



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE
AFLATOXINAS EN MAIZ DURANTE EL
PROCESO DE NIXTAMALIZACION

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

LUZ MARIA MACHORRO VELASCO

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	3
2.1. PROCESO DE NIXTAMALIZACION	
2.2. AFLATOXINAS	
2.3. BIOSINTESIS DE AFLATOXINAS	
2.4. METODOS DE ANALISIS	
2.4.1. PRUEBAS BIOLOGICAS	
2.4.2. PRUEBAS QUIMICAS	
2.5. TIPOS DE AFLATOXINAS	
2.6. INACTIVACION DE AFLATOXINAS	
2.6.1. ACIDOS	
2.6.2. BASES	
2.6.3. AGENTES OXIDANTES	
3. MATERIALES Y METODOS	33
3.1. COMPARACION DE METODOS DE IDENTIFICACION DE AFLATOXINAS	
3.2. DESCRIPCION DEL METODO RAPIDO PARA IDEN- TIFICACION DE AFLATOXINAS EN EL MAIZ	

- 3.3. INOCULACION DEL MAIZ
 - 3.4. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS
 - 3.5. DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS DURANTE EL PROCESO DE NIXTAMALIZACION Y ELABORACION DE TORTILLAS
 - 3.6. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DIGERIDA IN VITRO
 - 3.7. PRUEBAS CONFIRMATIVAS
-
- 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES 51
-
- 4.1. IDENTIFICACION DE AFLATOXINAS DURANTE EL PROCESO DE LA NIXTAMALIZACION
 - 4.2. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN EL MAIZ INICIAL
 - 4.3. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN EL NIXTAMAL Y NEJAYOTE CON TRATAMIENTO TERMICO - ALCALINO
 - 4.4. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN EL NIXTAMAL CON 14 HORAS DE REPOSO
 - 4.5. CAMBIOS DURANTE EL REPOSO
 - 4.6. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN LA TORTILLA
 - 4.7. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DIGERIDA IN VITRO
 - 4.8. PRUEBAS CONFIRMATIVAS

4.8.1. FORMACION DE DERIVADOS

4.8.2. ESTANDAR INTERNO

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
6.	BIBLIOGRAFIA	78

I N T R O D U C C I O N

El maíz es el principal cultivo en México. Su consumo se lleva a cabo en varias formas, siendo la tortilla el producto que se consume en mayor proporción. Para la elaboración de la tortilla, el maíz se somete a un tratamiento térmico - alcalino, que trae como consecuencia cambios físicos y químicos en el grano. Este proceso se conoce con el nombre de nixtamalización (1).

El maíz después de haber sido cosechado es almacenado en silos o bodegas, esto deberá ser en condiciones adecuadas para evitar pérdidas por contaminación, ya que un mal almacenamiento trae como consecuencia un deterioro en el grano por desarrollo de microorganismos y cambios en su composición. De la microflora original del maíz obtenida durante las operaciones de cosecha o transporte, una cantidad importante corresponde a la familia de los hongos que pueden desarrollarse y ocasionar las pérdidas significativas. Las principales especies de hongos que se han encontrado son : Penicillium, Aspergillus, Fusarium (2). Es conocido que estos microorganismos además de provocar un deterioro en la composición de los granos, producen metabolitos que pueden ser tóxicos a animales y muy probablemente al hombre. Estos

compuestos son metabolitos secundarios y reciben el nombre general de micotixonas. Entre las mas comunes y preligrosas podemos citar a las aflatoxinas.

El objetivo de este trabajo, es conocer las modificaciones que ocurren en las aflatoxinas durante el proceso de la nixtamalización empleando como material de prueba maíz contaminado artificialmente con Aspergillus flavus, productor principalmente de aflatoxinas B₁.

Para llevar a cabo el objetivo se planteó el siguiente plan general de trabajo.

- 1.- Dado que a la fecha existe una amplia información sobre las técnicas analíticas para cuantificar aflatoxinas, seleccionar de la literatura la más precisa y apropiada para la realización de este trabajo.
- 2.- Identificar, cuantificar y determinar los cambios que sufren las aflatoxinas durante las diferentes operaciones en el proceso de la nixtamalización y elaboración de la tortilla.

GENERALIDADES

2.1. PROCESO DE NIXTAMALIZACION

El maíz es el cereal básico utilizado en la alimentación del pueblo mexicano a través de varias centurias.

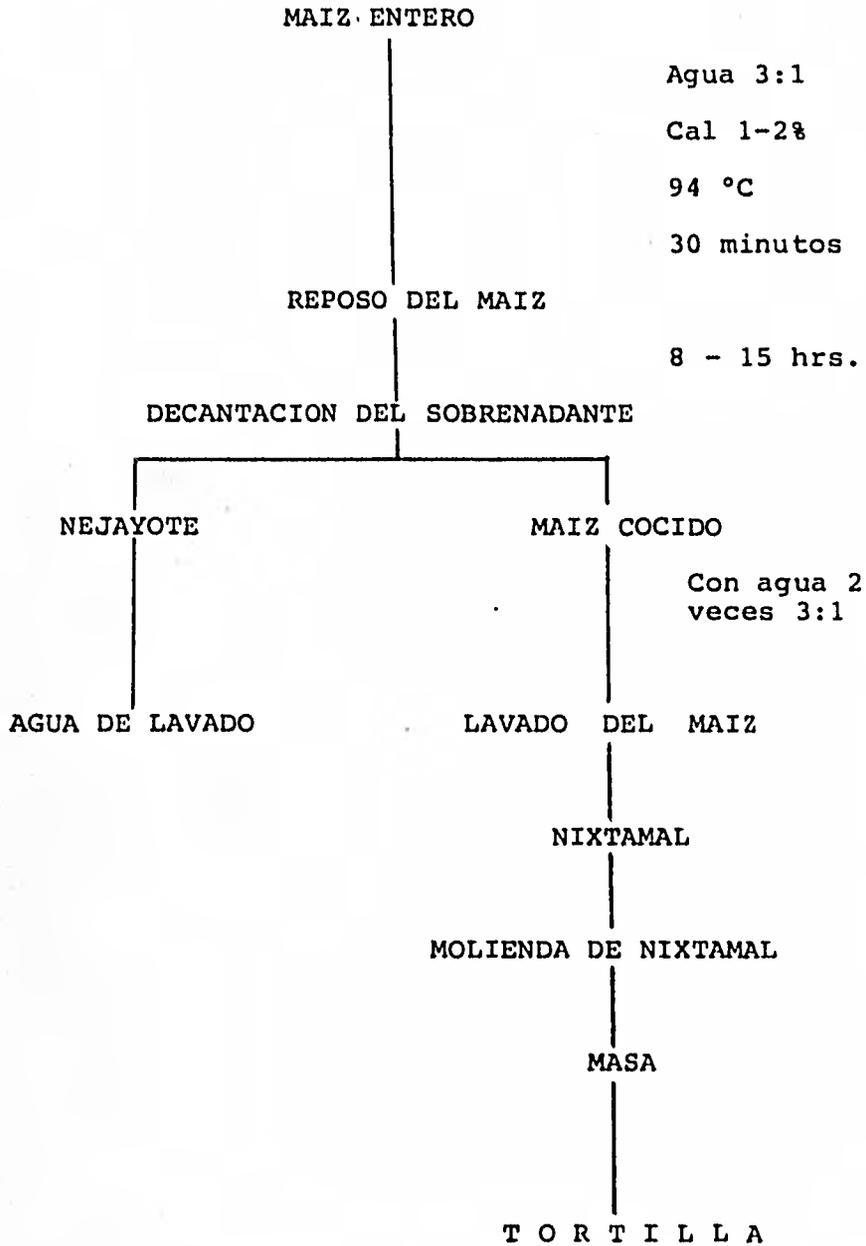
Así pues es sabido que los Mayas y otros habitantes primitivos de América latina conocían, cultivaban y consumían maíz, el cual formó parte esencial de su religión y cultura (1).

A partir de este cereal los Mayas preparaban varios alimentos, de los cuales la tortilla ha sido hasta la fecha de importancia significativa en la nutrición de nuestro pueblo.

- El proceso fundamental en la elaboración de las tortillas - es la nixtamalización la cual se describe en el cuadro 1.

La nixtamalización consiste en un proceso térmico-alcalino, que trae como resultado el desprendimiento de la cascara y la suavización del grano con una pérdida parcial de ciertos componentes e importante de fibra cruda. También ocurren ciertos cambios físico - químicos (1).

C U A D R O I



Entre los cambios mas importantes que podemos citar se encuentran :

- 1) Los cambios en la calidad protéica del maíz destacando el aumento en la relación de lisina, aumentando su disponibilidad 2.8 veces, otros aminoácidos esenciales como treonina, histidina y metionina también se hacen más disponibles, el triptofano también aumenta ligeramente. El aumento en la disponibilidad, es debido a que el calcio interacciona con los enlaces disulfuro de residuos de cistina de la fracción protéica glutelina del grano, provocando que el complejo se abra y deje disponibles a los aminoácidos (3). Por el contrario la fracción zeína que son proteínas solubles en el alcohol clasificadas como prolaminas, se hacen menos digeribles (3). Sin embargo, cabe señalar que este proceso térmico-alcalino, no mejora de manera importante la calidad de la proteína del maíz siendo ésta tan deficiente nutricionalmente como antes del proceso.
- 2) Un cambio que resulta importante es la liberación de vitaminas que se encuentran formando parte de un complejo que resulta difícil de atacar por las enzimas digestivas de monogástricos. De estas vitaminas las que principalmente aumentan su disponibilidad son tiamina, niaci-

na y riboflavina como se observa en la Tabla I (1).

El aumento en la disponibilidad de la niacina trae como consecuencia la aparente ausencia de pelagra en México a diferencia de otros lugares como Egipto y Estados Unidos (1).

- 3) En cuanto al contenido de minerales, el maíz presenta una cantidad importante de K, P, Mg, Ca y Na. Durante la nixtamalización hay un gran cambio en el contenido de Ca., incrementándose debido a la presencia de la cal.

T A B L A I

CAMBIOS DE CONCENTRACION DE ALGUNOS NUTRIENTES EN EL
MAIZ AL CONVERTIRLO EN TORTILLA (1)

<u>NUTRIENTE</u>	<u>MAIZ CRUDO</u>	<u>TORTILLA</u>	<u>CAMBIO</u>
Tiamina mcg/g	3.84	1.55	-59.6
Riboflavina mcg/g	1.14	0.55	-51.8
Niacina mcg/g	20.00	13.54	-32.3
Calcio mg/g	4.00	198.00	+495.0

- 4) Otros cambios que resultan de menor importancia nutricionalmente, pero de significancia para la manufactura de la tortilla son principalmente el desprendimiento del pericapio así como el cambio de la textura y consistencia del grano.

Esto resulta como consecuencia del efecto conjunto temperatura - cal que actúa provocando una gelatinización parcial del almidón. Así se lleva a cabo una absorción significativa de agua y suavidad del endospermo. Esto permite manejar con facilidad el grano para obtener el nixtamal.

2.2. AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son conocidas como metabolitos secundarios secretados bajo condiciones específicas de temperatura, humedad y composición del sustrato, por un gran número de géneros y especies de hongos.

En 1960 mas de 100,000 pavos jóvenes en granjas de aves en el sur y este de Inglaterra murieron en el curso de pocos meses aparentemente de una nueva enfermedad llamada "Enfermedad X de pavos" (5). Pronto se encontró que esta enfermedad no ocurría solamente en pavos sino en pa

tos y faisanes jóvenes. Estos eran afectados experimentando alta mortalidad. Simultáneamente se recibieron reportes de Kenia y Uganda de algunas pérdidas de patos por una enfermedad similar.

Paralelamente durante la primavera de 1960 en Estados Unidos se descubrió un brote de hepatoma en trucha en una remesa de un criadero comercial inspeccionada en la frontera del Estado de California.

No había entonces relación entre los diferentes brotes, demostrándose posteriormente que las aflatoxinas eran el común denominador.

La "Enfermedad X de pavos" se caracterizó por pérdida de apetito, letargo y un debilitamiento en las alas. Las aves afectadas murieron en espacio de una semana y a su muerte asumieron posturas características de la cabeza, cuello y piernas. El examen postmortem mostró hemorragia en el hígado con lesiones necróticas, con frecuencia de hinchazón en el riñón.

