



33
2e

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Facultad de Estudios Superiores

"CUAUTITLAN"

**IMPLEMENTACION DE TECNICAS DE CUANTIFICACION
DE AFLATOXINAS**

T E S I S

Para obtener el Título de:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A N:

**CAROLINA MORENO RAMOS
IDALIA HERNANDEZ TORRES**

DIRECTOR DE TESIS:

P h D. SARA ESTHER VALDES MARTINEZ

Cuautitlán, Izcalli

Edo. de Méx. 1988.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

I N D I C E

I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	3
2.1- Historia	3
2.2- Características	8
2.3- Metabolismo y Efectos Bioquímicos	13
2.4- Efectos Biológicos de las Aflatoxinas	22
2.5- Riesgos para el hombre	27
2.6- Prevención de la Contaminación de Alimentos y Forrajes por Micotoxinas	30
2.7- Destoxificación	38
2.8- Cuantificación de Aflatoxinas	45
III.- OBJETIVOS	53
IV.- METODOS	54
V.- RESULTADOS Y DISCUSION	62
VI.- CONCLUSIONES	105
VII.- ANEXOS	109
VIII.- BIBLIOGRAFIA	112

I.- RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo la comparación de diferentes métodos para la detección y separación de Aflatoxinas como son: Cromatografía en Capa Fina Unidimensional y Bidimensional, Cromatografía en Columna y Cromatografía en Minicolumna.

Dentro del método de Cromatografía en Capa Fina Unidimensional se probaron tres sistemas de solventes, donde las Aflatoxinas se aplicaron tanto en mezcla como individualmente, se encontró que el mejor sistema de solventes con que se logró la separación de las cuatro Aflatoxinas fue: Cloroformo-Acetona-Agua.

En el método de Cromatografía en Capa Fina Bidimensional se probaron seis sistemas de solventes, las Aflatoxinas fueron aplicadas en mezcla, de estos sistemas el mejor fue: I- Tolueno- Acetato de etilo-Ac. Fórmico 90%, II- Acetona- Cloroformo, se tuvo una excelente separación de las cuatro Aflatoxinas.

Para la Cromatografía de Minicolumna se compararon seis diferentes métodos, realizando la aplicación de Aflatoxinas así como también los sistemas de desarrollo por la parte superior

de la Minicolumna, por lo que el desarrollo fue de forma descendente. En el método donde se empleó como sistema de desarrollo Hexano-Acetona y los adsorbentes fueron Alúmina Neutra, Florisil, Lana de vidrio se obtuvo separación de Aflatoxinas B's (B₁, B₂) y Aflatoxinas G's (G₁, G₂), en los demás sistemas sólo se determinó la presencia de Aflatoxinas más no su separación.

En la realización de Cromatografía de Columna no se logró la separación de Aflatoxinas, ya que el método sólo es eficiente para la purificación de extractos que contengan Aflatoxinas, por lo que se decidió no continuar con este método.

II.- INTRODUCCION

2.1- Historia

El término Micotoxicosis incluye a aquellas intoxicaciones causadas por la ingestión de alimentos contaminados con Micotoxinas; el término de Micosis involucra una invasión generalizada de un hongo patógeno en tejido vivo. Una Micotoxina es un metabolito tóxico producido por un hongo.

Las Micotoxinas son conocidas desde hace ya bastante tiempo, aunque éstas no habían sido bien definidas, muchos problemas que se observaron en la antigüedad han sido relacionados en la actualidad con la sintomatología que se presenta al ingerir Micotoxinas en la dieta lo que en su época no pudieron ser explicados.

Schoental (1984) (1), menciona que gracias a los estudios científicos sobre las Micotoxinas de los pasados 20 años, es posible probar la interpretación de ciertas enfermedades y otros sucesos descritos en el pasado especialmente en la Biblia, en relación a la exposición a Micotoxinas como pueden ser las 10 Plagas de Egipto, y el caso de Job (Job fue un hombre muy rico que vivió alrededor de los años 500-400 A.E. subitamente perdió todos sus bienes así como también a su

familia quedando en la pobreza por lo que se vio obligado a consumir alimentos que probablemente se encontraban emmohecidos, presentando los siguientes síntomas: 1) Dermatitis severa, 2) Desordenes gastrointestinales y diarrea severa. Los males de Job parecen haber tenido algunos rasgos en común con la Pelagra, la cual podría explicar la sintomatología en base a una deficiencia nutricional, aunque lo más probable es que estos síntomas hayan sido una manifestación de Micotoxicosis aunada a una deficiencia vitamínica).

Se cree que la primera Micotoxicosis reconocida fue el Ergotismo, que es originado por la ingestión de centeno y otros granos infestados con el hongo Claviceps purpurea.

Durante la Epoca Feudal (IX-XIII) hubo un periodo de erupción de la enfermedad conocida como "Fuego de San Antonio" o "Fuego Santo" que causó miles de muertes.

La epidemia de Ergotismo ocurrió en Rusia en 1926-1927, en Inglaterra en 1928 y en Francia en 1951 cuando cientos de gentes fueron afectadas (2,4), siendo todos estos brotes relacionados con granos contaminados.

Otras Micotoxicosis que ha afectado seriamente a la población humana es la llamada Aleusia Tóxica Alimentaria (ATA). La enfermedad se presentó con especial severidad

durante la II guerra Mundial y post-guerra 1942-1947, principalmente durante 1944, cuando murieron miles de gentes, estas muertes han sido explicadas a través de estudios extensivos en Rusia donde se indica que el origen de la enfermedad se siguió hasta granos de cereales contaminados por un hongo que corresponde al género *Fusarium* (2,4).

En los primeros meses del año de 1960 se presentó un brote de intoxicación masiva de pavos en Inglaterra que fué reportada como una enfermedad desconocida caracterizada por una rápida deterioración de la condición de las aves con hemorragias sub-cutáneas y muerte.

Un postmortem de los animales afectados demuestra que el hígado de estos animales presentaba un color pálido anormal y muestras de necrosis extensiva y proliferación biliar.

Este síndrome fue llamado "Enfermedad X de los Pavos", también se presentó en faisanes, perdices y patos de un día de nacidos.

El factor común de estos brotes en aves fue la presencia de harina de cacahuete importada del Brasil, en las dietas de los mismos.

En ese mismo año también se reportó una enfermedad de agente etiológico desconocido en becerros y cerdos, en ambos casos la

etiología fue relacionada con la incorporación de harina de cacahuate dentro de las raciones de la alimentación de los animales.

Toda esta serie de reportes de miles de muertes ha llamado la atención en la comunidad científica y ha estimulado el interés en los efectos que produce la toxina.

Como resultado de estos brotes y la presencia en todos los casos de harina de cacahuate se decidió investigarla, en el Laboratorio Central Veterinario de Weybridge donde se llevó a cabo la extracción de un metabolito tóxico cuya toxicidad fue probada en patos de un día de nacidos, con seguimiento postmortem de las aves (2,3,4,6,).

Después de diversos estudios se encontró que la toxina productora del síndrome era producida por el hongo Aspergillus flavus de donde deriva el nombre de AFLATOXINA (AspergillusFLAVUSTOXIN) (2,4).

En 1961 la enfermedad fue señalada , por la ingestión de una toxina en alimentos para animales, producida por A.flavus y fue subsecuentemente llamada AFLATOXICOSIS (5).

Las características de un brote de Micotoxicosis han sido descritas por Feuill (1969), son las siguientes:

a) Elevan los problemas veterinarios cuyas causas no son

facilmente reconocidas.

- b) La enfermedad no es transmisible de un animal a otro.
- c) El tratamiento con drogas o antibióticos es de muy poco efecto en el curso de la enfermedad.
- d) Estudios cuidadosos indican una asociación con un alimento específico por ejemplo: harina de cacahuete, arroz o maíz contaminado.
- e) La examinación de alimentos sospechosos revelan signos de actividad fungal.

Los criterios anteriores son aplicables tanto a los animales como el hombre (2,4).

Se ha visto que los hongos son la mayor causa del deterioro y daño en cosechas almacenadas. El daño fungal ataca a los granos y dietas balanceadas cuando las condiciones del medio ambiente son favorables para su proliferación.

Los factores que influyen en la formación de Aflatoxinas son: humedad, temperatura, aereación y substrato. Bajo condiciones de almacenaje A.flavus y A.parasiticus pueden crecer a niveles de humedad de 15% o más a temperatura de 6 - 46 C y en un medio ambiente aeróbico (5).

2.2- Características

Muchos hongos producen metabolitos tóxicos denominados Micotoxinas, que causan enfermedades graves a veces mortales si son ingeridas. Existe una gran variedad de Micotoxinas, dentro de las más importantes se puede citar las: Toxinas de Claviceps, Toxinas de Aspergillus, Toxinas de Penicillium y Toxinas de Fusarium. En el CUADRO 1 se muestran, algunas Micotoxinas, organismo productor, alimentos susceptibles a ser atacados y algunos efectos tóxicos.

Entre las Micotoxinas de mayor importancia actualmente para el humano están las Aflatoxinas que son metabolitos producidos por *A.flavus* (7).

Las Aflatoxinas se consideran las más tóxicas de las Micotoxinas, han sido aisladas de: maíz, cacao, sorgo, trigo, avena, centeno, algodón y cacahuate (8).

Diversos investigadores han demostrado que algunas Micotoxinas cuando son consumidas por animales, contaminan los alimentos de origen pecuario como la leche, huevo, carne y sus derivados (7,8,9).

Sargent, Asao y Col. propusieron en 1963 las estructuras de las primeras cuatro Aflatoxinas B₁, G₁ junto con los

CUADRO 1. Micotoxinas Producidas por Diferentes Hongos y su Asociación con los Alimentos.

TOXINA	ORGANISMO	ALIMENTOS ATACADOS	ALGUNOS EFECTOS TOXICOS
1.- Aflatoxina	A.flavus	Cacahuete y sus productos, arroz, maíz, nueces, semilla de algodón, coco, trigo, leche, queso.	Carcinoma del hígado y del riñón, proliferación del conducto biliar, infiltración de grasa del hígado en los animales.
2.- Esterigmatocistina.	A.versicolor	Cereales	Hepatoma en las ratas.
3.- Ocratoxina	A.ochraceus	Cereales	Enfermedades del hígado y del riñón en las ratas.
4.- Citrinina	P.citrinum	Arroz	Nefropatía en los animales.
5.- Rubratoxina	P.rubrum	Maíz	Infiltración de grasa en el hígado de rata.
6.- Patulina	P.expansum A.clavatus	Manzana, arroz, -- pienso	Carcinógeno en las ratas.
7.- Cornezuclo	Claviceps ssp.		Gangrena.

referencia No.23.

dihidroderivados B2 y G2 (FIGURA 1).

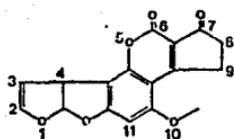
Las letras B y G les fueron dadas por el color de fluorescencia que producen bajo la luz ultravioleta, B= azul (blue) y G = verde (green).

La estructura química de las Aflatoxinas poseen un esqueleto de Difurano-Cumarinas; la diferencia básica entre las Aflatoxinas B y G es el átomo extra de oxígeno; la diferencia entre B y G y sus dihidroderivados es la presencia del doble enlace en los C¹ - C¹ en la estructura dihidrofurano _{2 3} como se aprecia en la FIGURA 1 (1,6,10).

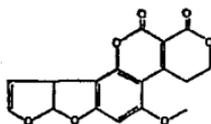
La fórmula molecular de la Aflatoxina B fue establecida como C¹ H¹⁷ O¹², y de la Aflatoxina G como C¹ H¹⁷ O¹²; las Aflatoxinas B y G fueron denominadas dihidro derivados de los compuestos anteriores siendo su fórmula molecular C¹⁷ H¹⁴ O⁶ y C¹⁷ H¹⁴ O⁷ respectivamente (10). Algunas de las propiedades físicas de estos compuestos son resumidas en el CUADRO 2 (6,10).

Las aflatoxinas se descomponen fácilmente cuando están en solución y estos procesos se aceleran especialmente en presencia de la luz y calor. También hay degradación al ser expuestas al aire, luz ultravioleta o luz visible (10).

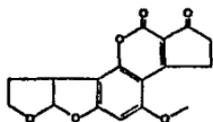
Diversos investigadores en 1963 detectaron la presencia de



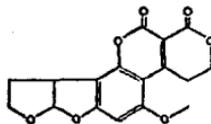
AFB1



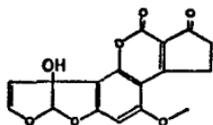
AFG1



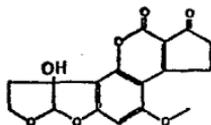
AFB2



AFG2



AFM1



AFM2

Fig. 1 ESTRUCTURAS DE LAS AFLATOXINAS

CUADRO 2. PROPIEDADES FISICAS DE LAS AFLATOXINAS

AFLATOXINA	FORMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	PUNTO DE FUSION C ⁰	EMISION FLUORESCENTE
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268 - 269	425 nm
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286 - 289	425 nm
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244 - 246	450 nm
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237 - 240	450 nm

un factor tóxico en la leche la cual fue relacionada cuando el ganado ingirió alimento contaminado con Aflatoxinas.

Observaron que su composición química era muy semejante al de la Aflatoxina, por lo que dedujeron que este compuesto al que denominaron M₁ era un hidroxilado de B₁ por el metabolismo de los animales (6,10).

2.3- Metabolismo y Efectos Bioquímicos

La manera por la cual las Aflatoxinas son metabolizadas por los animales es de interés en la investigación, dentro de los mecanismos bioquímicos y sus efectos biológicos.

El conocimiento de los productos metabólicos y de los caminos bioquímicos por el cual son producidos es esencial para la identificación de la configuración molecular responsable de la actividad biológica, tal información es también indispensable para establecer las bases de varias características de la respuesta biológica, tal como la relación estructura-actividad, especificidad de tejido y la

diferencia de especie en la respuesta entre otras .

La investigación cuantitativa de la excreción y el metabolismo de las Aflatoxinas ha sido grandemente facilitado por el aprovechamiento de material radioactivo. Estas técnicas hacen posible determinar cualitativamente las cantidades de compuesto o derivados excretados o retenidos por los animales (16).

Wogan y col. (1967), investigaron la excreción y distribución en el tejido de Aflatoxina B¹⁴ marcada con C¹⁴, utilizando dos diferentes tipos de marcado: Aflatoxina B¹ marcada en el grupo metoxi como se ilustra en la FIGURA 2. y Aflatoxina B¹ marcada en los anillos carbono. Los resultados de ambos tipos de marcado se muestran en las FIGURAS 3 y 4 (16,17,18).

La excreción total de los compuestos marcados en ambas formas es de 70-80% a través de orina, heces y CO₂ eliminado durante 24 hrs. La excreción a través de las heces fue significativamente diferente en los dos compuestos, cerca del 70% de la reactividad administrada del compuesto marcado en el anillo aparece en heces y solo el 14% fue excretado en heces por la ruta marcado en el carbono metoxi.

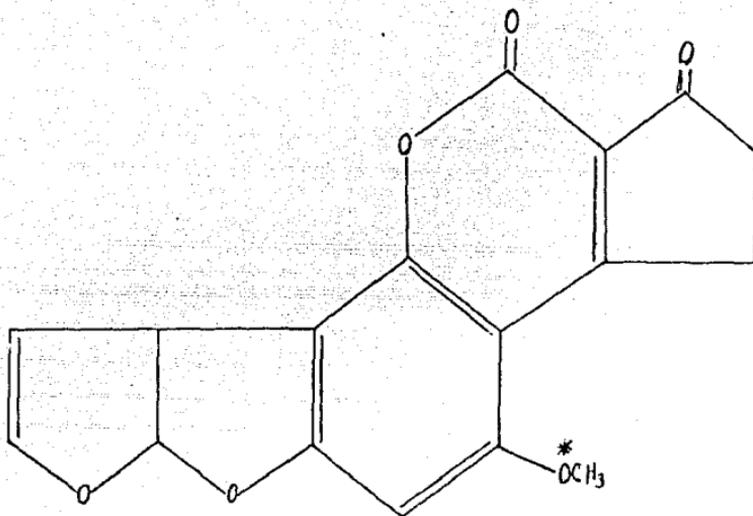


FIGURA 2

ESTRUCUTURA DE AFB₁ - C¹⁴ MARCADA EN EL CARBONO METOXI.

