



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"IZTACALA"

*Bonifacio
167
813*

DETERMINACION DE AFLATOXINAS
EN MAIZ DE AUTOCONSUMO
DEL MEDIO RURAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

HILDA CECILIA TORTAJADA QUIROZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

ESTUDIANTE :

NUNCA CONSIDERES EL ESTUDIO
COMO UN DEBER, SINO COMO —
UNA OPORTUNIDAD PARA PENE -
TRAR EN EL BELLO Y MARAVI -
LLOSO MUNDO DEL SABER.

ALBERT EINSTEIN

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, BAJO LA DIRECCION DE LA M. en C. YOJA GALLARDO NAVARRO, QUIEN ME APOYO Y ORIENTO DURANTE LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.

ESTE TRABAJO SE REALIZO CON EL APOYO ECONOMICO DE LA ORGANIZACION DE LOS ESTADOS AMERICANOS EN EL PROYECTO "PROPUESTA TECNOLÓGICA PARA EL MANEJO TRANSPORTE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCION DE ALIMENTOS", CLAVE : PIT / QU / OEA / 81 / 1888.

MI AGRADECIMIENTO AL DR. RENE ROSILES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, POR SUS ACERTADOS COMENTARIOS, A LOS PROFESORES QUE FUNGIERON COMO REVISORES DE TESIS PERO PRINCIPALMENTE A LOS BIÓLOGOS AGUSTIN RUIZ CABRERA Y JESUS MEDINA SOTO, POR SU AYUDA, ASI COMO AL I.B.Q. JUAN PEDRO OLIVARES - NAVA, POR LA COOPERACION PRESTADA Y A LA I.F.B. MA. DE LOURDES MURCIA FLORES, POR LA INFORMACION Y MATERIAL PRESTADO.

A MI FAMILIA

A MIS AMIGOS

A JORGE ROBERTO
JAVIER TORTAJADA

A LA MEMORIA DE EDGAR -
JAVIER GONZALEZ MENDOZA

AL PERSONAL DEL LABORATORIO
DE MICROBIOLOGIA SANITARIA
Y DEL DEPARTAMENTO DE GRA -
DUADOS E INVESTIGACION EN -
ALIMENTOS DE LA ESCUELA - -
NACIONAL DE CIENCIAS BIOL-
GICAS.

A TODOS AQUELLOS QUE DE
ALGUNA FORMA CONTRIBU -
YERON A LA REALIZACION
DEL PRESENTE TRABAJO.

I N D I C E

	Pág.
R E S U M E N	1
I N T R O D U C C I O N	2
O B J E T I V O	8
D E S C R I P C I O N D E L A R E A D E T R A B A J O	9
M A T E R I A L Y M E T O D O D E L A N A L I S I S	14
R E S U L T A D O S Y A N A L I S I S D E R E S U L T A D O S	18
D I S C U S I O N	27
C O N C L U S I O N E S	29
B I B L I O G R A F I A	30

En México, dadas las características de la población agrícola y la gran cantidad de población campesina, los granos que son almacenados por los agricultores en condiciones rústicas -- son de gran importancia, sobre todo aquellos de consumo directo como el frijol y el maíz, éste último ocupa el primer lugar en cultivo (aproximadamente 10 millones de hectáreas) y en consumo entre la población del país; se produce una cosecha anual un -- poco mayor de 10 millones de toneladas métricas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de aflatoxinas en maíz de autoconsumo rural.

El método utilizado es una modificación del Método II de -- la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Método -- BF, para determinación de aflatoxinas: Método rápido para la -- determinación de aflatoxinas y zeralenone en maíz de la AOAC.

Se analizaron 132 muestras en total de dos variedades de -- maíz (criollo y H-507) almacenados en tambo, costalilla y tapanco.

Ninguna de las muestras analizadas presentó contaminación con aflatoxinas, pero 72 de ellas mostraron fluorescencia azul muy intensa, desconociéndose la identidad de este compuesto por no considerarse fundamental para el presente trabajo.

INTRODUCCION

En México, la producción agrícola se ve limitada, en especial la de granos básicos, por diversos factores tales como la escasez de tierras laborables y agua, mala organización de las pequeñas unidades de producción, capacitación deficiente de campesinos y técnicos, carencia de asistencia técnica efectiva a las unidades de producción e insuficiencia de insumos agrícolas, entre ellos, de semillas mejoradas y daños provocados por plagas y enfermedades. Peor que esto, es que después de lograr con grandes esfuerzos una determinada cosecha, ésta sufra grandes pérdidas o deterioros en su calidad nutritiva y sanitaria, debido a la acción de factores físicos y bióticos favorecidos por la carencia de infraestructura adecuada para el almacenamiento y conservación de los granos, así como por falta de organización técnica y administrativa de dichas actividades (15).

Entre los granos de consumo directo se encuentran el maíz y el frijol (14). El maíz, que en la República Mexicana ocupa el primer lugar en cultivo y en consumo entre la población, es una de las plantas que se utiliza principalmente para la alimentación humana y que es cultivada actualmente en casi todos los países del mundo (16).

Esta planta de origen americano, con una gran importancia económica (26), pertenece a la extensa e importante familia - GRAMINEAE, subfamilia Panicoideae, Tribu Tripsceae y Género Zea, representado por la especie única Z. mays, que es el maíz indio o maíz (13).

La producción máxima de maíz depende, entre otros factores de suelos y condiciones climáticas favorables, mecanización eficaz, control de plagas, prácticas agrícolas modernas, manejo inteligente del agua y mayor productividad del trabajo agrícola - (28).

La conservación adecuada de los granos almacenados en cualquier parte del mundo depende esencialmente de la ecología de la región considerada, de la bodega o almacén disponible, del tipo y condición del grano por almacenar y la duración del almacenamiento (23).

Esta conservación de granos en las regiones tropicales (Veracruz en éste caso particular), donde existen condiciones de alta temperatura y humedad relativa, constituye un problema muy serio porque favorece el desarrollo de diferentes plagas, ya que muchos granos y sus productos no se almacenan en bodegas apropiadas, los agricultores siguen empleando sistemas de almacenamiento carentes de toda ventaja para la buena conservación del grano, el secado y la limpieza de los granos se practica a muy baja escala y en su mayoría no existen normas adecuadas a las áreas de producción, lo que permitiría establecer categorías en lo referente a calidades (1,22).

La forma y estructura de los almacenes rurales comprende una gran diversidad de los mismos, tanto en volumen de almacenamiento como en los materiales que se emplean para construirlos (9), entre los más comunes se encuentran el de costalilla, tambo y tapanco (8,22).

