

Nº 100
REV.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

COMPARACION DE METODOS ANALITICOS
PARA LA DETERMINACION DE
AFLATOXINAS

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A N:

ESTHER MATEOS GALEANA

BLANCA ESTELA ZENTENO MENDOZA



México, D. F.

1992

FALLA DE COPIA



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

	pág.
I. INTRODUCCION	1
I.1 HISTORIA	1
I.2 ESTRUCTURA QUIMICA	2
I.3 PROPIEDADES DE LAS AFLATOXINAS	4
I.4 EFECTOS BIOLÓGICOS	5
I.5 JUSTIFICACION	12
I.6 OBJETIVO GENERAL	15
I.7 OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
II. METODOS ANALITICOS	16
II.1 METODOS PRESUNTIVOS	16
II.2 METODOS DISCRIMINATORIOS RAPIDOS	17
(a) Método de minicolumna de Romer	
(b) Método de minicolumna de Holaday-Velasco	
II.3 METODOS CUANTITATIVOS	19
(a) Método de cromatografía en capa fina (CB)	
(b) Método de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	
II.4 METODOS DE INMUNOAFINIDAD	24
(a) Método de "Elisa"	
(b) Método de "Agri-Screen"	
(c) Método de "Ez-Screen"	
(d) Método tipo "Oxoid"	
(e) Método "inmunoenzimático homogéneo de aflatoxina B1"	
(f) Método "Aflatest"	
III. MATERIALES Y METODOS	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	35
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
VI. BIBLIOGRAFIA	64

APENDICE I.	LABORATORIOS ANALITICOS PARA AFLATOXINAS	68
	1. REGLAS DE SALUD Y SEGURIDAD	
	2. INSTALACIONES FISICAS	
APENDICE II.	LEGISLACION SOBRE MANEJO DE ALIMENTOS CONTAMINADOS CON AFLATOXINAS	76
APENDICE III.	MUESTREO	78
	1. GRANOS ENCOSTALADOS (COSTALES DE FIBRAS NATURALES O SINTETICAS)	
	2. MUESTREO DE GRANOS A GRANEL (EN UNIDAD DE TRANSPORTE O EN BODEGA)	
APENDICE IV.	DESCRIPCION DE MATERIALES Y METODOS	85
APENDICE V.	RESULTADOS ADICIONALES	95

RESUMEN

El maíz es el cereal que conforma la base de la dieta en México, Centroamérica y algunos países de Sudamérica. Debido a las condiciones de precosecha, cosecha, almacenamiento, manejo y distribución, el maíz presenta en ocasiones contaminaciones por hongos microscópicos que generan toxinas. Entre ellos, los del género Aspergillus y, especialmente A. flavus y A. parasiticus, producen sustancias conocidas como aflatoxinas de las cuales la aflatoxina B1 posee un poder hepatotóxico y mutágeno.

Se han realizado numerosas investigaciones sobre métodos analíticos para determinar la presencia de las aflatoxinas en cereales y cuantificar su contenido, ya que como son compuestos químicos relativamente estables es difícil eliminarlos de los alimentos. Estas metodologías se han desarrollado particularmente en los países avanzados tecnológicamente. Consecuentemente, sus costos por análisis son relativamente altos y la mayoría de ellas son presuntivas ya que se basan en la fluorescencia de las aflatoxinas al ser expuestas a irradiación ultravioleta (UV) y se identifican de acuerdo al color fluorescente verde o azul como: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂.

En México, se estudiaron los métodos aceptados internacionalmente, encontrándose que el método aprobado por la Asociación de Químicos Analíticos de los EEUA (AOAC), conocido como CB, tiene un costo (a pesos de febrero de 1988) de \$69,428 empleando 3 horas para una muestra y su repetición. Los autores

consideraron, que era necesario evaluar los procedimientos de detección de aflatoxinas en México y adecuarlos a las condiciones de la mayoría de los laboratorios disponibles para garantizar determinaciones confiables.

En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación de cuatro metodologías analíticas para cuantificar el contenido de aflatoxinas en muestras de maíz contaminado en forma natural en el campo (almacenado en silos) y de maíz contaminado artificialmente en el laboratorio con soluciones estándar con cantidades conocidas de aflatoxinas. En los tres primeros métodos: CB, Aflatest y Thean y col. se varió la técnica de extracción y purificación, manteniéndose constante la cuantificación, en la que se empleó la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR, o en inglés, HPLC). En el cuarto método se utilizó la metodología propuesta por el fabricante de un equipo fluoroscópico (Aflatest).