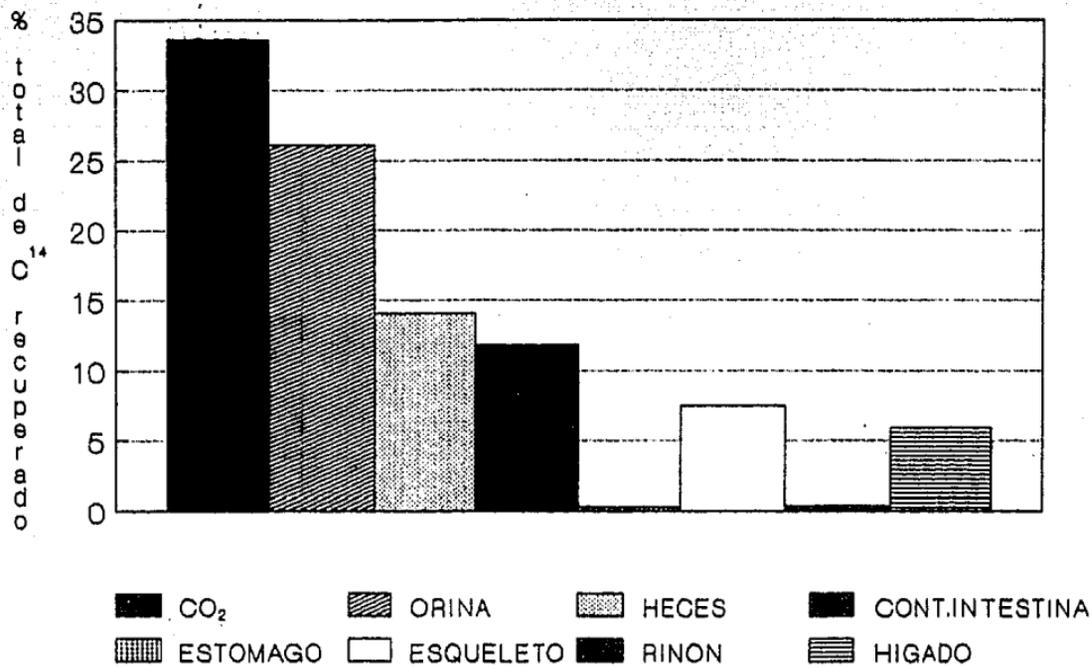


Figura 3 Distribucion de radioactividad (^{14}C) en tejido de rata y excretada en 24 hrs. despues de inyeccion intraperitoneal de AFB₁ , marcada en metoxi C.

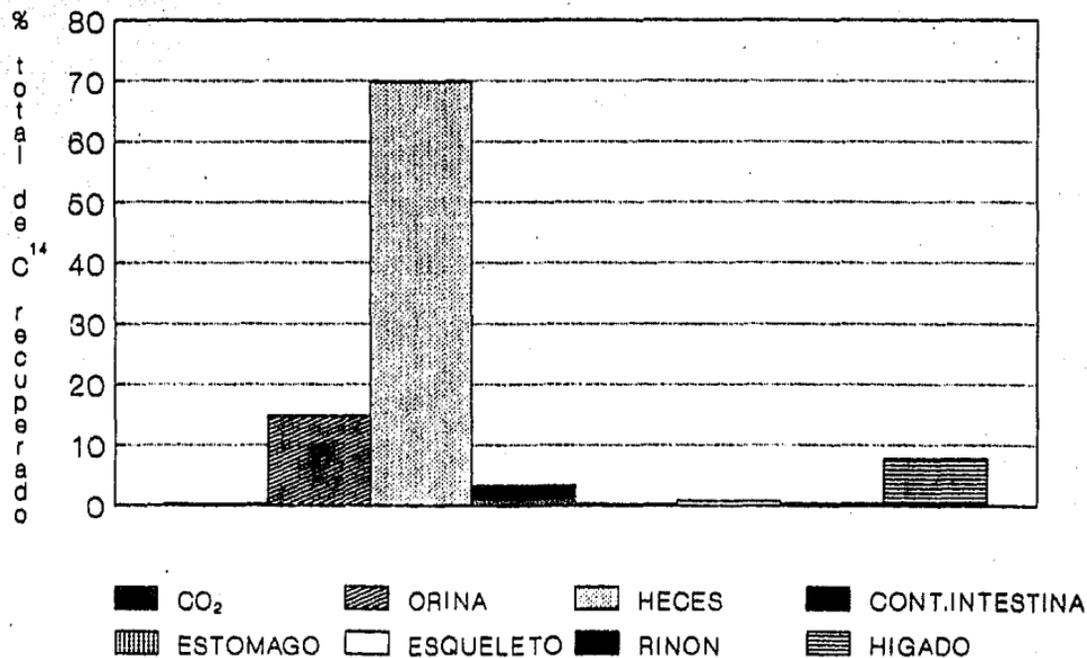


Figura 4 Distribucion de radioactividad (^{14}C) en tejido de rata y excretada en 24 hrs. despues de Inyeccion Intraperitoneal de AFB₁ marcada en el anillo.

Existe una gran diferencia en el contenido de C^{14} de CO_2 en animales dosificados con el compuesto marcado en el grupo metoxi que contiene alrededor de 37% de la dosis administrada y solo 0.3% de CO_2 fue eliminado en animales dosificados con el compuesto marcado en el anillo.

Estas observaciones indican que la Aflatoxina B₁ o sus metabolitos son eficientemente excretados por la rata después de la dosis única.

Estudios de la excreción de Aflatoxina B₁ marcada en el anillo a través de la ruta intestinal sugiere que la radiactividad finalmente excretada en heces es derivada de la excreción biliar (16,18).

Experimentos con Aflatoxina B₁ radiactiva han demostrado que las ratas excretan alrededor del 80% y los ratones alrededor del 90% de una dosis única del compuesto dentro de 24 hrs., como se muestra en el CUADRO 3.

Una segunda diferencia de las especies estudiadas fue la cantidad de radiactividad presente en hígado. Mientras que el hígado de rata retiene un 7.57% de C^{14} recuperado, en el ratón es mucho menor tan solo de 1.51%, en el hígado; un factor que puede ser relacionado a la resistencia del ratón

CUADRO 3. COMPARACION PATOLOGICA EN ANIMALES ALIMENTADOS CON ALIMENTO CONTAMINADO CON AFLATOXINA.

LESIONES EN HIGADO	BECERROS	GANADO VACUNO	CERDOS	OVEJA	PATO (1 día)	PATO ADULTO	PAVOS	POLLOS
Necrosis aguda y Hemorragia	-	-	+	-	+	-	+	-
Fibrosis Crónica	+	+	+	0	-	+	-	-
Hiperplasia en Ducto Biliar	+	+	+	0	+	+	+	+
Oclusión Venosa	+	+	-	0	-	-	-	-
Células Hepáticas alargadas	+	+	+	0	+	+	+	-

para el efecto tóxico carcinogénico de Aflatoxina B (16).

Se conoce que las Aflatoxinas producen un efecto determinado sobre el sistema bioquímico produciendo ciertos cambios vitales.

En base a esto se ha desarrollado una hipótesis acerca del mecanismo de acción por el cual las Aflatoxinas interfieren en las actividades celulares. Se sugiere que la secuencia en el cual las reacciones causadas por las Aflatoxinas pueden ocurrir de la siguiente manera :

- a).- Interacción de las Aflatoxinas con el DNA, trae como consecuencia una falla en el proceso de duplicación y transcripción.
- b).- Inhibición de la síntesis de proteínas, debido a la falla en la transcripción.

En consideración a los cambios que producen las Aflatoxinas sobre el sistema bioquímico podemos integrar los siguientes puntos:

1.- Metabolismo del DNA.

Mucha de la información acerca de los efectos de la Aflatoxina B en el metabolismo de DNA se ha obtenido de experimentos en los cuales se estimula la síntesis del DNA por

una hepatectomía parcial en ratas, induciéndose así la regeneración del tejido. Posteriormente al tratar con Aflatoxina B₁ a animales hepatectomizados trae como consecuencia la inhibición de la regeneración del tejido y por lo tanto la disminución de síntesis del DNA.

2.- Metabolismo del RNA.

La administración de Aflatoxina B₁ a ratas provoca una dramática inhibición de la incorporación de precursores en el RNA nuclear. La alteración en el metabolismo del RNA nuclear se acompaña de cambios en la morfología del núcleo, los cuales se han observado al estudiar bajo el microscopio electrónico células hepáticas de rata, tratadas con Aflatoxina B₁. Estos cambios morfológicos solo se presentan en las intoxicaciones agudas.

3.- Metabolismo de Proteínas.

Se sabe que las alteraciones en la transcripción repercuten en el proceso de síntesis de proteínas. Se ha demostrado que la Aflatoxina B₁ inhibe la síntesis de proteínas específicas mientras que la síntesis total de proteínas no es afectada (16).

El modo de acción de las Aflatoxinas se ha estudiado y la mayoría de los autores indican que su acción es a nivel de supresión de la síntesis de RNA mensajero y la síntesis de DNA, así que su efecto primario es en el núcleo vía inhibición del precursor en RNA, en consecuencia hay inhibición de la síntesis de proteínas, por lo que se inhibe la inclusión de aminoácidos al resto de la molécula o por inhibición de la RNA polimerasa en el retículo endoplásmico de la célula hepática.

La inhibición de la síntesis de proteínas y su relación con la falta de capacidad para movilizar grasas son posiblemente las causas para las lesiones primariamente hepáticas y una vez lesionado el hígado los signos clínicos y lesiones asociadas derivan de él (52,53).

2.4- Efectos Biológicos de las Aflatoxinas

Las propiedades tóxicas de las Aflatoxinas se manifiestan de diversas maneras dependiendo del sistema de prueba, dosis y duración de exposición.

Se puede dividir en: 1) Toxicidad aguda in vivo ; 2) Toxicidad aguda en cultivos celulares y embriones ; 3) Toxicidad sub-aguda (10).

1.- Toxicidad aguda in vivo.

Se ha comprobado que las Aflatoxinas son de toxicidad aguda para diversas especies animales. De las diferentes Aflatoxinas la B₁ es la más estudiada por presentar una potencia letal mayor y la letalidad in vivo para varios animales experimentales. La Aflatoxina B₁ es la más potente seguida de G₁, B₂, G₂ en orden de disminución de potencia.

Los patos de un día de nacidos son la especie más susceptible a la toxicidad aguda, la LD₅₀ de patos de un día de nacidos es alrededor de 0.5 mg/Kg, este valor es considerablemente pequeño comparado con la rata y el Hamster.

En muchas especies animales la muerte por intoxicación con Aflatoxina ocurre dentro de las primeras 72 hrs., después de la administración del compuesto y los daños que se presentan son : lesión en hígado como signo patológico y hemorragia en el tracto intestinal (10).

Buttler en 1964 encontró que el principal cambio histológico en el hígado de rata es el desarrollo de

necrosis en la zona periportal, dentro de los primeros 3-4 días de la ingestión con una marcada proliferación biliar (11). En todas las especies estudiadas la sensibilidad disminuye con la edad.

Newberne en 1971 sugiere que la toxicidad aguda puede ser modificada ya que determinó que ratas mantenidas con una dieta marginal de colina por dos semanas son resistentes a la acción carcinogénica de Aflatoxina B₁ en hígado (12).

2.- Toxicidad aguda en cultivos celulares y embriones.

Se ha demostrado que las Aflatoxinas son letales en cultivos de células animales cuando se administran grandes dosis por tiempo prolongado.

Los efectos tóxicos de la aflatoxina B₁ han sido investigados en varios sistemas de cultivos celulares in vitro y en huevos embrionados, estos sistemas son más sensitivos que los sistemas in vivo en términos de la cantidad de toxina requerida para producir efectos determinados. Se ha visto que a bajas concentraciones de Aflatoxina B₁ inhiben el proceso mitótico en células pulmonares de embrión humano .

Estudios in vitro sobre preparaciones de hígado humano demuestran que se ve seriamente dañado por concentraciones de

aflatoxina entre 1-5 ug/ml así como también afecta cultivos celulares primarios de embriones completos de patos y pollos (13). A bajas concentraciones de la toxina causa efectos demostrables como la inhibición de la síntesis de proteínas.

Se ha visto que en cultivos celulares y embriones la sensibilidad se reduce con la edad y los embriones de patos de un día de nacidos son más susceptibles que los embriones de pollo (10,14).

3.- Toxicidad sub-aguda.

En todas las especies los animales que consumen cantidades sub-letales de la toxina por varios días o semanas, desarrolla un moderado daño en el hígado como signo patológico.

La naturaleza de las lesiones hepáticas y la variación de su aparición en diferentes especies domésticas se resumen en el CUADRO 4. De acuerdo al Cuadro se puede observar que el carnero es el único entre las especies estudiadas que resiste a la toxina. También el desarrollo de hiperplasia biliar es la lesión más observada (5,10).

La toxicidad aguda y subaguda de las aflatoxinas varia

" PORCIENTO DE RECUPERACION DE C¹⁴ "

	Ratón	Rata
Excreción Total	*89.9	*80.1
CO ₂ Explusado	0.3	0.4
Orina	*34.5	*22.6
Heces	55.7	57.1
Intestino	0.75	0.8
Colon	2.59	3.9
Hígado	*1.51	*7.57
Riñón	0.1	0.37
Esqueleto	4.17	6.35

(*) mayor diferencia

CUADRO 4. EXCRECION Y DISTRIBUSION EN TEJIDO DE RADIATIVIDAD POR INYECCION INTRAPERITONEAL DE AFB₁ C¹⁴ MARCADO - EN ANILLO.

considerablemente según la especie, edad, sexo y el estado nutricional de la especie, la dosis de la Aflatoxina en cuestión, la duración y repetitividad de la exposición (14,15).

2.5- Riesgos para el Hombre

Basándose en la premisa de que el hombre puede ser susceptible a las Aflatoxinas se han realizado muchos trabajos tendientes a reducir los niveles de exposición humana.

Para el hombre la hipótesis de la inducción de cancer en el hígado por Micotoxinas requiere de más pruebas aunque hay incremento en la evidencia circunstancial que la alta incidencia de enfermedad crónica en el hígado en varias partes del mundo puede ser relacionada a la ingestión en la dieta de Micotoxinas.

En el hombre no se tienen datos suficientes y directos sobre los efectos de las Aflatoxinas debido a la dificultad para exponerlo al riesgo de ingerir alimentos que contengan

sustancias tóxicas en forma experimental. No obstante se ha comprobado que en los países donde se acostumbra consumir alimentos enmohecidos, la incidencia de cancer en el hígado es muy alta y la presencia de Aflatoxinas ha sido registrada.

En Uganda se reportó el caso de un niño de 14 años muerto de necrosis hepática aguda, con lesión similar presentada por los patos. análisis subsecuentes de la dieta consumida por el niño indicaban una alta contaminación por hongos y Aflatoxinas (6,19).

En Tailandia la etiología del síndrome de Reye ha sido vinculada con la ingestión de Aflatoxinas. El síndrome de Reye se caracteriza por una encefalopatía. infiltración de grasas de hígado al riñon ha sido reproducida experimentalmente en el mono macaque por alimentación con Aflatoxinas. La evidencia sugiere que las Aflatoxinas juegan un papel importante en la inducción de neoplasia humana (6).

Estudios epidemiológicos en la región del sub-Sahara de Africa y así como en el sureste de Asia y la India delinear mejor la patogénesis de la neoplasia y otras enfermedades asociadas a la ingestión de Aflatoxina y otros metabolitos fúngicos carcinogénicos (20).

En Kenia, Swaziland, Tailandia y Mozambique, donde la

incidencia de carcinoma hepático es alta comparado con otros países, se ha encontrado Aflatoxinas presentes en los alimentos.

Alpert y col. (1971) han demostrado que del 40% de los alimentos estudiados en Uganda contenían Aflatoxinas que en concentraciones mayores 1ppm.

En Filipinas Campbell (1970), analiza la orina y las heces de gente que han consumido mantequilla de cacahuete, que se sabía contaminada con Aflatoxinas, después de 24 hrs. de la ingestión, encontrando que una incidencia de 10-15 mcg de Aflatoxina B resultaba en una Aflatoxina M detectable en la orina (5).

Científicos en Sudafrica han hecho contribuciones significativas sobre el estudio de Micotoxinas, sin embargo esto ha sido solo de naturaleza puramente académica y se ha hecho muy poco para estimar la ocurrencia general de Micotoxinas, por contaminación de hongos productores de Aflatoxinas en productos agrícolas.

Durante 1980 se estableció un sistema analítico en la Universidad de Natal en el sur de Africa para examinar varios productos de consumo humano en cuanto a la presencia de Micotoxinas y contaminantes fúngicos, esto fue realizado para

valorar la prevalencia de tales contaminantes en productos de consumo agrícola en el sur de Africa y elevar el nivel de conocimientos relacionados con este problema en otras ciudades. Durante el período de 1982-1983, 800 muestras de consumo agrícola incluyendo cereales, heno y piensos fueron examinados, encontrando que el 27% de todas las muestras analizadas contenían Aflatoxinas B₁ (21).

Hay por lo tanto evidencias amplias de que el hombre es expuesto a la Aflatoxinas en aquellas áreas del mundo en los cuales el carcinoma hepático es prevalente. Esta exposición resulta directamente de los problemas de la cosecha y almacenamiento inadecuado de los diferentes productos agrícolas en general.

2.6- Prevención de la Contaminación de Alimentos y Forrajes por Micotoxinas

El descubrimiento de que las Aflatoxinas causan brotes de enfermedades mortales en animales y es potencialmente peligrosa para el hombre, estimuló la investigación científica para

descubrir la manera de prevenir y controlar la contaminación de los alimentos y forrajes por Micotoxinas.

Por muchas razones conviene prevenir la contaminación por hongos, a continuación se señalan las mas importantes :

- El ataque de los hongos hace perder la viabilidad a las semillas.
- Baja la calidad a la aceptabilidad por parte del comprador y del consumidor de varios productos agrícolas.
- Los hongos son la causa mas frecuente de descomposición de productos agrícolas.
- Se ocasionan pérdidas económicas cuando el ataque de los hongos es extenso, ya que en el peor de los casos hay que destruir toda la siembra.