Los granos tienen, en el momento de almacenarse, cantidades variables de esporas de hongos que adquieren naturalmente en el campo en donde se cosecharon; a estos hongos se les llama hongos de campo, mientras que aquellos que invaden a los granos durante el transporte y almacenamiento, se llaman hongos de almacén (17).

Generalmente, los hongos de almacén no invaden los granos antes de la cosecha, pero pueden encontrarse en la semilla en porcentajes tan bajos como un 1%, proporcionando el inóculo de los hongos de almacén (17).

Cuando los granos son almacenados en condiciones húmedas se requiere de secados continuos. Esto es difícil, porque la infraestructura con la que se cuenta en el medio rural es muy deficiente y no existen plantas de secado, dando como consecuencia que el grano se guarde húmedo y que exista un calentamiento posterior, y finalmente, la invasión por parte de los hongos de almacén (14).

Los hongos de almacén pertenecen principalmente a las especies de los géneros Aspergillus y Penicillium. Estos hongos no invaden en forma significativa a los productos agrícolas antes de la cosecha, sino en los diferentes graneros o silos de almacenamiento, en donde las condiciones ambientales favorecen su desarrollo (15).

Durante el desarrollo de los hongos de almacén en los granos almacenados, causan diferentes tipos de daños, siendo los principales la pérdida de germinación de las semillas, ennegrecimiento o manchado de los granos, calen

tamiento, producción de toxinas y la demeritación de la calidad en la industria alimenticia junto con la destrucción completa del producto (12).

La era de las toxicosis por mohos en alimentos y forrajes data de 1711 cuando se presentó una de las micotoxicosis más severas de toda la historia, ocurrida durante un período de 500 años entre los siglos XVI y XVII en la — Edad Media. Miles de personas murieron por una enfermedad que se creía había sido enviada por los dioses, llamada "Fuego de San Antonio" o "Fuego Santo". Conforme transcurrió el tiempo, estas muertes se relacionaron con el consumo de pan de trigo con alcaloides de esclerocio fungal producido en el grano de centeno. El hongo Claviceps invadió el grano y produjo el esclerocio de ergo tismo en lugar de las semillas normales (20).

Desde el primer descubrimiento de las micotoxicosis se han encontrado toxinas importantes que han afectado al hombre y a los animales a través de la historia. Posteriormente, se han identificado y aislado diferentes tipos de compuestos tóxicos asociados con el crecimiento de hongos y sin que exista ninguna relación con brotes de enfermedades, lo que lleva al área de investigación a la era de cambios múltiples (30,32).

Entre los compuestos tóxicos se encuentran zeralenone, citrinina, patulina, ácido penicílico, ácido kójico, ocratoxinas, esterigmatocistinas, aflatoxinas, etc. (35).

Las mayores investigaciones en cuanto a micotoxinas se refiere son las relacionadas con las aflatoxinas.

Las aflatoxinas se descubrieron en Inglaterra a raíz de la muerte de — más de 100 000 guajolotes alimentados con comida a base de cacahuete, importada de Brasil y dando lugar a investigaciones que permitieron aislar al hongo Aspergillus flavus. Se observó que este hongo producía toxinas al crecer en las semillas de cacahuete, toxinas que fueron llamadas aflatoxinas y que constituyen el grupo de compuestos carcinogénicos más potentes conocidos por el hombre. Se han encontrado aflatoxinas en alimentos y forrajes en un porcentaje elevado, lo que constituye ya un riesgo, directo e indirecto, a la — salud humana (20,36).

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos tóxicos, metabolitos de bisfuranocumarina, producidas por algunas cepas de Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus. Químicamente son cumarinas sustituidas con anillos de biferano y configuración tipo lactona, comunes a todas ellas. También se han clasificado como derivados del metoxi-benzen bifurano (19).

Las principales aflatoxinas son la B₁, B₂, G₁ y G₂, y como derivados de las anteriores, M₁, M₂, B₂A y G₂A, todas aisladas de Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus. Una de las formas para su identificación es la fluorescencia en luz UV (onda larga 366 nm) en la cual las aflatoxinas B₁ y B₂ fluorescen con un tono azul, y las G₁ y G₂ con un tono verde claro. En la Figura No. 1 se presentan las estructuras de las principales aflatoxinas y sus derivados (35).

Los factores ambientales que más influencia tienen en la producción de aflatoxinas (Cuadro No. 1) son la temperatura, el pH, la humedad del sustrato y la humedad relativa (5).

Otros aspectos importantes que intervienen en el crecimiento de los hongos y en la posterior producción de aflatoxinas son el secado, los daños mecánicos que pudiera presentar el grano, el tiempo de almacenamiento, la cantidad de O₂ presente, la naturaleza del sustrato, etc. (10).

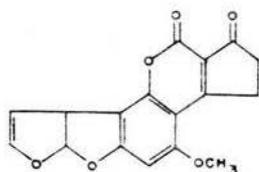
El aumento en el número de reportes sobre la presencia de aflatoxinas en alimentos y forrajes ha obligado al establecimiento de procedimientos de detoxificación que no sólo reduzcan los residuos tóxicos, sino que también mantengan el valor nutritivo de los productos (3,6,7).

La clave para prevenir el desarrollo de los hongos toxigénicos en los alimentos y evitar la producción de toxinas, es entender como invaden los hongos a las plantas, ya que una vez que se han desarrollado y las toxinas están presentes, la alternativa es destruirlas. Sin embargo, esto conduce a una serie de problemas. Cualquier tratamiento físico o químico que elimine a las micotoxinas presentes es un costo adicional para un producto que ya está dañado. La mayoría de los procesos que eliminan las micotoxinas no tienen una efectividad del 100% además de que cuando se utilizan procesos químicos se requiere de una amplia serie de pruebas para establecer si se ha formado o no un segundo compuesto biológico activo con un radio de acción diferente, además de que estos procesos reducen la calidad de los alimentos (10,27).

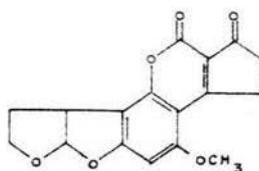
La importancia de las aflatoxinas radica en que son compuestos altamente carcinogénicos y que se presentan con mucha frecuencia en los alimentos y forrajes (31,35).