En el caso de maíz contaminado naturalmente los resultados obtenidos en cuanto a precisión, costo de reactivos por muestra, más su repetición a pesos mexicanos de diciembre de 1990, así como el tiempo de análisis por muestra, fueron:

* Método I CB-CLAR; se obtienen coeficientes de variación de 8.13 para el total de aflatoxinas y de 9.53 para la aflatoxina B₁, para la aflatoxina B₂ su coeficiente de variación es de 50.72 y su costo es de \$40,037 con un tiempo de operación de 3.5 horas.

* Método II fluoroscópico (Aflatest); el coeficiente de variación es de 9.41 para el total de aflatoxinas. Tiene un costo de \$107,057 con un tiempo de 30 minutos.

* Método III fluoroscópico-CLAR; el coeficiente de variación no fue mayor de 11.5 para el contenido total de aflatoxinas y para la B₁ no rebasó el valor de 12.5. El costo es de \$108,098 con una hora por análisis.

* Método IV de Thean y col.; sus coeficientes de variación fluctúan entre 64.40 para el total de las aflatoxinas, 67.63 para la aflatoxina B₁ y 101.11 para la aflatoxina B₂. Su costo es de \$30,244 y el tiempo empleado es de 3.5 horas.

Puede concluirse que; para muestras en los laboratorios ubicados para certificación, es conveniente usar metodologías como el proceso fluoroscópico, ya que el tiempo empleado es mínimo y no se detiene a los camiones transportadores de grano por mucho tiempo. Su costo puede abatirse siempre que se obtengan columnas a precios razonables, ya que el equipo per se puede amortizarse rápidamente por el tiempo-costo de transportistas ahorrado.

I. INTRODUCCION

I.1 HISTORIA

Históricamente las aflatoxinas fueron descubiertas como una consecuencia de la aparición de brotes de necrosis hepática dando lugar a la muerte de más de 100 mil pavos (enfermedad del "pavo X") en Inglaterra durante la década de los sesentas (Hamilton, 1987).

En sus inicios el problema fue señalado como una contaminación de alimentos, específicamente de un cargamento de cacahuates del Brasil, que fueron usados como suplemento proteínico en alimento para aves. Este alimento se encontró que estaba contaminado con el hongo Aspergillus flavus. La extracción de la toxina se realizó a partir de los cultivos de A. flavus en Inglaterra y Holanda, comprobando su efecto tóxico en aves de experimentación.

Un aspecto extremadamente importante de la aflatoxicosis es que existe la fuerte probabilidad de encontrar residuos tóxicos en los alimentos de origen animal consumidos por el hombre, particularmente en animales en periodos de lactación ya que las toxinas se excretan como metabolitos en la leche (M_1). Armbrecht y col. (1969), hicieron estudios alimentando cerdas lactantes con alimento contaminado con 100 microgramos de aflatoxina por kg de alimento (100ppb) encontrando desde 1.5 a 8.0 u/kg (ppb) de M_1 en la leche materna y en los hígados de sus crías, respectivamente.

Según Stoloff (1979) existe una relación dosis/respuesta, para productos de origen animal, estos son los siguientes: para hígado

de res 14,000:1, huevos de gallina 2,200:1, hígados de pollo 1,200:1, hígado de cerdo 800:1 y leche de vaca 300:1. Como puede apreciarse, es la leche en donde se encuentra el mayor contenido de residuos de aflatoxinas y, por lo tanto, es uno de los alimentos que representan un mayor peligro potencial para el consumidor.

1.2 ESTRUCTURA QUIMICA

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidas por los hongos Aspergillus flavus Link y Aspergillus parasiticus Speare. Ambas especies pertenecen al grupo Aspergillus flavus. Se les dió el nombre de aflatoxinas por "Aspergillus flavus toxin" (A-fla-toxin).

Las cepas productoras de las toxinas generalmente sintetizan solo dos o tres aflatoxinas bajo ciertas condiciones.

Se ha reportado que ciertas cepas de A. flavus pueden producir también la AFB_{2a} y la AFG_{2a} que son los derivados 2-hidroxi- de la AFB₁ y AFG₁, respectivamente. Estas han sido aisladas de los cultivos del hongo. También se detectaron pequeñas cantidades de AFM₁ (Shank, 1981).