En estudios llevados a cabo en extractos clorofórmicos hechos a partir de agar czapek conteniendo un hongo aislado de cacahuete (5), se encontró material fluorescente con un

Rf de 0.7 cuando se cromatografió en papel, este material - era tóxico a los patos produciendo síntomas característicos asociados con la enfermedad X de pavos. El hongo productor de la toxina fue identificado como Aspergillus flavus, por lo que de ahí se derivó el nombre de aflatoxinas (5), (6).

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos altamente tóxicos y carcinogénicos producidos por los hongos Aspergillus flavus y A. parasiticus principalmente, así como algunos - otros relacionados con el deterioro de productos agrícolas. El crecimiento de estos hongos depende principalmente de la naturaleza del sustrato y de las condiciones ambientales (7). Se ha encontrado que bajo almacenaje la temperatura debe ser menor de 25°C ya que el óptimo para la producción de aflatoxinas es de 30 a 38°C. La humedad en ninguno de los casos debe de ser mayor de 16%.

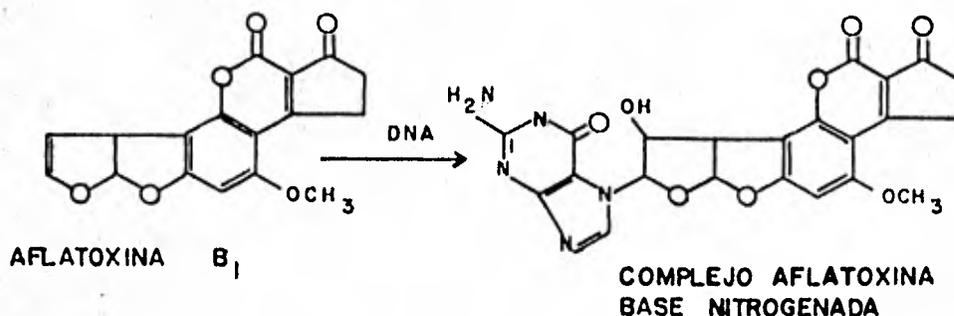
De los metabolitos designados como aflatoxinas, las principales son la B₁, B₂, G₁ y G₂ y pueden estar presente o no en los productos infectados con A. flavus (8). Sin embargo, la presencia del microorganismo, hace potencialmente peligroso el producto.

La aflatoxina que normalmente se halla presente en mayor - concentración en productos infectados, es la B₁ (8), la cual

es carcinogénica, mutagénica y teratogénica, ésto es la -- producción de anomalías y monstruosidades en el organismo. Debido a estas propiedades es considerado de gran importan- cia en salud pública y animal (6).

Se ha encontrado que las lesiones morfológicas y bioquími- cas causadas por las aflatoxinas en animales ocurre casi - siempre en células hepáticas. La interacción mutagénica de las aflatoxinas con el DNA es el evento inicial y crítico de esta acción donde estas toxinas interfieren en la trans- cripción, causando una síntesis deteriorada del DNA y como consecuencia se ve afectada la síntesis del RNA (6).

F I G U R A I
ENLACE DE AFLATOXINA Y DNA



Se ha comprobado que esta reacción se lleva a cabo por for- mación de un enlace covalente de la aflatoxina B₁ con los - ácidos nucleicos, ésto ha sido considerado el mecanismo ini-

cial para producir los efectos tóxicos y carcinogénicos (9).

Una incubación in vitro de aflatoxina B₁ con extractos de hígado de rata, da como resultado el enlace de la micotixina con los ácidos nucleicos, a niveles de 1 residuo de aflatoxina por cada 30 nucleotidos (10).

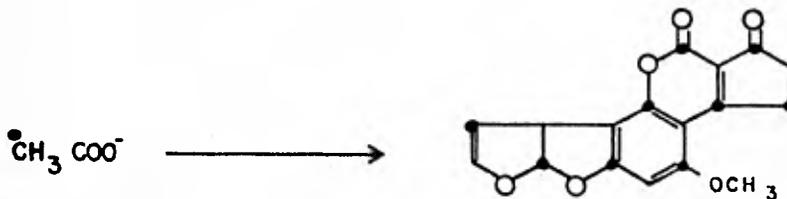
2.3. BIOSINTESIS DE AFLATOXINAS

Varios investigadores han reportado que la producción de aflatoxinas, además de las condiciones ambientales, está determinada por el origen y la concentración de la fuente de carbono disponible (11). Así se observó que sacarosa, glucosa y fructuosa permiten una gran producción de aflatoxinas, mientras que lactosa, maltosa, xilosa, glicerol y glutamato soportan el crecimiento de hongos pero con una acumulación pobre de aflatoxinas. Por otro lado el almidón, manitol, sobitol y la galactosa, dan un buen crecimiento y cantidades regulares de aflatoxinas. Por otro lado los ácidos grasos soportan crecimiento de hongos pero poca producción de aflatoxinas. Estudios similares muestran que la proteína como fuente de carbono soporta buenos crecimientos pero no hay producción de aflatoxinas. Por lo anterior parece que la máxima producción de aflatoxinas depende de concentraciones definidas de carbohidratos específicos.

Los últimos estudios sobre la biosíntesis de las aflatoxinas producidas por los principales microorganismos, revelan que la síntesis se lleva a cabo a partir de acetato (6).

Investigaciones realizadas demuestran que el acetato es el contribuyente de carbono en la biosíntesis de aflatoxinas B₁, cuando se preparó ésta a partir de acetatos marcados con carbono 14. Los átomos de carbono individuales se muestran en la siguiente figura 2 (6).

F I G U R A 2



ESTRUCTURA DE LA AFLATOXINA B₁ Y LA DISTRIBUCION DE
LOS CARBONES EN LA MOLECULA

Se ha sugerido la secuencia de la biosíntesis como : acetato, ácido norsolorfínico, versicolorín A, Sterigmatosistina, aflatoxina B₁.

En la Figura 3 se resumen todas las posibles evidencias de

la biosíntesis de aflatoxinas (6).

2.4. MÉTODOS DE ANALISIS

Los métodos químicos para determinar aflatoxinas en los productos agrícolas, se basan corrientemente en la fluorescencia característica de estos compuestos cuando se les somete a luz ultravioleta de onda larga (U.V.). La mayoría de los métodos que se han desarrollado dependen de la determinación cuantitativa o semicuantitativa de la fluorescencia que presentan los extractos del material objeto de la prueba. Los diversos métodos difieren en el disolvente empleado para extraer la toxina de la muestra y en el método de cuantificación.

Para detectar el material tóxico se han desarrollado dos tipos de pruebas : pruebas biológicas y pruebas químicas.

2.4.1. PRUEBAS BIOLÓGICAS

La prueba biológica consiste en administrar a patos de un día de edad un extracto concentrado del material dudoso. - La concentración de la toxina presente se determina por examen del daño causado al hígado después de un período de 7 días o a la muerte de los mismos. Esta prueba puede ser

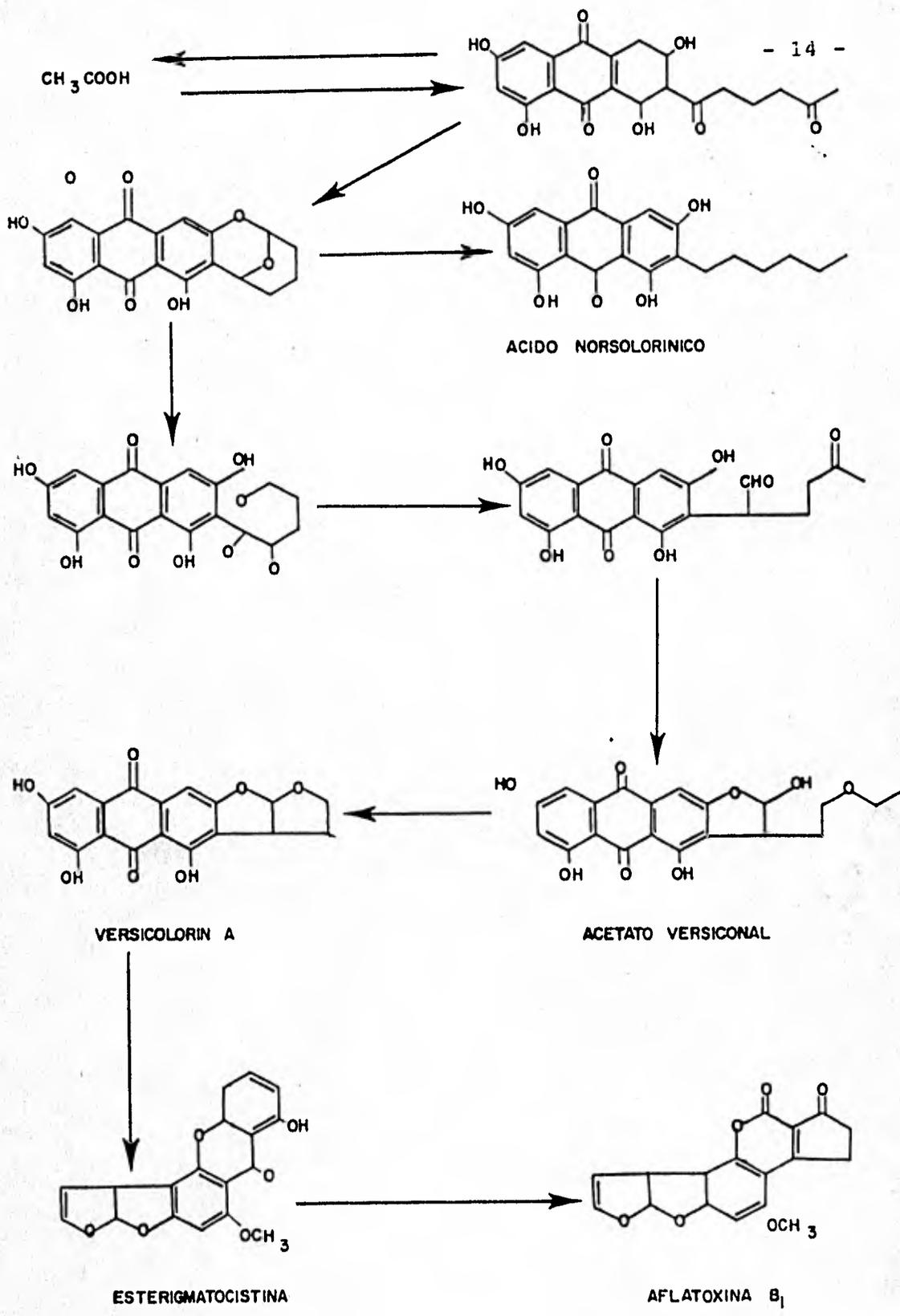


FIGURA 2

Biosíntesis de Aflatoxina B₁

utilizada para estudios confirmativos, particularmente en la condición de dificultad analítica que sufren ciertos -- alimentos. En otras pruebas biológicas se examinan los - efectos de extractos del material dudoso en el desarrollo fisiológico de ciertas especies de animales, como por ejemplo larvas de Brachydonio rerio y en huevos de gallina fertilizados.

Estos ensayos son muy largos y costosos para un análisis rutinario lo que frecuentemente es necesario en programas de control de calidad en el campo alimentario. En este caso la opción que resulta mas adecuada son los métodos químicos.

2.4.2. PRUEBAS QUIMICAS

De manera general las pruebas químicas consisten de los siguientes procedimientos (5) :

- I - Extracción primaria de aflatoxinas.
 - A) Extracción exhaustiva.
 - B) Equilibrio de la extracción.

- II - Purificación del extracto. .
 - A) Métodos de separación.

B) Método cromatográfico.

III - Separación e identificación de aflatoxinas por cromatografía en capa fina.

IV - Medición de aflatoxinas.

A) Medición semicuantitativa.

1. Estimación visual.

B) Medición cuantitativa.

1. Fluorodensitométrica.

2. Espectrofotométrico.

V - Métodos confirmativos.

I.- EXTRACCIÓN PRIMARIA DE AFLATOXINAS.

a) Extracción exhaustiva.

Tiene como fin el desgrasar y remover pigmentos y algunas macromoléculas constituyentes de la muestra. Esto se hace generalmente con solventes orgánicos, siendo los más comunes el metanol y el éter de petróleo.

b) Equilibrio de la extracción.

Consiste de una extracción más selectiva de las aflatoxinas en solventes donde presentan mayor solubilidad, - en este caso el cloroformo es usado de manera común.

II.- PURIFICACION DE EXTRACTOS.

a) Métodos de separación.

Se remueven interferencias como lípidos, carbohidratos y pigmentos que pudieran haber quedado de la extracción primaria. Se puede hacer con carbonato cúprico o con -- acetato de plomo.

b) Método cromatográfico.