De todas las plantas que se cultivan en el mundo para la producción de alimentos, los cereales son una de las mejores fuentes para el crecimiento

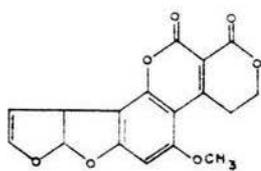
FIGURA No. 1



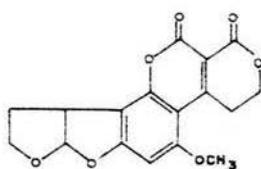
B 1



B 2

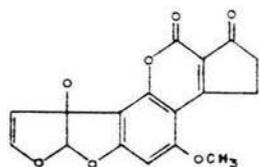


G 1

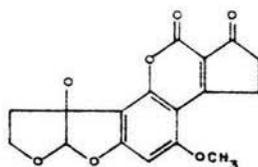


G 2

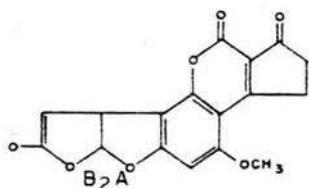
PRINCIPALES AFLATOXINAS



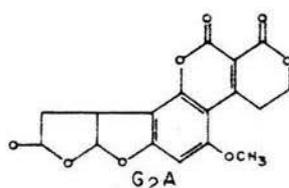
M 1



M 2



B₂A



G₂A

DERIVADOS DE AFLATOXINAS

CUADRO No. 1

INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA PRODUCCION
DE AFLATOXINAS.

FACTOR	CRECIMIENTO FUNGICO	PRODUCCION AFLATOXINAS	VALORES DE SEGU- RIDAD EN EL ALMA CEN.
pH	1.5 - 8.5	6.2	-
Temperatura	> 4-43°C (37°C)	12-41°C (28°C)	10°C
Humedad del Sustrato	> 12 %	17.5 (>80)	12 %
Humedad Relativa	70 %	83 % (98%)	65 %

() = VALORES OPTIMOS

FUENTE : BURDASPAL, P.A. 1978. AFLATOXINAS EN ALIMENTOS. CENTRO
NACIONAL DE ALIMENTACION Y NUTRICION. MEX. (24): 21-27.

to de hongos (2) y los más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas debido al manejo a que están sujetos y a las condiciones bajo las que son almacenados (28,31). Dentro de los cereales, son el maíz, el trigo y el - - arroz los más comúnmente contaminados (26), siendo el maíz uno de los principales dentro de nuestro medio.

El objetivo del presente trabajo es determinar la presencia de aflatoxinas en maíz de autoconsumo del medio rural, y en caso de encontrarlas, -- identificarlas y cuantificarlas.

DESCRIPCION DEL AREA DE TRABAJO.

MUESTREO :

El presente trabajo incluye únicamente la determinación de aflatoxinas en maíz de autoconsumo del medio rural, siendo la última parte del proyecto denominado "Cambios de maíz de autoconsumo durante su almacenamiento". Para llevar a cabo el proyecto inicial, se pensó en una zona rural en donde existiera un alto índice de producción y almacenamiento de maíz a nivel rural, y de que las condiciones de temperatura, humedad y manejo del grano fueran favorables para que se dieran cambios en el grano.

Se escogieron al sur del estado de Veracruz, 9 ejidos comprendidos en 5 municipios del Distrito de Temporal No. IX (Isla) (Figura No. 2), estableciéndose 19 zonas de muestreo (Cuadro No. 2) dependiendo de las facilidades para llegar al lugar, de las facilidades que dieron los campesinos, de que la siembra de invierno hubiera sido cosechada más o menos al mismo tiempo y de que los sistemas de almacenamiento y las variedades de maíz fueran los mismos.

SISTEMA DE MUESTREO :

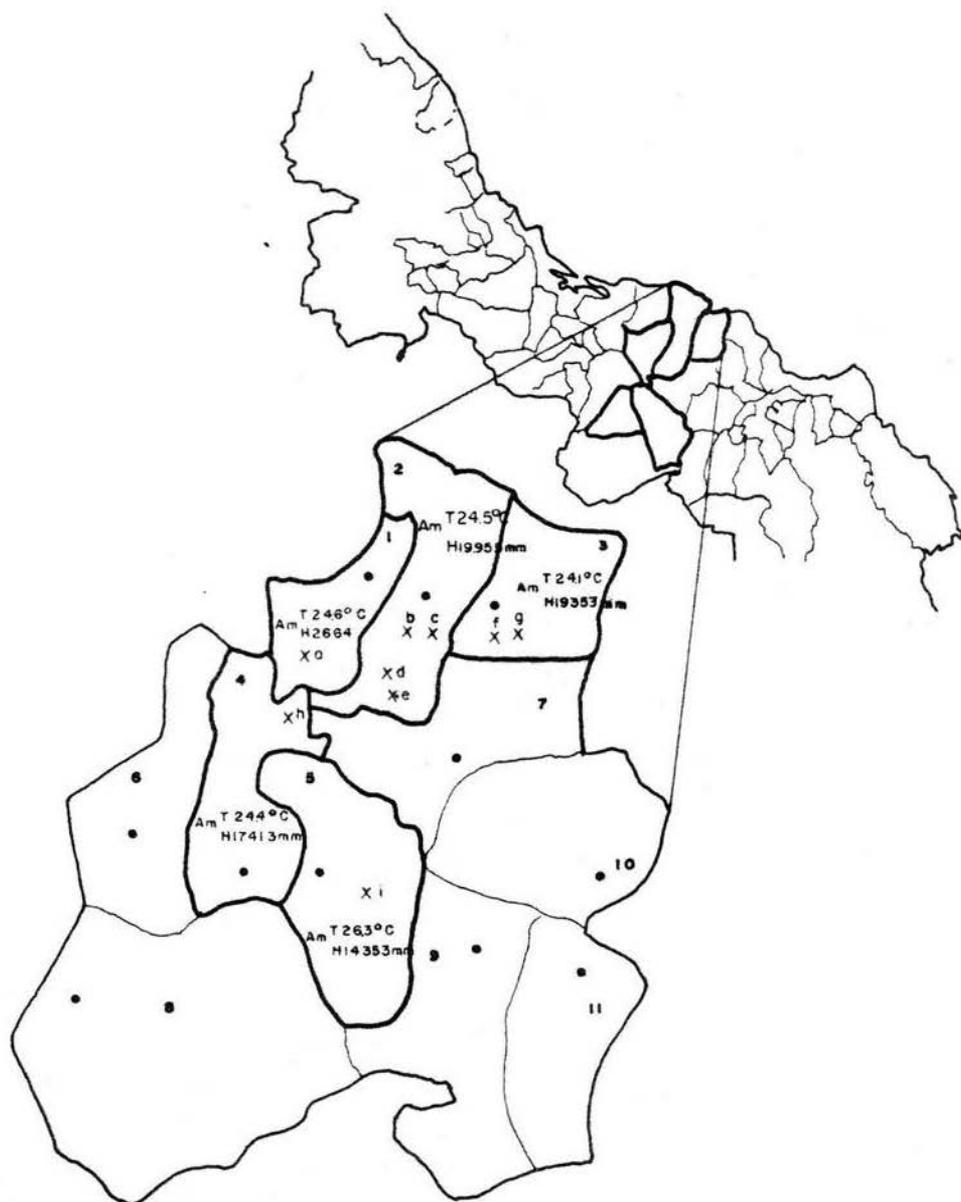
Se determinaron 7 épocas de muestreo entre el mes de Enero y Julio de 1983; se trabajó con maíz criollo y H-507, ambos almacenados en costalilla y tambo, y maíz criollo en tapanco.