Las principales aflatoxinas que se producen directamente por el hongo son cuatro: Aflatoxinas B₁ y B₂ (AFB₁ y AFB₂) designadas así por su fuerte fluorescencia azul (blue) bajo la luz ultravioleta, aflatoxinas G₁ y G₂ (AFG₁ y AFG₂) que dan fluorescencia verde-amarillo (green) bajo la luz ultravioleta (Fig. 1).

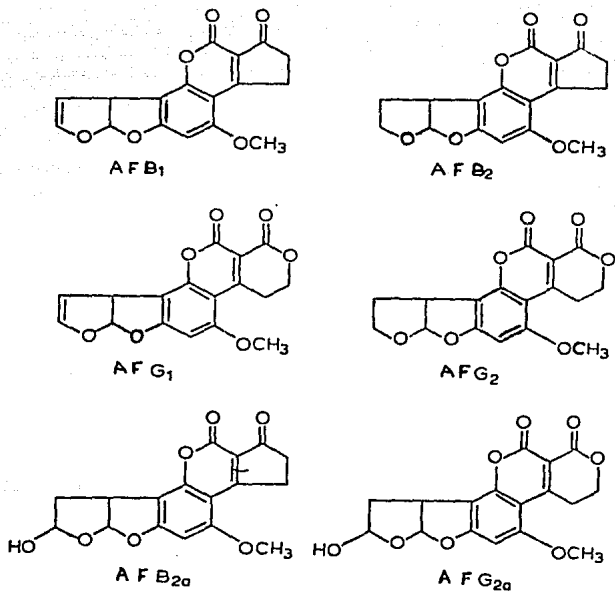


Fig. 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS AFLATOXINAS

La estructura química de las aflatoxinas ha sido estudiada extensamente. En la literatura se han reportado 18 aflatoxinas aunque únicamente se encuentran en la naturaleza como metabolitos secundarios producidos por hongos A. flavus y A. parasiticus o como derivados que se forman durante el metabolismo animal cuando se consumen alimentos contaminados con aflatoxinas.

De las cuatro estructuras básicas de las aflatoxinas encontradas la AFB₁ es mucho más tóxica y cancerígena que su análogo G. El derivado G₂ no es cancerígeno y la AFB₂ es "ligeramente" cancerígena probablemente porque hay una enzima que convierte la AFB₂ a AFB₁ en pequeñas cantidades.

Hay evidencias de que el último compuesto carcinogénico de varias aflatoxinas involucra un epóxido. Ya que hay otras rutas metabólicas compitiendo, incluyendo la producción de metabolitos del anillo hidroxilado y del fenol dimetilado. Las otras partes de la molécula incluyendo el anillo de lactona potencialmente reactivo, no están directamente involucradas con la actividad cancerígena de la aflatoxina, pero proveen volumen a la molécula (Doulls y col., 1986).

I.3 PROPIEDADES DE LAS AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son solubles en metanol, acetona, acetonitrilo, cloroformo y algunos otros disolventes polares pero son escasamente solubles en agua y en hidrocarburos.

Todas las aflatoxinas exhiben una fluorescencia intensa cuando son excitadas por radiaciones ultravioleta a 365nm. Entre las propiedades de las aflatoxinas destaca su gran termorresistencia ya que el punto de ebullición (descomposición) para la mayoría de ellas está por arriba de los 200°C.

Tabla 1. Propiedades de las aflatoxinas (Moreno y Gil, 1990)

A F L A T O X I N A S					
Características	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁
Fórmula química	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Peso molecular	312	314	328	330	330
Punto de fusión (°C)	268-269*	287-289*	244-248*	230	290*
Absorción ultravioleta nm (coeficiente de extinción)	223 (25,600)	220 (20,500)	243 (11,500)	217 (28,000)	226 (23,100)
En etanol	285 (23,400) 362 362 (21,800)	265 (12,700) 363 (24,000)	257 (9,900) 264 (10,000)	245 (12,900) 365 (19,300)	265 (11,600)
Fluorescencia (nm)	425	425	450	425	425
LD ₅₀ microgramos/kg	12-50	85	39	172	17

(*) = Desaparición

I.4 EFFECTOS BIOLÓGICOS

Las aflatoxinas son metabolizadas por la función de un sistema de oxidasas microsomales, por una compleja organización de citocromos, oxígeno y por una enzima dependiente del NADPH

localizada en el retículo endoplásmico de las células hepáticas.