Antes de considerar las diversas medidas que se pueden tomar para prevenir la contaminación hay que mencionar los factores que en una u otra forma pueden contribuir en el desarrollo de hongos y en la producción de Micotoxinas las cuales son las siguientes :

- Humedad .- El nivel de humedad de un producto puede deberse a la humedad natural del producto o a la adquirida durante su almacenamiento con humedad ambiente elevada.

- Temperatura ambiente .- Como las cepas toxigénicas de los hongos se hallan muy difundidas en la naturaleza esto implica un riesgo natural de contaminación y proliferación y por lo tanto una formación de toxinas la cual está dentro de un amplio rango de temperatura (10 -40 ° C).

- Infestación por insectos .- Los ataques de insectos pueden dar lugar al desarrollo de hongos y a la contaminación de una cosecha por Micotoxinas.

La infestación puede darse de dos maneras : a) la cosecha atacada por insectos se hace mas susceptible a la infección por hongos, b) los insectos mismos acarrean esporas de hongos y las introducen en las semillas atacadas.

La infestación puede tener lugar en cualquier etapa desde antes de la cosecha hasta durante su almacenamiento (23).

Las medidas de prevención de la contaminación por Micotoxinas se dan a través del control de factores como son la temperatura, humedad así como también la infestación de insectos que hacen a los granos en general mas susceptibles por lo cual son puntos importantes para la prevención del enmohecimiento.

Dentro de algunas medidas preventivas se encuentran :

1.- Protección antes y durante el secado y el almacenamiento.

II.- Prácticas de secado adecuadas.

III.- Buen almacenamiento.

I.- Protección antes y durante el secado y el almacenamiento.

Las medidas que se aplican a productos que van a ser almacenados antes y después del secado, así como durante el almacenamiento contribuyen mucho a impedir la migración de la humedad y prevenir así el ataque de hongos en general y la consecuente producción de Micotoxinas.

Las medidas de protección más comunes son :

- a) una limpieza completa del lugar donde se va a guardar el producto.
- b) una ventilación adecuada para que el aire caliente y húmedo salga del depósito y la humedad no se condense en las superficies interiores del almacén y vuelva a humedecer el grano. La salida del aire caliente del almacén facilitará también el enfriamiento del grano y reducirá de esa manera la formación del moho y la actividad de los insectos. En climas muy húmedos la ventilación con aire ambiental puede ser peligrosa en este caso se ha sugerido el uso de aire refrigerado (23).

Las medidas de protección son en realidad aplicaciones que no son necesariamente reglamentarias ya que son lógicas puesto que algunos agricultores lo llevan a cabo sin tener la necesidad de instrucción.

II.- Prácticas de secado adecuadas.

El secado después de la cosecha es obligatorio para cereales y semillas oleaginosas para con esta práctica alargar su vida de anaquel y disminuir la posibilidad de contaminación por hongos. En lugares donde la recolección se efectúa en tiempo seco el problema de la contaminación por Micotoxinas no alcanza proporciones alarmantes, sin embargo se convierte en un problema grave en las zonas donde la cosecha se efectúa en tiempo muy húmedo, en esos casos el secado del producto es un factor sumamente importante para resolver los problemas de Micotoxinas.

En el secado de granos y semillas oleaginosas hay que controlar los siguientes factores para evitar su contaminación por Micotoxinas :

- a) Conviene no demorar el secado después de la cosecha sobre todo a altos niveles de humedad.
- b) Conviene que el secado sea lo más rápido posible. El

secado prolongado al sol con humedad ambiente elevada es causa de contaminación por mohos.

c) Hay que evitar que los granos y semillas oleaginosas se rehumedescan durante el secado, fenómeno que puede suceder por dos motivos :

- La insuficiente protección del producto contra la lluvia durante el secado al sol.

- Las telas de plástico con que se cubre la cosecha por la noche pueden provocar la condensación del vapor de agua que se desprende de las semillas; ésta agua condensada puede volver a humedecer y así prolongar el tiempo de secado requerido facilitando que el producto se enmohezca.

d) Conviene secar los productos hasta niveles de humedad bajos antes de almacenarlos.

En los últimos años en varias partes del mundo, se han comenzado a emplear métodos de secado artificial, aunque resultan los costos muy elevados para un solo agricultor, por lo cual los secadores se instalan en cooperativas o como servicio público (23).

En países sub-desarrollados como México los métodos de secado artificial se utilizan muy poco debido a la falta de recursos económicos por lo que a nivel productor las

prácticas de secado normalmente seguidas, consisten en extender el producto sobre un piso y exponerlo al calor del sol y a las corrientes naturales del aire para conseguir un secado uniforme, voltean el producto de un lado para otro.

III.- Almacenamiento.

Es indispensable contar con buenos depósitos para almacenar convenientemente los cereales y demás productos agrícolas. Los dos principios básicos que sirven de guía para el almacenamiento son: mantener el producto seco y libre de insectos, hongos y roedores. Dentro de las recomendaciones para lograr condiciones óptimas de almacenamiento y evitar la contaminación por hongos cabe mencionar las siguientes:

- a) Conviene que los sitios de almacenamiento (almacenes abiertos, silos, bodegas hechas de diferente material y forma), estén secos y no permitan la entrada del agua ni por filtración ni por afloramiento de agua del suelo, también es conveniente separar las pilas de sacos de grano del suelo colocándolas sobre plataformas.
- b) La temperatura y humedad relativa del almacén deben mantenerse constantes.
- c) Conviene que los productos por almacenar sean de alta

calidad siempre que sea posible; lo ideal es que estén libres de mohos, insectos y malos olores y que hayan sido secadas hasta el nivel de humedad recomendada.

- d) Tratar con insecticidas protectores las estructuras de almacenamiento y los cereales. Si hay indicios de infestación dentro del producto debe fumigarse con productos eficaces contra todo los insectos.
- e) En los almacenes los daños de roedores habrán de evitarse llevando a cabo las siguientes medidas: eliminación de sus refugios, obstrucción de los agujeros, el saneamiento de los locales, empleo prudente de rodenticidas, trampas, la aplicación de cebos venenosos en envases y la fumigación de las ratoneras.

El almacenamiento es de particular importancia ya que es necesario efectuarlo, por lo que es necesario contar con buenos depósitos para almacenar convenientemente los cereales y demás productos. Por otra parte para tener las instalaciones de almacenamiento en óptimas condiciones se requiere de una inversión de capital de que no suelen disponer los países como México por lo que el almacenamiento casi siempre se realiza a nivel productor y con muchas deficiencias (23).

2.7- Destoxificación

En lo descrito anteriormente se han mencionado los elementos que favorecen la proliferación de hongos en los granos de alimentación y semillas oleaginosas durante el cultivo, almacenamiento y/o manipulación. No siempre podrá ser posible proteger todos los granos producidos en un país según sus recursos a nivel de almacenamiento y producción.

Ante el hecho de que existen grandes cantidades de granos contaminados se han generado una serie de investigaciones tendientes a reducir o eliminar el riesgo al humano por consumo de granos contaminados sobre todo en aquellos lugares en que hay una sub-población de la mismas. Dicho material necesita un tratamiento especial para eliminar, destruir o inactivar las toxinas contaminadoras. Un proceso de decontaminación se refiere a la supresión física de las unidades (granos o semillas) contaminadas, mientras que destoxificación es la supresión de la toxina del interior de la unidad o en su destrucción.

Un proceso de decontaminación debe ser viable desde el punto de vista técnico y económico. Además un proceso es

aceptable si cumple con los siguientes criterios:

- 1) Retener el valor nutritivo del producto, así como su aceptabilidad.
- 2) Destruir las esporas fungales y los micelios que podrían en condiciones favorables proliferar y formar nuevas toxinas.
- 3) Que destruya o inactive la Micotoxina.

Los métodos específicos de destoxificación consideran los procesos de decontaminación que se han probado a escala industrial y así mismo son los procesos que mejor satisfacen los criterios mencionados anteriormente ya que se han establecido únicamente para destruir Aflatoxinas (23,24).

Los métodos de decontaminación que existen actualmente pueden clasificarse en tres categorías :

- a).- Separación física del material contaminado con Micotoxinas.
- b).- Eliminación de Micotoxinas por extracción con disolventes.
- c).- La inactivación o degradación total de las Micotoxinas.

a).- Separación física del material contaminado con Micotoxinas.

La infección fungal de semillas o granos suele dar un color característico a los mismos de ahí que la separación de las semillas mediante algunos métodos constituye una solución eficaz. La eliminación de los granos de distinto color se practica generalmente en el caso del cacahuete, de los granos de café y otros productos de tamaño análogo utilizando para ello un aparato electrónico o recurriendo a su eliminación manual o empleando ambos procedimientos para una separación eficaz.

Por lo que respecta al trigo o mijo la eliminación de las semillas contaminadas se hace mediante una técnica de flotación, que consiste en suspender los granos en una solución de cloruro sódico. También se ha hecho una separación mediante la clasificación por aire.

b).- Eliminación de Micotoxinas por extracciones con disolventes.

Los mejores disolventes de las aflatoxinas son los solventes polares. Si se emplea sosa cáustica en un refinado de aceite quedan completamente eliminadas las aflatoxinas. Las

principales ventajas de suprimir las aflatoxinas por extracción con disolventes polares son :

1) conservación de las propiedades nutricionales de las proteina, 2) la supresión de la toxina en su forma primaria, evitando de este modo la posibilidad de peligros debidos a productos de degradación de las aflatoxinas (24,25).

c).- Inactivación de las aflatoxinas.

- 1) Inactivación de las aflatoxinas mediante la luz
- 2) Inactivación térmica de las aflatoxinas
- 3) Destoxificación con amoniaco
- 4) Destoxificación por medio de la nixtamalización
- 5) Inactivación de las aflatoxinas usando metabisulfito de sodio.

1)- Inactivación de las aflatoxinas mediante la luz.

La luz se ha empleado con buenos resultados para destruir aflatoxinas en aceite de cacahuete sin refinar. En estudios recientes se ha demostrado que la luz visible es más eficaz que la luz ultravioleta o luz infrarroja para la destrucción total de las aflatoxinas. La inactivación depende

de que se tomen las medidas necesarias para una exposición máxima del aceite a la luz del sol durante una hora. La exposición debe hacerse por una hora durante la parte más soleada del día, cuando las unidades lux serán del orden de 50,000 bastará para una destrucción total (23).

En base a lo anterior la inactivación de aflatoxinas mediante la luz es un proceso viable y económico que en países subdesarrollados como México, puede ser utilizado a nivel productor ya que no tendría que hacer ningún desembolso económico puesto que con solo colocar los granos en una área expuesta al sol lograría la inactivación de las aflatoxinas y la conservación de los granos.

2)- Inactivación Térmica de la Aflatoxina.

En recientes estudios efectuados en el Instituto Central de Investigación Tecnológica Alimentaria de Mysore, India (23), se reportó una destrucción de casi el 70% de la Aflatoxina después de cocer el arroz bajo presión de vapor. Este proceso puede ayudar a minimizar los peligros de esta toxina en grado bastante considerable.

El tostado en seco y tostado con aceite, en el cacahuate reduce notablemente los niveles de aflatoxina B₁, se

encontró un 65% de reducción en el nivel de aflatoxina B₁ mediante el tostado con aceite y de un 69% de reducción con el tostado en seco. Por estos dos procesos se pudo lograr el grado de reducción en el contenido de aflatoxina (26).

3)- Destoxificación con amoniaco.

Se ha desarrollado un procedimiento de destoxificación del maíz que se basa en el empleo de amoniaco acuoso a la presión atmosférica no plantea problemas tecnológicos, pero el maíz obtenido se decolora quedando su uso limitado a los alimentos de animales.

Se ha reportado un estudio en el cual se observó que el tiempo de exposición al amoniaco juega un papel importante ya que a mayor tiempo se logra una buena destoxificación.

Cuando la aflatoxina se inactiva con amoniaco es esencial que esta sustancia penetre en todo el grano. De este modo se logra un ambiente alcalino que lleva a la apertura del anillo lactónico, es decir la primera etapa de su destrucción.

La aplicación práctica del método a gran escala en países de desarrollo plantea problemas tecnológicos de orden económico que no deben olvidarse de los cuales estan los siguientes:

- Instalación para obtener amoniaco a presión.
- Inversión de capital, mantenimiento del equipo.
- Asegurar la ausencia de peligros de contaminación, por ejemplo: los posibles escapes de amoniaco gaseoso, requieren especial atención para evitar accidentes (24,29).

4)- Destoxificación por medio de la nixtamalización.

El empleo de la nixtamalización es un método que se encontro para la destoxificación de aflatoxinas en maíz.

La nixtamalización en maíz se experimentó en dos formas diferentes: nixtamalización por 14 horas con reposo y nixtamalización sin reposo. De los resultados obtenidos se encontró una pérdida total del 62% de aflatoxinas con la nixtamalización, observándose que la principal destrucción fue debida al tratamiento térmico alcalino y a la cocción de la tortilla. No se encontro diferencia en la utilización de nixtamalización con 14 horas de reposo y la nixtamalización sin reposo.

En base a lo mencionado anteriormente, la destoxificación por medio de la nixtamalización, es un proceso que puede ser de gran ayuda para contrarrestar el problema del maíz contaminado por aflatoxinas (27).

5)- Inactivación de aflatoxinas usando metabisulfito de sodio.

En estudios recientes se ha propuesto emplear metabisulfito de sodio para la inactivación de aflatoxinas en maíz.

Para este estudio se utilizó un lote de 150 Kg. de maíz libre de pesticidas, este fue inoculado con cepas de hongo del género *Aspergillus paraciticus* incubándose 30 días a 25 °C. La muestra inoculada se trató con metabisulfito de sodio a concentraciones de 0.1, 0.3, y 0.5% con tiempos de incubación de 5, 10, 15, 30 días; encontrándose que la mejor concentración utilizada de metabisulfito de sodio fue de 0.3 y 0.5% a tiempos de incubación de 15 y 30 días.

Considerando el proceso anterior puede ser de gran ayuda para reducir la contaminación de aflatoxinas en granos (2B).

2.8- Cuantificación de Aflatoxinas

De lo expuesto y tomando en consideración, las condiciones de almacenamiento de granos y cereales en México, además del hecho

de que las Micotoxinas se encuentran en forma natural en el medio ambiente, se considera importante llevar a cabo la detección cualitativa y cuantitativa de aflatoxinas en productos derivados de cacahuete y lácteos (principalmente leche).

De lo anterior resulta interesante el realizar estudios tendientes a detectar cualitativamente, dentro de niveles apropiados de confiabilidad, la presencia de estas sustancias en alimentos: campo dentro del cual los avances en nuestro país son escasos siendo sin embargo de cierta importancia los resultados de investigación efectuados.

La ocurrencia natural de las aflatoxinas en todo el mundo en diferentes artículos agrícolas justifica la necesidad desarrollar un método de rastreo rápido y sensitivo y conveniente para su detección. Los procedimientos cualitativos muestran ser prácticos, simples, económicos, sensitivos y rápidos.

La metodología inicial se estableció alrededor de técnicas de estimación semicuantitativas de aflatoxina B₁ en productos de cacahuete, harina y mantequilla de cacahuete (32).

Sargeant y col. (1961), mediante una extracción exhaustiva con metanol y una purificación parcial por transferencia en

el cloroformo seguido de una cromatografía, observaron las manchas fluorescentes bajo luz U.V. que correspondía a aflatoxinas.

Después de las observaciones iniciales de Sargeant y col. (1961) propusieron extracciones en soxhlet con metanol para remover las aflatoxinas de productos de cacahuete dañados por el hongo, con una duración de cuatro a seis horas.

Es de gran importancia mencionar que la primera purificación cromatográfica fue realizada por Coomes y Sanders en 1963, quienes cromatografiaron un extracto primario parcialmente purificado de productos de cacahuete en una columna de alúmina neutra para identificar aflatoxinas (30).

Longht y col. (1964), sugirieron una extracción doble en soxhlet con metanol una hora y cloroformo dos horas, ya que su objetivo era realizar una extracción en poco tiempo.

Mas adelante Pons y Goldblatt (1965), propusieron una extracción con acetona:agua (70:30), usando un agitador mecánico (32).

La separación de aflatoxinas por Cromatografía en Capa Fina acoplada a sus propiedades fluorescentes bajo luz U.V. ha cimentado las bases para métodos analíticos extremadamente sensibles.

Nessbitt y col. (1962) lograron resolver las aflatoxinas sobre

cromatoplasmas de alúmina empleando como sistema de desarrollo cloroformo-metanol (98.5 : 1.5). Simultáneamente otros grupos de investigadores introdujeron la cromatografía en sílica gel para la separación de aflatoxinas (31).

Vander Zedjen y col. (1962), reportan el aislamiento, primero sobre una columna de sílica gel seguido por una cromatografía en capa fina de Kieselgel G, posteriormente en columna cromatográfica sobre Kieselgel Celite y finalmente a través de una columna corta de alúmina (31).

Existen varios métodos de cromatografía en Capa Fina, utilizados para la determinación de aflatoxinas dentro de los cuales existen métodos de cromatografía en Capa Fina unidimensional como cromatografía en Capa Fina bidimensional.