Eventualmente se aplica el extracto en una columna para eliminar interferencias y separar a las aflatoxinas de otros compuestos. Este paso no se efectúa en todos los métodos.

III.- SEPARACION E IDENTIFICACION DE AFLATOXINAS POR CROMA TOGRAFIA EN CAPA FINA.

La identificación se basa fundamentalmente en la propiedad fluorescente de las aflatoxinas bajo luz ultravioleta, cuan

do son sometidas a un sistema eluyente para separarlas en cromatografía en capa fina, dan diferentes valores de Rf. La cromatografía en capa fina bidimensional se ha propuesto para dar una mejor separación entre las aflatoxinas.

Para los métodos cromatográficos en capa fina se hace necesaria la aplicación de estándares puros, para evitar confusión con otros compuestos de la muestra o metabolitos de descomposición que presentan también fluorescencia.

IV.- MEDICION DE AFLATOXINAS.

a) Medición semicuantitativa.

1.- Estimación visual. Hasta estudios recientes sobre la estimación de aflatoxinas en cromatografía en capa fina se ha confiado a una comparación visual de la intensidad de la fluorescencia y es propiamente clasificado como un método semicuantitativo. Para cálculos iniciales de un extracto desconocido de aflatoxinas B₁ se hace una serie de diluciones hasta extinción de la fluorescencia sobre la cromatoplaça. Con estas diluciones se hacen comparaciones con estándares de concentración conocida (5). En este método se clasifica a la muestra según su contenido de toxinas en 4 categorías :

Muy alto	mas de 1 ppm
Alto	0.25 a 1 ppm
Medio	0.05 a 0.25 ppm
Bajo	menos de 0.05 ppm

Como es de esperarse, este método presenta un intervalo de error muy grande, de 30 a 50% cuando sólo se tiene un estandar para comparar y de 15 a 25% cuando la muestra se interpola entre 2 estandares.

b) Medición cuantitativa.

1.- Fluorodensitométrico.

Esta medición es más sensible se lee directamente sobre la placa de sílica gel usando un registrador densitométrico equipado para mediciones de emisión fluorescentes. La precisión y exactitud obtenida con un medidor de este tipo es marcadamente superior a la estimación visual.

2.- Espectrofotométrica.

El primer esfuerzo para tener una precisión en los métodos cuantitativos es separar de la placa las bandas de aflatoxinas B_1 y B_2 con un Rf de 0.30 y 0.25 respectivamente con metanol. Al extracto obtenido se le determina el contenido de aflatoxinas por absorción espectrofoto-

métrica a 363 nm.

V.- METODOS CONFORMATIVOS.

Se ha establecido la necesidad de llevar a cabo pruebas con firmativas adicionales para distinguir sin problema entre - las aflatoxinas y otros compuestos fluorescentes que puedan estar presentes en el extracto cuando estas son identifica- das por métodos cromatográficos (8).

Uno de los métodos confirmativos más usados se basa en la - formación de derivados a partir de las aflatoxinas por me- dio de reacciones específicas. De los derivados que se pue- den formar está el aducto de agua por medio del tratamiento con ácido fórmico, ácido tricloroacético o ácido trifluoro- acético (8).

Otro derivado es el acetato formado por reacción con ácido acético y cloruro de tionilo (8).

La adición de agua al doble enlace terminal del anillo de - furano de la aflatoxina B₁ hace la conversión a la aflatoxi- na B_{2a}. La aflatoxina G₁ es convertida de forma similar en aflatoxina G_{2a} (12), con un Rf menor al de la aflatoxina B₁ y G₁ respectivamente.

Cabe hacer mención que además de la formación de derivados, se aumenta la seguridad en la identificación de las aflatoxinas en un extracto desconocido usando un estándar interno aplicado sobre la alícuota del extracto desconocido (5).

2.5. CLASIFICACION DE AFLATOXINAS

Entre las principales aflatoxinas se encuentran las aflatoxinas : B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}, M₁, M₂, P, Q₁ y aflatoxicol, - cuyo nombre y fórmula se indican en las figuras 4 y 5.

Las aflatoxinas B₁ y B₂, son así designadas ya que presentan una fluorescencia azul intenso bajo luz ultravioleta, - cuando se analizan en capa fina. La aflatoxina B₂ tiene un R_f un poco menor que la B₁.

Las aflatoxinas han demostrado una actividad carcinogénica, en muchas especies de animales que incluye roedores, primates no humanos, aves y peces. El hígado ha sido el órgano principalmente afectado.

La mayoría de la información reportada sobre los efectos - carcinogénicos de las aflatoxinas han involucrado experimentos en ratas (9). Con un nivel de solamente 1 ppm en -- una dieta dada a ratas, de la especie Wistar, da como re--

FIGURA 4
AFLATOXINA B₁ Y ALGUNOS DERIVADOS

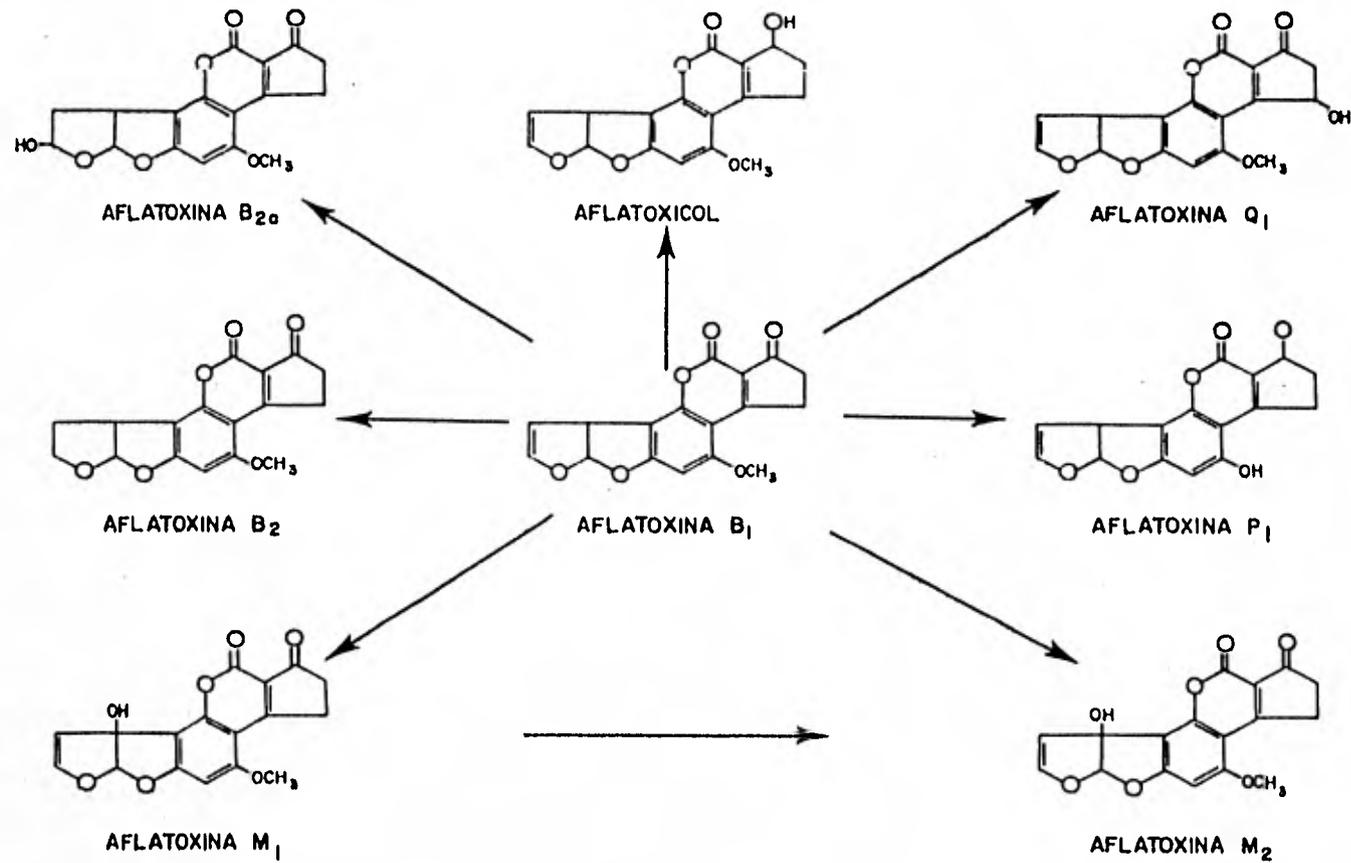
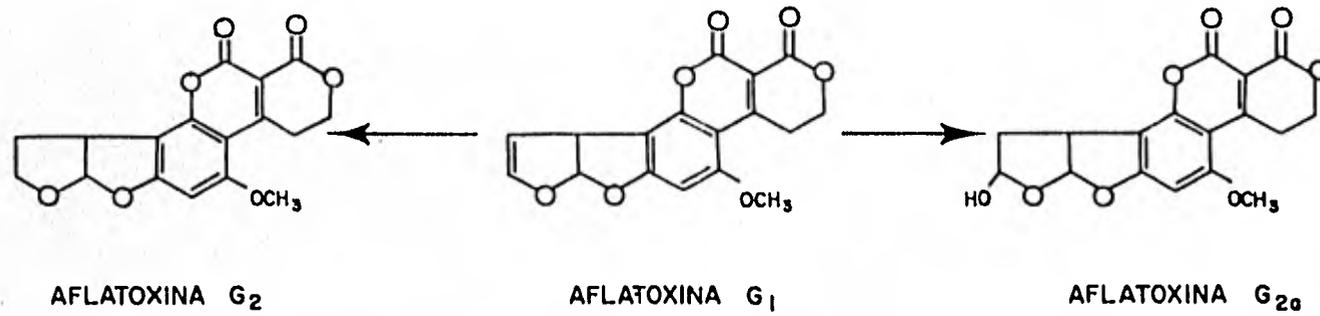


FIGURA 5
AFLATOXINA G Y ALGUNOS DERIVADOS



sultado un tumor en el hígado después de 21 semanas como se muestra en la Tabla II. Una administración diaria de aflatoxinas a monos causa daño en el hígado y finalmente la muerte. También se ha demostrado in vitro que las células hepáticas del hombre son destruidas de manera severa por las aflatoxinas B₁ (13).

Las aflatoxinas G₁ y G₂ difieren de la B₁ y B₂ respectivamente por tener un anillo terminal de 6 miembros. La fluorescencia es azul - verde, y son también carcinogénicas pero menos tóxicas que las del grupo B.

Las aflatoxinas B₂ y G₂ son derivados dihidro de las aflatoxinas B₁ y G₁ respectivamente, por lo que se encuentran en menor cantidad.

Las aflatoxinas M₁ y M₂ son productos del metabolismo de hongos y animales. Primero se descubrieron en leche de vaca y de ahí se les designó M. La estructura de la aflatoxina - M₂ es igual a la aflatoxina M, excepto que el anillo furano está saturado.

La intensidad de la fluorescencia de M₁ y M₂ es aproximadamente la misma que la B₁ pero presenta mayor polaridad cuando es aplicada en cromatografía en capa fina, lo que facilita

TABLA II

HEPATOCARCINOGENICIDAD DE AFLATOXINA B₁

<u>E S P E C I E</u>	<u>D O S I S</u>	<u>DURANCION DEL TRATAMIENTO</u>	<u>PERIODO DE OBSERVACION</u>	<u>INCIDENCIA</u>
Rata Fischer	1.0 ppm en dieta	34 semanas	52 semanas	3 / 6
Rata Fischer	1.0 ppm en dieta	41 - 64 semanas	41 - 64 semanas	18 / 21
Rata Fischer	55 ppm en dieta	71 - 97 semanas	71 - 97 semanas	20 / 25
Rata Porton	1.0 ppm en dieta	20 semanas	90 semanas	19 / 30
Rata Wiston	1.0 ppm en dieta	21 semanas	87 semanas	12 / 14
Ratón Suizo	150 ppm en dieta	20 semanas	20 meses	0 / 60
Mono Rhesus (M)	1.655 g	5.5 años	8 años	1 / 1
Mono Rhesus (F)	1.655 g	5.5 años	10.75 años	1 / 1
Pato	30 ppb en dieta	14 meses	14 meses	8 / 11
Trucha Arcoiris	4 ppb en dieta	12 meses	12 meses	15 %
Salmón	12 ppb en dieta	20 meses	20 meses	50 %

ta la identificación entre estas aflatoxinas.