Estas enzimas metabolizan oxidativamente una amplia variedad de compuestos xenobióticos, con el fin de eliminar el compuesto original por medio de la formación de varios derivados hidroxilados, los cuales en su transformación se unen con iones sulfato o con el ácido glucurónico para formar sulfatos de ésteres o glucuronidina solubles en agua y ser excretados por la orina o la bilis.

Durante el metabolismo se pueden generar metabolitos altamente reactivos como la aflatoxina-8,-9-epóxido los cuales tienen la capacidad para reaccionar covalentemente con los centros nucleofílicos en las macromoléculas celulares, como en el ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) y las proteínas (fig.2). El resultado de estas interacciones son los conocidos efectos tóxicos de las aflatoxinas, que pueden llegar inclusive a la muerte. Las aflatoxinas son tóxicas para las bacterias, plantas, invertebrados, vertebrados y primates. La sensibilidad para los efectos tóxicos de estos compuestos varía grandemente entre las especies. De todos los animales domésticos estudiados, las ovejas parecen ser las más resistentes, mientras que la trucha arcoiris, los patos y las codornices parecen ser los más susceptibles. Las diferencias interespecie son un reflejo de la variación entre:

- a) La fijación de las moléculas de la toxina,
- b) La capacidad del organismo para metabolizar la toxina a su

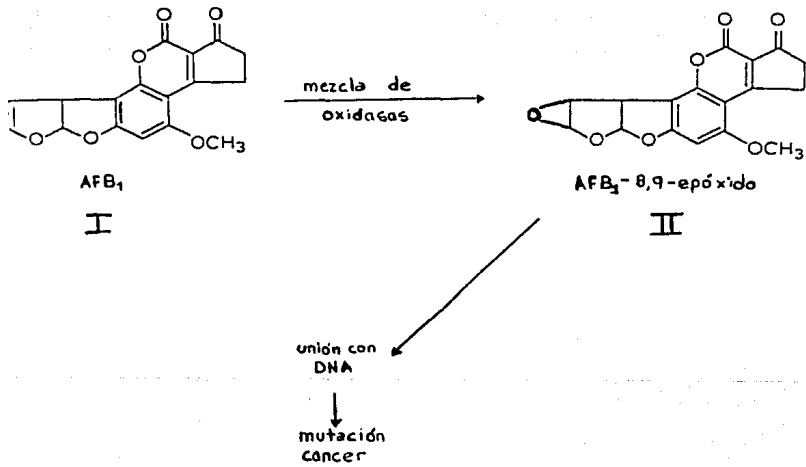


Fig. 2 METABOLISMO DE LAS AFLATOXINAS

forma reactiva,

c) La capacidad de eliminación de las toxinas que tienen los organismos,

d) La habilidad para reparar el daño producido en las células.

Las aflatoxinas, suprimen en algunas especies estudiadas la síntesis del RNA-mensajero. También se han detectado efectos sobre la síntesis del DNA (Lillehoj, 1970; Wogan, 1975).

Para el RNA, el efecto incide en el núcleo vía inhibición en la incorporación de los precursores.

Existe inhibición de la actividad de la polimerasa DNA-dependiente del RNA. Como resultado de esta inhibición nuclear del RNA se sospecha que el ARN citoplásmico se afecta también.

La deficiencia en la síntesis de proteínas y la particularidad de mover las grasas se relaciona aparentemente con las lesiones que se observan en el hígado de los animales afectados. En conejillos de Indias, la aflatoxina produce un aumento en gama-globulina y una disminución en alfa-globulina y, generalmente, una disminución en la concentración de proteína total (Cysewski y col, 1968).

Las aflatoxinas son metabolizadas por diferentes sistemas biológicos, sin embargo no es claro cómo alcanzan a ser metabolizadas para ejercer su acción tóxica o carcinogénica. La acción toxica de las aflatoxinas puede ser aumentada o reducida. Es aumentada por el consumo de una dieta baja en proteínas o por hipofisectomía. En estos casos es posible que disminuya la cantidad de toxina metabolizada. En contraste, el consumo de una

dieta deficiente en colina, (la cual reduce la actividad de ciertas oxidasas) y la administración de DDT (el cual induce una función mezclada de oxidasas) permiten alguna protección. Asimismo, la respuesta carcinogénica puede ser reducida por hipofisectomía, por un tratamiento con fenobarbitona y por la alimentación de una dieta baja en proteínas. Una dieta baja en colina, por el contrario aumenta la susceptibilidad.

