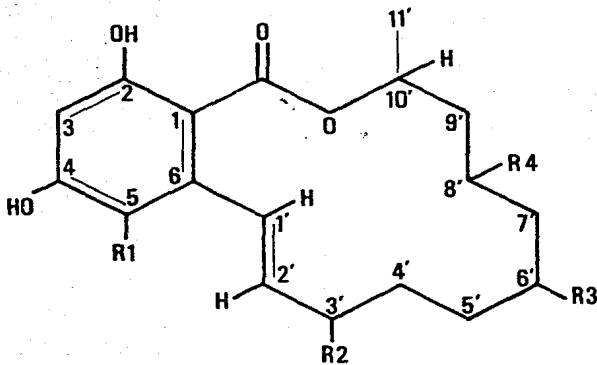


FIGURA 1 . ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ZEAXALENONA  
(TOMADO DE MYRÓCHA, 1983 ).

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Zeaxalenol	H	H <sub>2</sub>	OH	H <sub>2</sub>
Zeaxalenona	H	H <sub>2</sub>	O	H <sub>2</sub>
8'-Hidroxizeaxalenona	H	H <sub>2</sub>	O	OH
6',8'-Dihidroxizeaxalenona	H	H <sub>2</sub>	OH	OH
3' Hidroxizeaxalenona	H	OH	O	H <sub>2</sub>
5-Formilzeaxalenona	CHO	H <sub>2</sub>	O	H <sub>2</sub>
7'-Dehidrozeaxaldienona	H	H <sub>2</sub>	O	H

plantas como son: marchitamiento, plagas y pudrición (Mirocha y Christensen, 1983).

La palabra zearalenona deriva en parte de la planta hospedera *zea* = maíz, y en parte de su estructura química: *ral* = lactona del ácido resorcílico, en = doble ligadura, y *ona* = cetona, y como su nombre lo indica es una lactona del ácido resorcílico cuya fórmula se presenta en la figura 1 (Mirocha y Christensen, 1983).

Existen otros productos metabólicos relacionados con esta micotoxina entre ellas tenemos:  $\alpha$  y  $\beta$  zearalenol (Hagler *et al.*, 1979),  $\alpha$  y  $\beta$  -8' hidroxizearalenona, la 5 formilzearalenona y la 7'-dehidrozearalenona (Bolliger y Tamm, 1972), 6',8'-dihidroxizearalenona (Steele *et al.*, 1976), y  $\beta$ -3hidroxizearalenona (Pahtre *et al.*, 1980) y 4' 5'-dihidroxizearalenona (Robison *et al.*, 1979), cuyas fórmulas se presentan en la figura 1.

La zearalenona se reportó por primera vez en 1927, cuando los granjeros del Medio Oeste de Estados Unidos encontraron hiperestrogenismo en cerdos y lo asociaron al maíz atacado por Fusarium (Mirocha *et al.*, 1971), pero no fue hasta 1966 en que Urry y colaboradores reportaron que la causa del hiperestrogenismo era la zearalenona.

Esta toxina ha sido encontrada en maíz, trigo, sorgo, cebada, avena, germen de trigo y otros

cereales a concentraciones entre 0.1 y 2.90% mg/kg = ppm (Mirocha et al., 1974, 1976, 1977).

La fórmula concentrada de la zearalenona es  $C_{18}H_{22}O_5$ , su peso molecular es de 318 mol/gr, su punto de ebullición es de 164-165°C; esta toxina es un compuesto fenólico con fluorescencia azul-verde (360 nm) cuando es iluminado con luz ultravioleta; sin embargo, la fluorescencia es más intensa con ondas cortas (260 nm) (Guillespie y Schenk, 1977).

Esta toxina ha podido ser aislada, tanto del maíz esterilizado en autoclave, como de alimento peleteado, lo que indica que es un producto termoestable (Rosiles y López, 1977).

El periodo de incubación para la producción de la zearalenona es de 6 a 10 semanas. A una temperatura de 28°C, se produjo la más alta actividad estrogénica en ratas. Cambios alternados en la temperatura de incubación que van de 30°C a 25°C, durante dos semanas también dieron una alta actividad estrogénica de este hongo (Stoloff et al., 1971).

Las diferentes especies de Fusarium que sintetizan zearalenona lo hacen a diferentes concentraciones y temperaturas. Fusarium roseum puede producir altas cantidades de zearalenona (3 000 - 15 000 ppm). Fusarium moniliforme sintetiza bajas cantidades de esta toxina (1 - 19 ppm). Fusarium roseum se desarrolla a temperaturas máximas de 24-27

°C, mientras que la zearalenona es producida a temperaturas de 12-14°C (Mirocha, et al., 1977). Por otra parte, F.roseum "Gibbosum" y F.roseum "semictectum" resisten temperaturas de 25 °C.

La diferencia principal de la zearalenona comparada con otras micotoxinas consiste en que, dependiendo del animal al cual se suministra o por el que sean consumidas, presenta diferentes síntomas. Cuando la zearalenona es consumida por cerdos provoca un gran perjuicio, ya que produce hiperestrogenismo; cuando es consumida por gallinas y pavos su efecto es mínimo o puede no existir, mientras que el zearalenal puede servir como una droga benéfica para aliviar los dolores postmenopáusicos en la mujer (Mirocha y Christensen, 1983).

Los cerdos son los animales más sensibles y los más afectados en la granja. La zearalenona es un estrógeno verdadero, ya que produce cornificación de la vagina en ratas adultas como ocurre en el estro natural; pero también presenta efectos anabólicos y antiespermáticos (Christensen, et al., 1975). El hiperestrogenismo ha sido estudiado en cerdas vírgenes en las que se han detectado cambios degenerativos y proliferativos de la mucosa vaginal (Harold et al., 1969 ; Rosiles y López, 1977).

La importancia de la zearalenona se debe al efecto estrogénico que produce y se manifiesta en los

cerdos hembras un aumento del tamaño de la vulva, prolapso vaginal y diversos grados de desarrollo de las glándulas mamarias en hembras recién nacidas (Rosiles y López 1977). Figuras 2,3 y 4.

Al examen postmortem se observa un enrojecimiento de los labios vulvares y de la mucosa vaginal. En la mucosa de la vagina se observa un exudado turbio blanquecino, los vasos sanguíneos se observan hiperémicos, es decir con una congestión de sangre, pero en el cérvix esta congestión es escasa. En el resto de los órganos no se presenta ningún cambio significativo (Rosiles y López, 1977).

Los efectos de la zearalenona en los cerdos machos son la hinchazón del prepucio y del escroto y una disminución de la libido (Rosiles y López, 1977). Los machos jóvenes pueden presentar atrofia de los testículos y alargamiento de las glándulas mamarias (Mirocha y Christensen, 1983).

Al analizar los tejidos de la mucosa vaginal de cerdos se encontró un engrosamiento del epitelio hasta de 20 células en línea transversal; en algunas porciones del borde libre del epitelio estas células se observan con una degeneración vacuolar y un desprendimiento de la capa de células estratificadas. En contraste a esto, las cerdas de 3.5 meses de edad presentan normalmente un epitelio con 5 a 8 capas de células en línea transversal (Villalobos y Doporto,



FIGURA 2 : HINCHAMIENTO VULVAR EN HEMBRAS DE CERDO RECIÉN NACIDAS  
(UNA SEMANA DE EDAD) (Fotografía tomada por Dr. René Rosiles)



FIGURA 3 : HINCHAMIENTO DE LAS GLANDULAS MAMARIAS EN HEMBRAS DE CERDO  
DE DOS SEMANAS DE EDAD ( Fotografía del Dr. René Rosiles).



FIGURA 4 : PROTRUSIÓN VAGINAL Y DEL RECTO; ESTE SINTOMA PRECEDE  
A LA MUERTE (Fotografía del Dr. René Rosiles).



1974 ).

La zearalenona no causa aborto, pero puede causar infertilidad, reducción del lechón, así como una prolongación del estro (Chang et al., 1971).

El estrogenismo en cerdos se presenta con mayor frecuencia en invierno y principios de primavera, debido a que el hongo requiere de un periodo de temperatura relativamente bajo para la producción de la zearalenona (Christensen y Kaufmann, 1969).

El hiperestrogenismo en cerdos se ha reportado en Australia, Canadá, China, Dinamarca, Escocia, Estados Unidos, Hungría, Inglaterra, Italia, Japón, Rumania, Rusia, Sudáfrica y Yugoslavia (Mirocha y Christensen, 1983).

La mejor medida de control para la producción de zearalenona es almacenar las mazorcas de maíz con cáscara y mantenerlas con un contenido de humedad menor del 15% en una base fresca, ya que es poco probable que Fusarium crezca en maíz con cáscara aún cuando tenga alta humedad, ya que se desarrollan otros tipos de hongos cuyos componentes obstaculizan el desarrollo de Fusarium. (Mirocha y Christensen, 1983).