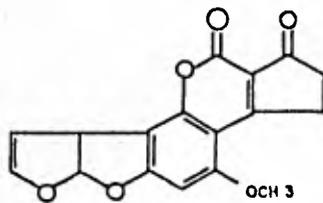
Las aflatoxinas M se han encontrado en leche de vaca cuando los animales han ingerido alimentos contaminados con aflatoxinas del grupo B (14). La leche contaminada cuando es ingerida por patos tiene efectos similares a los causados por las aflatoxinas del grupo B (5). Estos metabolitos se han encontrado también en la orina de animales incluyendo el hombre (15).

Las aflatoxinas B_{2a} y G_{2a} son derivados que tienen un grupo hidroxilo en la posición C-2 del anillo de furano y -- son hemicetales respectivamente de B₁ y G₁, como se observa en las figuras 4 y 5. Cuando son aplicados a animales de experimentación son virtualmente no tóxicos. Siendo de 60 a 100 veces mayor la dosis letal requerida en patos en relación a la aflatoxina B₁. La formación de este derivado puede constituir un proceso de destoxificación. Estas se pueden formar durante el aislamiento de la B₁ con metanol o etanol en presencia de cloroformo (6).

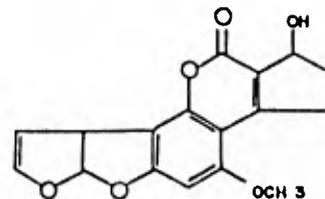
La formación de las aflatoxinas B_{2a} y G_{2a} pueden ser usadas como una prueba confirmativa para la identificación de aflatoxinas B₁ y G₁ formándolas sobre la cromatoplaaca con ácido trifluoroacético, ácido fórmico o ácido tricloaceti

co, el valor de Rf de este derivado resulta menor al de la aflatoxina original.

El aflatoxicol es un derivado formado por varios hongos, - por reducción enzimática del grupo funcional carbonil del anillo de la ciclopentanona de la aflatoxina B₁ por medio de una enzima citoplasmática NADPH dependiente. Es un metabolito importante porque en especies animales, incluyendo al hombre, se forma por reducción enzimática y estas mismas enzimas hacen reversible la reacción para formar aflatoxina B₁. De aquí que puede actuar como reservorio para la -- formación de aflatoxinas B₁ (6).



Aflatoxina B₁



Aflatoxicol

FIGURA 6

2.6. INACTIVACION DE AFLATOXINAS

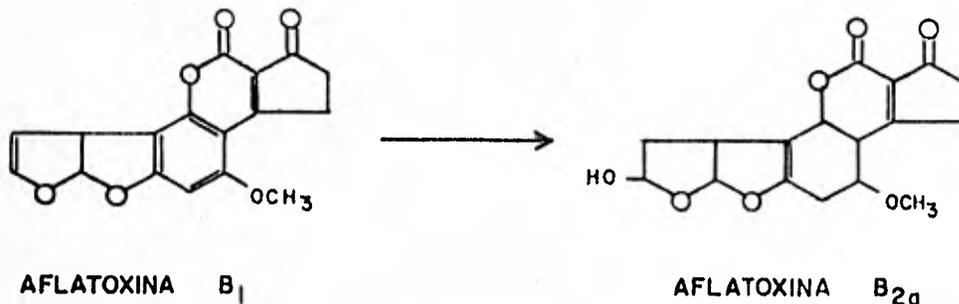
Algunos métodos han sido utilizados para la inactivación de aflatoxinas en productos agrícolas basándose en la estructura de las aflatoxinas.

El mecanismo de reacción de la inactivación no se ha establecido y sólo se pueden hacer postulados.

2.6.1. ACIDOS

La habilidad de los ácidos fuertes en soluciones acuosas para destruir la actividad biológica de las aflatoxinas B₁ y G₁ es debido a la adición catalítica de agua al doble enlace terminal en el anillo de la lactona. Los hemiacetales formados por la adición de agua son las aflatoxinas B_{2a} y G_{2a} (15).

FIGURA 7



Otros grupos como el metil eter y los grupos eter furano - pueden también ser vulnerables a ácidos fuertes como el -- clorhídrico.

Después de un calentamiento a 100°C por 10 minutos a pH de 1, un 95% de aflatoxina B₁ es convertida en aflatoxina B_{2a}, mientras que a Ph de 3 y la misma temperatura fueron necesarias 7 horas para tener la misma conversión (16). Por lo tanto una alta concentración de ácidos minerales y temperaturas elevadas son requeridas para obtener aflatoxina B_{2a} (17).

Cabe indicar, sin embargo, que este procedimiento no resulta práctico para la inactivación de grandes cantidades de productos agrícolas, ya que se necesitan condiciones muy drásticas para la conversión de aflatoxinas B₁ y G₁, además de que cuando están presentes las aflatoxinas B₂ y G₂, éstas no se ven afectadas de manera importante por este -- tratamiento.

En un intento por encontrar un mecanismo de inactivación - apropiado para grandes volúmenes de granos, se procedió a evaluar los cambios cuantitativos de las aflatoxinas por - medio de las fermentaciones lácticas. Sin embargo, el ácido producido durante el ensilado del maíz no inactivó la -

aflatoxina B₁, la cantidad de acidez obtenida en la fermentación láctica del maíz fue insuficiente para la inactivación (18).

2.6.2. BASES

Se ha demostrado que el uso de bases orgánicas e inorgánicas permiten una eficiente destrucción o arrastre de aflatoxinas en grandes cantidades de productos agrícolas contaminados (5).

En el tratamiento de harina de cacahuete con una humedad de 30% con metilnamina al 1.25% el contenido total de aflatoxinas se reduce a 5 ug/kg cuando la harina es calentada a 100°C por 90 minutos. Sin embargo, se encontró que la lisina disponible era baja y el valor del PER (relación de eficiencia de la proteína) era reducido en las harinas tratadas (19).

El amoníaco como agente inactivador a elevada temperatura y presión dió una reducción de cerca del 95 - 98% de aflatoxinas en harina de cacahuete. Estos niveles de reducción indican casi la completa destrucción de B₁ y G₁ o valores de menos de 5 ug/kg (19, 20).

Una harina de cacahuate con 68 ug/kg de B₁ y 113 ug/kg de aflatoxina total y 22% de humedad fue cocida con hidroxido de sodio al 2%, la aflatoxina B₁ se redujo y se observó -- una reducción a 11 ug/kg y a 18 ug/kg de aflatoxina total. Cuando se coció con hidroxido de sodio al 2% y con 30% de humedad, solamente quedaron trazas de B₁, la B₂ no fue detectable y de G₁ se detectó 4 ug/kg.

2.6.3. AGENTES OXIDANTES

Hay varios sistemas de óxido-reducción que destruyen la actividad toxicológica de las aflatoxinas B₁ y G₁ pero no de B₂ y G₂ (20). De los sistemas oxidantes que destruyen todas las aflatoxinas solamente el peróxido de hidrógeno ha mostrado inactivarlas en los alimentos, el cambio en el valor del PER es mínimo (5, 21).

Calentando la harina de cacahuate y de algodón que contienen 22% de humedad por 2 horas a 100°C en presencia de -- aire y oxígeno, se redujo el nivel de aflatoxinas en un 67 - 76%. En condiciones similares aire ozonizado destruyó -- completamente las aflatoxinas B₁ y G₁ en una hora. Este -- tratamiento tuvo el inconveniente de que no redujo el nivel de aflatoxina B₂ y redujo la cantidad de lisina disponible así como el valor del PER (19).

El grupo cetona del anillo de ciclo pentanona de las aflatoxinas B₁ y B₂ puede ser oxidado o reducido por agentes - electrolíticos. Esto no sucede con las aflatoxinas G₁ y G₂ (5).

Si se analizan los efectos de los tratamientos de inactivación descritos, el inconveniente que presentan es el de -- que no destruyen totalmente las aflatoxinas y algunos disminuyen el PER, resultando los alimentos tratados por este - medio de mala calidad nutricional, y altamente riesgosos - para su consumo.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

3.1. COMPARACION DE METODOS DE IDENTIFICACION DE AFLATOXINAS.

De los métodos reportados en la bibliografía se hizo una selección con base en la forma de separación y purificación de las aflatoxinas. Se probaron 5 métodos los cuales eran los más representativos y sugerían ser los más adecuados para cereales, especialmente maíz.

Para la selección y la comparación de los métodos de identificación se utilizó maíz contaminado con aflatoxinas, donado por el Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

En el primer método de identificación (22) se efectuaron varias extracciones con diferentes solventes para eliminar interferencias de impurezas en el extracto y la separación se llevó a cabo en placa fina bidimensional, para eliminar interferencias de impurezas en el extracto. La desventaja del método fue la resolución que resultó poco satisfactoria y las manchas poco claras.

En el segundo método (23) las aflatoxinas fueron extraídas

de la muestra con diferentes solventes y purificadas a --
través de una columna de alumina y silica gel utilizando -
un sistema de solventes apropiado para la elución selecti-
va de las micotoxinas. La extracción se efectuó con cloro-
formo - acetona. El residuo fué evaporado, redissuelto y --
aplicado en una cromatoplaça. La desventaja en este método
fué evidente cuando el extracto fué aplicado en la cromato
plaça, resultando manchas no bien definidas.

El tercer método (24) fué simple y rápido y consistió en -
hacer diferentes extracciones. El extracto obtenido fue ab
sorbido por capilaridad en una minicolumna de alúmina áci-
da y silical gel. La principal desventaja que presentó és-
te método fué que no hubo una separación bien definida en-
tre las aflatoxinas, siendo difícil la identificación.

El cuarto método (25), consistió en extracciones sucesivas
tomadas de manera parcial, haciéndose una purificación con
una gel de sulfato ferroso. La identificación se hizo en -
cromatografía en capa fina. La desventaja que presentó fue
que la intensidad de las manchas resultó muy tenue siendo
éste método aplicable cuando hay altas concentraciones de
aflatoxinas.

El quinto método (26) consistió en hacer la extracción ex-

haustiva con metanol - agua, hexano como desengrasante y - una solución saturada de cloruro de sodio para romper las células remanentes del extracto. Las aflatoxinas fueron recuperadas de manera selectiva con cloroformo. El extracto fue posteriormente purificado con carbonato cúprico para - remover pigmentos, lípidos o carbohidratos residuales. La separación e identificación se llevó a cabo por cromatografía en capa fina, usando como sistema desarrollador tolueno / acetato de etilo / acetona. Con este procedimiento -- las manchas resultaron bien definidas.

El método anterior presentó la mejor separación y resolución de las manchas, por lo que de acuerdo a las necesidades de experimentación fué el seleccionado para este trabajo.

3.2. DESCRIPCION DEL METODO RAPIDO PARA IDENTIFICACION DE AFLATOXINAS EN EL MAIZ (26) .

3.2.1. EQUIPO

- a) Licuadora Osterizer.
- b) Matraz Kitaza to.
- c) Buckner de 10 cm de diámetro.
- d) Papel filtro de poro abierto.

- e) Embudo de cola corta.
- f) Papel filtro de poro cerrado.
- g) Rotavapor BUCHI No. 113048.
- h) Cromatoplaça de 20 x 20 cm, con silica gel GF 254.
- i) Microjeringa de 10 ul para cromatografía en capa fina.
Hamilton Co. No. 701.
- k) Cámara de desarrollo 22 x 23 x 8 cm. Camaç.
- l) Lámpara de luz ultravioleta de onda larga marca Blak
Ray, San Gabriel Calif.

3.2.2. REACTIVOS

- a) Solventes extractor, metanol - agua (60 / 40, v/v, reac
tivo analítico, agua desionizada. J.T. Baker.
- b) Solución saturada de cloruro de sodio. Química J V C.
- c) Hexano, reactivo analítico, Técnica Química, S.A.