La persona que llevó a cabo el muestreo (comunicación personal con la Q.F.B. Ma. de Lourdes Murcia Flores) lo hizo tratando de acercarse lo más posible a la forma en que el campesino se abastece de maíz.

Para el muestreo en costalilla, en cada zona se apartó un costal con una capacidad aproximada de 50 Kg, lleno de mazorcas y se dejó entre los costales de los campesinos, de tal forma que estuvieran bajo las mismas condiciones. Se tomaron cada vez mazorcas, se desgranaron y se reunieron más de 2 Kg. Para tomar las muestras en el tambo se sacaron cada vez 2 Kg aproximadamente de grano del orificio que se encuentra en la parte inferior del tambo, de igual forma que lo hacen los campesinos. En el caso del tapanco se tomaron cada vez mazorcas de la parte superior y más externa del mismo. A estas muestras de maíz recolectadas se les hicieron diferentes pruebas, entre ellas la determinación de humedad (AACC), el porcentaje de grano contaminado por hongos (medio agar-sal) y la identificación de hongos .

FIGURA No. 2 ESTADO DE VERACRUZ

DISTRITO DE TEMPORAL No. IX (ISLA)



X EJIDOS DONDE SE LLEVO A CABO EL MUESTREO

DESCRIPCION DE LOS MUNICIPIOS Y EJIDOS DEL DISTRITO DE
TEMPORAL No. IX.

1. SANTIAGO TUXTLA
 - a) . EJIDO EL MORILLO
2. SAN ANDRES TUXTLA
 - b) . EJIDO EL SALTO DE EYIPANTLA
 - c) . EJIDO COMOAPAN
 - d) . EJIDO CHUNTIAPA DE ABAJO
 - e) . EJIDO LOS NARANJOS.
3. CAATEMACO
 - f) . EJIDO LA VICTORIA
 - g) . EJIDO CARTAGENA
4. ISLA
 - h) . EJIDO NOPALAPA
5. J. RODRIGUEZ CLARA
 - i) . EL TESORO
6. VILLA AZUETA
7. HUEYAPAN DE OCAMPO
8. PLAYA VACENTE
9. SAN JUAN EVANGELISTA
10. ACAYUCAN
11. SAYULA DE ALEMAN.

CUADRO No. 2

ZONA DE TRABAJO, EJIDO AL QUE PERTENECE, SISTEMA DE
ALMACENAMIENTO Y VARIEDADES DE MAIZ.

ZONA	NOMBRE DEL EJIDO	ALMACENAMIENTO	VARIEDAD DE MAIZ
1	EL MORILLO	TAMBO	CRIOLLO
2	EL MORILLO .	TAPANCO	CRIOLLO
3	EL SALTO DE EY.	COSTALILLA	CRIOLLO
4	EL SALTO DE EY.	COSTALILLA	CRIOLLO
5	EL SALTO DE EY.	COSTALILLA	CRIOLLO
6	CHUNIAPA DE ABAJO	COSTALILLA	CRIOLLO
7	CHUNIAPA DE ABAJO	COSTALILLA	CRIOLLO
8	CHUNIAPA DE ABAJO	COSTALILLA	CRIOLLO
9	CHUNIAPA DE ABAJO	COSTALILLA	CRIOLLO
10	LOS NARANJOS	COSTALILLA	H-507
11	LOS NARANJOS	COSTALILLA	H-507
12	LOS NARANJOS	COSTALILLA	H-507
13	LOS NARANJOS	COSTALILLA	H-507
14	LA VICTORIA	TAMBO	CRIOLLO
15	CARTAGENA	TAMBO	CRIOLLO
16	NOPALAPA	TAMBO	H-507
17	NOPALAPA	TAMBO	H-507
18	NOPALAPA	TAMBO	H-507
19	EL TESORO	TAMBO	H-507

Desde el momento del muestreo hasta el análisis, el maíz se mantuvo en frascos color ámbar, en refrigeración y apartado de la luz, además de estar debidamente etiquetadas con el nombre del ejido, nombre del propietario del ejido y fecha de la muestra.

El trabajo sobre determinación de aflatoxinas se hizo utilizando -- las muestras que se encontraban ya en el Laboratorio de Microbiología -- del Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos de la E.N.C.B., I. P. N.

MATERIAL Y METODO.

METODO DE ANALISIS.

El método utilizado es el método rápido para la detección de aflatoxinas y zeralenone en maíz de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (33). Es una modificación del método II (Método BF) para la detección de aflatoxinas (18). En el Cuadro No. 3 se observan los pasos para el análisis de aflatoxinas.

Preparación y Extracción de la muestra.

Se muele y se prepara la muestra teniendo en cuenta las precauciones del párrafo 26.003 (18). Se le agregan a 50 gr de maíz molido (como harina), 250 ml de la mezcla metanol : agua (60:40) y se homogeneizan durante 2 minutos a alta velocidad en un homogeneizador (Omni-Mixer. Sorval. 230V-AC-59/60 CY.). Se filtra la muestra a través de papel Whatman No. 4 a un vaso de precipitado hasta reunir 125 ml de filtrado. Los sólidos se desechan y los 125 ml de líquido se transfieren a un embudo de separación.