Los procesos de detoxificación son caros, debido a la energía necesaria para tratar y secar el grano.

Sin embargo, la zearalenona puede destruirse por medios químicos. Lasztity et al. (1977) sometieron el maíz a temperaturas altas y obtuvieron una detoxificación satisfactoria. Este tratamiento provoca que el maíz se decolore y pierda algunas de sus propiedades físicas, pareciéndose al maíz cocinado. El disulfito de sodio ha sido aprobado y usado para la detoxificación de aflatoxinas y puede ser usado para la detoxificación de la zearalenona (Moerck et al., 1980).

Una vez habiendo conocido los síntomas e importancia de la zearalenona, es necesario determinar tanto su consumo por personas en México, como determinar que método de extracción es el más recomendable y eficiente para con estos datos avocarnos a resolver el problema.

Por lo tanto el enunciado de los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1) Determinar el índice de recuperación de la zearalenona ( cantidad mínima recuperada) por tres diferentes métodos de extracción; Stoloff et al (1971), Thomas et al (1975) y Bennett et al (1984).

2) Comparar el costo, riesgo y tiempo asociados con la utilización de dichos métodos, para poder determinar cual es el más recomendable.

3) Detectar la presencia de zearalenona en las tortillas de la Delegación Cuauhtémoc del Distrito Federal.

#### MATERIALES Y METODOS

Este estudio fue realizado en el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en el año de 1986, con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Para conocer el índice de recuperación de la zearalenona se utilizaron diferentes métodos de extracción, que son técnicas usadas para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente.

La identificación de la zearalenona se realizó por su fluorescencia en cromatografía de capa fina. El índice de recuperación de zearalenona se obtuvo mediante diluciones del estándar, hasta obtener la dilución que proporcionó el límite mínimo de detección en el cromatograma, así como tomando en cuenta la densidad de la mancha fluorescente. Se usó maíz como base de análisis.

**MÉTODOS DE EXTRACCIÓN :**

- a) Método de Stoloff, et al. (1971).

Este método es general para la extracción de micotoxinas (aflatoxinas, B1, B2, G1, G2, zearalenol, zearalenona y ocratoxinas).

Para encontrar el índice mínimo de recuperación, al maíz base se le añadieron 2.4, 1.8 y 1.2 ppm del estándar, y se hicieron cinco repeticiones con cada dilución. Los pasos realizados son los siguientes:

1) Se licuaron 25 gramos del maíz o tortilla por analizar con 90 ml de acetonitrilo y 10 ml de cloruro de potasio al 4 %. Se añadieron diferentes cantidades de zearalenona (2.4, 1.8 y 1.2 ppm), hasta encontrar el índice de recuperación de la micotoxina; se licuó durante dos minutos en una licuadora con vaso de vidrio a alta velocidad. En el caso de las tortillas ya no se puso estándar de zearalenona extra, pues se trataba de detectar su presencia en este alimento.

2) Se filtró a través de un papel filtro de poro grueso para obtener la porción líquida en un embudo de separación de 250 ml.

3) A la parte filtrada contenida en el embudo de separación, se le añadieron 25 ml de éter de petróleo y se agitó por un minuto, cuidando de sacar

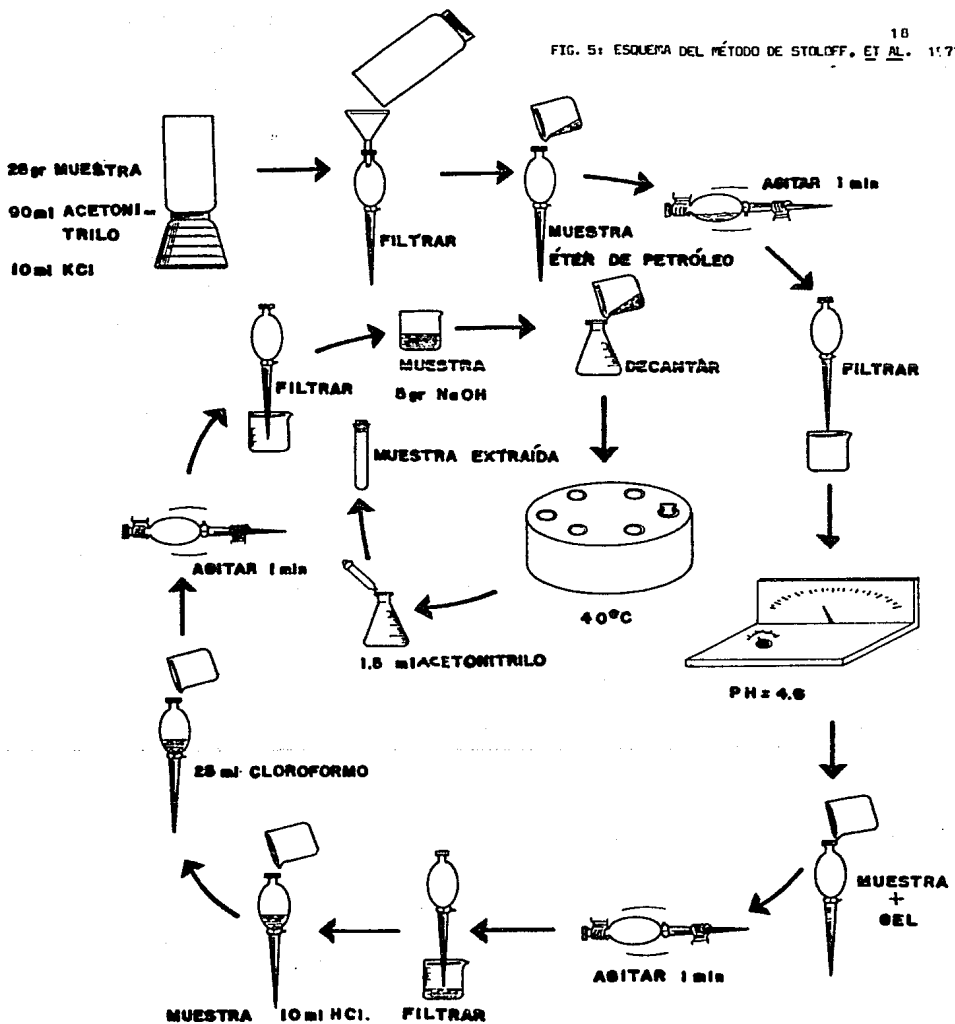
el gas que se formara para que no explotara el embudo; posteriormente, se separaron las partes y se desechó la fase superior. Este procedimiento se repitió dos veces, y se realizó para desengrasar el extracto de maíz o de tortillas.

4) Para hacer el gel, se colocaron 100 ml de agua destilada y 10 ml de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 10 % y se tituló con sosa ( $\text{NaOH}$ ) al 4 %; se midió el pH ajustándolo a 4.6 en un potenciómetro.

5) Se añadió el gel dentro del embudo de separación que contenía la muestra extractada y se agitó por un minuto, dejando salir el gas; se dejó reposar hasta que se separara el gel; se abrió la llave del embudo de separación y se dejó escurrir 100 ml de la muestra ya decolorada, la cual era anteriormente de un color amarillento, a través de un papel filtro recolectándolo en un vaso de precipitado, se enjuagó el embudo de separación.

6) Se colocaron los 100 ml de la muestra contenida en el vaso al embudo de separación y se añadieron a la muestra 10 ml de ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) al 1.5 de pH. Esta es una modificación que se realizó a la técnica original, debido a que los ácidos ayudan a la extracción de micotoxinas.

7) Se adicionaron 25 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) al filtrado y se agitó por un minuto, abriendo la llave del embudo de separación con el fin de que los gases



salieran.

8) Una vez separadas las fases, se filtró la fase inferior correspondiente al cloroformo ( 2 veces).

9) Se drenó la fase inferior, correspondiente al cloroformo a un matraz que contenía 5-10 gramos de sulfato de sodio para extraer el agua que quedaba.

10) Se decantó el cloroformo a otro matraz que se etiquetó con el número de la muestra.

11) La muestra contenida en el matraz se evaporó a sequedad en una estufa, a una temperatura máxima de 40°C.

12) Finalmente se disolvió el extracto de la muestra con 1.5 ml de acetonitrilo y se agitó en el vórtex por dos minutos.

13) Se desarrolló la cromatografía en capa fina, con un disolvente preparado con 20 ml de acetona, 40 ml de acetato de etilo y 60 ml de tolueno en un equipo básico para cromatografía de capa fina.

14) Se observó el cromatograma con una lámpara de luz ultravioleta, marcando con un lápiz las marcas fluorescentes que se observaran.

15) Se midió el factor de retardación (Rf) de cada una de las manchas. anotándolas en una libreta.