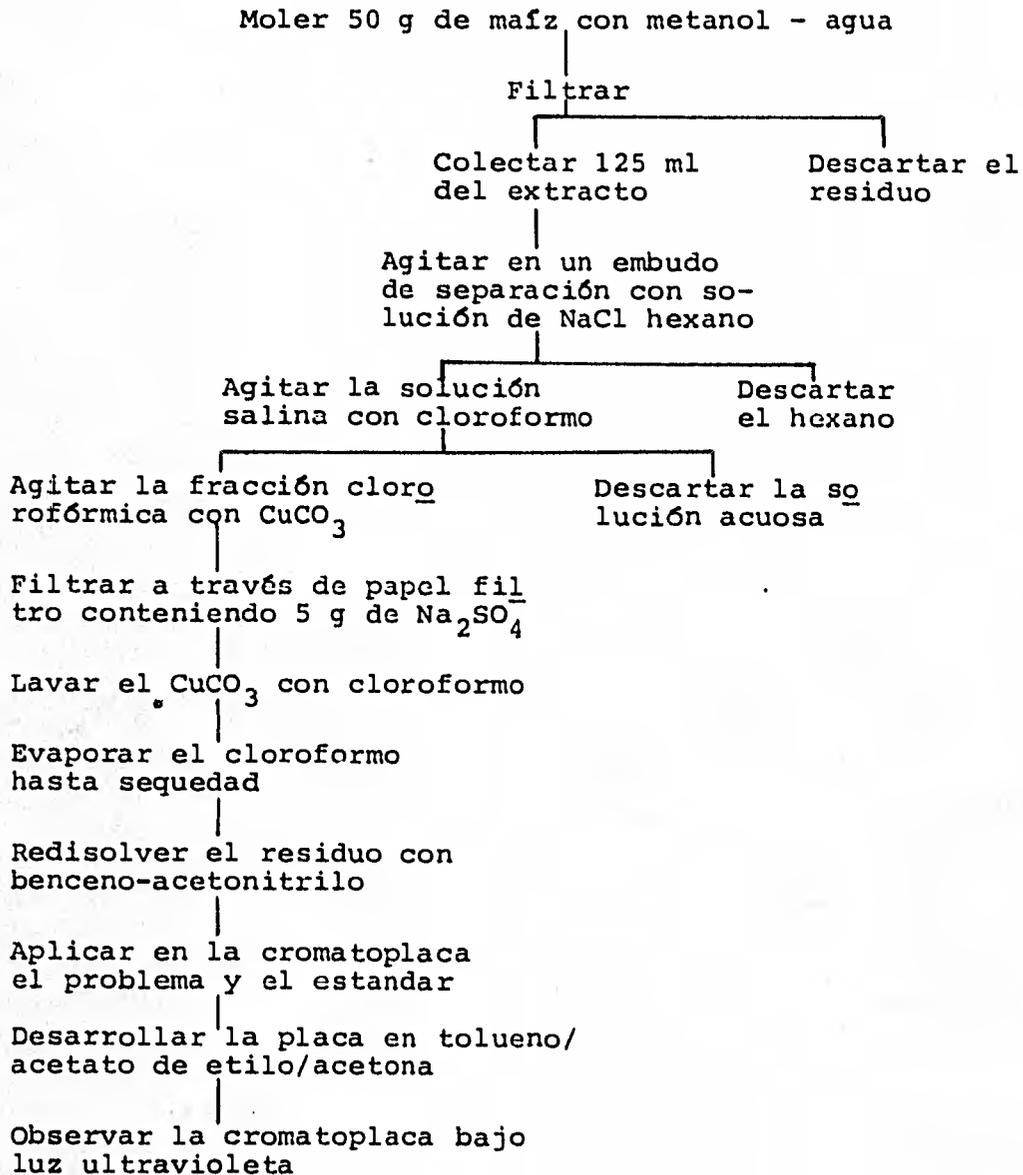
- d) Cloroformo, reactivo analítico. J. T. Baker.
- e) Sulfato de sodio anhidro. J.T. Baker.
- f) Carbonato cúprico. Mallinkrodt.
- g) Disolvente, benceno - acetonitrilo (98/2, v/v) reactivo analítico. J.T. Baker.
- h) Estandares de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. Supelco Inc. 1 ug/ml B₁, G₁ y 0.3 ug/ml B₂ y G₂. Solvente benceno / acetonitrilo (98/2, v/v).
- i) Sistema desarrollador, tolueno / acetato de etilo / acetona (3/2/1, v/v/v), reactivo analítico. Técnica Quimica / J.T. Baker / Monterrey.

3.2.3. PROCEDIMIENTOS

El procedimiento usado en la extracción, purificación e --
identificación se muestra en el Cuadro II.

C U A D R O II

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION, PURIFICACION E IDENTIFICACION



Moler en licuadora 50 g de la muestra durante 3 minutos -- con 250 ml de metanol / agua. Filtrar el extracto a través de papel filtro de poro ancho, con ayuda de vacio, coleccionar 125 ml del filtrado. Transferir a un embudo de separación de 250 ml, añadir 30 ml de solución saturada de cloruro de sodio y 50 ml de hexano, agitar un minuto, dejar reposar. Transferir la fase acuosa a un segundo embudo de separación con 50 ml de cloroformo, agitar y dejar reposar. Transferir el cloroformo a un matraz Erlen/meyer de 125 ml que contenga 5 g de carbonato cúprico hasta que se mezcle bien, dejar asentar el carbonato cúprico y decantar el cloroformo a través de un papel filtro de poro cerrado conteniendo 5 g de sulfato de sodio anhidro. Lavar el carbonato cúprico con 25 ml de cloroformo y filtrar a través del -- sulfato de sodio. Evaporar el cloroformo en rotavapor sin calor hasta cerca de sequedad bajo corriente de nitrógeno.

Activar la cromatoplaca de silica-gel 1 hr. a 80°C en estufa.

Añadir 500 ul de benceno-acetonitrilo a la muestra y agitar vigorosamente hasta disolver el residuo. Aplicar 10 ul del extracto en la cromatoplaca y en la misma aplicar 10 ul del estandar de aflatoxinas.

Poner en la cámara desarrolladora 100 ml de tolueno/aceta-
to de etilo/acetona, insertar la placa y sellar la cámara.
Mantener la cámara en la oscuridad durante el desarrollo.
Cuando el solvente ascienda hasta 7/8 de la placa sacarla
y dejarla secar.

Observar la cromatoplaça ya seca bajo luz ultravioleta de
onda larga. Identificar las 4 manchas del estandar de afla
toxinas y compararlas con las muestras problema.

3.3. INOCULACION DEL MAIZ

3.3.1. EQUIPO

- a) Garrafón Pyrex de 20 lt.
- b) Autoclave.
- c) Incubadora a 36 - 37 °C.

3.3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Maíz cristalino híbrido H-28 cosecha 1978, donado por -
la Escuela Nacional de Agricultura Chapingo, Estado de
México.
- b) Cepa pura de Aspergillus flavus, proporcionada por el -

Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

3.3.3. PROCEDIMIENTO

El maíz limpio se rompió parcialmente para que el crecimiento del A. flavus fuera más rápido. La humedad se ajustó a 50% con agua destilada. Posteriormente se esterilizó en autoclave 30 minutos a 121°C.

Una vez que el maíz estuvo a temperatura ambiente se inoculó con el A. flavus, que originalmente creció en granos de maíz. Se incubó a 36 - 37 °C. Se efectuó periódicamente una prueba en la cual se evaluó la intensidad de las manchas en capa fina, resultando la máxima producción de aflatoxinas en un período de 15 días.

Para detener el crecimiento del A. flavus y la producción de aflatoxinas se esterilizó a 121 °C durante 30 minutos, se guardó en refrigeración y en la oscuridad.

3.4. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS

3.4.1. EQUIPO

a) Espectrofotometro PYE UNICAM sp 30 U.V.

3.4.2. REACTIVOS

a) Benceno-acetonitrilo (98/2, v/v) R.A. J.T. Baker.

3.4.3. MATERIAL BIOLÓGICO

a) Extractos secos obtenidos en 3.2.

3.4.4. PROCEDIMIENTO

Una vez identificada por cromatografía la presencia de - - aflatoxinas en el maíz inoculado se procedió a su cuantificación.

Inicialmente se intentó la cuantificación por raspado de - la cromatoplaaca utilizada en la identificación. Se extrajeron las aflatoxinas con benceno/acetonitrilo. Se midió su absorbancia a 350 nm, sin embargo, no fué posible detectar las aflatoxinas debido a su baja concentración (23).

Debido a las dificultades presentadas, se procedió a cuantificar el contenido de aflatoxinas por el método reportado en el AOAC (27), el cual consiste en la medición direc-

ta del extracto de benceno / acetonitrilo obtenido en el -
paso previo a la cromatografía, en el espectrofotómetro a
350 nm utilizando como blanco benceno / acetonitrilo. Se -
buscó la dilución adecuada.

La concentración de aflatoxina se determinó de acuerdo a -
la siguiente fórmula :

$$\text{ug aflatoxina / ml} = \frac{(\text{A} \times \text{PM} \times 1000 \times \text{factor de corrección})}{\text{E}}$$

donde :

A : absorbancia del problema 350 nm.

P.M : 312 (la concentración total de aflatoxinas se repor-
ta como aflatoxina B₁)

E : Extinción 19,800

Factor de corrección (23) : 1

El factor de corrección se obtiene al calibrar el espectro
fotómetro de la siguiente manera : determinar la absorban-
cia de 3 soluciones de K₂Cr₂O₇ (0.4, 0.2 y 0.1 mM) en - -
H₂SO₄ 0.016N a una longitud de onda de 350 nm, usando como

blanco H_2SO_4 0.016N. Calcular el coeficiente de extinción (e) para cada concentración ;

$$e = \frac{A \times 1000}{\text{concentración en mM,}}$$

obtener el promedio de los 3 valores \bar{e} para determinar - el factor de corrección :

$$F_c = \frac{3160}{\bar{e}}$$

donde : 3160 es el valor de E para el $K_2Cr_2O_7$.

3.5. DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS DURANTE EL PROCESO DE NIXTAMALIZACION Y ELABORACION DE TORTILLAS

3.5.1. EQUIPO

- a) El mismo usado en 3.2.1. y en 3.4.1.
- b) Prensa manual y casera para hacer tortillas.
- c) Comal.

d) Estufa de gas Across.

e) Termobalanza OHAUS Modelo 6010.

3.5.2. REACTIVOS

a) Los mismos que en 3.2.2.

b) Hidróxido de calcio

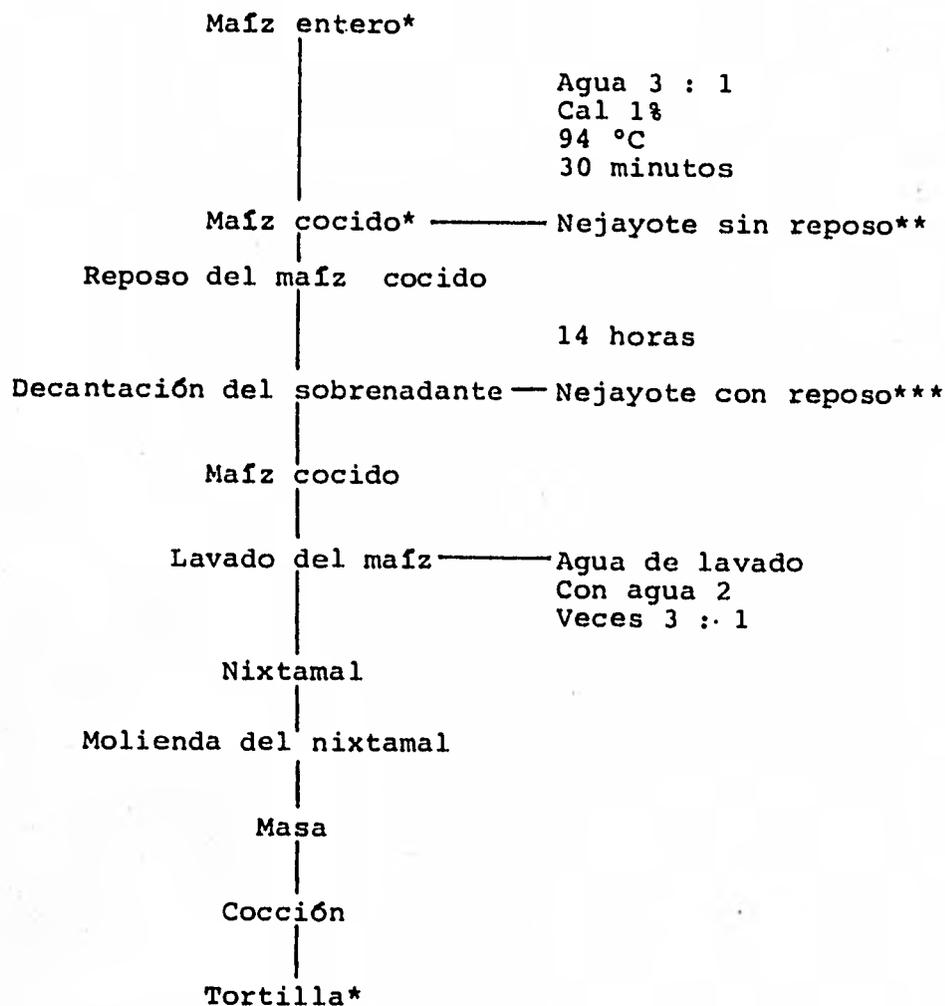
3.5.3. MATERIAL BIOLÓGICO

a) Maíz contaminado con aflatoxinas en 3.3.