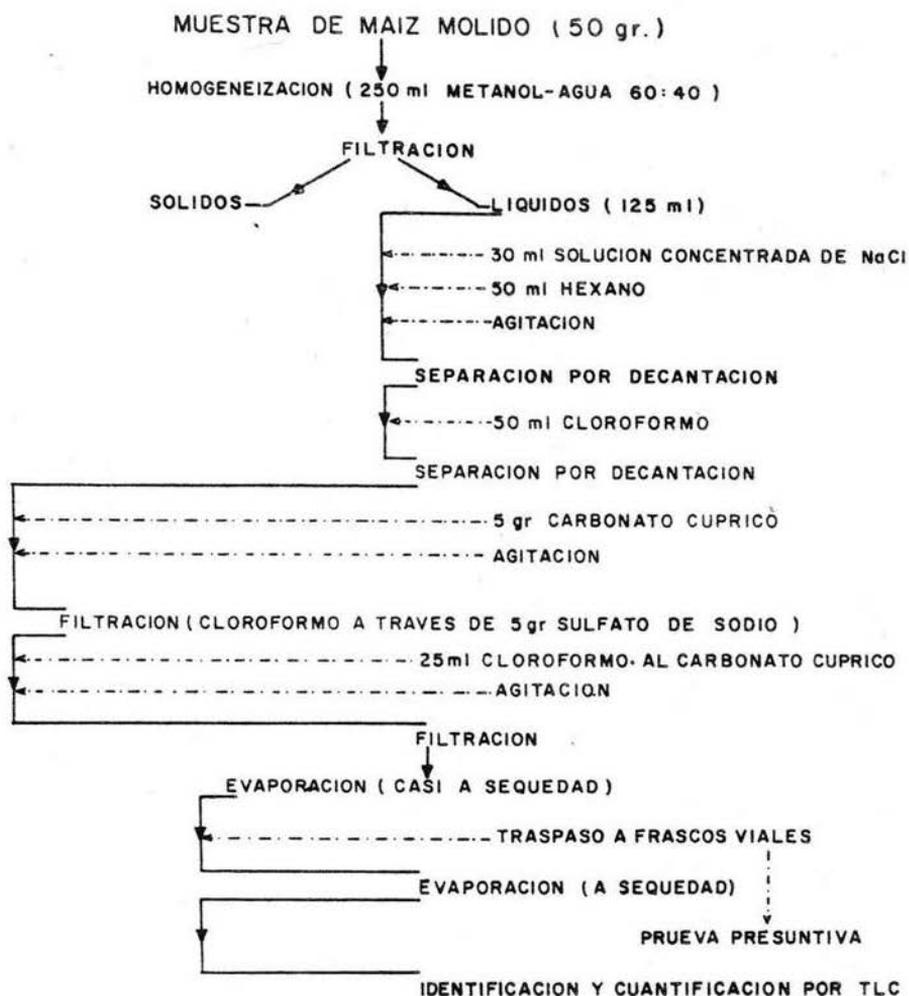
Separación líquido - líquido.

Se agregan 30 ml de la solución saturada de cloruro de sodio y 50 ml de hexano al embudo de separación que contiene el filtrado; se agita durante 1 minuto y la fase inferior, la más transparente y que corresponde al metanol, se transfiere a un segundo embudo de separación. Se extrae el metanol acuoso con 50 ml de cloroformo y se vierte este cloroformo a un matraz de 125 ml que contenga 5 gr de carbonato cúprico; se agita manualmente hasta que se mezclen perfectamente. Se deja asentar el carbonato cúprico y se decanta el cloroformo a través de un papel Whatman No. 2 en el que haya 5 gr de sulfato de sodio anhidro. Se ponen 25 ml de cloroformo al matraz con carbonato cúprico y se agita de nuevo; se decanta a través del sulfato de sodio anhidro. Se evapora el extracto casi a sequedad y se transfiere a frascos viales color ámbar.

Prueba Presuntiva.

Se toma una alícuota del extracto que se encuentra en estos frascos viales y se aplica en una placa de cromatografía de capa fina, se deja secar y se observa en una cámara de luz U.V. (en onda larga 366 nm) si hay fluorescencia. Si no hay fluorescencia significa que no hay aflatoxinas. Para la comprobación de la presencia de aflatoxinas se procede a cambiar de longitud de on-

FIG. No.3 METODO MODIFICADO PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS



CONCLUSIONES

da en la cámara de luz U.V., sabiendo de antemano que las aflatoxinas no son fluorescentes con luz U.V. de onda corta (254 nm).

Identificación y Cuantificación de Aflatoxinas.

Las muestras cuyos concentrados hayan presentado fluorescencia pasan a la siguiente etapa que es la de identificación y cuantificación de aflatoxinas. Las muestras que no haya presentado fluorescencia a 366 nm se dan como negativas.

La identificación y cuantificación de aflatoxinas se lleva a cabo mediante una cromatografía de capa fina. Se utilizan placas de cromatografía de capa fina Kieselgel 60 F₂₅₄ Art. 5715 DC Fertigplatten Merck, de 20 x 20 cm, y 0.25 mm de grosor. Estas placas de cromatografía se activan poniéndolas en un horno a 110°C durante una hora, y se colocan en un desecador hasta el momento de usarlas, no después de 24 horas.

Después de que se ha llevado a cabo la prueba presuntiva, los extractos que se encuentran en los frascos viales se evaporan a sequedad. Para llevar a cabo la prueba que se está describiendo, se le agregan a cada frasco vial - 200 µl de mezcla benceno: acetonitrilo (98:2) y se agitan vigorosamente para disolver cualquier residuo que pudiera existir. Se traza una línea a lo largo de la placa de cromatografía, a 10 cm del borde inferior, y en una línea imaginaria a 4 cm desde el borde inferior de la placa se aplican alícuotas de 10 µl de cada una de las muestras. Se aplican también alícuotas de 5, 10 y 15 µl de la solución patrón de aflatoxinas.

Corrimiento de la Cromatografía.

Se colocan 50 ml de una solución acetona:cloroformo (4:96) en una cámara de cromatografía, cuidando que el volumen usado provea 2 cm de profundidad; - se deja saturar la cámara herméticamente cerrada, durante 30 minutos, antes de colocar la placa. Se pone una placa a la vez, inclinada para que se logre una máxima exposición a la mezcla de disolventes e inmediatamente después se cierra la cámara perfectamente y se cuida de no moverla y de que no entre luz en ella. Se deja correr el cromatograma a una temperatura entre 23 y 25°C - - hasta que el frente de disolvente haya alcanzado la línea de 10 cm que ya se había trazado. Se saca la placa de la cámara de cromatografía y se deja secar a temperatura ambiente y en la oscuridad; después se coloca en la cámara de luz U.V. a onda larga (366 nm) y se observa si existen manchas fluorescentes

con Rf, color e intensidad similares a la solución patrón de aflatoxinas. - También se observa el corrimiento de las cuatro aflatoxinas que conforman esta solución patrón, las cuales se identifican en orden decreciente de Rf: B₁, B₂ (color azul) y G₁ y G₂ (color verde). Es bien sabido que las aflatoxinas no fluorescen a onda corta, por lo que también se observan las manchas a 254 nm.