Para realizar este método se utilizó toda la vidriería marca Kimex, así como todos los disolventes, el equipo básico para cromatografía y el papel filtro Whatmann # 4, marca Merck-México, S.A., la licuadora utilizada fue marca Osterizer, el potenciómetro marca Corning modelo 12, la estufa marca American Instruments, Co.Inc., y la lámpara de luz ultravioleta marca Listed Insp & Meas, eq..

b) Método de Bennett, et al., 1976. (Figura 6).

Este método es específico para zearalenona. Se realizaron diluciones de 0.5, 1.0, 1.5, y 2 ml que equivalen a 0.04, 1.2 y 2.4 ppm respectivamente, haciendo 5 repeticiones de cada una. Se sustituyó la tierra de diatomeas por arena de playa con diluciones de 2.5, 3.0 y 3.5 ml de zearalenona que equivalen a 3.0, 3.6 y 4.2 ppm en ese orden, haciendo 3 repeticiones con cada una de ellas, pero como no dio buen resultado se siguió utilizando tierra silíceica o de diatomeas.

Se siguió el procedimiento que a continuación se describe:

1) Se colocaron 25 gramos de maíz finamente molido en un matraz de 200 ml y esto se mezcló con 12.5 gramos de tierra silíceica purificada y calcinada (celite); se le añadieron en el caso del estudio de



recuperación de micotoxina las diferentes cantidades de zearalenona.

2) Se añadieron 10 ml de agua destilada al matraz y se agitó con un agitador de vidrio hasta que la mezcla quedó uniforme.

3) Se añadieron 125 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) a la mezcla y se agitó por 15 a 20 minutos, con el fin de extraer la micotoxina del maíz, ya que la tierra de diatomeas o celite funciona como abrasivo.

4) Se transfirió a un embudo de separación de 250 ml, filtrando la mezcla a través de papel filtro Whatmann # 4, colectando la porción líquida.

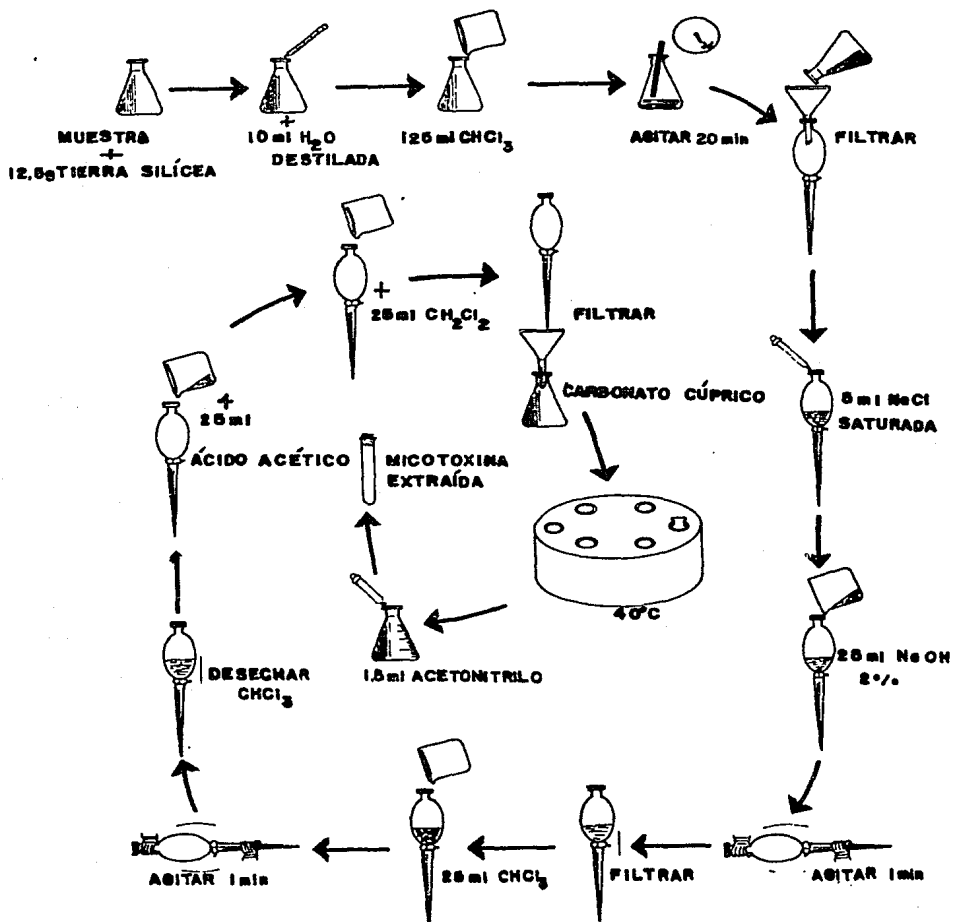
5) Posteriormente se le añadieron al embudo de separación que contenía la porción líquida, 5 ml de una solución de cloruro de sodio saturada y se mezcló.

6) Se añadieron 25 ml de hidróxido de sodio al 2 % (25 gramos de hidróxido de sodio en 1 litro de agua destilada) y se mezcló vigorosamente por un minuto.

7) Cuando las fases se separaron, se desechó la fase inferior y el sedimento, conservando la fase superior.

8) A la fase que quedó en el embudo se le añadieron 25 ml de cloroformo, y se agitó por un minuto.

FIG. 6: ESQUEMA DEL MÉTODO DE BENNETT, ET AL.



9) Se descartó la fase inferior de cloroformo y se añadieron 25 ml de una solución de ácido acético monohidratado [106gr de ácido acético monohidratado ( $C_2H_4O_2 \cdot H_2O$ ) en un litro de agua destilada], agitando por un minuto.

10) Se extrajo la zearalenona añadiendo 25 ml de cloruro de metileno ( $CH_2Cl_2$ ), y se agitó cuidadosamente por un minuto, abriendo la llave del embudo de separación para evitar que los gases se condensaran y explotara el embudo.

11) En un embudo de filtración de vidrio se colocó una pequeña borla de fibra de vidrio y encima 25 g de sulfato de sodio anhidro, para eliminar el agua que contenía.

12) Se filtró la fase inferior contenida en el embudo de separación, correspondiente al cloruro de metileno, a través del sulfato de sodio, recolectándolo en un matraz de 200 ml.

13) Se re-extrajo la fase inferior (Fase orgánica) que quedó en el embudo de separación con 25 ml de cloruro de metileno y se volvió a drenar por el sulfato de sodio.

14) Se evaporó la muestra contenida en el matraz en una estufa a temperatura de  $40^\circ C$  a sequedad.

15) La muestra ya evaporada, se resuspendió colocando 1.5 ml de acetonitrilo y se agitó en el

vórtex por dos minutos.

16) Se realizó la cromatografía en capa fina, utilizando como desarrollador 20 ml de acetona, 40 ml de etil acetato y 60 ml de tolueno, en una cámara para cromatogramas.

17) Se observó con luz ultravioleta y se determinaron los factores de retardación (Rf).

La tierra de diatomeas sirve como abrasivo, siendo de la parte más importante, debido a que en este paso se muele la muestra bien para que quede en contacto con los solventes.

Con objeto de abaratar el costo de la extracción, se eligió un material que presentara las mismas características que la tierra de diatomeas, seleccionando arena de playa, la cual fue lavada con metanol y varios enjuagues de agua; el peso de la arena era también de 12.5 g igual que el de la tierra silíceo. El método descrito se realizó con celite y con arena y se detectaron las diferencias.

El material de vidriería utilizado fue marca Kimex, los solventes, el papel filtro, así como la tierra silíceo purificada fue marca Merck-México, S.A., la estufa marca American Instruments, Co. Inc., y la lámpara de luz ultravioleta marca Listed Insp. & Meas, eq..

c) Método de Thomas, et al. (1975) Figura 7)

Este método de extracción metanol-agua, presenta como principal ventaja el ser un método rápido, que dura aproximadamente 1 hora, y se utiliza para la detección de aflatoxinas y zearalenona.

Se realizaron 9 repeticiones con diluciones de 1.0, 1.5 y 2.0 ml de zearalenona, que corresponden a 1.2, 1.8 y 2.4 ppm respectivamente.

Los pasos seguidos en este método son los siguientes:

1) Se licuaron 50 gramos de maíz con 150 ml de una solución metanol-agua (60+40 v/v), y en el caso de estudiar el índice de recuperación de la zearalenona se añadieron cantidades de 1.2, 1.8 y 2.4 ppm de estándar de zearalenona, en una licuadora con vaso de vidrio, a alta velocidad por dos minutos.

2) Se filtró el extracto en papel filtro Whatman #4, a un embudo de separación de 250 ml y se colectaron 125 ml del extracto.

3) El siguiente paso fue añadir 30 ml de una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) y 50 ml de hexano en el embudo de separación que contenía el filtrado y se agitó por un minuto, abriendo la llave para que salieran los gases y evitar que la presión fuera muy fuerte.