La LD₅₀ varía entre las especies con valores desde 0.3 a 17.9mg/kg. Se ha visto que los animales adultos son menos susceptibles que los jóvenes, lo que hace suponer la existencia de diferentes rutas metabólicas para eliminar a la aflatoxina. La letalidad de la aflatoxina B₁ ha sido estudiada en numerosos animales de granja y laboratorio. Los valores de "LD₅₀" tienen un intervalo de menos de 0.5µg/kg hasta más de 20µg/kg de peso corporal, Goldblatt (1974).

La toxicidad de las aflatoxinas en una especie en particular puede variar dependiendo de un número de factores, los cuales incluyen sexo, edad, estado nutricional, etc.

Cuando hay ingestión de aflatoxinas, parte de ellas es acumulada en los órganos internos y el resto es metabolizado y excretado en la orina y las heces. En el caso de los mamíferos lactantes, como ya se mencionó son excretadas, además, por la leche como AFM₁ y AFM₂.

Existe un número de cambios patológicos que pueden ocurrir como un resultado de la exposición a las aflatoxinas. El primer órgano

dañado en todas las especies estudiadas es el hígado. Los principales efectos que han sido identificados como un resultado de la aflatoxicosis son: deposición de grasa, reducción de peso, hemorragias internas, ictericia de las membranas mucosas, proliferación de los ductos biliares, necrosis y cirrosis del hígado.

En el caso específico de los mamíferos, las manifestaciones patológicas producidas por la aflatoxicosis están relacionadas con la capacidad de la aflatoxina de obstaculizar la síntesis de las proteínas, de reaccionar con las macromoléculas y orgánulos celulares y de interferir en la producción normal de reguladores celulares (Pier, 1987).

En el caso de las aves, la aflatoxicosis genera, entre otros efectos, malabsorción de nutrientes, coagulopatía, crecimiento deficiente, susceptibilidad a infecciones, ineffectividad de las vacunas, problemas a nivel del sistema reproductor, sensibilidad a temperaturas extremas, (además del peligro que presentan los residuos tóxicos de las aflatoxinas en los productos de origen animal para consumo humano como carne, leche y huevos (Hamilton, 1987; Rosiles, 1987; Peers y col, 1987; Yeh y col, 1989).

También han resultado susceptibles a las aflatoxinas, desde protozoarios, camarones, truchas, aves, ganado vacuno, cerdos, hasta humanos. Algunas bacterias se inhiben con las aflatoxinas, algunas plantas verdes presentan albinismo (deficiencia de clorofila), las semillas pierden capacidad de germinación, etc. (Hamilton, 1987).

Basándose en la idea de que el hombre puede ser susceptible a las aflatoxinas, se han llevado a cabo muchos trabajos para reducir los niveles de exposición a los humanos.

Aunque se conoce el grado de susceptibilidad de diferentes especies y se tienen tablas sobre las LD₅₀ para cada una, en el caso del hombre no es así, ya que no se conoce si el hombre es tan susceptible como el pato o el mono o si es relativamente resistente como la rata y el ratón. Se ha observado que las aflatoxinas inducen la hepatocarcinomas en ratas, patos y truchas, por lo que se puede pensar que para el hombre también. Sin embargo no existen evidencias directas sobre esto.

Hay evidencias de toxicidad aguda en niños. Se reportó la muerte de un niño en Uganda por daño en el hígado y se encontró que había comido "cassava" (yuca) la cual estaba contaminada con aflatoxinas. En Tailandia, existe una enfermedad conocida como el síndrome de Reye, que ha sido asociada con la ingestión de aflatoxinas. El síndrome de Reye presenta encefalopatía e infiltración grasa del hígado y el riñón; este síndrome ha sido reproducido experimentalmente en monos, alimentados con aflatoxinas. En Kenia, Swazilandia, Tailandia y Mozambique, donde la incidencia de carcinoma hepático es alta, las aflatoxinas se encuentran presentes en los alimentos para humanos. En Filipinas se analizó la orina y las heces fecales de gente que había consumido crema de cacahuate contaminada con aflatoxinas. Los análisis reportaron la presencia de la aflatoxina M₁ en la orina. No obstante, hay controversia sobre las evidencias que existen sobre la inducción de cáncer humano con respecto a la exposición de aflatoxina (Howard, 1981; Shank, 1981; Peers y col, 1987).