El método de cromatografía en Capa Fina bidimensional es de gran importancia debido a que el análisis visual y Densitométrico de aflatoxinas en alimentos por cromatografía en Capa Fina a veces resulta difícil por la interferencia de sustancias fluorescentes y estas pueden ser eliminadas usando el método de cromatografía en Capa Fina bidimensional (33,34).

La cromatografía en Capa Fina bidimensional para la determinación de aflatoxinas fue primero introducida por Peterson y Ciegler (1967) y más tarde fue empleada con éxito

por Schuller y col. (1971) para mantequilla de cacahuete, por Yin y col. (1971), para harina de semilla de algodón tostada, por Altenkirk (1972) para harina y leche en polvo (35).

El método de cromatografía en Capa Fina bidimensional de puntos antidiagonales es reportado por Beljaars y col. (1973) (36).

Sin embargo posteriormente se pensó en desarrollar un método cromatográfico que fuera simple y rápido para la determinación de aflatoxinas, por lo que surgió el método de cromatografía en Minicolumna.

El uso de pequeñas columnas cromatograficas (Minicolumnas) para la detección de aflatoxinas en alimentos y forrajes fue introducida en 1968 por Holaday, la cual fué usada para detectar aflatoxinas en cacahuete de una manera similar a la técnica tradicional de cromatografía en Capa Fina(43).

La Minicolumna consiste en un tubo de vidrio pequeño (aprox. 4mm de diametro interior), el cual es rellenado con uno o varios tipos de adsorbentes, como pueden ser: Florisil, Sílica gel para columna, Alúmina (ácida, básica y neutra), Celulosa y Arena, los cuales son desarrollados con un sistema de solvente adecuado y posteriormente se observa bajo luz U.V. (32).

En 1972 Cucullu y col. reportaron un método de rastreo para

la detección de aflatoxinas por Minicolumna en semillas de algodón en el mismo año Velasco hizo una nueva modificación a la técnica de Holaday, el cual los resultados sugirieron que era una técnica más sensitiva, al no obtener falsos negativos en el estudio por lo que fue tomado como un método oficial de la A.O.A.C. (38).

En 1973 Velasco continuo con los estudios para determinar la rapidez y la susceptibilidad a través de la cual las aflatoxinas pueden ser detectadas en los tubos de Minicolumna (36).

Smith en 1972 reportó la detección de 5ppb de aflatoxina en maíz y 10ppb en alimentos para animales por medio de cromatografía en Minicolumna (37).

El procedimiento cromatográfico de Minicolumna para la detección de la contaminación de aflatoxinas ha sido de uso general en un gran número de laboratorios y ha sido de buen éxito, aplicado a varios productos agrícolas.

Las principales ventajas del método de Minicolumna sobre cromatografía en Capa Fina son: disminución del tiempo de desarrollo, equipo y operación simple, bajo costo por muestra.

Probablemente la desventaja sea la baja susceptibilidad en la detección de aflatoxinas (36,39).

En las últimas décadas se ha estado utilizando para la

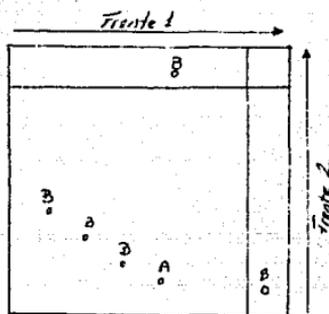
determinación de aflatoxinas un método que ofrece un sistema instrumental para mejorar la exactitud y precisión en la determinación de aflatoxinas en varios productos agrícolas, este método es el llamado Cromatografía de Líquidos (HPLC).

Gerald J. y col. (1977), reportaron el desarrollo de un método de análisis para la detección de aflatoxinas en cantidades de subpicogramos, basándose en HPLC, usando conjuntamente un fluorómetro láser (que consiste en la detección de fluorescencia induciendo rayos láser) (47,48,49). La Detección y Cuantificación de las Aflatoxinas es llevada a cabo bajo luz U.V. de onda larga (365nm), comparando contra una curva estándar de referencia.

La Cuantificación también se puede hacer por medio de un Densitómetro de placa que leera área y densidad óptica de las manchas fluorescentes de las Aflatoxinas de una muestra y de un Estándar (54).

En caso de no contar con un Densitómetro, se puede usar un patrón de manchas antidiagonales, como lo desarrolló Beljaars en 1973 (36) como se muestra en la FIGURA 5. En el CUADRO 5, se muestran algunas características de métodos usados para la determinación de Micotoxinas en alimentos como son: amplitud

de aplicación, confianza, límite de detección, costo de equipo y una posible automatización (54).



A= extracto muestra
B= estándar de aflatoxina

FIGURA 5

Categoría	Amplitud de aplicación	Confianza	Límite de detección	Costo de equipo	Automatización
Minicolumna	límite	moderada	moderada	bajo	No
CCF	amplio	alta	bajo	bajo	No
HPLC	amplio	alta	bajo	alto	parcial
GLC	límite	alta	bajo	alto	parcial

CUADRO 5. Comparación de algunas características de varios métodos para la determinación de Micotoxinas en alimentos.

III.- O B J E T I V O S

- Comparación de diferentes sistemas de desarrollo para la separación de aflatoxinas por :

Cromatografía en Capa Fina Unidimensional y Bidimensional.

Cromatografía en Micolumna.

Cromatografía de Columna.

- Adaptación de una técnica factible de ser utilizada rutinariamente.

IV.- METODOLOGIA

En el presente trabajo se utilizaron métodos de Cromatografía en Capa Fina Unidimensional y Bidimensional, Cromatografía en Minicolumna y Columna, como se indica en la FIGURA 6.

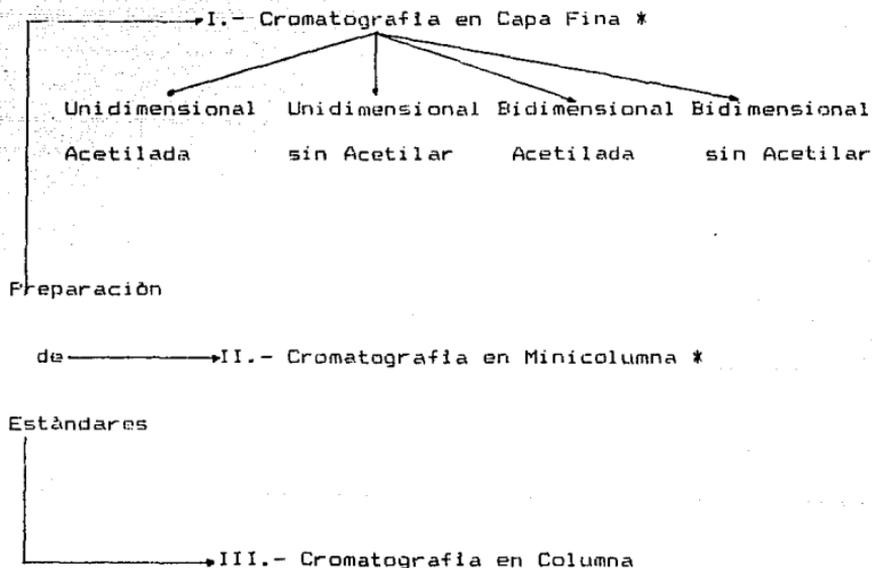


FIGURA 6.

* Utilizando sistemas de solventes indicados en Cuadros 6 y 7.

Se probaron para la aplicación de los estándares de aflatoxinas, diferentes concentraciones para determinar la concentración mínima requerida para observación cualitativa. Las aplicaciones a probar fueron: 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l, de la cual la aplicación óptima fue la de 3 μ l (Conc. 9.3ng/ μ l).

Al realizar Cromatografía en Capa Fina Unidimensional, para la separación y determinación de aflatoxinas, se utilizaron tres diferentes mezclas de solventes los cuales se indican en el CUADRO 6. En el se señalan las diferentes aplicaciones de la muestra tanto en mezcla como separadas y en algunos sistemas se empleó la acetilación.

Para la realización de Cromatografía en Capa Fina Bidimensional se probaron seis diferentes mezclas de solventes, los cuales se muestran en el CUADRO 7. En este método las aplicaciones de la muestra siempre fueron en mezcla y en algunos casos se utilizó la acetilación.

1.- Metodología de Cromatografía en Capa Fina.

- a). Cromatografía en Capa Fina Unidimensional (CCF Unidimensional).

Se preparan las placas de Cromatografía con Silica gel 60G

CUADRO 6. SISTEMAS DE SOLVENTES UTILIZADOS EN CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA UNIDIMENSIONAL PARA SEPARACION DE -- AFLATOXINAS.

SISTEMAS	M	Ma	S	Sa
ETER-METANOL-AGUA (82.5:5:12.5)	X			
ETER-METANOL-AGUA (82.5:5:12.5)			X	
ETER-METANOL-AGUA (82.5:5:12.5)				X
ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA(10:2:1)	X			
ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA(10:2:1)			X	
CLOROFORMO-ACETONA-AGUA (88:12:1.5)	X			
CLOROFORMO-ACETONA-AGUA (88:12:1.5)			X	

NOTA: M=Mezcla de Aflatoxinas

S=Aflatoxinas Separadas

Sa=Aflatoxinas separadas acetiladas

Ma=Mezcla de aflatoxinas acetiladas

CUADRO 7. SISTEMAS DE SOLVENTES UTILIZADOS EN CROMATOGRAFIA DE
CAPA FINA BIDIMENSIONAL PARA SEPARACION DE AFLATOXINA.

SISTEMAS	S/A	C/A
A) 1º Frente: ACETONA-CLOROFORMO (1:9) 2º Frente: ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA (10:2:1)	X	
A) 1º Frente: ACETONA-CLOROFORMO (1:9) 2º Frente: ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA (10:2:1)		X
B) 1º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-AGUA (88:12:1.5) 2º Frente: BENCENO-METANOL-AC.ACETICO (90:5:5)	X	
C) 1º Frente: BENCENO-ETANOL-AGUA (45:35:19) 2º Frente: BENCENO-METANOL-AC.ACETICO (90:5:5)	X	
D) 1º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-DIETIL ETER (5:1:4) 2º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-AC.ACETICO (93.7:3:3.3)	X	
E) 1º Frente: DIETIL ETER-METANOL-AGUA (94:4.5:1.5) 2º Frente: CLOROFORMO-ACETONA (90:10)	X	
F) 1º Frente: TOLUENO-ACETATO DE ETILO-AC. -- FORMICO 90% (5:4:1) 2º Frente: ACETONA-CLOROFORMO (1:9)	X	

NOTA: S/A= Sin acetilación

C/A= Con acetilación

(0.25 mm de espesor), se activan a 100 °C durante una hora. Posteriormente se dejan enfriar, se marcan las distancias a la cual debe correr el solvente, después se aplica el estándar de aflatoxina, se introducen las placas en la cámara de desarrollo que contiene la mezcla de solvente a utilizar. El tiempo de desarrollo es de 20 - 30 min. se sacan las placas de la cámara de desarrollo y se observan bajo luz U.V. en un lugar oscuro.

b). Cromatografía en Capa Fina Bidimensional (CCF Bidimensional)

Se preparan las placas Cromatográficas de la forma descrita anteriormente. Ya preparadas las placas, se meten en una cámara de desarrollo con un 1er. sistema de solventes, después las placas se sacan, se espera a que se evaporen los solventes y son nuevamente introducidas en otra cámara de desarrollo conteniendo un 2o. sistema de solventes (las placas son introducidas a la cámara del lado posterior, FIGURA 7.), el tiempo de desarrollo total es de 60 - 70 min. las placas son observadas bajo luz U.V.

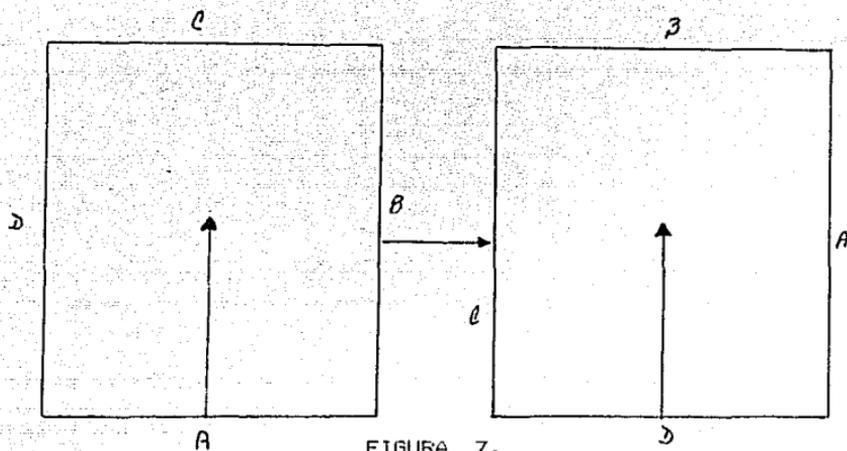


FIGURA 7.

c). Metodología de la Acetilación.

- Se aplican 3 μ l de muestra en la placa y se deja secar.
- Se aplican 2 μ l de anhídrido acético y 1 μ l de HCL al 32% en el mismo punto.
- Se deja reaccionar durante 10 min. en la obscuridad.
- Se mete al horno a 60 C durante 10 min.
- Se desarrollan las placas.

11.- Metodología de Cromatografía en Minicolumna.

Se emplean tubos de vidrio de aproximadamente 20 cm de longitud, 0.8 mm de diámetro exterior y 0.6 mm de diámetro interno. Estas Minicolumnas son empacadas de la siguiente manera: se tapa el extremo inferior con lana de vidrio, se agregan los diferentes tipos de adsorbente como se ilustra en

Las LAMINAS 15 - 20, se tapa la Minicolumna con lana de vidrio. No debe haber ninguna separación en la Minicolumna al momento de empacar, posteriormente se aplica la muestra por la parte superior de la Minicolumna y se aplica el sistema de solventes de la misma manera, se espera a que drene todo el sistema de solvente, e inmediatamente son examinadas bajo luz U.V. en un lugar obscuro. El tiempo de desarrollo de la Minicolumna es de 5 - 10 min.

III.- Metodología de Cromatografía en Columna.

Se emplean Columnas Cromatográficas de 15 mm de diám. int. Estas Columnas son empacadas con los diferentes tipos de adsorbente, posteriormente se aplica la muestra y se aplica el sistema de solvente, se eluye e inmediatamente se observa bajo luz U.V. el tiempo de desarrollo es de 15 - 20 min.

IV.- Análisis de resultados.

Los resultados obtenidos fueron evaluados por Análisis de Varianza para un diseño completamente al azar con el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ij} = U + \mathcal{E}_i + E_{ij}$$

$i = 1, 2, 3 \text{ y } 4 \text{ sistema}$
de solvente.
 $j = 1, 2, \dots, 20 \text{ repeticiones.}$

DONDE :

Y_{ij} = el R_{ij} en la j -ésima repetición en el i -ésimo sistema.

U = es la media general.

\mathcal{E}_i = es el efecto del i -ésimo sistema de solvente.

E_{ij} = el error aleatorio en la j -ésima repetición en el i -ésimo sistema.

Este diseño fue aplicado dentro de cada método de CCF. Las medias fueron comparadas por el método de rango estudiantizado de Tukey (DMSH) con un nivel de confianza del 95%.

En el método de CCF bidimensional se utilizó el producto del valor de R_{ij} obtenido por el frente 1 y el R_{ij} del frente 2. En el método de CCF unidimensional se utilizó el R_{ij} para analizar los resultados obtenidos.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION

Las observaciones generales del método de CCF Unidimensional en el que usaron tres sistemas de solventes, se presentan en el CUADRO 8. Los resultados de R_f obtenidos utilizando este método se muestra en el CUADRO 9.