4) Cuando se separaron las fases, se transfirió la inferior (fase acuosa de metanol) a un segundo embudo de separación desechando la fase superior.

5) Para extraer el metanol acuoso se añadieron 50 ml de cloroformo agitando por un minuto y sacando los gases formados.

6) Cuando se separaron las fases, se drenó la fase inferior de cloroformo en un matraz de 200 ml que contenía 5 gramos de carbonato cúprico con el fin de precipitar los pigmentos, y se agitó por dos minutos.

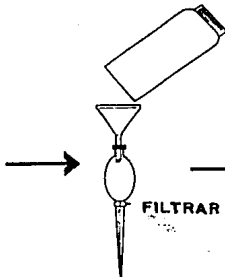
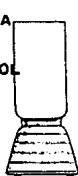
7) Se dejó asentar el carbonato cúprico y se decantó el cloroformo a través de un papel filtro Whatman #2, el cual contenía 5 gramos de sulfato de sodio con el fin de deshidratar la muestra.

8) Posteriormente se colocaron 25 ml más de cloroformo en el matraz para lavar bien el carbonato cúprico, volviéndose a decantar a través del papel filtro.

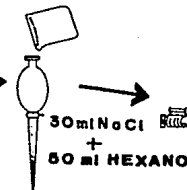
9) Se evaporó el cloroformo con el extracto, hasta quedar aproximadamente 1 ml y se transfirió a un vial.

10) Posteriormente se evaporó el extracto del vial a sequedad en una estufa a una temperatura máxima de 40°C.

50gr MUESTRA  
+  
150ml METANOL  
+  
H<sub>2</sub>O



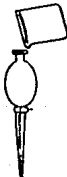
FILTRAR



30ml NaCl  
+  
50 ml HEXANO

AGITAR 1 min

TRANSFERIR A OTRO EMBUDO

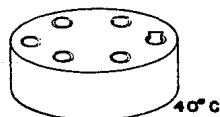


50 ml CHCl<sub>2</sub>

5 gr CARBONATO CÚPRICO



DECANTAR CHCl<sub>2</sub>



40°C

MUESTRA EXTRAÍDA



11) Se resuspendió el extracto del vial con 1.5 ml de acetonitrilo, agitando por un minuto en el vórtex.

12) Se desarrolló la cromatografía en capa fina, utilizando 50 $\mu$ l del extracto del vial en cada carril, así como 50 $\mu$ l del estándar.

13) Se observó con luz ultravioleta, y se anotaron los factores de retardación (Rf) en una libreta.

Para este método se utilizó una licuadora marca Osterizer, la vidriería utilizada fue marca Kimex, los solventes, así como el equipo básico para cromatografía marca Merck-México, S.A., a excepción del carbonato cúprico que fue marca J.T. Baker S.A. de C.V., la estufa marca American Instruments, Co., y la lámpara de luz ultravioleta marca Listed Insp. & Meas, eq..

#### CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La característica principal de la cromatografía consiste en que los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra se filtra a través de los intersticios o sobre la superficie de la fase fija. El desplazamiento de la fase móvil se



manifiesta en una migración diferencial de los componentes de la muestra.

Una gota de líquido colocada sobre un trozo de papel o de tela se difunde en forma circular, y si el líquido contiene sustancias coloridas se pueden ver fácilmente los círculos concéntricos ( Feckok y Shiels, 1983).

a) Preparación de las placas:

Se usaron vidrios planos de 20 cm por lado y 3 mm de grosor. La superficie se limpió escrupulosamente con detergente y/o un disolvente orgánico para eliminar cualquier rastro de grasa.

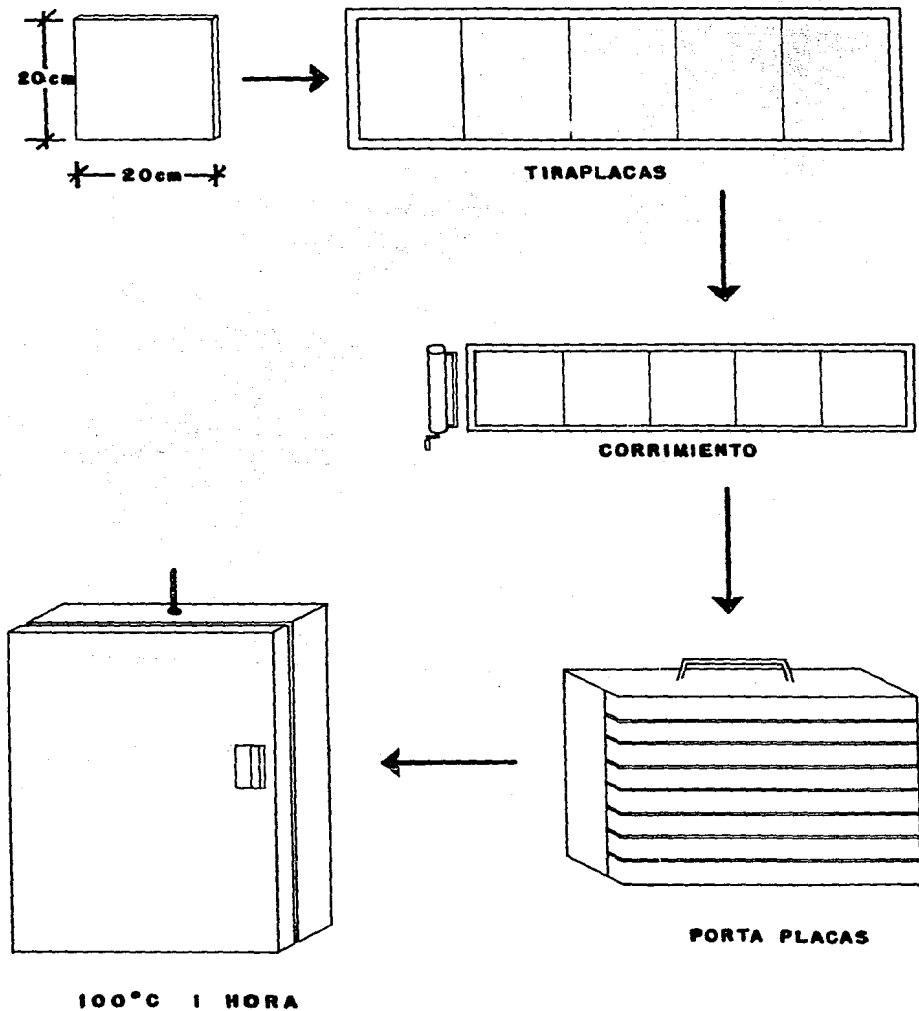
Se colocaron 5 vidrios en fila sobre el soporte de placas marca Desaga Heildeberg. Posteriormente se hizo una solución de gel de sílice, colocando 30 gramos de éste ( Kieselgel 60H) Merck- México S.A., y 70 ml de agua destilada. La suspensión no debe estar ni muy espesa (viscosa), ni muy diluida, de lo contrario no se extiende bien.

Con un aplicador comercial marca Desaga Heildeberg, que tiene una ranura, se desliza sobre los vidrios, y deposita una capa de espesor uniforme ( 0.5 mm aproximadamente).

Después de la aplicación, el conglomerante requiere aproximadamente de 20 minutos para fraguar. Posteriormente se colocaron las placas en un portaplacas marca Desaga Heildeberg, colocándolas

FIG. 8: PREPARACIÓN DE PLACAS PARA CROMATOGRAFÍA FINA.

30.



dentro de un horno marca Felisa modelo FE 291, a una temperatura de 100 °C por una hora, con objeto de activar las placas. (Figura 8)

Se sacan las placas y se guardan en un portaplacas dentro de un desecador o gabinete especial. Esto es importante, ya que una placa activada absorbe vapor de agua y otros vapores de la atmósfera que pueden causar cambios drásticos en su funcionamiento cromatográfico.

b) Aplicación de la zearalenona en las placas y criterios de interpretación:

Las placas ya activadas se rayaron con líneas paralelas entre sí con una distancia de 1 cm entre ellas. En la parte posterior de la placa se marcaron unos puntos pequeños para obtener una misma partida en cada carril.

Se colocaron 30  $\mu$ l de la muestra ya extraída y resuspendida con una pipeta Eppendorf, marca Fisher Scientific Co., colocando en un carril 30  $\mu$ l de estándar de zearalenona marca Sigma, Chemical Company., para poder comparar con la muestra.

El aparato básico para cromatografía de capa fina marca Merck-México S.A., consiste en una cámara hermética de vidrio, para evitar la evaporación de los disolventes, y saturar la atmósfera de ellos.

Es conveniente colocar la muestra gota a gota y esperar a que se seque entre una y otra. La mancha debe ser tan pequeña como se pueda para que la separación sea máxima y la dispersión mínima.