Interpretación del cromatograma.

Se observan los puntos correspondientes a las alícuotas del patrón de referencia, se comparan con la muestra identificando el tipo de aflatoxina presente; se observa el color, fluorescencia y Rf correspondientes.

Recuperación del método.

Con el fin de determinar la eficiencia del método, se lleva a cabo un experimento de recuperación. Se adiciona una cantidad conocida (100 µl) de la solución de aflatoxina B₁, a una muestra de maíz no contaminada y se procede a su recuperación siguiendo todo el método, evaluando por cromatografía en capa fina. Este paso se lleva a cabo por duplicado.

RESULTADOS Y
ANALISIS DE RESULTADOS

El estudio para determinar la presencia de aflatoxinas se hizo tomando como antecedentes importantes el porciento de granos contaminados por hongos que se encontró y los hongos que fueron identificados (Comunicación personal con la Q.F.B. Ma. de Lourdes Murcia Flores) (Cuadros Nos. 4 y 5).

Dentro del Municipio de Santiago Tuxtla, en la zona 1 se analizaron 7 - muestras, de las cuales 4 fueron positivas en la prueba presuntiva, lo que - representa un 57.14% del total. En la zona 2, de 7 muestras analizadas, 3 - fueron positivas, o sea el 42.85% (Cuadro No. 6).

En el Municipio de San Andrés Tuxtla, la zona 3 presentó un 100% de - - muestras positivas en la prueba presuntiva, y las zonas 4 y 5, el 42.85%. La zona 6 presentó un 57.14% de pruebas positivas presuntivas con una posible - presencia de aflatoxinas, la zona 7 el 85.71% y las zonas 8 y 9 el 42.85%. La zona 10 tuvo un porcentaje del 71.42%, la zona 11 un 42.85%, la zona 12 - el 85.71% y la zona 13 un 42.85% (Cuadro No. 7).

Al analizar las muestras correspondientes al Municipio de Catemaco, se encontró que de las muestras de la zona 14, el 28.57% eran positivas en la - prueba presuntiva y en la zona 15 el 28.57% (Cuadro No. 8).

En el Municipio Isla, las muestras de las zonas 16 y 17 fueron positi- vas en un 57.14% y las muestras de la zona 18, en un 28.57% (Cuadro No. 9).

Por último, las muestras de la zona 19, del Municipio J. Rodríguez Cla- ra, fueron un 71.42% positivas en la prueba presuntiva (Cuadro No. 10).

Al correr los extractos de las muestras que habían presentado fluore-- cencia en la prueba presuntiva de posible presencia de aflatoxinas, se encon- tró que el compuesto que producía la fluorescencia era de un color azul y de una intensidad diferentes a las características de las aflatoxinas, además - de que su Rf no correspondía con el de la solución patrón de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, aún cuando no eran fluorescentes a la longitud de onda menor. - Todas las muestras analizadas dieron resultados negativos a la presencia de aflatoxinas.

En la prueba de recuperación del método utilizado que se hizo por dupli- cado con 50gr de una muestra de maíz no contaminado al que se le añadieron - 100 µl de aflatoxina B₁, se encontró que la concentración de aflatoxina B₁ - recuperada era cercana a 50 µl en los dos casos en que se hizo el análisis, por lo que se estableció que la recuperación del método era de aproximadamen- te el 50% (Cuadro No. 11).

CUADRO No. 4

HONGO IDENTIFICADO	ALMACENAMIENTO EN TAMBO HUMEDAD PROMEDIO 15%	
	MAIZ CRIOLLO	MAIZ H-507
<u>Penicillium</u> spp.	40	59
<u>A. flavus</u>	1	2
<u>A. tamarii</u>	10	3
<u>A. glaucus</u>	4	2
<u>A. candidus</u>	-	1
<u>A. terreus</u>	-	-
<u>A. ochraceus</u>	-	-

NOMBRE DE LOS HONGOS IDENTIFICADOS Y PORCIENTO DE GRANOS QUE PRESENTARON CONTAMINACION POR HONGOS.

COMUNICACION PERSONAL CON LA QFB. MA. DE LOURDES MURCIA FLORES
DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

C U A D R O No. 5

HONGO IDENTIFICADO	ALMACENAMIENTO EN COSTALILLA	
	HUMEDAD PROMEDIO 13%	
	MAIZ CRIOLLO	MAIZ H-507
<u>Penicillium</u> spp.	16	20
<u>A. flavus</u>	10	8
<u>A. tamarii</u>	3	1
<u>A. glaucus</u>	3	2
<u>A. candidus</u>	1	1
<u>A. terreus</u>	-	1
<u>A. ochraceus</u>	1	1

NOMBRE DE LOS HONGOS IDENTIFICADOS Y PORCIENTO DE GRANOS QUE PRESENTARON CONTAMINACION POR HONGOS.

COMUNICACION PERSONAL CON LA QFB. MA. DE LOURDES MURCIA FLORES
 DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS.
 ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS
 INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

C U A D R O No. 6

DETERMINACION DE AFLATOXINAS MUNICIPIO
SANTIAGO TUXTLA

ZONA	PRUEBA PRESUNTIVA POSIBLE PRESENCIA DE AFLATOXINAS.	IDENTIFICACION Y CUANTI- FICACION DE AFLATOXINAS			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	4 de 7 = 57.14 %	-	-	-	-
2	3 de 7 = 42.85 %	-	-	-	-

C U A D R O No. 7

DETERMINACION DE AFLATOXINAS MUNICIPIO
SAN ANDRES TUXTLA

ZONA	PRUEBA PRESUNTIVA POSIBLE PRESENCIA DE AFLATOXINAS	IDENTIFICACION Y CUANTI- FICACION DE AFLATOXINAS			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
3	7 de 7 = 100 %	-	-	-	-
4	3 de 7 = 42.85 %	-	-	-	-
5	3 de 7 = 42.85 %	-	-	-	-
6	4 de 7 = 57.14 %	-	-	-	-
7	6 de 7 = 85.71 %	-	-	-	-
8	3 de 7 = 42.85 %	-	-	-	-
9	3 de 7 = 42.85 %	-	-	-	-
10	5 de 7 = 71.42 %	-	-	-	-
11	3 de 7 = 42.85 %	-	-	-	-
12	6 de 7 = 85.71 %	-	-	-	-
13	3 de 7 = 42.85 %	-	-	-	-