El sistema ETER-METANOL-AGUA propuesto por Cauderay (1981) (46), empleó la acetilación para CCF unidimensional para confirmar la identidad de Aflatoxina B (AFB₁) y Aflatoxina G (AFG₁). En el presente trabajo se utilizó este sistema de desarrollo para Aflatoxinas (AFL's) tanto como con acetilación como sin acetilación , encontrándose que al aplicar AFL's individualmente con acetilación, la AFB₁ corrió menos que la AFB₂ y la AFG₁ corrió menos que la AFG₂ , por lo tanto los valores de R_f de AFB₁ y AFG₁ son menores que los de AFB₂ y AFG₂ , normalmente las AFB₁ y AFG₁ presentan R_f mayor que AFB₂ y AFG₂ respectivamente. Las observaciones realizadas coinciden con lo descrito por Cauderay (1981), aunque también observó que los valores de R_f de AFB₁ y AFG₁ disminuyen en comparación con los valores de R_f obtenidos en condiciones normales, el autor atribuye este fenómeno al cambio de superficie en el gel,

CUADRO 8. OBSERVACIONES GENERALES DE LOS SISTEMAS EMPLEADOS EN
CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA UNIDIMENSIONAL

SISTEMAS	M	Ma	S	Sa	OBSERVACIONES
ETER-METANOL-AGUA			X		Pequeña separación de AFL's y el R_f es bajo.
ETER-METANOL-AGUA				X	Casi no hay separación el R_f es bajo y hay -- descomposición de AFB ₁ y AFG ₁ .
ETER-METANOL-AGUA	X				Solo hay separación -- entre AFB ₁ , AFB ₂ y AFG's
ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA			X		Se tiene un R_f alto -- pero no hay separación
ACETAO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA	X				Hay separación entre - AFB's y AFG's
CLOROFORMO-ACETONA-AGUA			X		Buena separación entre las 4 AFL's
CLOROFORMO-ACETONA-AGUA	X				Excelente separación-- entre las 4 AFL's

NOTA: M= Mezcla

Ma= Mezcla acetilada

S= Separadas

Sa= Separadas acetiladas

CUADRO 9. R_f 's PROMEDIOS OBTENIDOS EN CADA SISTEMA DE SOLVENTE CON EL METODO DE CCF UNIDIMENSIONAL

SISTEMA	M	Ma	S	Sa	VALORES DE R_f 's			
					AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
ETER-METANOL-AGUA	X				0.30	0.28	0.17	0.17
ETER-METANOL-AGUA			X		0.30	0.25	0.18	0.13
ETER-METANOL-AGUA				X	0.21	0.24	0.13	0.12
ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA	X				0.76	0.76	0.68	0.68
ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA			X		0.87	0.85	0.76	0.74
CLOROFORMO-ACETONA-AGUA	X				0.67	0.62	0.54	0.47
CLOROFORMO-ACETONA-AGUA			X		0.5	0.46	0.37	0.33

NOTA: M= Mezcla de aflatoxinas
 Ma= Mezcla de aflatoxinas acetiladas
 S= Aflatoxinas separadas
 Sa= Aflatoxinas separadas acetiladas

debido a la reacción. La explicación que podemos dar al fenómeno de que AFB_1 y AFG_1 corren menos se atribuye a la adición de un grupo acetal a la molécula, lo que provoca un aumento en su peso molecular siendo su movilidad menor, así como la polaridad de las AFL's pudo haberse visto modificada y por lo tanto la distancia recorrida será menor y su R_f será menor que bajo condiciones normales (sin acetilación).

A pesar de tomar las precauciones de aislar la cámara de la luz durante la acetilación como lo sugiere Cauderay (1981), se tuvo una descomposición de las AFB_1 y AFG_1 .

Al aplicar las AFL's sin acetilación individualmente y desarrollarlas con el sistema de solvente se observó que hay una pequeña separación entre las AFL's, aunque se obtuvieron valores de R_f menores a los reportados por Cauderay (1981), al desarrollar las AFL's en condiciones normales (sin acetilación) lo cual se explica ya que Cauderay (1981) empleó doble desarrollo y en este caso se utilizó un solo desarrollo, ya que al intentar el doble desarrollo, el corrimiento de las AFL's no fue uniforme, como se observa en la FIGURA 8.

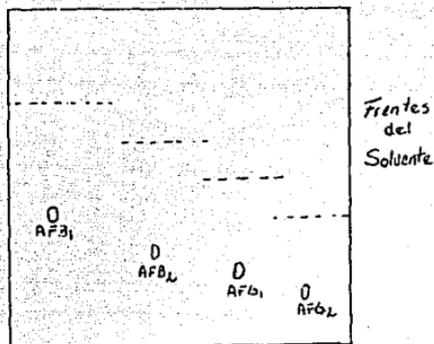
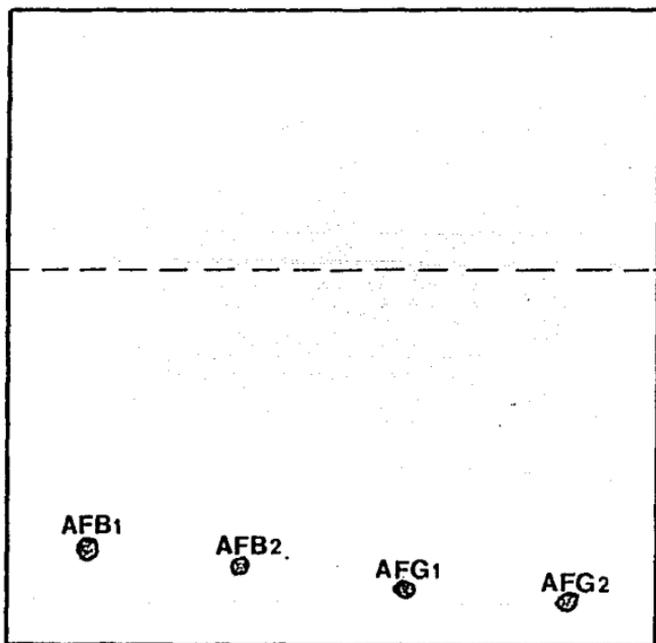


FIGURA 8

Al ser aplicadas las AFL's en mezcla sin acetilación se obtiene una separación solo entre AFB₁ y AFB₂, pero entre Aflatoxinas G's (AFG's), como se puede ver en la LAMINA 1,2 y 3. Con el objeto de observar si se logra una mejor separación para este sistema se podría sugerir el desarrollo del sistema por más tiempo, para lograr la separación de AFG's.

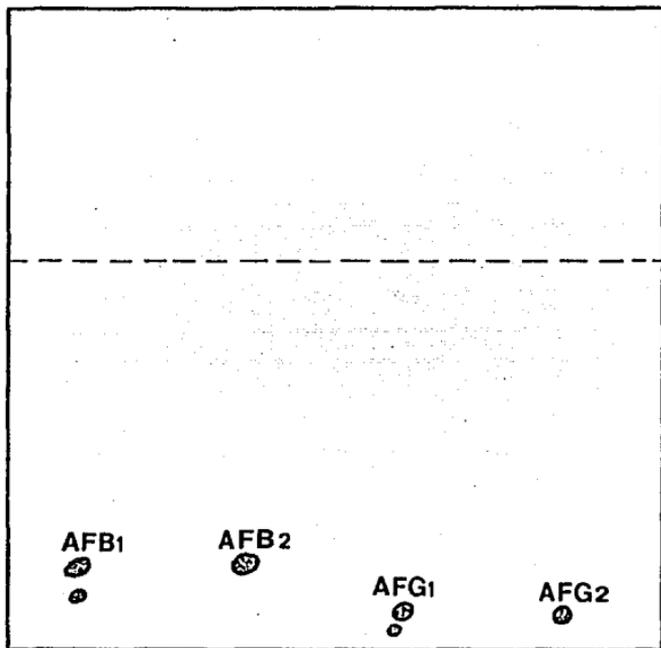
De acuerdo a lo anteriormente descrito se puede decir que el método de acetilación no es de gran utilidad para los propósitos de este trabajo ya que si se tienen las AFL's en mezcla no se podría determinar bien su separación para su identificación, por lo que si hay descomposición de AFB₁ y AFG₁ interferirían AFB₁ con AFG₁ y AFG₂ como se observa en la LAMINA 2.

SISTEMA UNIDIMENSIONAL
Eter - Metanol - Agua sin Acetilación



LAMINA No. 1

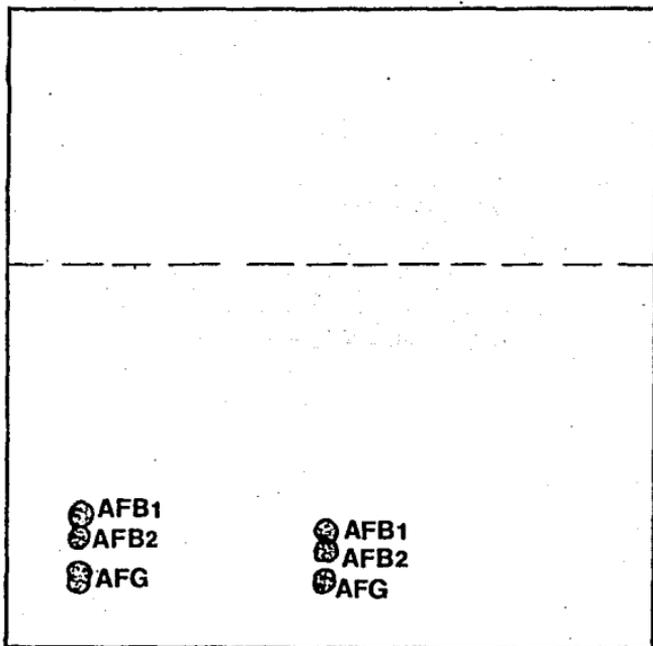
SISTEMA UNIDIMENSIONAL
Eter - Metanol - Agua con acetilación



LAMINA No. 2

SISTEMA UNIDIMENSIONAL

Eter - Metanol - Agua sin Acetilación



LAMINA No. 3

El análisis estadístico realizado para los resultados obtenidos de este método, se tienen que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las cuatro AFL's al ser aplicadas individualmente sin acetilación, lo cual concuerda con lo observado en las LAMINAS 1,2 y 3.

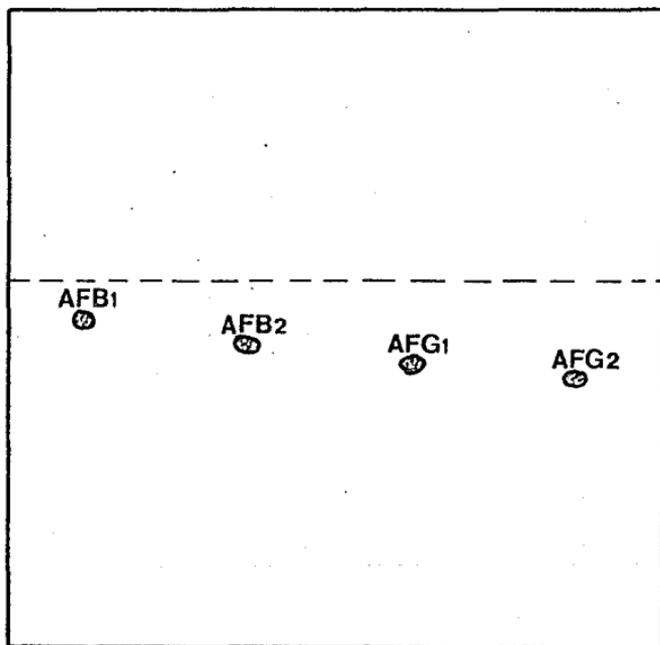
No se tuvo diferencia significativa ($P > 0.05$) en AFL's en mezcla sin acetilación, sin embargo se tuvo diferencia entre AFB₁ y AFB₂.

Para las AFL's aplicadas individualmente con acetilación no se tiene diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ninguna, esto puede ser debido a la variabilidad que se tiene en la distancia recorrida por las AFL's en las diferentes placas lo cual concuerda con las observaciones visuales.

El sistema ACETATO DE ETILO-ISOPROPILÓ-AGUA fue utilizado por Peterson y Ciegler (1977) (50%), para CCF bidimensional con el objeto de separar AFL's. En el presente trabajo se consideró este sistema para CCF unidimensional. En este sistema se encontró que casi no hay separación visible entre las AFL's, aunque estas recorren una distancia mayor que el sistema anterior, como se ilustra en las LAMINAS 4 y 5. Al aplicar AFL's en mezcla no hay separación alguna entre AFB₁ y AFB₂.

SISTEMA UNIDIMENSIONAL

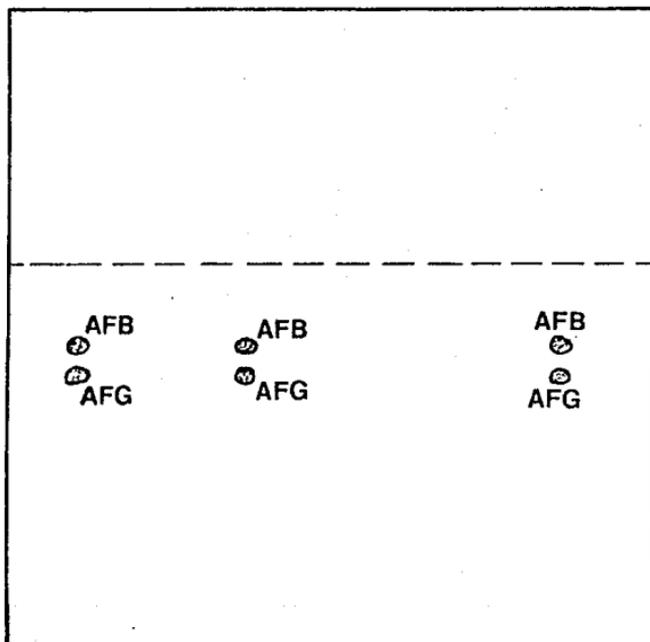
Acetato de Etilo - Isopropilo - Agua sin Acetilación



LAMINA No. 4

SISTEMA UNIDIMENSIONAL

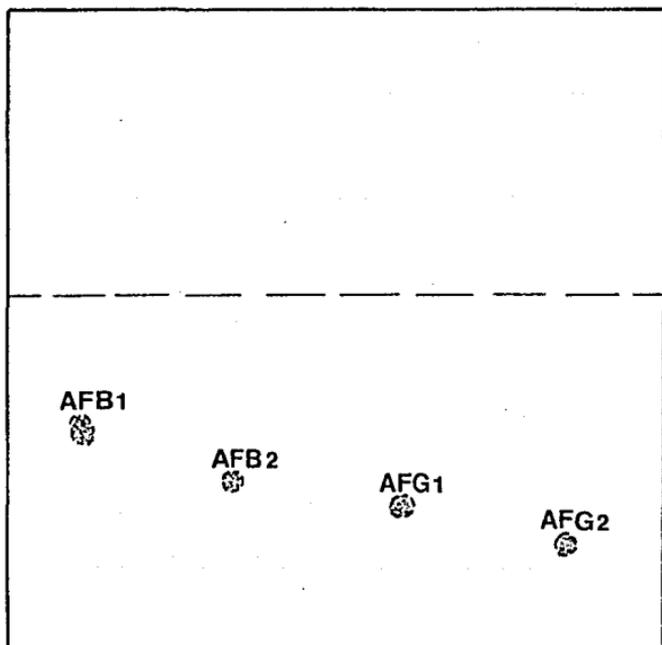
Acetato de Etilo - Isopropilo - Agua sin Acetilación



LAMINA No. 5

SISTEMA UNIDIMENSIONAL

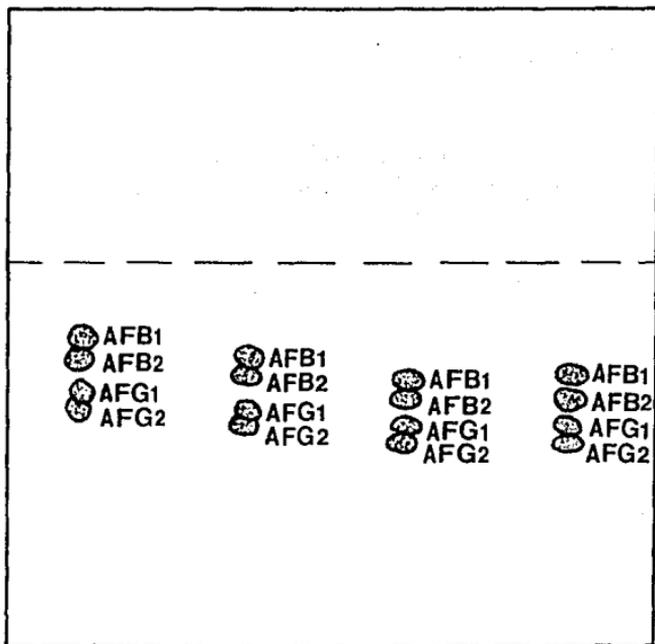
Acetona - Cloroformo - Agua sin Acetilación



LAMINA No. 6

SISTEMA UNIDIMENSIONAL

Cloroformo-Acetona - Agua sin Acetilación



LAMINA No. 7

AFB₁, AFB₂, solo separa AFB's y AFG's por lo cual esta mezcla de solventes unicamente serviria como prueba presuntiva de la presencia de AFB's y AFG's, más no de las cuatro AFL's.

Este hecho se encuentra reforzado por el análisis estadístico del cual se observa que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre AFB₁ y AFB₂, AFB₁ y AFG₁, y AFB₂ y AFG₁, pero si entre AFB's y AFG's ($P \leq 0.05$).

El sistema CLOROFORMO-ACETONA-AGUA fue empleado por Haleem y col. (1977) (51), para desarrollar un método rápido y simple para la separación de AFL's. En el presente estudio se encontró que al aplicar las AFL's tanto en mezcla como individualmente se obtiene una buena separación de las cuatro AFL's como puede observarse en las LAMINAS 7 y 6, siendo los valores de R_f presentados en el CUADRO 9

Estos resultados corroboran lo encontrado por Haleem y col., en cuanto a que es un buen sistema para la separación de AFL's.

El análisis estadístico de los resultados muestran que hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para las AFL's aplicadas individualmente, pero con AFL's aplicadas en mezcla no se tuvo

diferencia ($P > 0.05$) entre las cuatro AFL's, LAMINAS 7 y 6. Aunque visualmente si se observa separación entre AFB₁ y AFB₂, AFB₁ y AFB₂ esto se puede deber a la variabilidad que existe entre la distancia recorrida por las AFL's en una misma placa, ya que se observa un corrimiento no parejo al centro de la placa FIGURA 9.