Sin embargo, el cáncer hepático es raro en las naciones avanzadas tecnológicamente, mientras que en naciones en las cuales la población se sabe que ingiere niveles relativamente altos de aflatoxinas en su dieta, la incidencia de cáncer en el hígado es elevada. El riesgo de consumir productos de origen animal que han sido expuestos a las aflatoxinas no ha sido cuantificado pero se sabe que existe (Martín y col. 1987).

I.5 JUSTIFICACION

Recientemente, en el norte del estado de Tamaulipas, México y en el sur de Texas EEUUA, se ha presentado el problema de contaminación del maíz, antes de su cosecha, por tres años consecutivos 1989, 1990 y 1991, en la cual más de 400 mil toneladas de maíz tuvieron que destinarse al consumo animal debido al alto contenido en aflatoxinas y el resto mantenerse en cuarentena.

Esta contaminación en el campo se debe a las condiciones climáticas que desfavorecen a la planta, haciéndola susceptible al ataque de A. flavus y a la producción de aflatoxinas. La sequía, la presencia de insectos que atacan la mazorca y la alta temperatura ambiental son los factores más importantes en la contaminación del maíz en el campo, al favorecer el establecimiento del hongo y la actividad metabólica del mismo que conlleva a la producción de esos metabolitos tóxicos.

Como ya se mencionó las aflatoxinas, además de ser carcinógenas, son teratógenas y mutágenas. El órgano más afectado es el hígado, por lo que son consideradas como hepatoxinas. También hay evidencias de que al inhalar partículas contaminadas con aflatoxinas se desarrolla el cáncer pulmonar. Esto es importante para la salud de los trabajadores que están expuestos al manejo de granos contaminados con estas toxinas. También se ha dicho que uno de los factores que las hace sustancias peligrosas, es que son acumulativas y pasan del tracto digestivo a la carne, a la leche y a los huevos de los animales que las consumen, con el consiguiente riesgo de llegar al hombre.

De todo lo mencionado anteriormente surge la necesidad de encontrar un método confiable, exacto y preciso, que permita cuantificar la cantidad de aflatoxina presente ya que es importante (tanto para las personas encargadas de certificar el grano y designarle su destino, como para los investigadores que, interesados en el problema, han iniciado proyectos concernientes a la destrucción de las aflatoxinas) contar con un método de análisis que les provea resultados exactos, precisos y reproducibles, los cuales puedan ser confiables para dar un fallo ya sea sobre la evaluación de un método ó sobre el destino que se le dará a un lote de maíz contaminado.

En la literatura se encuentran reportados un gran número de métodos para la detección y cuantificación de aflatoxinas. De igual manera, del extranjero han llegado nuevos métodos y equipo para la cuantificación de las mismas. Sin embargo, se desconoce la eficiencia de recuperación de la toxina.

Ante estas alternativas el analista debe decidir cuál es el método que le proporciona los mejores resultados (incluyendo exactitud, precisión y reproducibilidad) a un costo accesible.

Es pertinente mencionar que es necesario contar con un laboratorio equipado de manera especial para el manejo y análisis de alimentos contaminados con aflatoxinas. Los apéndices I y II presentan los requerimientos mínimos que deben tener esas instalaciones, así como los lineamientos que marcan algunas legislaciones sobre el manejo que debe darse a estos alimentos.

Este trabajo de tesis es sólo el inicio de un proyecto realizado entre el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM y el Centro Nacional de Investigación Certificación y Capacitación (CENICCANDSA), ante la problemática presentada hoy en día por las aflatoxinas. En función de las instalaciones disponibles y el equipo analítico con el que cuentan se definiéron, tanto el objetivo general como los objetivos específicos de este trabajo.

I.6 OBJETIVO GENERAL

Este trabajo tiene como objetivo el estudio de cuatro metodologías analíticas, para determinar dentro de los límites establecidos por la "propia química analítica, que los resultados obtenidos reflejan de manera real el contenido de aflatoxinas en los alimentos analizados. Estas metodologías deben estar a un nivel de costo accesible para un país en vías de desarrollo como México, sobre todo considerando su extensión territorial y la enorme dispersión de los cultivos de granos básicos que pueden estar contaminados y que llegan a los canales de distribución por diferentes vías.

I.7 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Evaluar la precisión, exactitud y costo de cuatro metodologías que permitan el análisis de aflatoxinas en maíz contaminado.
- 2) Establecer criterios al finalizar el trabajo, para hacer recomendaciones de cada metodología empleada.