C U A D R O No. 8

DETERMINACION DE AFLATOXINAS MUNICIPIO CAATEMACO

ZONA	PRUEBA PRESUNTIVA POSIBLE PRESENCIA DE AFLATOXINAS	IDENTIFICACION Y CUANTI- FICACION DE AFLATOXINAS			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
14	2 de 7 = 28.57 %	-	-	-	-
15	2 de 7 = 28.57 %	-	-	-	-

C U A D R O No. 9

DETERMINACION DE AFLATOXINAS MUNICIPIO

I S L A

ZONA	PRUEBA PRESUNTIVA POSIBLE PRESENCIA DE AFLATOXINAS	IDENTIFICACION Y CUANTI- FICACION DE AFLATOXINAS			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
16	4 de 7 = 57.14 %	-	-	-	-
17	4 de 7 = 57.14 %	-	-	-	-
18	2 de 7 = 28.57 %	-	-	-	-

C U A D R O No. 10

DETERMINACION DE AFLATOXINAS MUNICIPIO J. RODRIGUEZ CLARA.

ZONA	PRUEBA PRESUNTIVA POSIBLE PRESENCIA DE AFLATOXINAS	IDENTIFICACION Y CUANTIFI- CACION DE AFLATOXINAS.			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
19	5 de 7 = 71.42%	-	-	-	-

C U A D R O No. 11

ANALISIS POR DUPLICADO DE 50 gr DE UNA MUESTRA DE MAIZ NO CONTAMINADO
NATURALMENTE, CON 100 μ l DE AFLATOXINA B₁

MUESTRAS	CONC. DE AFLATOXINA B ₁ INOCULADA EN LAS MUESTRAS. (1 AF/50 gr M)	CONC. DE AFLATOXINA B ₁ RECUPERADA POR EL METODO II (1 AF/50 gr M)	EFICIENCIA DE RECUPERACION.
A	100 μ l	50 μ l	50 %
B	100 μ l	50 μ l	50 %

RECUPERACION DEL METODO II MODIFICADO PARA LA RAPIDA DETECCION DE AFLATOXINAS Y ZERALENONE EN MAIZ DE LA AOAC.

Se podría pensar que debido a las condiciones ambientales y al manejo y almacenamiento a que el maíz estuvo sujeto, el porcentaje de granos contaminados por hongos podría haber sido mayor que el que se encontró. La persona que realizó los muestreos lo hizo tratando de acercarse lo más posible a la forma en que los campesinos tomaban el maíz para su consumo, pero esto podría haber resultado poco significativo, ya que existía la probabilidad de muestrear maíz contaminado por hongos si se hubiera tomado de otros sitios aparte de la parte superior en el caso del costal, la inferior en el caso del tambo, y la más próxima a la entrada en el caso del tanco.

Los Almacenes Nacionales de Depósito (27) recomiendan que cuando el muestreo se practique en granos encostados, se deben extraer pequeñas porciones del mayor número posible de los sacos visibles del lote a muestrear, o cuando menos el 20% de ellos; se debe introducir el colador en forma alternada en las partes media, lateral, delantera y posterior de los costales.

Rosiles (25) recomienda el muestreo en un corte vertical, desde la superficie hasta el fondo, o en forma radial, con el fin de establecer dónde se extienden el crecimiento de hongos y la presencia de aflatoxinas, en los diferentes sistemas de almacenamiento.

Por otra parte, Bothast (4), establece como puntos de muestreo de un sistema de almacenamiento, la parte superior, los lados, el grano que se encuentra en la superficie, el centro y la parte posterior. La finalidad principal es que el muestreo asegure la representatividad de las muestras (11).

Ahora bien, el hecho de que haya existido la presencia de granos contaminados por hongos primero, y la fluorescencia en los extractos de las muestras después, y que no existan aflatoxinas, es comprensible.

El aislamiento de Aspergillus flavus en un alimento sólo sirve como sospecha de una posible presencia de aflatoxinas, siendo necesario siempre el análisis posterior. La identificación de los hongos contaminantes es un dato poco irrelevante e ineficaz por sí solo en la detección de aflatoxinas y sirve únicamente como apoyo para estudios posteriores. En apoyo a la bibliografía consultada (21,24,34) es importante mencionar que cuando se trabaja con maíz, en los procedimientos analíticos, aun cuando la prueba de luz UV muestre fluorescencia y esta fluorescencia tenga relación con la presencia de aflatoxinas, el compuesto fluorescente puede ser resultado de la presencia de pigmentos interferentes propios del maíz.

Wicklow (34) reporta la presencia de una fluorescencia típica sin que se detectara ningún tipo de aflatoxina, y Seitz (29) también reporta que existe la presencia de un compuesto fluorescente azul que puede llegar a causar un falso positivo, pero que puede ser identificado como ajeno a las aflatoxinas principalmente por su intensidad y Rf.

Cieglar (6) reporta la presencia de compuestos fluorescentes color azul pálido, algunos con una intensa fluorescencia, mientras que otros apenas eran visibles. Pons y col. (21) reportan que al trabajar con diferentes granos, la mayoría de los pigmentos interferentes pueden ser eliminados con solución de cloruro de sodio y hexano, a excepción del maíz. Encontraron que al aplicar un tratamiento de acetato de plomo antes de la primera extracción se eliminan pigmentos residuales interferentes.

Como ya se vio en los resultados, la recuperación del método utilizado durante la fase experimental fue cercano al 50% que comparado con el reportado por Thomas y col. (33) de 60%, se considera satisfactorio.

Aun cuando el método para cuantificación de aflatoxinas en maíz aprobado por la AOAC y la AACC (American Association of Cereal Chemists) conocido como el CB (Contaminants Branch) tiene un índice de recuperación del 80 al 90% (27), sería recomendable utilizar el método del presente trabajo por cuanto a rapidez y utilidad se refiere, para saber si una muestra se desecha por presentar aflatoxinas, o si se acepta, siendo una de las ventajas del método su bajo porcentaje de recuperación y la no eliminación total de los pigmentos interferentes propios del maíz.

El bajo índice de granos contaminados por hongos puede deberse a un muestreo poco representativo.