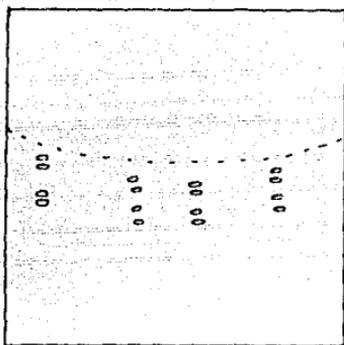


FIGURA 9

Para los tres sistemas de solvente utilizados en CCF unidimensional se empleó el mismo tiempo de desarrollo observándose diferentes separaciones entre las AFL's, de estos resultados es muy claro que de los tres sistemas probados el más eficiente fue el sistema CLOROFORMO-ACETONA-AGUA, aplicando las AFL's tanto en mezcla como individualmente, aunque estadísticamente no se encontró diferencia significativa para

este sistema al aplicar las AFL's en mezcla, por las razones expresadas anteriormente, lo cual podría corregirse tal vez permitiendo un mayor tiempo de desarrollo y realizando menos aplicaciones de AFL's en una sola placa para evitar interferencias entre ellas.

Las observaciones generales del método de CCF bidimensional en el que se usaron seis sistemas de solventes se presentan en el CUADRO 10. Los resultados de R_f obtenidos utilizando este método se encuentran en el CUADRO 11.

Para todos los sistemas bidimensionales probados las AFL's se aplicaron siempre en mezcla, ya que si se aplican individualmente sería más difícil determinar el valor de R_f , ya que sus frentes variarían FIGURA 10. Existe otro sistema de aplicación donde se aprovecha al máximo la superficie de la placa, sin embargo la aplicación es complicada y se requiere de experiencia FIGURA 11. (34,35).

CUADRO 10. OBSERVACIONES GENERALES DE LOS SISTEMAS EMPLEADOS EN CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA BIDIMENSIONAL

SISTEMAS	S/A	C/A	OBSERVACIONES
A) 1º Frente: ACETONA-CLOROFORMO 2º Frente: ACETATO DE ETILO - ISOPROPILO-AGUA	X		Hay una leve separación entre las 4 AFL's
A) 1º Frente: ACETONA-CLOROFORMO 2º Frente: ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA		X	Solo hay separación entre -- AFB's y AFG's
B) 1º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-AGUA 2º Frente: BENCENO-METANOL-AC.ACETICO	X		Hay separación entre las 4 - AFL's
C) 1º Frente: BENCENO-ETANOL-AGUA 2º Frente: BENCENO-METANOL-AC.ACETICO	X		Solo hay separación entre -- AFB's y AFG's
D) 1º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-DIETIL ETER 2º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-AC.ACETICO	X		Hay separación entre AFB's y AFG's
E) 1º Frente: DIETIL ETER-METANOL-AGUA 2º Frente: CLOROFORMO-ACETONA	X		Hay separación entre AFB ₁ y -- AFB ₂ , pero no entre AFG's
F) 1º Frente: TOLUENO-ACETATO DE ETILO-AC.-- FORMICO 90% 2º Frente: ACETONA-CLOROFORMO	X		Hay una excelente separación- entre las 4 AFL's

NOTA: S/A= Sin acetilación

C/A= Con acetilación

CUADRO 11. R_f 's PROMEDIOS OBTENIDOS DE CADA SISTEMA DE SOLVENTES CON EL METODO DE CCF BIDIMENSIONAL.

SISTEMAS	S/A	C/A	VALORES DE R_f 's			
			AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
A)- 1º Frente: ACETONA-CLOROFORMO 2º Frente: ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA	X		0.50	0.45	0.33	0.29
			0.78	0.74	0.70	0.64
A)- 1º Frente: ACETONA-CLOROFORMO 2º Frente: ACETATO DE ETILO-ISOPROPILO-AGUA		X	0.45	0.45	0.29	0.29
			0.76	0.76	0.70	0.70
B)- 1º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-AGUA 2º Frente: BENCENO-METANOL-AC.ACETICO	X		0.59	0.55	0.46	0.41
			0.25	0.22	0.17	0.14
C)- 1º Frente: BENCENO-ETANOL-AGUA 2º Frente: BENCENO-METANOL-AC.ACETICO	X		0.95	0.95	0.89	0.89
			0.52	0.52	0.37	0.37
D)- 1º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-DIETIL ETER 2º Frente: CLOROFORMO-ACETONA-AC.ACETICO	X		0.43	0.43	0.24	0.24
			0.38	0.38	0.23	0.23
E)- 1º Frente: DIETIL ETER-METANOL-AGUA 2º Frente: CLOROFORMO-ACETONA	X		0.41	0.31	0.20	0.20
			0.73	0.69	0.60	0.60
F)- 1º Frente: TOLUENO-ACETATO DE ETILO-AC.-- FORMICO 90% 2º Frente: ACETONA-CLOROFORMO	X		0.45	0.36	0.26	0.19
			0.51	0.49	0.37	0.35

NOTA: S/A= Sin acetilación

C/A= Con acetilación

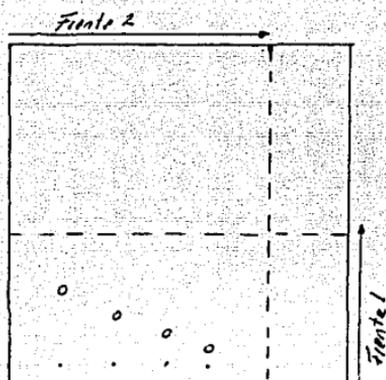


FIGURA 10

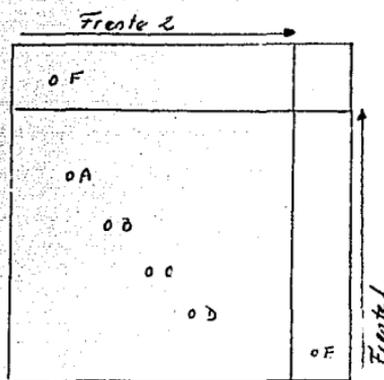


FIGURA 11

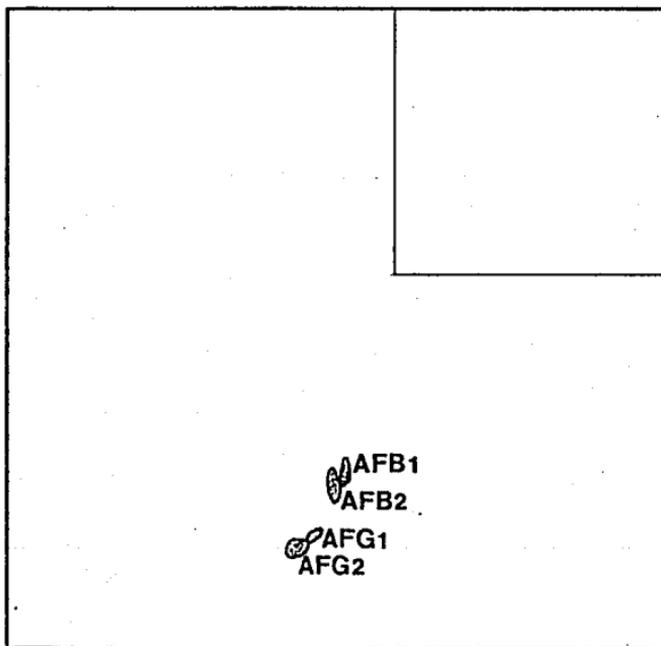
El SISTEMA A bidimensional fue propuesto por Peterson y Ciegler (1967) (50), para separar AFL's de impurezas de extractos de plantas así como también para mejorar la separación de las AFB's y AFG's. Para este sistema se encontró que hay una leve separación entre las cuatro AFL's, aunque la separación entre AFB₁ y AFB₂ así como AFG₁ y AFG₂ es muy pequeña y la separación entre AFB's y AFG's es más clara, por lo cual este método no se podría sugerir como técnica de separación entre las cuatro AFL's, pero sí para confirmar la presencia de AFB's y AFG's LAMINA B.

Al realizar el análisis estadístico se encontró diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre AFB₁ y AFB₂, pero no entre AFG₁ y AFG₂, lo cual refuerza las observaciones visuales.

SISTEMA BIDIMENSIONAL

1º Frente Acetona - Cloroformo

2º Frente Isopropilo - Acetato de Etilo - Agua



LAMINA No. 8

Se decidió intentar utilizar la acetilación de las AFL's en un sistema bidimensional en base a lo sugerido anteriormente en CCF unidimensional por Cauderay (1981) (46). Para este propósito se utilizó el SISTEMA A bidimensional, tomando las precauciones de aislar las cámaras de la luz para evitar degradaciones de las AFL's lo que se obtiene es una muy buena separación entre las AFB's y AFG's aunque no se observa separación alguna entre AFB₁ y AFB₂, y AFG₁ y AFG₂, por lo que se considera que el empleo de la acetilación no es recomendable para diferenciar entre las cuatro AFL's tan solo entre AFB's y AFG's ver LAMINA 9. Estadísticamente se encontró que hay diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre AFB's y AFG's.

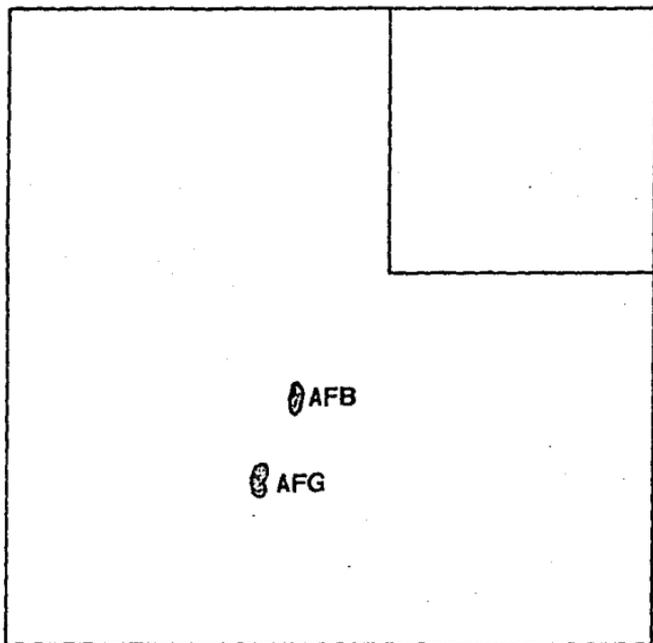
Con el propósito de obtener una buena separación de las AFL's se diseñó el SISTEMA B bidimensional empleando como primer sistema de desarrollo CLOROFOMO-ACETONA-AGUA, (Haleem y col. 1977) (51), en base a los buenos resultados de separación entre las cuatro AFL's en CCF unidimensional, obtenidos en el presente trabajo y como segundo sistema de desarrollo que decidió utilizar fue también empleado por Haleem y col. en 1977, para una recromatografía.

Como se puede observar en la LAMINA 10, la separación entre

SISTEMA BIDIMENSIONAL

1º Frente Acetona-Cloroformo

2º Frente Isopropilo-Acetato de Etilo-Agua con acetilación

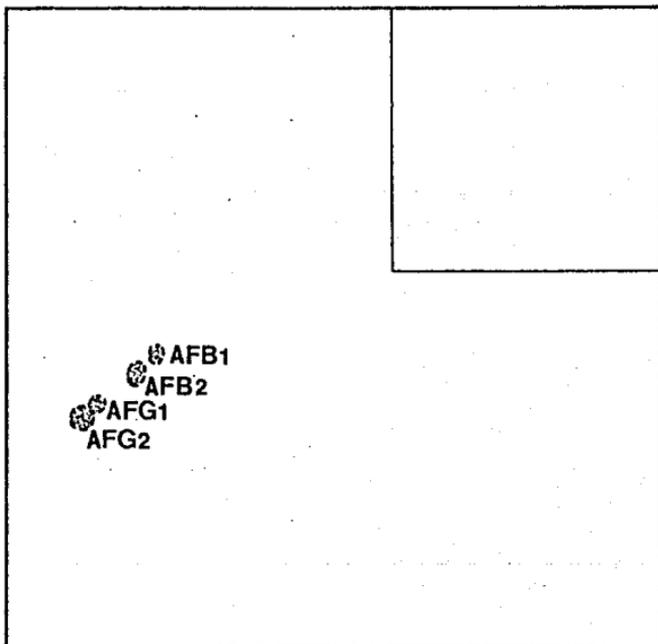


LAMINA No. 9

SISTEMA BIDIMENSIONAL

1º Frente Cloroformo Acetona - Agua

2º Frente Benceno Metanol - Ac Acético



LAMINA No. 10

las cuatro AFL's es bastante buena, sobre todo entre AFB₁, AFB₂ y AFB's, entre AFG₁ y AFG₂ la separación es muy pequeña, aunque visible.

En base a que las AFL's corrieron más con el primer sistema de solvente que con el segundo se podría, sugerir en utilizar como segundo sistema de desarrollo el primero que es CLOROFORMO-ACETONA-AGUA y obtener así una mejor separación de las cuatro AFL's.

En el análisis estadístico realizado se muestra una diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre AFB₁ y AFB₂, pero entre AFB's aunque visiblemente si hay diferencia entre las cuatro AFL's, debido tal vez a la variabilidad que existe en la distancia recorrida por las AFL's, por lo que se sugiere que si se realizan mayor número de repeticiones del tratamiento, tal vez se pueda eliminar esa variabilidad o corriendo más tiempo los frentes de solventes.

Por lo anterior se estima que este sistema puede ser adecuado para la separación de las cuatro AFL's.

Los SISTEMAS C y D bidimensionales fueron sugeridos por Allen Lewis en 1974 (34), con el objeto de eliminar

interferencias fluorescentes de higo , encontrando que no eran eficientes para sus propósitos. En el presente trabajo se probaron ambos sistemas para observar la eficiencia de la separación entre las cuatro AFL's estudiadas (B₁, B₂, G₁, G₂), observándose que hay separación entre AFB's y AFG's, pero individualmente en ambos sistemas. En el SISTEMA C se observó el color fluorescente que producen las AFL's bajo luz U.V. que fue muy definido, color azul de las AFB's y color verde de las AFG's.

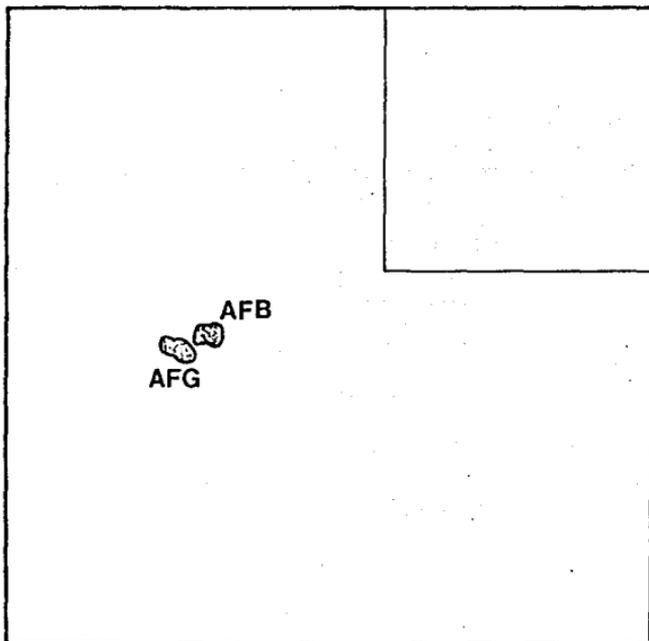
Para el SISTEMA D se puede ver que ninguna de las dos mezclas de solventes desarrollan las cuatro AFL's, por lo que no son de utilidad para los objetivos planteados en este estudio, aunque podría ser de utilidad para la identificación de AFB's y AFG's ya que tiene una mejor separación en comparación con el sistema C ver LAMINA 11 y 12.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis estadístico, no se tiene diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las cuatro AFL's solo entre AFB's y AFG's, esto coincide con lo observado para ambos sistemas.

SISTEMA BIDIMENSIONAL.

1^{er} Frente : Benceno - Etanol - Agua

2^o Frente : Benceno - Metanol - Ac. Acético

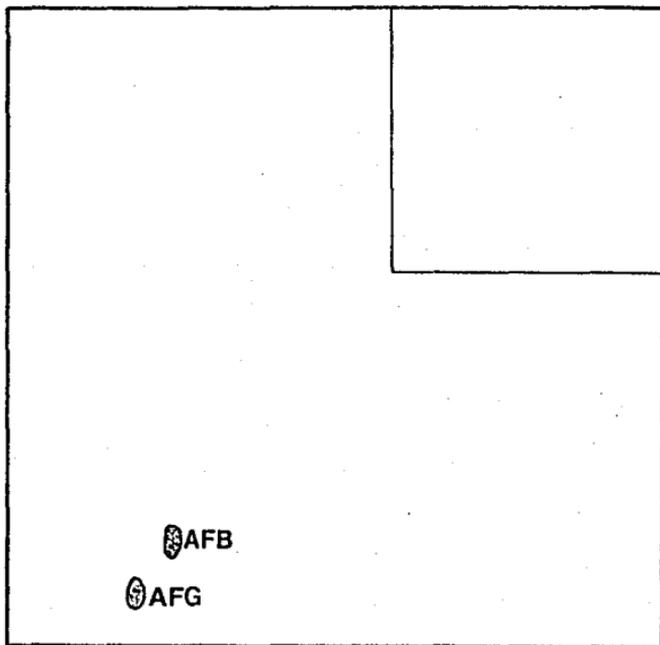


LAMINA No. 11

SISTEMA BIDIMENSIONAL

1º Frente Cloroformo - Acetona - Dietil eter

2º Frente Cloroformo - Acetona - Ac. acetico



LAMINA No. 12

Beljaars (1973) (35), utilizó el SISTEMA E bidimensional para determinar solo AFB₁ más no para separar las cuatro AFL's. En el presente trabajo se decidió probar el sistema con las cuatro AFL's y los resultados obtenidos pueden observarse en la LAMINA 13, en esta observamos una separación entre AFB₁ y AFB₂ y las AFG's, pero no entre AFG₁ y AFG₂. Este sistema sería útil para diferenciar entre AFB's y AFG's y entre AFB₁ y AFB₂.