Posteriormente se sumergió la parte inferior de la placa ( que no debe llegar a la altura de la mancha) en la cámara hermética cerrada y se dejó correr, hasta que llegara a faltar aproximadamente 3 cm para el final de la placa, lo cual tarda alrededor de 40 minutos. El disolvente asciende por acción capilar.

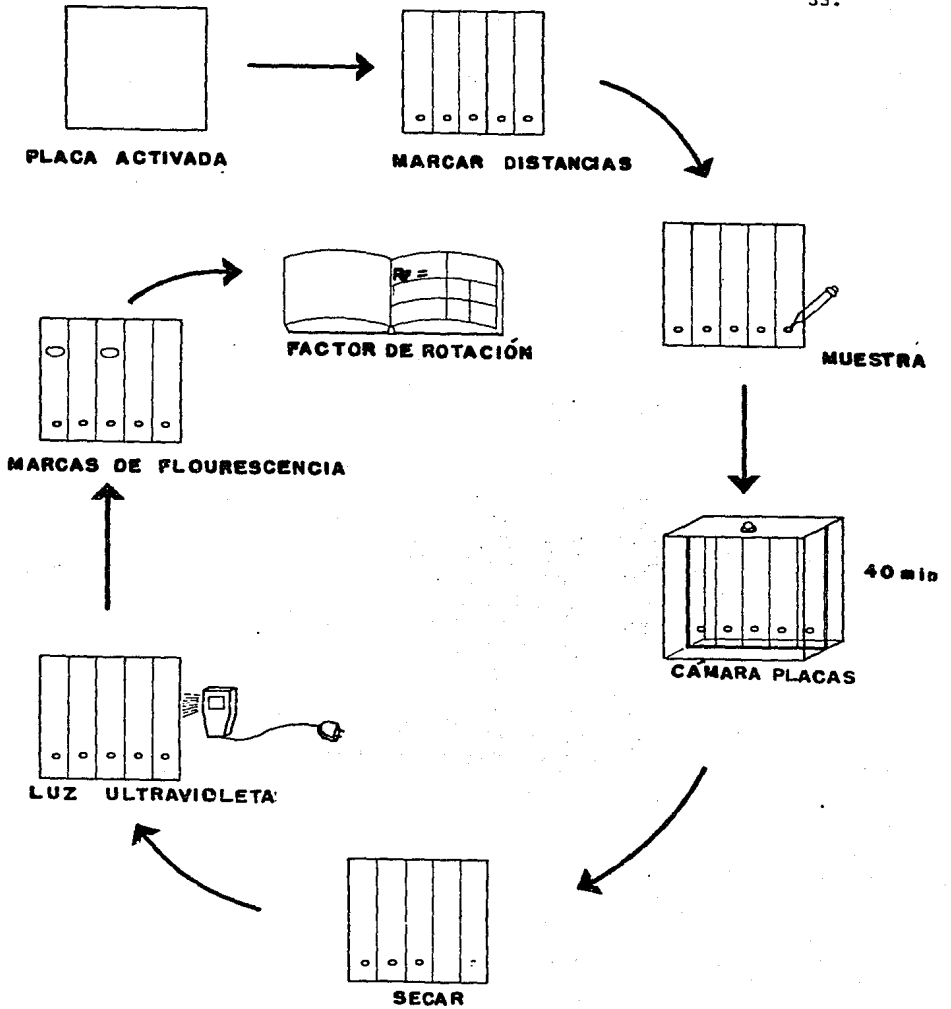
Después del revelado, se sacó la placa esperando que se secase y las manchas individuales de soluto se fijan o hacen visibles con una lámpara de luz ultravioleta marca Listed Insp & Meas, eq.. Se dibujó un círculo con lápiz en torno a las manchas para identificarlas permanentemente y determinar su grado de retención o Rf ( Figura 9)

El grado de retención en cromatografía de capa fina se acostumbra expresar como el factor de retardación o factor de rotación (Rf).

$$R_f = \frac{\text{distancia de desplazamiento de soluto}}{\text{distancia de desplazamiento del disolvente}}$$

El "frente" del disolvente es el límite donde se mide la distancia en que se ha desplazado éste. La distancia de desplazamiento de la muestra se mide al centro de la mancha o al punto de máxima densidad

FIG. 9: PROCESO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICOTOXINAS.



( Peckok y Shiels, 1983).

Los valores de  $R_f$  están sujetos también a muchas influencias menores, como tipo y dirección del desarrollo, tamaño y concentración de la muestra, por lo cual se agrega una sustancia testigo o sea el estándar (zearalenona).

Las distancias se midieron desde el centro de la mancha colocada en la parte inferior de la placa. El frente del disolvente se midió en la línea que quedó en la parte superior de la placa. La distancia a la que se desplaza el soluto se midió desde el centro de la mancha del soluto o su densidad máxima, al límite donde la mancha se encuentra. Estos datos se anotaron en una libreta.

#### Preparación del estándar de zearalenona:

Se utilizó zearalenona pura marca Sigma, Chemical Company. Se pesaron 3 miligramos de zearalenona en una balanza analítica, y se colocaron en un matraz marca Kimex, se le añadieron 50 ml de acetonitrilo y se agitó, todo el procedimiento debe hacerse con guantes y con la mayor precaución posible.

#### Medidas de protección usadas:

Debido al grado tóxico de la zearalenona y los solventes, es necesario tener medidas de protección, tanto en el material, para evitar que la muestra

siguiente se contamine, así como en la persona que realiza el análisis. Para esto se tomaron diferentes precauciones: para la descontaminación del material fue necesario dejar todo el material en una cubeta de plástico con 2 litros de agua aproximadamente y medio litro de hipoclorito, durante 24 horas mínimo, al día siguiente todo el material se enjuagó y se volvió a lavar con Extran líquido, desinfectante para lavar utensilios de laboratorio marca Merck-México S.A..

Para el cuidado personal era indispensable usar bata blanca, guantes de cirujano y mascarilla contra gases marca Cabel, S.A. de C.V..

2) Para conocer la cantidad de zearalenona presente en las tortillas de la Delegación Cuauhtémoc del Distrito Federal.

Este estudio fue realizado gracias al apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), así como por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI).

Para efectos de este estudio se seleccionó la Delegación Cuauhtémoc, debido a que se encuentran representadas en ella todas las clases sociales, así como el mayor número de tortillerías. Esta Delegación presenta la mayor concentración poblacional.

El periodo en que se llevó a cabo el muestreo abarcó de febrero a noviembre de 1986, el cual fue

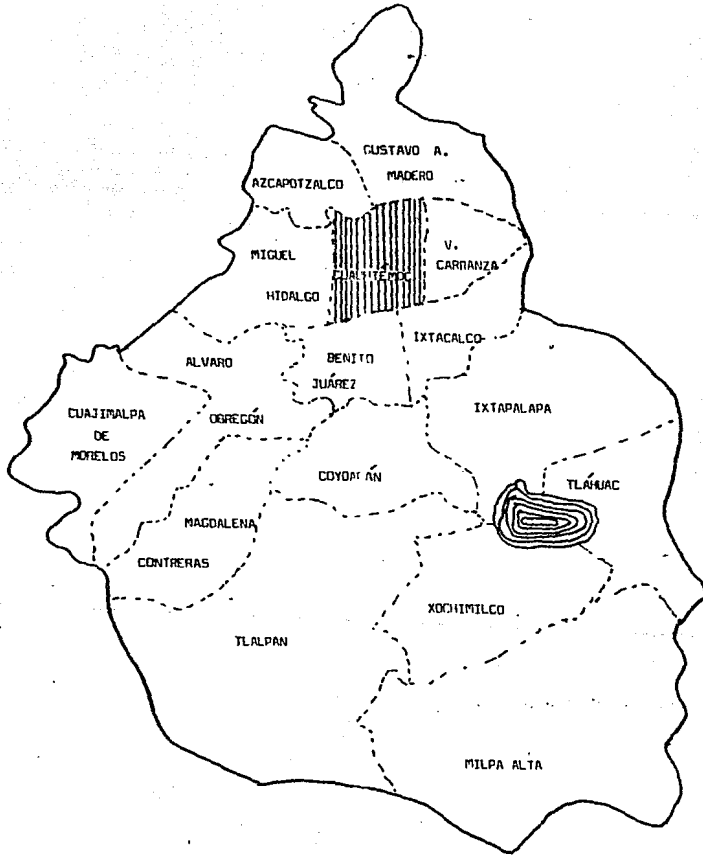


FIGURA 10: UBICACIÓN DE LAS DELEGACIONES POLÍTICAS DEL D.F.



realizado por los inspectores de la Dirección General de Inspección y Vigilancia de SECOFI, encargados de comprar el mismo día todos los kilos de tortillas requeridos por muestreo. En todos los establecimientos muestreados se adquirió siempre un kilo de tortillas. Se muestrearon 122 kilos en 96 tortillerías las cuales se indican en el Apéndice 1.