3.5.4. PROCEDIMIENTO

Se tomó una muestra de 300 g del maíz contaminado con aflatoxinas y se homogenizó. Posteriormente se muestreo y se tomaron 50 g de la muestra para determinar los niveles iniciales de aflatoxinas. A 10 g del mismo lote se le determinó la humedad. Se procedió a nixtamalizar los 240 g restantes como se muestra en el cuadro.

PUNTOS DE MUESTREO DURANTE EL PROCESO



* Se determinaron los niveles de aflatoxinas según el método 3.4., tomando 50 g del material correspondiente en cada paso y 10 g para determinar la humedad de la misma.

** Se tomó una muestra proporcional a la cantidad de maíz tomada para la determinación de aflatoxinas correspon--

diente al maíz cocido. De esta muestra se tomó una alícuota de 150 ml y se efectuó la determinación de aflatoxinas según el procedimiento 3.4.4. modificando el solvente extractor, el cual se sustituyó la parte acuosa -- por la parte alícuota de la muestra.

*** Se combinó el nejayote y el agua de lavado, se mezclaron, se tomaron 150 ml y se procedió a la determinación de -- aflatoxinas de acuerdo al procedimiento 3.4.4. modificando el solvente extractor como se hizo en la determinación de nejayote sin reposo.

3.6. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DIGERIDA IN VITRO

3.6.1. EQUIPO

- a) El mismo usado en 3.2.1. y en 3.4.1.
- b) Agitador con incubador ambiental G 24 New Brunswick Sci. Co.
- c) Material de vidrio.

3.6.2. REACTIVOS

- a) Pepsina Sigma (actividad 1 : 10,000)
- b) HCl 0.075 N. J.T. Baker.

3.6.3. MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Tortilla elaborada según el punto 3.5.

3.6.4. PROCEDIMIENTO

Se pesó 1 g de la muestra y se colocó en un vaso, se añadió 150 ml de solución de pepsina - HCL 2% recientemente preparada y precalentada a 42 - 45 °C. Se tapó el vaso y se colocó en agitación continua durante 16 horas a una temperatura de 45 °C \pm 1 °C.

3.7. PRUEBAS CONFIRMATIVAS

3.7.1. EQUIPO

- a) Cromatoplaaca de 20 x 20 cm., con silica gel G F 254.
- b) Plantilla de aplicación. CAMAG. IEA No. 2732 B 28.
Spotting guide.
- c) Microjeringa de 10 ul. Hamilton Co., No. 701.
- d) Cámara de desarrollo 22 x 23 x 8 cm.
- e) Lámpara de luz ultravioleta, Blak - Ray, San Gabriel, Col.
- f) Estufa a 35 - 40 °C. Marca Felisa.

3.7.2. REACTIVOS

- a) Estadares de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂. Supelco Inc.
- b) Acido tricloroacético al 10% (TCA). R.A. J.T. Baker.

c) Solvente revelador, tolueno / acetato de etilo / acetona (3/2/1, v/v/v). Técnica Química / J.T. Baker / Monterey.

3.7.3. MATERIAL BIOLÓGICO

a) Extractos en benceno / acetonitrilo obtenidos en 3.5., mismos que fueron utilizados para la cuantificación e identificación de aflatoxinas.

3.7.4. PROCEDIMIENTO

3.7.4.1. FORMACION DE DERIVADOS

Se dividió la placa en 2 partes. En la primera parte se aplicaron los extractos problemas y el estandar directamente sobre las aplicaciones adicionaron 5 ul de TCA. Se dejó reaccionar 5 minutos y se calentó la placa durante 10 minutos a 35 - 40 °C. En la segunda parte de la placa se aplicaron de nuevo los mismos extractos y el estandar. La placa se desarrollo en tolueno / acetato de etilo / acetona. La observación se realizó bajo luz ultravioleta de onda -- larga (12).

3.7.4.2. ESTANDAR INTERNO

Esta técnica consistió en aplicar 10 ul del extracto problema sobre la placa y sobre este punto se aplicaron 10 ul del estandar. También se aplicaron sobre la misma placa el extracto problema y el estandar de manera independiente. - La placa se desarrollo en el sistema tolueno /acetato de etilo / acetona. Finalmente se observó la placa bajo luz ultravioleta.

RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación de aflatoxinas, así como - la discusión.

4.1. IDENTIFICACION DE AFLATOXINAS DURANTE EL PROCESO DE - LA NIXTAMALIZACION.

La identificación de aflatoxinas se llevó a cabo por análisis cromatográfico en capa fina con ayuda de estándares de las 4 aflatoxinas principales, B₁, B₂, G₁ y G₂. La identificación se realizó por simple comparación como se ve en - la Figura 8.

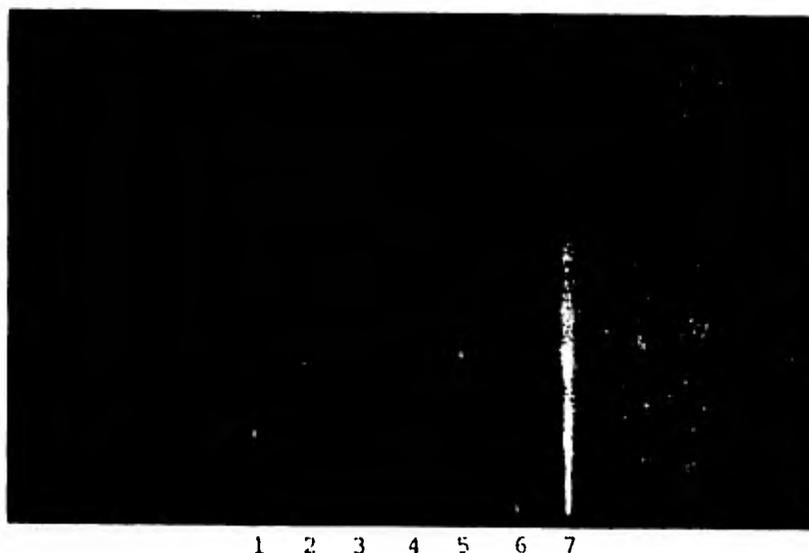


FIGURA 8

Identificación por comparación de aflatoxinas

Donde :

- 1.- M.I. Mafz inicial.
- 2.- Nx C/R Nixtamal con reposo.
- 3.- Nj C/R Nejayote con reposo.
- 4.- St. Estandar de aflatoxinas, B₁, B₂, G₁, G₂
con Rf 0.45, 0.40, 0.35, 0.30 respecti-
vamente.
- 5.- Nx S/R Nixtamal sin reposo.
- 6.- Nj S/R Nejayote sin reposo.
- 7.- T Tortilla

Al analizar los resultados de la Figura 8 correspondientes al extracto de la tortilla se pueden observar una serie de manchas fluorescentes que interfieren de manera significativa en la determinación visual. Estos compuestos probablemente son producto de obscurecimiento de tipo no enzimático de las reacciones que se llevan a cabo durante la cocción de la tortilla.

La cuantificación se llevó a cabo por el método espectrofotométrico antes mencionado, el resultado se expresó como aflatoxinas B₁, ya que es la que se encuentra en mayor cantidad. Cabe señalar que las longitudes de onda entre las aflatoxinas son muy cercanas, haciendo difícil la cuantificación espectrofotométrica por separado.

Para conocer, la cantidad de aflatoxinas en el maíz inicial efectuaron varias determinaciones, encontrándose en valor promedio de 3.72 ppm. La variabilidad en la cantidad inicial fue debida a que el crecimiento del Aspergillus flavus no fue homogéneo en el maíz, y esto provocó que la cantidad de aflatoxina presente no fuera constante en todo el cereal (8).

En la Tabla III se expresan los resultados de las determinaciones efectuadas en el maíz inicial, en la cual se puede observar la dispersión en cuanto al contenido inicial de aflatoxinas.

	3.85 ppm
	4.69 ppm
	3.37 ppm
	3.16 ppm
	4.16 ppm
	4.61 ppm
	4.52 ppm
	2.89 ppm
	2.97 ppm
	2.93 ppm
	<hr/>
P r o m e d i o	3.72 ppm
Deviación estandar	0.74

T A B L A I I I

Contenido de aflatoxinas en el maíz original

4.3. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN EL NIXTAMAL Y NEJAYOTE.

Resultados correspondientes al contenido de aflatoxinas en el nixtamal y en el nejayote inmediatamente después de la cocción por 30 minutos con 1% de cal; es decir sin reposo.

	<u>MAIZ</u>	<u>NIXTAMAL</u>		<u>NEJAYOTE</u>		<u>DESTRUCCION</u>	
	<u>INICIAL</u>	ppm	%	ppm	%	ppm	%
	4.36	2.13	48.85	1.45	33.26	0.78	17.89
	4.88	2.77	56.76	1.44	29.51	0.67	13.73
	4.34	2.17	50.00	1.61	37.10	0.56	12.90
	3.56	1.61	45.22	1.37	38.48	0.58	16.29
	3.09	1.48	47.90	1.14	36.89	0.47	15.21
	4.18	2.18	52.15	0.99	23.68	1.01	24.16
	4.10	1.91	46.59	1.29	31.46	0.90	21.95
	4.22	2.60	61.61	1.08	25.59	0.54	12.80
Promedio	4.09	2.11	51.14	1.30	32.00	0.69	16.87
Desviación estandar	0.54	0.44	5.54	0.21	5.48	0.19	4.23

T A B L A IV

Contenido de aflatoxinas en nixtamal y nejayote.

Al analizar los resultados anteriores se observa que :

1.- El nixtamal después de lavado conservó 51.1% de aflatoxinas.

2.- Se detectaron 32% de aflatoxinas en el nejayote y agua de lavado, es decir que fueron arrastradas del maíz durante la operación de lavado.

3.- El 16.87% restante no fue detectable por las técnicas analíticas empleadas por lo que se consideraron destruidas por el tratamiento térmico - alcalino.

4.4. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN EL NIXTAMAL CON 14 HORAS DE REPOSO.

Al determinar la cantidad de aflatoxinas en el nixtamal y en el nejayote con 14 horas de reposo se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla V.

	<u>MAIZ INICIAL</u>		<u>NIXTAMAL</u>		<u>NEJAYOTE</u>		<u>DESTRUCCION</u>	
	ppm		ppm	%	ppm	%	ppm	%
	2.93		1.14	38.91	1.54	52.56	0.25	8.53
	3.02		1.33	44.04	1.45	38.01	0.24	7.95
	4.36		2.15	49.31	1.41	32.34	0.80	18.35
	4.88		2.42	49.59	1.77	36.27	0.69	14.14
	4.34		2.12	48.85	1.53	35.25	0.69	15.90
	3.56		1.65	46.35	1.27	35.67	0.64	17.98
	3.09		1.38	44.66	1.18	38.19	0.53	17.15
	4.92		2.34	47.56	1.74	35.37	0.84	17.07
	4.78		2.70	56.49	1.42	29.71	0.66	13.81
	3.26		1.62	49.69	1.10	33.74	0.54	16.56
	4.18		2.06	49.28	1.10	26.32	1.02	24.40
	4.10		1.91	46.59	1.02	24.88	1.17	28.54
	3.88		2.18	56.19	0.94	24.23	0.76	19.59
	3.65		1.94	53.15	0.92	25.21	0.79	21.61
	4.22		2.22	51.61	1.03	24.41	0.97	22.94
Promedio	3.94		1.94	48.88	1.29	33.48	0.71	17.63
Desviación estandar	0.67		0.44	4.62	0.28	8.42	0.26	5.46

TABLA V

Contenido de aflatoxinas en nixtamal y nejayote con reposo

Con los resultados de la Tabla V se puede observar que :

- 1.- El nixtamal conservó 48.8% de aflatoxinas después de haber sido sometido al proceso térmico-alkalino y 14 horas de reposo a pH 11.
- 2.- En el nejayote y agua de lavado se detectaron 33.5% - de aflatoxinas que fueron arrastradas del maíz durante el lavado.
- 3.- El resto de las aflatoxinas 17.64% no fueron detectadas por lo que se consideran destruidas.