El análisis estadístico de este sistema muestra una diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre AFB₁ y AFB₂, pero no entre AFG's, resultado que coincide con lo observado visualmente.

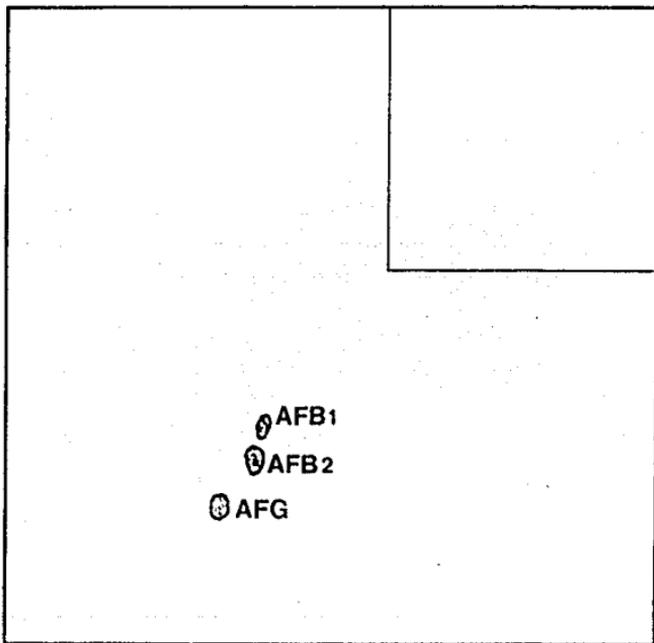
Por último se probó el SISTEMA F bidimensional el cual fue propuesto por Allen Lewis (1974) (34), para eliminar interferencia fluorescente de higo, este sistema fue adecuado para sus propósitos. Al utilizar este sistema en la presente investigación se encontró que la separación entre las AFL's es excelente ver LAMINA 14. Aunque con el primer sistema de solvente no se desarrollaron mucho las AFL's y con el segundo se desarrollaron más, ambos sistemas son eficientes al separar las AFL's, ya que visualmente es excelente la separación.

En base al análisis estadístico se tiene diferencia ($P \geq$

SISTEMA BIDIMENSIONAL

1º Frente Dietileter - Metanol - Agua

2º Frente Cloroformo - Acetona

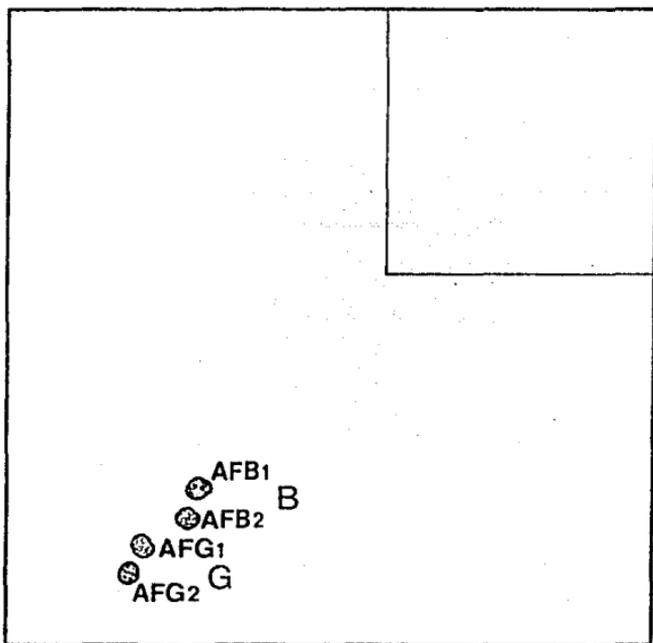


LAMINA No. 13

SISTEMA BIDIMENSIONAL

1º Frente Tolueno - Acetato de Etilo - Ac. formico 90%

2º Frente Acetona - Cloroformo



LAMINA No. 14

0.05) entre AFB₁ y AFB₂, pero entre AFB's, aunque estadísticamente no hay diferencia (P < 0.05) entre las cuatro AFL's, debido tal vez a la variabilidad que existe de la distancia recorrida por las AFL's, este sistema se considera eficiente, se puede observar en la LAMINA 14.

Para la realización de la Cromatografía en Minicolumna se compararon seis diferentes métodos sugeridos en la bibliografía.

La aplicación de las AFL's así como también los sistemas de solventes se hizo por la parte superior de la Minicolumna por lo que el desarrollo es de forma descendente.

Se utilizaron siete Minicolumnas para cada método estudiado las AFL's se aplicaron solas y en mezclas quedando las siete Minicolumnas de la siguiente manera: 1) Blanco, 2) Minicolumna con 4 µl de AFB's, 3) Minicolumna con 4 µl de AFB's, 4) Minicolumna con 4 µl de la mezcla de AFL's (1 µl de c/u), 5) Minicolumna con 8 µl de la mezcla de AFL's, 6) Minicolumna con 12 µl de la mezcla de AFL's, 7) Minicolumna con 16 µl de la mezcla de AFL's.

En esta etapa de esta investigación se contaba tan solo con una cantidad mínima de estándares de AFL's por lo cual las

determinaciones fueron realizadas una sola vez, razón por la cual no se presentaron más que observaciones preliminares un estudio conclusivo no puede presentarse para esta parte del estudio.

Los métodos A,B,C,D,E,F, fueron sugeridos por diferentes autores (36,40,41,42,44), quienes las emplearon básicamente para confirmar la presencia de AFB's. En el presente trabajo se decidió observar la posibilidad de que estos sistemas pudieran ser empleados para la separación de las cuatro AFL's.

El METODO A fue empleado por Shotwell y Stubblefield (1973) (41), el cual es un método oficial de la A.O.A.C., fue empleado por ellos para detectar niveles de AFB₁ en maíz. En el presente trabajo se probaron las siete Minicolumnas ya mencionadas, observándose posteriormente bajo luz U.V. después de desarrollar la Minicolumna, una banda fluorescente azul muy tenue en la parte superior de la capa de alúmina y esto también fue observado en el blanco, por lo que puede decirse que se trata de una interferencia en las Minicolumnas de AFB's y AFG's. Para las Minicolumnas donde las AFL's se aplican en mezcla en diferente concentración se observa una fluorescencia muy tenue en la capa de Silica gel, casi no hay diferencia en

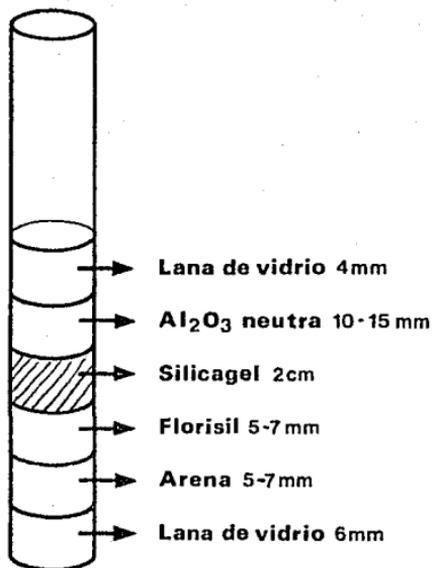
la tonalidad de la fluorescencia azul, ya que se esperaba que esta fluorescencia fuera de menos a mas conforme aumentara la concentración.

Por lo anterior este método no es eficiente para la separación de AFL's, pero si para la confirmación de las mismas, LAMINA 15, ya que solo se ve la fluorescencia azul, la cual enmascara a la verde que corresponde a las AFG's.

El METODO B fue sugerido por Holaday (1976) (40), como un procedimiento rápido y económico para cuantificar AFL's.

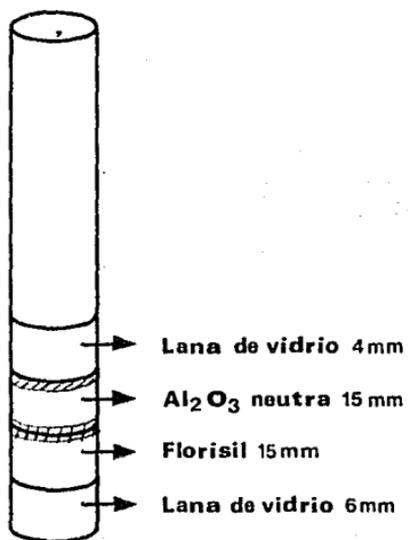
Al desarrollar este método, en las Minicolumnas preparadas para este sistema, se observó una banda fluorescente azul en la parte superior de la alúmina neutra y una banda fluorescente muy tenue de color verde en la interfase florisil-alúmina, para el blanco ninguna de estas dos bandas se presentan, lo cual indica que si hay separación entre las AFB's y AFG's. Se observa diferencia en la tonalidad de la fluorescencia, lo que indica que va de menos a mas, conforme va aumentando la concentración, por lo que este método puede ser apropiado para determinar las AFB's y AFG's ver LAMINA 16.

A Cloroformo-Acetona (1+9)



LAMINA No. 15

B Hexano - Acetona (8+2)



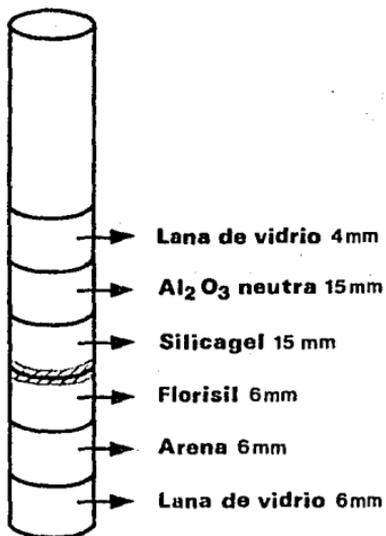
LAMINA No. 16

El METODO C fue realizado por Velasco y Whiten (1973) (36), ellos indican que el método sirve para cuantificar la presencia de AFL's desde 4 ppb, aunque se sugiere que para mayor eficiencia es necesario que sea mayor a 5ppb. En el presente trabajo se observó en la Minicolumna de AFB's una banda fluorescente azul en la interfase, Silica gel-florisil, en la Minicolumna de AFB's se observa una banda fluorescente muy tenue de color verde en la interfase que la Minicolumna anterior y en las Minicolumnas que contienen la mezcla de AFL's con diferentes concentraciones se tiene una banda fluorescente azul en la misma interfase Silica gel-florisil por lo que la fluorescencia de color azul está sobre la fluorescencia de color verde. La tonalidad de color va de menos a más conforme va aumentando la concentración, esto se comparó con el blanco el cual no presentó ninguna fluorescencia.

De lo anterior se deduce que el método no es eficiente para la separación de AFL's, ya que las cuatro AFL's se encuentran en un mismo punto, sin embargo el método puede ser apropiado para confirmar la presencia de AFL's LAMINA 17.

El METODO D fue empleado como práctica de Toxicología de Alimentos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de

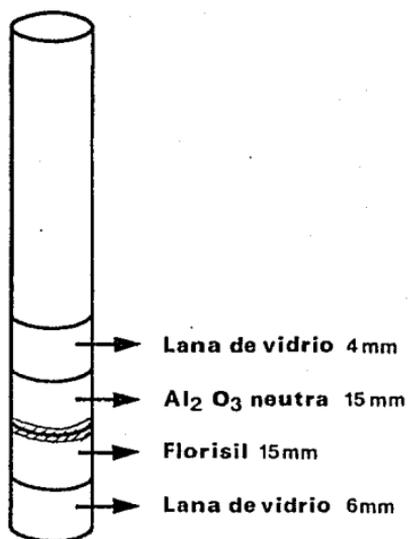
C Cloroformo-Acetona (9+1)



lamina No. 17

D

Cloroformo-Acetona (9+1)



LAMINA No. 18

Difinica en C.U., el cual fue utilizado para determinar AFL's. En el presente trabajo se encontró que en las Minicolumnas de AFB's y AFG's se visualizó una banda fluorescente de color azul en la interfase alúmina neutra-florisil y en las Minicolumnas con AFL's en mezcla se observó una banda fluorescente en la misma interfase que en las Minicolumnas anteriores, por lo que se infiere que las AFB's y AFG's están en el mismo punto. Estas Minicolumnas fueron comparadas con un blanco, el cual no presentó ninguna fluorescencia. La tonalidad de la fluorescencia va de menos a mas, lo que indica que es de acuerdo al aumento de la concentración.

Por lo anterior se puede decir que este método no es eficiente para la separación de AFL's, pero si para confirmar la presencia de AFL's.

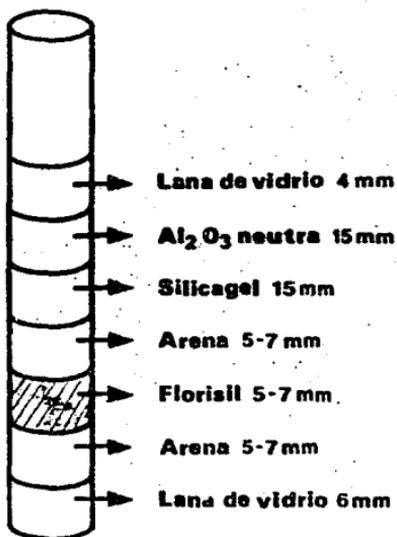
El METODO E es propuesto por Velasco el cual fue utilizado para la detección de AFB por medio del fluorómetro de Velasco (1977) (42). En la presente investigación se encontró una banda fluorescente de color azul en la capa de florisil en la Minicolumna de AFB's, en la Minicolumna de AFG's no se observó ninguna fluorescencia. En las Minicolumnas que contienen la mezcla de AFL's con diferentes concentraciones se observa una

banda azul fluorescente intenso que va de menos a mas, esto fue comparado con el blanco el cual no presentó ninguna fluorescencia.

Este método solo sirve para determinar la presencia de AFB's, pero no para la separación de ellas LAMINA 19.

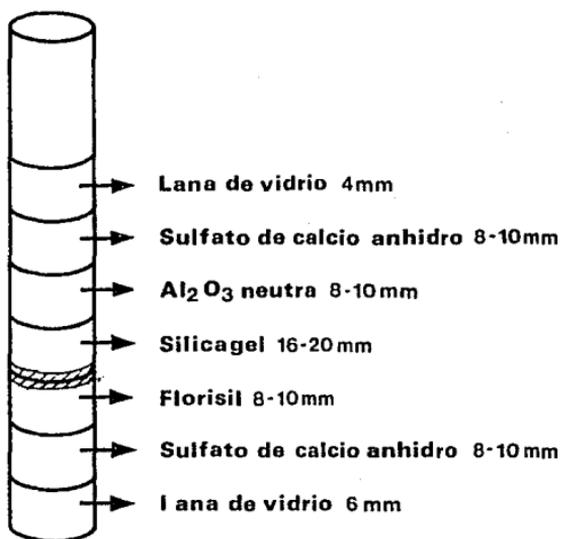
El METODO F fue empleado por Romer (1975) (39), y posteriormente fue corroborado por Shotwell, Shannon y Goulden (1976) (44). Romer lo utilizó para la detección de las cuatro AFL's detectando de 10 - 20 mcg/kg de mezcla de AFL's. Al emplear este método se observó una banda fluorescente azul muy intensa en la interfase de Silica gel-florisil en la Minicolumna de AFB's y en la Minicolumna de AFG's se detecta una fluorescencia tenue solo que no se distingue el color verde propio de las AFG's. En las Minicolumnas que contienen la mezcla de AFL's con diferente concentración se observa una banda fluorescente azul intensa en la misma interfase que va de menos a mas, aunque comparándolo con los métodos anteriores en este se logra una banda fluorescente azul muy visible en la Minicolumna que contiene la menor concentración por lo que este método solo es útil para detectar la presencia de AFL's mas no para su separación LAMINA 20.

E Cloroformo-Metanol (96+4)



LAMINA No. 19

F Cloroformo - Acetona (9+1)



LAMINA No. 20

Para la realización del Método de Cromatografía de Columna, se utilizaron métodos donde empleaban adsorbentes iguales a los descritos en Cromatografía de Minicolumna, observándose que al aplicar las AFL's, desarrollarlas con el sistema de solventes y posteriormente observarlas bajo luz U.V. se tuvo que no había AFL's en la Columna, ya que se drenaron junto con el solvente (45).

VI.- CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

1.- El sistema ETER-METANOL-AGUA empleado en CCF unidimensional encontró que al aplicar las AFL's en mezcla se tuvo una separación de AFB₁ y AFB₂, pero no entre AFG's, por lo que si se dejara desarrollar el sistema de solvente por más tiempo, tal vez se logre una separación entre las AFG's. Sin embargo se tuvo separación de las AFL's al aplicarlas individualmente.