El número de tortillerías revisadas fue de 96, con 122 kilos de tortillas comprados, debido a que algunas tortillerías fueron revisadas dos y tres veces. Se realizaron tres muestreos en diferentes épocas, el primero fue el 21 de febrero, el segundo el 22 de mayo y el tercero el 22 de agosto.

El primer paso a seguir fue pesar cada kilo de tortillas para comprobar su peso húmedo, posteriormente se dejaron secar todas las tortillas extendidas al medio ambiente obteniendo el peso seco, para poder conocer el contenido de agua que contenían.

En seguida, se molió cada kilo, separando 25g de cada kilo molido en paquetes, se realizaron las extracciones de micotoxinas con los métodos de Stoloff *et al.* y el de Bennett *et al.*, descritos anteriormente. Se realizó la cromatografía de capa fina siguiendo el procedimiento que se utilizó para el índice de recuperación de la zearalenona.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio se dividen en tres aspectos principales:

- 1) Obtención de la cantidad mínima que se recupera de zearalenona con cada uno de los métodos descritos.
- 2) Comparación de los tres métodos de extracción: Stoloff, et al. (1971), Thomas et al. (1975) y Bennett, et al. (1984).
- 3) Cantidad de zearalenona presente en las tortillas elaboradas en la Delegación Cuauhtémoc del Distrito Federal.

### 1) Porcentaje de recuperación de zearalenona:

#### 1.- Método de Stoloff, et al. (1971) (Tabla 1).

En un principio no se obtuvo ningún índice de recuperación de la zearalenona, por tanto se optó por realizar el método por pasos, separando cada paso en tubos viales, para posteriormente realizar la cromatografía, determinando así en donde se perdía la zearalenona. Se observó que generalmente la zearalenona se perdía en el 2o. y 3er. paso correspondiente al éter de petróleo.

Se le añadió ácido clorhídrico ( HCl ) a un pH = 1.5,

TABLA 1. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL MÉTODO DE STOLOFF, *et al.*, (1971)  
PARA LA EXTRACCIÓN DE ZEARALENONA

REPETICIÓN	ESTÁNDAR APLICADO al ppm	FACTOR DE RETARDACIÓN (R <sub>F</sub> )	FFM RECUPERADAS	OBSERVACIONES
1	2.0 2.4	—	—	No se recuperó
2	2.0 2.4	0.91	0.7	El método se realizó por pasos
3	2.0 2.4	0.92	0.4	Se obtuvo recuperación en muestra evaporada
4	2.0 2.4	0.93	2.28	Se le añadió
5	1.0 1.2	0.86	0.7	Mancha tenue
6	1.5 1.8	0.75	0.9	Mancha tenue
7	2.0 2.4	0.97	2.4	Recuperación en paralelo
8	1.0 1.2	0.81	0.6	Manchas poco visibles
9	1.0 1.2	0.75	0.7	Manchas poco visibles
10	1.5 1.8	0.86	0.84	Manchas poco visibles
11	1.5 1.8	0.97	0.9	Manchas poco visibles
12	1.5 1.8	0.97	0.9	Manchas poco visibles
13	2.0 2.4	0.78	2.16	Índice exceso de
14	2.0 2.4	0.86	2.4	recuperación
15	2.0 2.4	0.73	2.4	obtenido con 2 repeticiones

x = 1.37

igualando las características ácidas del estómago, ya que el ácido permite que las micotoxinas se detecten, éste se agregó al paso en el que se había perdido la zearalenona.

El resultado fue positivo, bajando las diluciones de estándar, se encontró que al añadir 1 ml ( 1.2 ppm) y 1.5 ml ( 1.8 ppm), se observaban manchas pero demasiado tenues, por lo cual se aumentó la cantidad de estándar, encontrando el límite mínimo de recuperación al añadir 2 ml de zearalenona es decir 2.4 ppm; Se hicieron tres repeticiones con esta dilución, dando el mismo resultado.

El factor de retardación o Rf de la zearalenona fue de 0.83.

El límite mínimo de recuperación de la zearalenona fue de 1.2 ppm con el método de Stoloff, et al (1981) debido a que comparando las fluorescencias, con esta dilución se pudo observar igual que el estándar.

## 2.- Método de Bennett, et al. (1984)

En este método ( Tabla 2) se encontró que la cantidad mínima que se recuperó de la zearalenona fue al añadirle 1.5 ml de zearalenona es decir, 1.8 ppm.

Al sustituir la tierra silíceas por la arena de playa, se probaron varias diluciones de zearalenona de 3.5 y 4.2 ppm. sin poder obtener la mancha del estándar, por lo tanto se podría utilizar la arena de playa únicamente para muestras con cantidades altas de zearalenona.

Este método es el más recomendable, ya que se logró recuperar una cantidad muy baja de zearalenona.

TABLA 2. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL MÉTODO DE GEMNETT, et. al., (1984)  
 PARA LA EXTRACCIÓN DE ZEAXANTINA

REPETICIÓN	ESTÁNDAR APLICADO #1	ESTÁNDAR APLICADO ppm	FACTOR DE RETARDACIÓN (R1)	FPM RECUPERADAS	OBSERVACIONES
1	0.5	0.6	0.84	1.2	No se recuperó
2	1.0	1.2	0.83	1.62	tenué
3	1.5	1.8	0.85	2.4	muy fluorescente
4	2.0	2.4	0.87	1.8	índice mínimo
5	1.5	1.8	0.91	1.8	de recuperación
6	1.5	1.8	0.83	1.8	mismas carac-
7	1.5	1.8	0.75	1.8	terísticas del estándar
8	1.0	1.2	0.77	1.2	muy fluorescente
9	2.5	3.0	-	-	con arena de playa
10	3.0	3.6	-	-	-
11	3.5	4.2	0.91	3.36	la muestra no se logró igual
12	3.5	4.2	0.87	3.35	al estándar

### 3.- Método de Thomas, et al. (1975)

La cantidad mínima de zearalenona recuperada con esta técnica fue de 1.5 ml es decir 1.8 ppm (Tabla 3).

Esta técnica se eligió debido a que es una técnica rápida para la extracción de micotoxinas.

Al añadir desde 1 ml (1.2 ppm) se pudo detectar una mancha parecida al estándar, ya que presenta el mismo Rf y la misma fluorescencia, pero esta concentración se aumentó, debido a que la intensidad, con respecto al estándar, era muy baja. Mientras que al añadir 2 ml (2.4ppm) de zearalenona, aunque presentara el mismo Rf la intensidad de la fluorescencia era demasiado alta, comparándola con el estándar. Por lo tanto se bajó la recuperación a una concentración de 1.8 ppm, presentando ésta el mismo Rf así como la misma intensidad de fluorescencia del estándar.

b) Comparación de los tres métodos de extracción: Stoloff, et al. (1971) Bennett, et al. (1974) y Thomas, et al. (1984).

Se realizó una comparación entre los tres métodos (Tabla 4), para poder determinar el tiempo utilizado por extracción de zearalenona, desde el inicio de la técnica; hasta la purificación de la micotoxina, el riesgo que representa para la salud humana los solventes utilizados en cada técnica, así como el costo de extracción de una muestra

TABLA 3. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL MÉTODO DE THOMAS, *et. al.*, (1975)  
PARA LA EXTRACCIÓN DE ZEARALENONA

REPETICIÓN	ESTÁNDAR APLICADO		PPH RECUPERADAS	OBSERVACIONES
	ml	ppm		
1	1.0	1.2	.3	Muy tenue
2	1.5	1.8	1.8	Muy fluorescente
3	2.0	2.4	2.4	Muy fluorescente
4	1.0	1.2	.48	Muy tenue
5	1.5	1.8	1.8	Igual al estándar
6	2.0	2.4	2.4	Muy fluorescente
7	1.0	1.2	.6	Muy tenue
8	1.5	1.8	1.8	cantidad mínima de recuperación
9	1.5	1.8	1.8	encontrado
			x = 1.52	

de 25 gramos.

Se observó que el Método de Thomas, et al (1975) es el que lleva menos tiempo ( 20 minutos + 40 minutos de corrimiento de cromatograma de capa fina = 60 minutos), razón por la cual dicho método se eligió como apropiado para la detección de micotoxinas.

Por el contrario el método de Bennett, et al (1984) resultó ser el más tardado, requiere al inicio de la técnica de 15 minutos de agitación, sin embargo el procedimiento posterior sólo lleva 10 minutos, por lo cual podría ser también considerado como un método rápido para la extracción de micotoxinas ( 25 minutos + 40 min. de cromatograma = 60 min.).

El método de Stoloff, et al (1971) requiere de 23 minutos para obtener la purificación de la micotoxina ( 23 minutos + 40 min.= 60 minutos).

Con respecto al riesgo, el método de Stoloff, et al (1971), presenta el mayor peligro, debido a la cantidad de solventes tóxicos que requiere ( éter de petróleo, cloroformo y tolueno).