4.5. CAMBIOS DURANTE EL REPOSO

Al hacer el análisis de resultados de las Tablas IV y V, podemos observar que no hay diferencia entre los resultados obtenidos en el nixtamal y nejayote antes y después - de la operación de reposo.

Asimismo se puede decir que la destrucción de las aflatoxinas se llevó a cabo durante el tratamiento térmico-alkalino con 1% de cal por 30 minutos, ya que la destrucción durante el reposo demostró ser mínima. Datos similares -- fueron obtenidos por Rosiles (28) en estudios llevados a -

cabo en granos contaminados tratados con diferentes concentraciones de alcali, reportando que no hubo diferencia en la concentración de aflatoxinas, a diferentes porcentajes de alcali, y donde la destrucción se llevó a cabo durante el calentamiento.

La pérdida principal, como se pudo observar en los resultados, fue debida al desprendimiento del pericarpio del maíz durante la operación de cocción, ya que en esa estructura del cereal se acumula la mayor cantidad de aflatoxinas. Esto trae como consecuencia que la mayor proporción de esta pérdida sea encontrada en el nejayote y agua de lavado.

En la figura 8, se puede ver claramente que la intensidad del extracto de nixtamal con reposo es similar a la intensidad del extracto de nixtamal sin reposo y ambos son mayores a las intensidades de los dos extractos de nejayote.

Para conocer si estadísticamente había diferencia significativa entre la cantidad de aflatoxinas en el nixtamal con reposo (C/R) y el nixtamal sin reposo (S/R) y entre el nejayote C/R, y el nejayote S/R se hizo un análisis de varianza que se presenta en la Tabla VI, donde se comparan las muestras (M) y los tramientos (T).

El análisis de varianza se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente forma (29) :

1.- Factor de corrección, FC

$$FC = \frac{(\text{total})^2}{\text{No. de resultados}}$$

2.- Suma del cuadrado de los tratamientos, SCT

$$SCT = \frac{\text{suma del cuadrado del total para cada tratamiento}}{\text{No. de resultados para cada tratamiento}} - FC$$

3.- Suma del cuadrado de las muestras, SCM

$$SCM = \frac{\text{Suma del cuadrado del total por cada muestra}}{\text{No. de resultados para cada tratamiento}} - FC$$

4.- Suma total del cuadrado, STC

$$STC = \text{Suma de los cuadrados para cada resultado} - FC$$

5.- Grados de libertad GL.

a) Para los tratamientos es el número de tratamientos menos

uno.

b) Para las muestras es el número de muestras menos uno.

c) El grado de libertad total es el número de resultados menos uno.

6.- Error; para determinar el error de los GL se restan - los valores obtenidos al total. Para determinar el error del SC se restan los valores obtenidos para las otras variables del total.

7.- El cuadrado significativo para cada variable; CM. Se determina dividiéndose el SC de cada uno de su respectivo grado de libertad.

8.- El radio de variación F o F para cada muestra. Se determina dividiéndose el CM de cada tratamiento - entre el CM error. El F para las muestras se determi- na dividiendo su CM entre el CM error.

Para determinar si hay diferencia entre las muestras y entre los tratamientos y si ésta es significativa, el valor calculado de F se compara en tablas, con diferentes gra-- dos de confiabilidad.

Si la F calculada es menor a la F de tablas no hay diferen- cia significativa, por el contrario la F calculada es ma-- yor a la de la tabla, si hay diferencia estadísticamente - significativa (29).

<u>MAIZ INICIAL</u>	<u>NIXTAMAL C/R</u>		<u>NIXTAMAL S/R</u>	
ppm	ppm	%	ppm	%
4.36	2.15	49.31	2.13	48.85
4.88	2.42	49.59	2.77	56.76
4.34	2.12	48.85	2.17	50.00
3.56	1.62	45.51	1.62	45.22
3.09	1.38	44.66	1.48	47.90
4.18	2.06	49.28	2.18	52.15
4.10	1.91	46.59	1.91	46.59
4.22	2.22	52.61	2.60	61.61

Fc : 39549.28; SCT : 32.15; SCM : 217.26; STC : 293.64

	GL	SC	CM	FC	Ft5%	D	Ft1%	D
T	1	32.5	32.15	5.09	5.59	NO	12.25	NO
M	7	217.26	31.04	4.91	3.79	SI	20.00	NO
ERROR	7	44.23	6.32					
TOTAL	15	293.64						

MAIZ INICIAL ppm	NEJAYOTE C/R ppm	%	NEJAYOTE S/R ppm	%
4.36	1.41	32.10	1.45	33.26
4.88	1.77	36.27	1.44	29.51
4.34	1.53	35.25	1.61	37.10
3.56	1.27	35.67	1.37	38.48
3.09	1.18	38.19	1.14	36.89
4.18	1.10	26.32	0.99	23.68
4.10	1.02	24.88	1.30	31.46
4.22	1.03	24.41	1.08	25.59

Fc : 16196 : 38; SCT : 0.52; SCM : 375.97; STC : 430.93

	GL	SC	CM	FC	Ft5%	D	Ft1%	D
T	1	0.52	0.52	0.07	5.59	NO	12.25	NO
M	7	375.07	53.58	6.78	3.79	SI	7.00	NO
ERROR	7	55.34	7.91					
TOTAL	15	430.93						

TABLA VI
Análisis de varianza

El análisis de varianza se hizo al 1 y al 5% de confiabilidad donde se puede observar que :

- 1) Al 1% de confiabilidad no hubo diferencia significativa entre las muestras ni entre los tratamientos.
- 2) Al 5% de confiabilidad hay diferencia significativa -- tanto en las muestras de nixtamal como en las muestras de nejayote, con lo que se confirma lo que se habfa dicho con respecto a la falta de homogeneidad en cuanto al contenido de micotoxinas en el maiz.
- 3) En el análisis con respecto a los tratamiento no se encontró diferencia significativa entre el nixtamal con reposo y el nixtamal sin reposo y tampoco hay diferencia entre el nejayote con reposo y el nejayote sin reposo, con lo que se confirma lo que se habfa dicho anteriormente de que la destrucción se lleva a cabo durante la cocción del maiz en el proceso de la nixtamalización.
- 4) Cabe señalar, además que el reposo en condiciones alcalinas tiene un efecto mínimo sobre las aflatoxinas.

4.6. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN LA TORTILLA

Al efectuar la cuantificación de aflatoxinas en la tortilla elaborada a partir del nixtamal con reposo se obtuvieron los siguientes resultados :

	<u>MAIZ INICIAL</u>		<u>NIXTAMAL</u>		<u>TORTILLA</u>		<u>DESTRUCCION</u>	
	ppm		ppm	%	ppm	%	ppm	%
	4.92		2.34	47.56	1.91	38.82	0.43	8.74
	4.78		2.70	56.49	1.72	35.98	0.98	20.50
	3.26		1.60	49.08	1.25	38.34	0.35	10.74
	4.18		2.06	49.28	1.57	37.56	0.49	11.72
	3.88		2.18	56.19	1.51	38.92	0.67	17.27
	3.65		1.94	53.15	1.51	41.37	0.43	11.78
	4.22		2.22	52.61	1.41	33.41	0.81	19.19
Promedio	4.13		2.15	52.05	1.55	37.77	0.59	14.28
Desviación estandar	0.59		0.34	3.54	0.21	2.52	0.23	4.61

TABLA VII

Contenido de aflatoxina en tortilla

De los resultados de la Tabla VI se puede observar que :

- 1) La tortilla elaborada con nixtamal con un contenido de aflatoxinas de 52.05% con respecto al maíz inicial conserva 37.77% de aflatoxinas.
- 2) De estos se puede afirmar que durante la cocción hubo una pérdida de 14.28%.
- 3) Sin embargo, la pérdida total fue de 62.23% de aflatoxinas con respecto al maíz inicial.

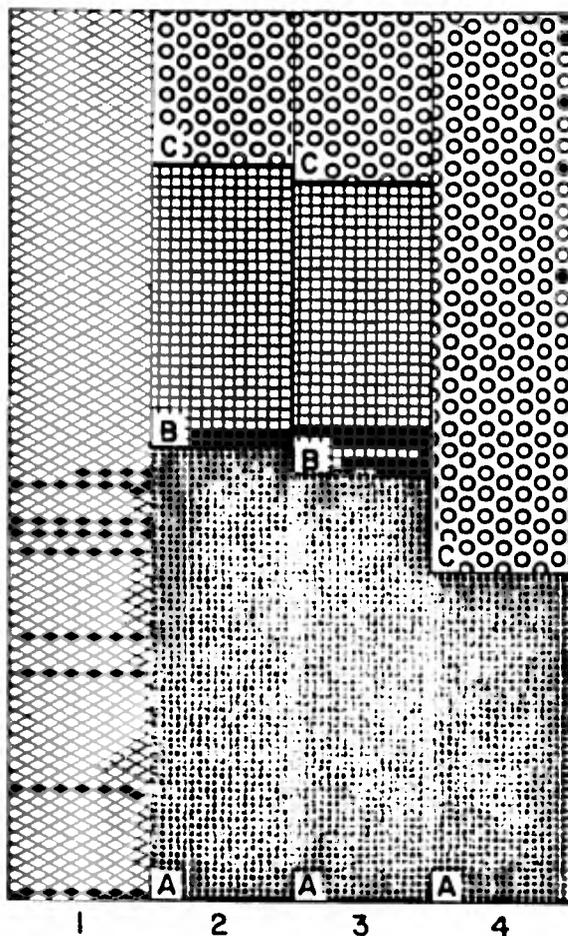
El resultado anterior indica que lo que afectó en mayor medida a las aflatoxinas fue el calentamiento, ya que durante el tratamiento térmico inicial del grano y en la cocción de la tortilla el contenido de aflatoxinas se vió disminuido.

4.7. CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN TORTILLA DIGERIDA - IN VITRO

Ulloa - Sosa (3) reportó que el tratamiento alcalino disminuye la intensidad de la fluorescencia de la aflatoxina B₁ y consecuentemente la concentración en el maíz pero propone que este efecto puede ser reversible cuando se

CUADRO IV

- 67 -



Donde :

- 1) Maíz inicial con 100% de aflatoxinas
- 2)
 - A - Nixtamal sin reposo con 51% de aflatoxinas
 - B - Nejayote sin reposo
 - C - Destrucción de aflatoxinas 17%
- 3)
 - A - Nixtamal con reposo con 48% de aflatoxinas
 - B - Nejayote con reposo
 - C - Destrucción 19% de aflatoxinas
- 4)
 - A - Tortilla con 37% de aflatoxinas
 - B - Destrucción de aflatoxinas 63%

trata el material con ácido. Sobre esta base, se efectuó una digestión, según el método del A.O.A.C. (27). Para digestibilidad de proteínas "in vitro" se sometió a la tortilla a pH ácido con enzimas tratando de simular las condiciones que se dan en el aparato digestivo del humano.

Los resultados obtenidos en esta parte no fueron satisfactorios, debido a que al efectuar la cuantificación espectrofotométrica a 350 nm los valores obtenidos fueron de magnitudes muy grandes, ésto seguramente fué efecto de la pepsina y las proteínas hidrolizadas, ya que estos compuestos absorben en la región cercana a 360 nm en el espectro.

Cabe señalar, que este efecto no se pudo evitar, aún con las mejoras y cuidados en la etapa de extracción.

Estos resultados se pueden observar en la Figura 10. Se

ve claro en el extracto correspondiente a la tortilla con digestión (5a. posición) que las manchas no fueron definidas, aparentemente por la formación de nuevos compuestos fluorescentes, aún más que en la tortilla sin tratamiento (Fig. 10, posición 4). Es necesario señalar que la cantidad de muestra utilizada para la prueba de digestibilidad "in vitro" fué menor con relación a las determinaciones rutinarias para el análisis de aflatoxinas.

4.8. PRUEBAS CONFIRMATIVAS

Para asegurar, que los resultados obtenidos por la técnica cromatográfica, fueron efectivamente confiables y adicionalmente eliminar posibles interferencias de otros compuestos fluorescentes, se hizo necesario usar dos pruebas confirmativas. Una, basada en la formación de derivados y la otra fundamentada en el uso de un estandar interno.