II. METODOS ANALITICOS

Dentro de las metodologías actuales para el análisis de las aflatoxinas hay técnicas presuntivas, cualitativas y cuantitativas, de las cuales el analista puede seleccionar según sus necesidades. Las presuntivas son útiles cuando se requiere saber de forma rápida si hubo crecimiento de una cepa productora de aflatoxina y cuantitativas cuando es necesario detectar la cantidad exacta del nivel de contaminación de aflatoxinas en la muestra. En estos casos se requiere de técnicas de análisis más precisas.

II.I METODOS PRESUNTIVOS

Los métodos presuntivos son los más rápidos para determinar la posible presencia de aflatoxinas en granos. Entre estos métodos se encuentra la técnica de "luz negra", que detecta los granos que brillan con una fluorescencia verde amarillenta brillante, fluorescencia que generalmente es producida por A. flavus y A. parasiticus cuando crecen en semillas vivas de maíz, algodón, sorgo, trigo u otros granos.

Como la fluorescencia se debe a la reacción efectuada entre el ácido kójico que produce el hongo y la peroxidasa encontrada en la semilla viva, la prueba se efectúa en semillas vivas ya que las muertas o inviables no darán fluorescencia. Es importante aclarar que esta fluorescencia no se debe a las aflatoxinas sino al crecimiento del hongo en la semilla viva (García, 1989).

Se recomienda que el grano sea quebrado antes de la inspección con la luz negra. Este examen con la luz negra debe hacerse en un cuarto oscuro con luz UV (de longitud de onda de 365nm). Si la prueba presuntiva es positiva, posteriormente se realiza un análisis químico más específico. Este método presuntivo ha sido aprobado por la American Association of Cereal Chemists (método AACC, 1986).

Para los resultados de esta prueba presuntiva sean verídicos y confiables deben evitarse los errores más frecuentes, como la descripción del color y el brillo en la muestra de granos, tomando algunas precauciones como las siguientes:

1. Usar como referencia muestras auténticamente positivas que no hayan sido muy expuestas a la luz UV,
2. Usar como referencia, patrón de color,
3. Confirmar la solubilidad del material fluorescente ya que es soluble en agua y
4. Confirmar que la partícula fluorescente proviene del endospermo amilacéo o de los fragmentos del embrión del grano de maíz.

II.2 MÉTODOS DESCRIMINATORIOS RÁPIDOS

Estos métodos son cualitativos y dan una aproximación de la cantidad de las aflatoxinas presentes en la muestra, permitiendo la clasificación de las mismas en dudosas y seguras. Estos métodos permiten la detección de aflatoxinas en varios productos agrícolas en un tiempo aproximado entre 15 y 30 minutos. Tiene

como ventaja, el uso de reactivos químicos y equipo fácilmente accesibles y de bajo costo. Entre estos se encuentran los métodos aprobados por la AOAC: el de Romer y el de Holaday-Velaco (1990).

a) Método de minicolumna de Romer (1990)

Es aplicable para la detección de cantidades de aflatoxinas hasta 10ppb del total de aflatoxinas en maíz blanco, maíz amarillo, cacahuates, nueces y pistaches. Utiliza como disolventes cloroformo, potasa y sulfato de sodio anhidro. Para la detección se usan minicolumnas de borosilicato y lámpara de luz UV. Si la prueba es positiva para aflatoxinas se observa una banda fluorescente de color azul.

b) Método de minicolumna Holaday-Velasco (1990)

Este método, al igual que el anterior, permite la detección de 10ppb de aflatoxinas en maíz blanco, maíz amarillo y cacahuates. Utiliza una minicolumna de fluorisil y sus reactivos son: benceno, mezcla de agua-metano, solución de cloruro de sodio y cloroformo-acetona. El método consiste en una extracción y visualización de cromatografía en columna. Si la muestra es positiva a aflatoxinas se observa una banda de fluorescencia azul en la columna. El reactivo para la extracción es metanol al 80%, el extracto es filtrado, y tratado con una solución de cloruro de sodio y la extracción final se hace con benceno. La aflatoxina contenida en el extracto de benceno es atrapada en la capa de fluorisil de la minicolumna y detectada por medio de la luz UV. Las desventajas del método son la poca especificidad para la AFB₁

y, por otro lado, es muy difícil decidir si la fluorescencia que presenta para la AFB₁ es debida a niveles cercanos de 20ppb o ligeramente arriba. Además, el benceno, cloroformo y los estándares de aflatoxinas requeridas para este método presentan importantes problemas de seguridad (Koeltzow, 1989).