El método de Bennett, et al (1975) se considera el menos riesgoso, ya que el único solvente tóxico que se utiliza es el cloroformo.



El método de Thomas, et al (1975) presenta como solventes tóxicos para la salud humana, el hexano y el cloroformo.

Finalmente, se hizo la comparación del costo de los materiales en cada método. Este presupuesto se realizó tanto en pesos ( M.N.) como en dólares para poder precisar en cualquier fecha su costo real.

El método que resultò ser el más económico fue el Método de Bennett, et al (1984) con un costo de \$ 2614.43 M.N., siendo \$ 2.26 dólares por cada muestra de 25 gramos (al momento de la conversión eran \$ 963.00 M.N. por dólar norteamericano).

El método de Stoloff, et al (1971) fue el más costoso siendo de \$ 6128.00 M.N. correspondientes a \$ 6.35 dólares, debido a que este método requiere de acetonitrilo, que es un solvente muy caro.

El método de Thomas, et al (1975) tiene un costo de \$ 4792.95 M.N. siendo \$ 4.96 dólares por muestra.

Por todo lo anterior se puede proponer como método más recomendable para la extracción de micotoxinas el método de Bennett, et al (1984) considerando también el índice mínimo de recuperación que es de 1.8 ppm [ en Stoloff, et al (1971) 2.4 ppm., y en Thomas, et al (1975) 1.8 ppm.].

El método de Stoloff, et al. (1971) resultó ser el menos

TABLA 4. COMPARACIÓN DE LOS TRES MÉTODOS  
STOLOFF, BENNETT Y THOMAS

MÉTODO	SOLVENTES PELIGROSOS PARA LA SALUD HUMANA ESCALA §	TIEMPO	COSTO **	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	RECOMENDACIÓN ***		
Stoloff	acetonitrilo	2	con HCl	N.M.	100%	3	
	cloruro de potasio	1	23	6128			
	éter de petróleo	3	sin.	Dis.			
	cloruro férrico	1		6.35			
	sosa	2					
	ácido clorhídrico	2			75%	5	
	cloroformo	3	sin HCl	N.M.			
	sulfato de sodio	1	21	6086			
	acetona	2	sin.	Dis.			
	acetato de etilo	1		6.3			
tolueno	3						
zearalenoa	3						
Bennett	tierra silíceo	1			100%	1	
	cloroformo	3	con tierra	N.M. a			
	cloruro de sodio	1	23	2614.45			
	hidróxido de sodio	1	sin.				
Thomas	ácido acético	2		Dis.	80%	4	
	cloruro de metileno	2		2.71			
	sulfato de sodio	1	con arena	N.M.			
			30	2183.2			
			minutos	Dis.			
				2.26			
		metanol	1			100%	2
		Cloruro de sodio	1				
		Hexano	3	26	N.M.		
		cloroformo	3	minutos	4792.95		
	carbonato cuprico	1		Dis.			
	acetonitrilo	2		4.96			

## § Escala

- 1.- Inocuo
- 2.- Medianamente tóxico
- 3.- Muy tóxico

## \*\* Costo

El costo fue obtenido el día 22 de enero de 1987. Calculado por una muestra de 25 grs..

Se realizó la conversión a dólares para obtener una idea más real sobre el costo.

## \*\*\* Recomendación

En base a los factores aquí mencionados, se recomienda el método con #1 de mejor, siendo el menos recomendable el # 5.

recomendable, por su alto grado de toxicidad y su alto costo, además de que requirió de una modificación en la técnica original ( ácido clorhídrico).

c) Detección de zearalenona presente en las tortillas de la Delegación Cuauhtémoc del Distrito Federal.

En el muestreo de las tortillas elaboradas en la Delegación Cuauhtémoc, se encontró que en los pesos húmedos de las 122 muestras, solamente 39 kilos pesaron verdaderamente un kilo, mientras que los 83 'kilos' restantes pesaron menos dando un peso desde 436 gramos hasta 999 gramos, por lo cual se analizaron 83.8 kilos en lugar de 122 esperados.

Se obtuvo como resultado que 1.89 kg estuvieron contaminados con zearalenona. por lo tanto, solamente, existió un 2.28 % de contaminación, lo que corresponde a 2.277 kg en 83 kilos y 27.46 Kg/ tonelada.

En el Distrito Federal se consumen 2 289 000 kilogramos diarios de tortillas, de las cuales se encontró que 52 647 kilogramos probablemente estén contaminados por zearalenona.

Se realizaron 732 extracciones con el método de Stoloff, et al ( 1971), las tortillerías contaminadas con zearalenona fueron:

Ciprés 11-9 Colonia Sta. Ma la Ribera, siendo el muestreo el 21 de febrero de 1986.

Beethoven 52 Colonia Ex- Hipódromo de Peralvillo, siendo el muestreo el 22 de mayo de 1986.

Mercado Hidalgo Loc. 795 Colonia Guerrero, siendo el muestreo el 22 de mayo de 1986.

Es importante continuar este estudio ya que la contaminación por micotoxinas provoca grandes daños tanto en animales como en la salud humana.

#### CONCLUSIONES

Con este trabajo podemos concluir:

Se logró recuperar 2.4 ppm de zearalenona con el método de Stcloff, et al. (1971) 1.8 ppm con el método de Bennett, et al. (1984) y 1.8 ppm con el Método de Thomas, et al. (1975).

El método más recomendable en este estudio fue el Método de Bennett, et al. (1984). debido a que se utilizan el menor número de solventes peligrosos como el cloroformo, por otra parte, el tiempo que requiere esta técnica es bastante aceptable (25 minutos + 40 minutos cromatograma) y su costo es el más bajo, siendo de \$ 2614.43 M.N.

Por otro lado la contaminación de tortillas es de tomarse en cuenta, ya que de 2289 toneladas de tortilla que se consumen diario en el Distrito Federal cerca de 53 toneladas se encuentran contaminadas.

La detección oportuna de agentes contaminantes en alimentos es una actividad de fundamental importancia.

Existen numerosos contaminantes que ejercen efectos nocivos en la salud humana y animal, por lo cual se requiere urgentemente de estudios para determinar la magnitud de este problema.

El grado en que llegan a afectar las cantidades de contaminantes producidos en nuestro país, es difícil de determinar pero evidentemente es uno de los problemas de mayor importancia.

Se debe de considerar este estudio, así como continuar debido a su importancia ya que la tortilla es uno de los principales alimentos en nuestro país. Este estudio se debe planear para poder muestrear todas las delegaciones posibles, y poder tener así un estudio más completo.

Es importante también recalcar la importancia de realizar estudios sobre la acción de las micotoxinas en el ser humano, ya que existen pocos reportes sobre el tema y las consecuencias son muy importantes.

## LITERATURA CITADA

- Bennett, G.A., Shotwell, D.L. and Kwolek, W.F. 1984. Determination of zearalenol and zearalenone in corn by high performance liquid chromatography. (Working paper).
- Burnside, J.E., W.L. Sippel, J. Forgaes, W.T., Carl, M.B. Atwood and E.R. Doll. 1957. A disease of swine and cattle caused by eating moldy corn, 11: Experimental production with pure cultures of molds, American Journal of Veterinary Research 18: 817-824.
- Bolliger, G., and Tamm, C. 1972. Vierneue metabolite von *Giberella zea*: 5 formyl-zearalenol, 7' dehidrozearalenon, 8'hydroxy, 8'-epihidroxyzearalenone. Helv. Chim. Acta 55: 3030-3048.
- Chang, K., Kurtz, H., and Mirocha, C.J.. 1979. Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. Am. J. Vet. Res. 40: 1260-1267.
- Christensen, C.M. y Kaufmann, H.H. 1969. Contaminación por hongos en granos almacenados. Ed. Pax-México. México. 199pp.
- Christensen, C.M. and López, L.C. 1962. Daños que causan en México los hongos en granos almacenados. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Folleto Técnico No.44.

- Chistensen, C.M., Nelson, G.H., Newbern, P.M., Mirocha, C.J. 1975. Mycotoxicosis caused by *Fusarium* spp., Dysease of swine. Dunne H.W. 888-897 cap.46. Ed Iowa State University Press.

- Gillespie, A.M. and Schenk, G.M.. 1977. Fluorescence and phosphorescence of ochratoxins, sterigmatocystin, patulin and zearalenone: Quantitation of ochratoxins. *Anal.Lett*: 10 (2) : 161-172.

- Graham, R. 1936. Corn stalk disease investigations. *Veterinary Medicine*, 31: 46-50.

- Hagler, W.M., Mirocha, C.J., Pahtre, S.V. and Bohrens, J.C. 1979. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum'. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 849-853.