4.8.1. FORMACION DE DERIVADOS

Los resultados de la prueba de formación de derivados se muestran en la siguiente Figura 9 :

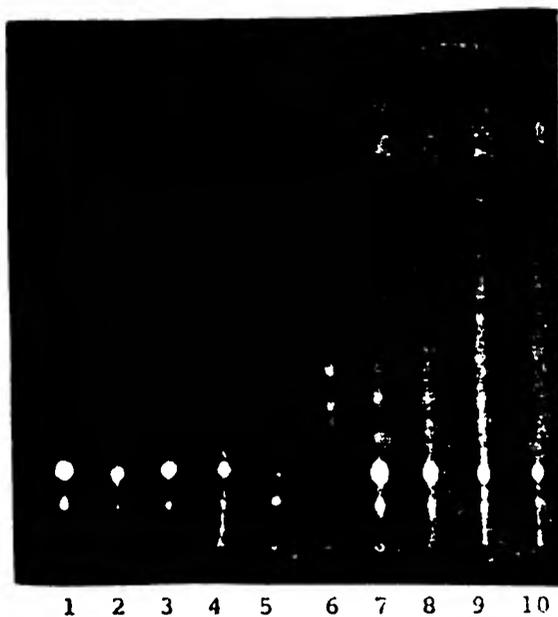


FIGURA 9

Formación de derivados

Donde :

- 1.- M.I. con formación de derivados.
- 2.- N C/R con formación de derivados.
- 3.- N S/R con formación de derivados.
- 4.- T con formación de derivados.

- 5.- St con formación de derivados.
- 6.- St sin formación de derivados.
- 7.- M.I. sin formación de derivados.
- 8.- N C/R sin formación de derivados.
- 9.- T sin formación de derivados.
- 10.- N S/R sin formación de derivados.

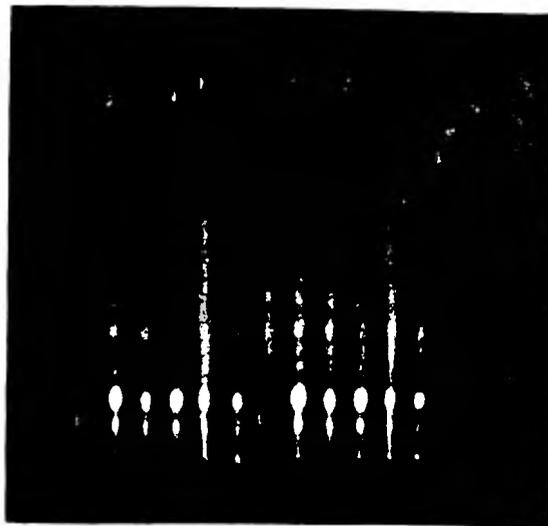
Se observa que el Rf normal de las aflatoxinas es para B₁ 0.45, B₂ 0.40, G₁ 0.35 y 0.30, para G₂, al formarse el derivado se ve modificado el Rf de las aflatoxinas B₁ y G₁ un tercio menor al del Rf normal, por lo que el nuevo Rf de las aflatoxinas es de 0.16 para la B₁ y 0.12 para G₁. Con lo anterior se ve claramente confirmada la presencia de aflatoxinas en los diferentes tratamientos.

Se encontró que en la totalidad de los extractos problemas, había manchas con fuerte fluorescencia y con un Rf de 1/3 menor al de las micotoxinas B₁ y G₁. Esto provocó una interferencia como se puede observar con claridad en la Figura 9, con la prueba de formación de derivados ya que el Rf modificado coincidía con el Rf de estas manchas. Estas manchas, es muy probable que se hayan originado después del tratamiento del maíz con cloroformo. Este tratamiento fue necesario llevarlo a cabo, para evitar la contaminación por otros microorganismos.

Se ha demostrado (6) que el cloroformo en conjunto con el metanol, que en este caso fue usado durante la extracción, tiene un efecto sobre las aflatoxinas B₁ y G₁, para la -- formación de aflatoxinas B_{2a} y G_{2a} respectivamente. Es-- tos derivados tienen un Rf de 1/3 menor que B₁ y G₁.

4.8.2. ESTANDAR INTERNO

Los resultados de la prueba donde se usa un estandar in-- terno se presentan en la Figura 10.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

FIGURA 10

Estandar Interno

Donde :

- 1.- Maíz inicial.
- 2.- Nixtamal S/R.
- 3.- Nixtamal C/R.
- 4.- Tortilla.
- 5.- Tortilla con digestión.
- 6.- Estandar.
- 7.- Maíz inicial con estandar interno.
- 8.- Nixtamal S/R con estandar interno.
- 9.- Nixtamal C/R con estandar interno.
- 10.- Tortilla con estandar interno.
- 11.- Tortilla con digestión con estandar interno.

Con los resultados de la Figura 10 se pudo confirmar la presencia de las cuatro aflatoxinas, de esta forma se corroboraron los datos obtenidos con la primera prueba confirmativa utilizada. En la 2a. división de la cromatopla-
ca se pudo observar con claridad, que los Rfs de las muestras problema, correspondientes a las diferentes operaciones del proceso, coinciden sin excepción, con los Rfs del estandar interno.

Es importante hacer hincapié que como se demuestra en las Figuras 8, 9 y 10, fue evidente el decremento en la intensidad de la fluorescencia con relación al maíz inicial, -

conforme éste sufría las diferentes operaciones del proceso. Estos resultados fueron confirmados con el análisis cuantitativo en el espectrofotómetro.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados se puede decir que :

- 1) El método de identificación por cromatografía en capa fina demostró ser preciso y confiable para el análisis rutinario durante este trabajo.

- 2) Los resultados cuantitativos obtenidos en el espectrofotómetro, expresados como contenido de aflatoxina B₁, guardaron una relación directa con el decremento en la intensidad de las manchas fluorescentes observadas en la cromatoplaca. Esto persistió aún cuando los aparentes derivados fueron formados al agregar cloroformo al maíz, para evitar su contaminación.

- 3) Por la alta variabilidad que se presenta al cuantificar las aflatoxinas en las muestras iniciales, se demostró que el Aspergillus flavus utilizado no produjo las micotoxinas de manera homogénea sobre el maíz.

- 4) De acuerdo al análisis estadístico realizado se demos-

tró que el reposo del maíz durante 14 horas en condiciones alcalinas, no afecta de manera significativa a las aflatoxinas.

- 5) Se demostró que la destrucción de aflatoxinas fue debida principalmente a las operaciones térmicas llevadas a cabo durante la nixtamalización y en la cocción de la tortilla.

- 6) Se demostró que durante la nixtamalización hasta la obtención de la tortilla, hay una pérdida total de aflatoxinas de 62%. Sin embargo, la pérdida efectiva, es decir por destrucción, fue de solamente 28.75%, el resto fue arrastrado en el nejayote y en el agua de lavado.

- 7) Sobre la prueba de digestibilidad en vitro, para observar si había regeneración de aflatoxinas cuando estas son sometidas a pH ácido, no se obtuvieron resultados concluyentes, ya que los valores determinados no fueron confiables.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en este

estudio se recomienda :

- 1) Que se haga un estudio sobre la incidencia de aflatoxinas en el maíz en México ya que es sabido que las técnicas de almacenamiento no son siempre las adecuadas.
- 2) Tomando en consideración que el maíz es consumido principalmente como tortilla cabe señalar el cuidado de -- usar maíz no contaminado para la elaboración de este -- producto básico, ya que se demostró en este trabajo -- que las aflatoxinas no son totalmente destruidas por -- el proceso tradicional de la nixtamalización.
- 3) Es importante señalar que un maíz contaminado no debe usarse para consumo humano ni para consumo animal, recomendándose un tratamiento de inactivación que tenga un efecto total.
- 4) Tomando en cuenta que el nejayote es una fuente importante de contaminación en ríos, mares o cosechas y si el nejayote tiene aflatoxinas la contaminación es mas peligrosa, por lo que si en algún caso se utiliza maíz dudoso, se debe de someter a un tratamiento de inactivación.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- BRESSAMI, BRAHAM y BEHAR. Mejoramiento nutricional del -
Maíz. I N CAP, Guatemala 1972.
- 2.- STEPHEN S. AESTER, Preservación de granos almacenados. -
FAO. Londres, P 94, 1947.
- 3.- STERNBERG M., KINC and PLANKETT R.A., Lysinoalamine detere
mination in proteins. J. of Food Science. Vol. 40, p. 1168
- 1170, 1975.
- 4.- FISHER, P. y BENDER, A. Valor nutritivo de los Alimentos.
LIMUSA. México, p. 87, 1978.
- 5.- GOLDBLATT, L.A. (ed) 1969. Aflatoxin : Scientific Background,
control and Implications. Academic Press : New York.
- 6.- PIETER S. STERN. The Biosynthesis of Micotoxins. Academic
Press : New York, 159 - 179, 1980
- 7.- SHOTWELL. Aflatoxin in Corn. J. Am Oil Chemist Soc. Vol.
54, p. 216 - 224, 1977
- 8.- JONES, B.D. Métodos de análisis del contenido de aflatoxi-
nas. Tropical Products Institute, 1972.

- 9.- LIENER, E.L. Toxic constituents of Plant Foodstuffs, 2a. edition. Academic Press p. 341; 1980.
- 10.- GARNER, R.C. MILLER, E.C. and MILLER, J.A. Cancer Rev. - 32 p. 2058 - 2066, 1972.
- 11.- ABDOLLAHI AND BUCHANAN. Regulation of aflatoxins Biosynthesis, Caraterization of Glucose as an Apparent Inducer of Aflatoxin Production. J. of Food Science 46, 143 - 146 1981.
- 12.- STACK AND POHLAND. Collaboration Study of a Method of -- Chemical Confirmation of Identity of Aflatoxins. J.A.O.A.C. 58 p 110 - 114, 1975.
- 13.- SCOTT, P.M. The Analysis of Foods for Aflatoxins and Other Jungal Toxins. Can Inst. Food Technol. Vol. 2, No. 1 p. 173 - 177, 1969.
- 14.- ALLCROFT, R., ROGERS, H., LEWIS S., NABREY, J., and Best - P.E. Nature, London 209 P. 154 - 155, 1966.
- 15.- CIEHLER, A., PETERSON, R.E. appl. Microbiol, Vol. 16, p. - 665, 1968.
- 16.- PONS, N.A. J. CUCULLU, A.F., LEE, L.S., GOLDBLATT, L.A. - J. Am. Oil Chem Soc Vol. 49, p. 124, 1972.

- 17.- PONLAND, CUSHMAC, ANDRELLOS, J.A.O.A.C. 51 p. 907 - 910, 1978.
- 18.- LINDENFILSEN AND CIEGLEN. Studies on Aflatoxins. Detoxification in Shelled Corn by Ensilaging. J. Agricultural. - Food Chem. 18, 1970.
- 19.- DOLLER, F.G., MANN, G.E., J. Am Oil Chem. Soc. 45 p. 862, 1968.
- 20.- MASRI, M.S. GOLDBLATT, U.S. Patent 3, 429, 709 (1969).
- 21.- PONS, N.A., CUCULLU, A.F., LEE L.S., GOLDBLATT, L.A. J. Am. Oil Chem. Soc. 49 p. 124, 1972.
- 22.- ALEXANDER, R.J. AND BAUR, M.C. Note on a Two - Dimensional TLC Procedure for Determining Aflatoxins in Corn. - Cereal Chem. 54 (3) pp 699 - 704, 1977.
- 23.- BARABOLAK R. Improved Procedure form Quantitative Determination of Aflatoxinas in Corn and Zuet Milled Corn - - Products, J.A.O.A.C. 60 (2) p. 308 - 310, 1972.
- 24.- PONS, W.A., CUCULLU, A.F., GOLDBLATT, L.A. Rapid Detection of Aflatoxin Contamination in Agricultural Products. J.A.O.A.C. 56 (4) p 803 - 807, 1973.

- 25.- STOLOFF, L., Analytical Methods for Micotoxins. Clin.Tox. 5, p. 465 - 495, 1972.
- 26.- THOMAS, F. EPPLEY and TRUCKSESS, M.W., Rapid Screening -- Method for Aflatoxins and Zearalinane in Corn. J.A.O.A.C. Vol. 58 No. 1, p. 114 - 116, 1975.
- 27.- OFFICIAL METHODS OF ANALISIS (1970) 11th. Ed. A.O.A.C., - Washington, D.C. p. 426 - 438, 1970.
- 28.- ROSILES, R. Las aflatoxinas en las tortillas. Vet. Mex., X : p. 37 - 44, 1979.
- 29.- LORMAND, E. Methods for Sensory Evaluation of Food. Canada Department of Agricultural, 1970.
- 30.- ULLOA - SOSA, and SCHROEDER. Note on Aflatoxins Discomposition in the Process of Making Tortilla from Corn. Cereal Che. 46, p. 397-400, 1969.