2.- El método de acetilación utilizado en CCF unidimensional no fue de gran utilidad para la separación de AFL's, ya que se tuvo descomposición de AFB₁ y AFG₁, a pesar de tomar las precauciones de aislar la cámara de la luz durante la acetilación.

3.- El sistema ACETATO DE ETILO-ISOPROPIL-AGUA utilizado en

CCF unidimensional solo es apropiado para determinar la presencia de AFB's y AFG's, mas no para la separación entre ellas.

4.- De los tres sistemas empleados en CCF unidimensional el más eficiente para la separación de las cuatro AFL's fue el sistema CLOROFORMO-ACETONA-AGUA, con aplicación de AFL's tanto en mezcla como individualmente.

5.- El sistema A bidimensional presentó una pequeña separación entre las cuatro AFL's, siendo más clara la separación entre AFB's y AFG's, por lo tanto este método no se podría sugerir como técnica de separación de las cuatro AFL's, pero si para confirmar la presencia de AFB's y AFG's.

6.- Con el sistema B bidimensional se encontró una buena separación entre las cuatro AFL's sobre todo entre AFB₁ Y AFB₂, por lo que se considera que este sistema es adecuado para la separación de las AFL's.

7.- Los sistemas C y D bidimensionales no fueron eficientes para la separación de las cuatro AFL's, por lo que no son de utilidad para los objetivos planteados en este estudio.

8.- El sistema F bidimensional fue el sistema más eficiente para los propósitos de este trabajo, ya que se observó la separación de las cuatro AFL's que fue excelente, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa entre las cuatro AFL's debido tal vez a la variabilidad que existe en la distancia recorrida por las AFL's.

9.- En el método B de Cromatografía en Minicolumna se encontró separación de AFB's y AFG's, ya que se observó una banda fluorescente de color azul propia de AFB's y una banda fluorescente de color verde propia de las AFG's, por lo tanto este método es adecuado para la determinación de AFB's y AFG's.

10.- Con los métodos A, C, D, E y F de Cromatografía en Minicolumna solo se pudo determinar la presencia de las AFL's,

pero no la separación de AFB's y AFG's.

11.- Con el método de Cromatografía en Columna no se tuvo resultados favorables, con respecto a la separación de AFL's, debido a que este método es empleado para la purificación de extractos de muestras que contengan AFL's.

12.- Con los métodos de CCF tanto unidimensional como bidimensional se observó que las AFB₁ y AFB₂, siempre se desarrollaron más y se tuvo mejor separación entre ellas que las AFG's, ya que las AFG₁ y AFG₂ siempre separaron poco. Así como también se encontró en ambos métodos separación entre AFB's y AFG's.

13.- Con respecto a los métodos cromatográficos empleados para la determinación y separación de AFL's, el método de CCF tanto unidimensional como bidimensional, fue uno de los métodos más eficientes para la separación de AFL's y el método de cromatografía de minicolumna es útil como prueba presuntiva para la determinación de la presencia de AFL's además de ser muy rápida.

VII.- ANEXOS

MATERIAL

APARATOS :

- a).-Placas de vidrio para Cromatografía en Capa Fina de 20 x 20 cm. cubiertas con una capa de Silica gel de 125mm. de espesor, activadas a 110°C durante 1 hr.
- b).-Equipo Standar para Cromatografía en Capa Fina
- c).-Lampara U.V. longitud de onda larga y onda corta de 4 watt Fisher Scientific Co. No.1198420.
- d).-Tubos de vidrio, para Cromatografía en Minicolumna con un diametro interno de 0.6mm por 20cm de longitud.
- e).-Tubos de vidrio para Cromatografía en Columna.
- f).-Material común de laboratorio.

REACTIVOS :

- a).-Solventes.- Grado ACS; Eter, Metanol, Acetato de etilo, Isopropilo, Cloroformo, Acetona, Benceno, Ac.acético, Dietil eter, Tolueno, Ac.fórmico 90%, Hexano.
- b).-Silica gel 60G para Cromatografía en capa fina E.Merck No.7734 0.063-0.200mm (malla 70-250).

- c).-Silica gel 60G para Cromatografía en Columna E.Merck No.7731.
- d).-Florisol E.Merck No.12518 0.150-0.250mm (malla 60-100)
- e).-Alumina Neutra E.Merck No.1077 0.063-0.200mm (malla 70-230).
- f).-Sulfato de calcio anhidro.
- g).-Arena.
- h).-Lana de vidrio.
- i).-Estándares de referencia de Aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂ (Conc.8-10mcg/ml), preparadas en Benceno-Acetonitrilo (98:2) como se indica en el método 26.002 del A.O.A.C. para tener 1ng/ml de Aflatoxina. Almacenar los estándares de Aflatoxinas diluidas en un refrigerador.

CUADRO GENERAL DEL ANALISIS ESTADISTICO

SISTEMA	TRATAMIENTOS	G.L./trat.	G.L./tot.	Fc.
Bidimen- sional	A	3	79	62.3800
	B	1	39	13.5264
	C	1	39	198.9044
	D	2	59	81.8032
	E	3	39	39.76
	F	3	39	40.26
Unidimen- sional	A	3	79	99.02
	B	3	67	27.6908
	C	3	46	67.9621

NOTA: G.L./trat. = grados de libertad por tratamiento.

G.L./tot. = grados de libertad totales.

VIII.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- Schoental, R. (1984). Mycotoxins and the Bible. Perspectives in Biology and Medicine, 28,1: 117-120.
- 2.- Goldblatt, L.A. (1977). Mycotoxins-Past, Present and Future. J. Am. Oil Chemists' Soc. 54: 302A-309A.
- 3.- Krogh, P.B. (1983). Mycotoxicoses of Animals. Micropathologia, 65: 43-45.
- 4.- Goldblatt, L.A. (1973). Learning to live with Mycotoxins: Aflatoxin-A Case History. Pure Appl. Chem. 35: -- 223-238.
- 5.- Nibbelink, S.K. (1986). Aflatoxicosis in Food Animals: A Clinical Review. Iowa State University Veterinarian, 48,1: 28-31.
- 6.- Butler, W.H. (1974). Cap.I: Aflatoxins in: MYCOTOXINS, ed. by I.F.M. Purchase. pp: 1-28. Elsevier Scientific Publishing Company.
- 7.- feuell, A.J. (1969). Cap.VII: Types of Mycotoxins in Food and Feeds in: AFLATOXIN, Scientific Background,-

- 8.- Valle Vega Pedro. TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS. Documento Provisional del Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (ECO) de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)/ Organización Mundial de la Salud (OMS).
- 9.- Frobisher and Fuerst. (1984). MICROBIOLOGIA. 4a. Edición. pp: 39, 347, 469. Ed. Interamericana, S.A.
- 10.- Wogan, G.N. (1966). Chemical Nature and Biological Effects of the Aflatoxins. Bacteriological Review, 30, 2: 460-470.
- 11.- Butler, W.H. (1964). Acute Toxicity of Aflatoxin B₁ in rats. Brit. J. Cancer, 18: 756-762. citado por Wogan, G.N. (1966).
- 12.- Rogers, A.E. and Newberne, F.M. (1971) Nature: 229-62. citado por Butler, W.H. (1973).
- 13.- Gablils, J.W. (1965). Effect of AFB₁ in cell cultures. J. Bacteriol 90: 720-723. citado por Wogan, G.N. (1966).
- 14.- Butler, W.H. (1969). Cap.VIII: Aflatoxicosis in Laboratory Animals in: AFLATOXIN, Scientific Background, Control and Implication. ed. by L.A. Goldblatt, 1st. Edition. pp: 223-234. Academic Press.

15. Wetz, Melnick, Adelberg. (1983). MICRUBIOLOGIA MEDICA
10a. Edición. pp: 100. Ed. El Manual Moderno.
- 16.- Wogan, G.N. (1969). Cap.VI: Metabolism and Biochemical
Effects of Aflatoxins in: AFLATOXIN, Scientific
Background, Control. Control and Implication. ed
by L.A.Goldblatt. 1st. Edition, pp: 152-181.
Academic Press.
- 17.- Wogan, G.N., Edwards, G.S., and Shank, R.C. (1967). Excretion
and tissue distribution of radioactivity from
Aflatoxin B¹⁴-C¹⁴ in rats. Cancer Res. 27: 1724-
1736. citado en Cap.VI: Metabolism and
Biochemical Effects of Aflatoxins in: AFLATOXIN,
Scientific Background, Control and Implication.
ed by L.A.Goldblatt. 1st Edition pp: 152-181.
Academic Press.
- 18.- Shank and Wogan. (1965). Distribution and Excretion of C¹⁴
labeled AFB¹ in rat. Federation Proc. 24: 627.
- 19.- Butler, W.H. (1973). Review of the Toxicology of Aflatoxin.
Pure Appl. Chem. 35: 217-222.
- 20.- Krabill, H.F. and Shapiro, R.F. (1969). Cap.XV: Implications
of Fungal Toxicity to Human Health in: AFLATOXIN,
Scientific Background, Control and Implication.

ed by L.A.Goldblatt. 1st. Edition. pp: 401-433.
Academic Press.

21.- Dutton, M.F. and Kenneth Westlake. (1985). Occurrence of
Mycotoxins in Cereals and Animal Feedstuffs
Natal, South Africa. J. Assoc. Off. Anal. Chem.
68,5: 839-842.

22.- Golumbic, C. and Kulik, M.N. (1969). Cap. XI: Fungal Spoilage
in Stored crops and its control in: AFLATOXIN,
Scientific Background, Control and Implication.
ed by L.A.Goldblatt. 1st. Edition. pp: 307-323.
Academic Press.

23.- Cuaderno Técnico de la FAO. PREVENCIÓN DE LAS MICOTOXINAS.
Roma (1979), No.10. Preparado por la Organización
de las Naciones Unidas para la Agricultura y la
Alimentación en Colaboración con el Programa de
las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.

24.- Cuaderno Técnico de la FAO. INFORME DE LA CONFERENCIA
MIXTA FAO/OMS/PNUMA SOBRE MICOTOXINAS. Roma.
(1977), No.2. Preparado por la Organización de
las Naciones Unidas para la Agricultura y la
Alimentación en Colaboración con el Programa de
las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.

- 25.- Dollear, F.G. (1969). Cap.XIII: Detoxificación of Aflatoxin in Foods and Feeds in: AFLATOXIN, Scientific Background, Control and Implication. ed by L.A.Goldblatt, 1st. Edition. pp: 360-383. Academic Press.
- 26.- Lee, L.S., Cucullu, A.F., Franz, Jr., A.O. and Pons, Jr., W.A. (1966). Destruction of Aflatoxins in Peanuts during Dry and Oil Roasting. J. Agr. Food Chem. 17,3: 451-453.
- 27.- Machorro, J.M.L. y Valdivia, L.M.A. (1984). Cambios de las Aflatoxinas durante el proceso de la nixtamalización y elaboración de la tortilla. XIV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Tecnol. Aliment.(Mex.).ATAM. Organó Oficial de la Asociación de Tecnólogos de Alimentos de México. Vol.19, No.1 pp: 14 (Ene-Feb).
- 28.- Uribe, L.G. y Tejada, I. (1985). Inactivación de AFB₁ contenida en maíz utilizando Hidróxido de Amonio (NH₄OH) y Metabisulfito de Sodio (Na₂S₂). XVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Tecnol. Aliment.(Mex.).ATAM Organó

Oficial de la Asociación de Tecnólogos de Alimentos de México. Vol.20, No.4 (Jul-Ago).

- 29.- Vesonder, R.F., Beckwith, A.C., Ciegler, A., and Dimler, R.J. (1975). Ammonium Hydroxide Treatment of Aflatoxin B. Some Chemical Characteristics and Biological Effects. J. Agr. Food Chem. 23,2: 242-243.
- 30.- Coomes, T. and Sanders, J.C. (1973). The Detection and Estimation of Aflatoxin in Groundnuts and Groundnut Materials. Analyst. 88: 208-213.
- 31.- Pons, W.A., and Goldblatt, L.A. (1969). Cap. IV: Physicochemical Assay of Aflatoxins in: AFLATOXIN, Scientific Background, Control and Implication. ed. by L.A. Goldblatt. 1st. Edition. Academic Press.
- 32.- Schuller, P.L., Horwitz, W. and Stoloff, L. (1976). A Review of Sampling plans and Collaborative Studied Methods of Analysis for Aflatoxins. J.A.O.A.C. 59,6: 1315-1343.
- 33.- Trucksess, M.W., Stoloff, L., Pons, Jr., W.A., Cucullu, A.F., Lee, L.S., and Franz, Jr., A.O. (1977). Thin-Layer Chromatographic Determination of Aflatoxin B in Eggs. J.A.O.A.C. 60,4: 795-798.

34. Gillen, L. (1974). Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography of Aflatoxins in Figs. J.A.O.A.C. 57,6: 1398-1401.
35. - Beljaars, P.R., Verhúlsdonk, C.A.H., Poulsch, W.E., and Liem, D.H. (1973). Collaborative Study of Two-Dimensional Thin-Layer Chromatographic Analysis of Aflatoxin B₁ in Peanut Butter Extracts, using the Antidiagonal spot Application Technique. Journal of the A.O.A.C. 56,6: 1444-1451.
36. - Velasco, J. and Whitten, M.E. (1973). Evaluation of Florisil Tubes in Detection of Aflatoxin. J. Am. Oil Chem. Soc. 50: 120-121.
37. - Mongi Jemali. (1973). Sensitive Cellulose Column for the Rapid Detection of Aflatoxins in Agricultural Products. Journal of the A.O.A.C. 56,6: 1512-1513.
38. - Romer, T.R., Ghouri, N., and Boling, T.M. (1979). Minicolumn Screening Methods for Detecting Aflatoxin: State of the Art. Journal of the American Oil Chemists' Society. 56: 795-796.
39. - Romer, T.R. (1975). Screening Method for the Detection of Aflatoxins in Mixed Feeds and other Agricultural

Commodities with subsequent Confirmation and Quantitative Measurement of Aflatoxins in Positive Samples. Journal of the A.O.A.C. 58,3: 500-506.

40.- Holaday, C.E. (1976). A Rapid Screening Method for the Aflatoxins and Ochratoxin A. Journal of the Am. Oil Chem. Soc. 53: 603-605.

41.- Shotwell, O.L. and Stubblefield, R.D. (1973). Collaborative Study of Three Screening Method for Aflatoxin in Corn. J.A.O.A.C. 56,4: 808-812.

42.- Velasco, J. (1977). INSTRUCTION MANUAL, VELASCO
tm. Neotec Instruments, Inc.
FLUROTOXIN METER
Silver Spring, Maryland, U.S.A.

43.- Holaday, C.E. and Lansden, J. (1975). Rapid Screening Method for Aflatoxin in a Number of Products. J. Agric. Food Chem. 23,6: 1134-1136.

44.- Shotwell, O.L., Shannon, G.M., and Goulden, M.L. (1976). Confirmation of Results of Rapid Screening Test for Aflatoxins Performed at Corn Elevator. J.A.O.A.C. 59,6: 1419-1421.

45.- Megalla, S.E. (1983). Rapid, Economical, Qualitative Method for Separation of Aflatoxins B-1, B-2, & G-1, G-2

by Dry Column Chromatography. Micopathologia 84:
45-47.

46.- Cauderay, P.H. (1981). Rapid Chemical Confirmation Method for Aflatoxin B₁ y G₁ by direct Acetylation on Thin Layer Plate before Chromatography. Nestlé Research News 1980/81 pp:111.

47.- Pons, W.A. Jr., and Franz, A.O. Jr. (1978). High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxin in Peanut Product. J.A.O.A.C. 61,4: 793-800.

48.- Diebold, G.J. and Zare, R.N. (1977). Laser fluorimetry: Sub picogram Detection of Aflatoxins using High-Pressure Liquid Chromatography. Science 196: 1439-1441.

49.- Diebold, G.J. (1979). Laser Fluorometric Determination of Aflatoxin B₁ in Corn. J.A.O.A.C. 62,3: 564-569.

50.- Peterson, R.E., and Ciegler, A. (1967). Separation of Aflatoxins by Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography. J. Chromatog. 31: 250-251. citado en Cap. IV: Physicochemical assay of Aflatoxins in: AFLATOXIN, Scientific Background, Control and Implication. ed by L.A. Goldblatt, 1st. Edition. pp:77-100. Academic Press.

- 51.- Haleem, J.I., Barr, E.W. and Zielinski, Jr. (1977). Non-Destructive distinction between Aflatoxin B and Ethoxyquin in Thin Layer Chromatography. J. of Chromatography 172: 115-120.
- 52.- Rosiles Rene (1985). Toxicos y Contaminantes en Ganado y su Repercusion en Alimentación Humana. XVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. CURSO TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS. ATAM. pp: 84-101.
- 53.- Cervantes Roberto (1985). Aflatoxinas. XVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. CURSO TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS. ATAM. pp: 149-157.
- 54.- Van Egnmond H.P. (1984). Cap. 3: Determination of Mycotoxins in: DEVELOPMENTS IN FOOD ANALYSIS TECNIC 3. ed by Byrdking. pp: 99-149. Elsevier Applied Scientific Publishing Company. London-New York.