- Harold J., Malcom, E. Glen, H., Christensen, M., Chester J. and Mirocha, C.J. 1969. Histologic changes in the Genital tracts of Swine Fed Estrogenic Mycotoxin. *Am. J. vet. Res.* Vol 30. 4: 551-556.

- Lasztity, R., Tamas, K., and Woller, L. 1977. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in some Hungarian corn cobs and the possibilities of detoxification. *Ann. Nutr. Alim.* 31: 495.

- Micchener, C.J. 1882. Cerebrospinal meningitis-fungos toxicum paralyticus. *American Veterinary Revue*, 6:345

-347.

- Mirocha, C.J. and Christensen, C.M. and Nelson, G.H.. 1971. F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. Microbial Toxins. S.Kadis, A.Ciegler and S.J. Ajl .Ed Academic Press, New York. 8:107-138.

- Mirocha, C.J. and Schauerhamer, B., and Pahtre, S.V. 1974. Isolation, detection and quantitation of zearalenone in maize and barley. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57:1105-1110.

- Mirocha, C.J., Pahtre, S.V. and Christensen, C.M..1976. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in foodstuff. Appl. Environ. Microbiol. 32: 553-556.

- Mirocha, C.J., Pahtre, S.V. and Christensen, C.M. 1977. Zearalenone. Mycotoxins in Human and Animal Health. Ed. Pathathox Publ. Inc. Park Forest South. 345-364.

- Mirocha, C.J., Pahtre, S.V., and Christensen, C.M. 1980. Mycotoxins. Advances in Cereal Science and Technology. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St Paul, M.N. 3:159-225.

- Mirocha, C.J. and Christensen, C.M. 1983. Mycotoxins. Chapter 8. Storage of Cereal Grains and their Products. 241-280.

- Moerck, K.E., Wohlaman, A., and Hilton, B.W. 1980. Aflatoxin destruction corn using sodium bisulfite, sodium hydroxide and aqueous ammonia. J. Food. Prot. 43:571-574.



- Pahre, S.V., Fenton, S.W., and Mirocha, C.J. 1980. 3'-hydroxizearalenones, two new metabolites produced by *Fusarium roseum*. *Agric. Food Chem.* 28:421-424.
- Peckok, R.L., y Shiels, D. 1983. Métodos modernos de análisis químicos. Limusa. México, 487pp.
- Robison, T.S., Fenton, S.W. and Mirocha, C.J.. 1979. Isolation of 4',5'-dihydroxizearalenone- A zearalenone related metabolite of *Fusarium roseum* 'Gibbosum'. Abstract of Papers, Agric. Food Div., Am. Chem. Soc., Paper 80. 178th Nat. Meeting.
- Rosiles, R y nd López, R.. 1977. Síndrome estrogénico de origen alimenticio en cerdos. *Veterinaria México.* 8:123-126.
- Rosiles, R y Pérez, A.H. 1981. Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas en alimentos para animales domésticos durante los años 1977 & 1980., *Veterinaria México.* 199pp.
- Sippel, W.L., Burnside, J.E. and Atwood, B.F. 1953. A disease of swine and cattle caused by eating molded corn. *Proceedings of the Veterinary Association.* 174-181 pp.
- Steele, J.A., Mirocha, C.J., and Pahre, S.V. 1976. Metabolism of zearalenone by *Fusarium roseum*. *J. Agric. Food Chem.* 24:89.

- Stoloff, L., Nesheim, S., Yin, L., Rodricks, J. V., Stack, M and Campell, A. D.. 1971. Multimycotoxin Detection Method for Aflatoxins Ochratoxins, Zearalenone, Sterigmatocystin and Patulin. J. Assoc. Official Anal. Chem. 54: 91-97.

- Thomas, F., Eppley, R. M., and Trucksess, M. W. 1975. Rapid Screening Method for Aflatoxin and Zearalenone in Corn. Journal of the AOAC. 58 (1): 114-116.

- Urry, W. H., Wehrmeister, H. L., Hodge, E. B., and Hidy, P. H. 1966. The structure of zearalenone. Tetrahedron Lett. 27: 3109-3114.

- Villalobos, A y Doporto, J. M. 1974. Diagnóstico de gestación en la cerda por medio de biopsia vaginal. Veterinaria. México. 2 (5): 34-42.

Colonia	Dirección de la tortillería	No. de muestreos	Peso húmedo en gramos	Peso seco en gramos
Algarín	Torbio Medina 45-B	1	981.4	590.0
	Isabel La Católica 472 Acc.	1	1,025.4	735.6
Asturias	Ramon Fabie 187-D	1	943.4	599.0
Centro	Allende 155 Acc. C.	2	927.4	567.8
		3	1,010.5	614.3
	Ayuntamiento 148 loc. D	1	992.3	607.8
	Balderas 72 loc. I	1	619.7	405.0
	Coloabia 27	2	1,001.4	622.3
		3	983.7	601.5
	Colombia 56 A	2	1,012.9	650.4
	El Rosario 206	1	1,013.9	624.4
	Héroes 136 A	2	961.5	665.4
	Interior del mercado El Pasaje local 10	2	946.4	584.3
	Jesús María 178	1	1,022.3	630.1
	Libertad 12	3	1,019.6	618.8
	Libertad 15 Acc. D	2	999.6	644.0
	Libertad 59	2	969.5	606.4
	Libertad 127	2	978.9	596.1
		3	1,019.6	618.8
	Margil 31A	1	1,010.9	613.9
	Rep. de Ecuador 11 Acc. H	2	983.5	668.8
		3	986.0	628.4
	República del Perú 131	2	1,007.5	619.3
	3	1,005.8	598.9	
Santísima 22 Acc. A	1	1,032.7	678.8	
Candesa	Vicente Suárez 41	1	979.6	636.8
Doctores	Av. Niños Héroes 213	1	994.0	565.1
		2	896.6	602.5
		3	1015.4	656.7
	Niños Héroes 231	2	975.6	628.0
	Dr. Erazo 23	1	961.4	619.5
Ex-Hipódromo de Peralvillo	Beethoven 52	2	963.7	625.7
		3	960.7	621.8
	Beethoven 61-B	2	979.1	606.6
		3	980.6	583.6
	Ernesto Elorduy 7 Acc. 2	1	1007.0	648.0
	Ernesto Elorduy 34	2	763.3	606.2
	Ernesto Elorduy 131	3	957.0	663.9
	Debussy 30	1	1033.0	630.7
	Wagner 132	2	985.8	639.6
		3	960.4	609.2
Guerrero	Carlos G. Meneses 238-20	1	1005.4	630.5

	Degollado 43	1	923.8	543.6
	Héroes 20	3	1034.4	708.8
	Héroes 104	3	1056.3	689.7
		3	950.3	612.6
	Héroes 136-A	3	928.5	602.5
	Héroes 134	3	964.7	630.2
	Héroes 143	2	959.0	614.5
	Héroes 201	2	1002.3	665.8
	Luna 200-B	2	1013.1	612.4
		3	996.0	616.2
	Meneses 212	2	977.3	607.7
	Mercado Hidalgo Loc. 33	3	994.9	645.5
	Mercado Hidalgo Loc. 795	2	940.4	600.4
	Mercado Hidalgo Loc. 799	3	997.3	647.0
	Mercado Hidalgo Loc. 893	3	881.9	600.6
	Minas 178	1	1041.2	682.1
	Sol 80	1	1002.1	661.5
	Sol 87	1	964.3	595.9
	Violeta 31-F	2	1080.7	646.5
	Zaragoza 59-A	2	998.0	632.1
		3	1169.8	721.8
	Zaragoza 144-A	2	968.2	643.8
		3	985.3	634.6
	Zarco 116 Acc. A	1	1012.5	631.6
	Zarco 149	2	987.1	627.7
		3	566.6	308.9
<hr/>				
Juárez	Abraham González 143 Loc. C	1	990.1	620.0
	Toledo 32-B	1	998.5	637.0
<hr/>				
Morelos	Jaime Muñoz s/n	2	981.2	652.6
	Multifamiliar Libertad Loc. 29	2	992.3	446.2
<hr/>				
Marvarte	Dr. Vertiz 953-B	1	937.5	614.0
<hr/>				
Obreira	Lorenzo Boturini 95	1	1023.5	640.3
	Juan A. de la Fuente & C	1	1027.4	668.1
<hr/>				
Peralvillo	Calzada de los Misterios 2	1	974.3	673.1
	Adelina Patti 70	1	986.2	590.5
<hr/>				
Rosa	Campeche 74	2	1041.8	636.2
		3	1010.5	648.7
	Córdoba, 152 Loc. B	3	987.1	612.4
	Medellín 231	2	987.0	654.2
	Medellín 229	3	969.6	680.6
	Ures 51	2	907.9	569.6
	Zacatecas esq. con Córdoba	2	920.8	577.0
<hr/>				
Rosa Sur	Actopan 2	1	966.1	581.1
	Bajío 250	1	990.4	611.7