La identificación de los hongos contaminantes por sí solo es un dato poco irrelevante en la detección de aflatoxinas. El aislamiento de Aspergillus flavus en un alimento sólo sirve como sospecha de una posible presencia de aflatoxinas, siendo necesario siempre el análisis posterior; es decir, que la presencia de Aspergillus flavus no indica necesariamente la existencia de aflatoxinas, ya que no todas las cepas las producen.

La presencia de fluorescencia tiene relación con la presencia de aflatoxinas, pero no está necesariamente ligada a ella.

Es necesario establecer un método para la determinación de aflatoxinas en maíz en el cual se eliminen hasta donde sea posible, los pigmentos interferentes que causan confusión en la identificación de estas toxinas.

El método para la detección rápida de aflatoxinas y zeralenone es -- útil principalmente por su rapidez para seleccionar las muestras no contaminadas con un análisis rápido.

Es conveniente un estudio posterior y detallado de los diferentes sistemas de almacenamiento.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDSA. 1972. Como conservar los granos en nuestro granero rústico. Boletín ANDSA. 2 (13): 2-5.
2. ANDSA. 1973. Las aflatoxinas. Boletín ANDSA. 3(32): 5 - 6
3. Beckwith, A.C., Vesonder, R.F. & Ciegler, A. 1976. Chemical methods investigated for destoxifying aflatoxins in foods and feeds. Agr. - Res. Ser. Department of Agriculture. USA. 58 - 67.
4. Bothast, R.J., Goulden, M.L., Shotwell, O.L. & Hesseltine, C. 1976. Aspergillus flavus and aflatoxin production in acid-treated maize.- J. stored Prod. Res. 12: 177 - 183.
5. Burdaspal, P.A. 1978. Aflatoxinas en alimentos. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Méx. (24): 21 - 27.
6. Ciegler, M. P., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E. & Hall, H.H. 1966. - Microbial detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14(6): 934-939.
7. Doyle, M.P., Applebarum, R.S., Brackett, R.E. & Marth, E.H. 1982. - Physical, chemical and agricultural commodities. J. Food Prot. 45 (10): 964 - 971.
8. Guajardo, G.R. 1983. Almacenamiento de granos en México. Chapingo, - México. Departamento de Economía Agrícola. (Tesis Profesional).
9. Hernández, X.E. 1975. Graneros de maíz en México. Colegio de Postgrados de Chapingo, Méx. Folleto 1738.
10. Hesseltine, W.C. 1974. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. Mycotoxins. (3): 1 - 12.
11. Investigación UIA. 1983. Evaluación de las condiciones de almacenamiento y de la calidad del maíz que se emplea en los molinos de nixtamal del Distrito Federal. Departamento de Ciencias de la Nutrición y de los Alimentos, Méx. (20).
12. Jamieson, M., Jobber, P. 1974. Manejo de los Alimentos, Ecología del Almacenamiento. Pax-Mex. 1: 103-150.
13. Jugenheimer, R.W. 1981. Maíz. Variedades mejoradas, métodos de cultivo producción de semillas. Ed. Limusa. 19-71, 225-485, 579-687.
14. Moreno, M. E., Ramírez, M. 1983. Memorias del coloquio internacional sobre conservación de semillas y granos almacenados. Instituto de -

- Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 37-42, 130-166, 400-510.
15. Moreno, M.E. 1984. Los problemas de la conservación de granos y semillas en México. Ciencia y Desarrollo. (58) X: 9-20
 16. Museo Nacional de Culturas Populares. 1982. El Maíz. SEP. Mex.
 17. Neergaard, P. 1977. Storage Fungi. The Mc Millan Press. 1:282-297.
 18. Official Methods of Analysis. 11 ed. AOAC. Washington, D.C. 1970. secs. 26.021 - 16.025.
 19. Olivares, N.P. 1984. Cuantificación de aflatoxinas en semillas de calabaza. Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos, ENCB. I.P.N. (Tesis Profesional).
 20. Pettit, R.E., Taber, R.A. 1976. Symposium on mycotoxicology food and feed contamination. Proceedings of the American Phytopathological So. 3: 99 - 172.
 21. Pons, A.W., Cucullu, A.F., Franz, A.O., Lee, L.S. & Goldblatt, L.A. 1973. Rapid detection of aflatoxin contamination in agricultural products. JAOAC. 56 : 803 - 807.
 22. Ramírez, G.M. 1961. La conservación de los granos almacenados. Boletín Técnico de la Sociedad Agronómica Mexicana (7): 41 - 47.
 23. Ramírez, G.M. 1966. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. CECSA. Méx.
 24. Romer, T. 1984. Mycotoxins in corn and corn milling products. Cereal Fd. World. 29(8): 459 - 462.
 25. Rosiles, R. 1978. Estudio de las aflatoxinas en ensilado de maíz. Vet Mex. 163 - 168.
 26. Rosiles, R. 1979. Las aflatoxinas en las tortillas. Vet-Mex. 10:37-43
 27. Sánchez, J.A. 1985. Determinación de aflatoxinas en sorgo. Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos. ENCB. IPN. (Tesis Profesional).
 28. Scott, P.M. 1984. Effects of food processing on mycotoxins. J. Food - Prot. 47(6) : 489-499.
 29. Seita, L.M., Mohr. H.E. 1974. Aflatoxin detection in corn: a simple screening test. Cereal Chem. 51: 487-491.

30. Shotwell, O.L., Bennett, G.A., Goulden, M.L. Plattner, R.D. & C.W. - Hesseltine. 1980. Survey for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin - in U.S. grain sorghum from 1975 and 1976 crops. JAOAC. 63(4):922-925.
31. Stoloff, L. 1974. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. Proceedings from the American Phytopathological So. Washington, D.C. (2): - 23 - 50.
32. Stoloff, L. 1979. The three eras of fungal toxic research. J. Am. Oil Chem. Soc. 56:784-788.
33. Thomas, F., Eppley, R.M. & Truckless, M.W. 1975. Rapid screening method for aflatoxins and zearalenone in corn. JAOAC. 58(1): 114-116.
34. Wicklow, D.T., Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L. & Adams, G.L. 1980. - Interference competition and aflatoxin levels in corn. Postharvest Pathology and Mycotoxins. 70 (8): 761 - 763.
35. Wyllie, T., Morehouse, L.G. 1977. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: an encyclopedic handbook. Marcel Dekker. 1.
36. Wilson, B.J. 1978. Hazards of mycotoxins to public health. J. Food. - Prot. 41(5): 375 - 384.
37. Wogan, G.N. 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bacteriol. Rev. 30(2): 460 - 470.