Es importante conocer que las técnicas de minicolumna no son utilizadas para cuantificar. Recientemente se desarrolló un método de confirmación de minicolumna para aflatoxinas. La identidad de las aflatoxinas sobre la minicolumna desarrollada se hace mediante la aplicación de 20% de ácido sulfúrico, 20% de ácido clorhídrico ó ácido trifluoro-acético en 20% de ácido nítrico. Todos los ácidos cambian la fluorescencia de azul a amarillo.

II.3 MÉTODOS CUANTITATIVOS

Varios de los métodos adoptados por los científicos y las agencias de gobierno están basados en los procedimientos de cuantificación y detección por cromatografía en capa fina, los que han sido evaluados con frecuencia por estudios colaborativos.

Los métodos de cromatografía líquida de alta resolución son menos utilizados, aunque no dejan de ser excelentes para la cuantificación de aflatoxinas.

La cromatografía en capa fina se utiliza para cuantificar las micotoxinas mediante una medición visual y densitométrica en sus zonas fluorescentes. La resolución de aflatoxinas en cromatografía en capa fina varía día a día debido a las

condiciones cambiantes de laboratorio. La precisión expresada como coeficiente de variación para los estándares son de 5-10% (densitómetro) y de 20 a 28% (visual) (Stubblefield y Shotwell 1977).

a) Métodos de cromatografía en capa fina

Entre los métodos de cromatografía en capa fina se encuentra el método CB descrito en el libro de métodos de análisis de la Asociación de Químicos Analistas Oficiales de los EEUUA (AOAC,1990). Este método se usa como método tipo para evaluar la eficiencia de otros métodos.

Este método consta de las siguientes etapas:

- 1) Extracción: se basa en el uso de reactivos químicos que tienen una polaridad semejante a las aflatoxinas de tal forma que puedan ser extraídas de las muestras.
- 2) Purificación: la purificación se realiza por medio de cromatografía en columna donde el extracto con la aflatoxina se pasa a través de una columna de separación, empacada con sílica gel. Se eluyen diferentes reactivos químicos con distinta polaridad, arrastrando consigo los materiales contaminantes ajenos a las aflatoxinas y, finalmente, se colecta la aflatoxina haciendo pasar disolventes de una polaridad afín a las mismas.
- 3) Cuantificación: la cuantificación se hace por cromatografía en capa fina donde se aplican en capas de sílica gel los estándares y la muestra problema. La concentración se calcula por

comparación visual o densitométrica.

La identificación de aflatoxinas necesita ser confirmada aún después de utilizar la cromatografía en capa fina. Uno de los métodos de confirmación según el manual de la AOAC se basa en una reacción entre el ácido trifluoroacético con AFB₁ y AFG₁.

Una de las ventajas del método es que los disolventes que utiliza (cloroformo, agua) extraen las aflatoxinas del maíz de una manera eficiente. Pero tienen como, principales desventajas los grandes volúmenes de disolventes que utiliza y su peligrosidad por su grado de toxicidad.

Se han implantado varias modificaciones al método CB como puede verificarse en el manual de la AOAC. Recientemente se publicó un método de cromatografía en capa fina rápido, el cual utiliza para la purificación una columna de sílica gel y para su confirmación la cromatografía de gases y espectroscopía de masas.

b) CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR)

El análisis por CLAR puede realizarse en fase normal o fase reversa, con una detección por fluorescencia o por absorción con luz UV. En la cromatografía de fase reversa los compuestos polares se eluyen antes que los compuestos no polares y la mezcla de elución es: solvente acuoso polar/solvente orgánico (v/v). Este tipo de cromatografía utiliza columnas empaquetadas de sílica gel con enlaces de octadecilclorosilano. Estas columnas, conocidas como columnas C₁₈, usan una fase móvil que contiene agua como componente primario (Stubblefield y Shotwell, 1977).

Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de AFB₁ y AFG₁ en la mezcla de disolvente en fase reversa depende de la derivatización, que es generalmente preparada antes de ser inyectada. En la derivatización, las aflatoxinas B₁ y G₁ son convertidas en hemiacetales B_{2a} y G_{2a}, los que presentan una fluorescencia más intensa por tratamiento con ácido trifluoroacético-agua (Hutchins y Hagler, 1983).

El analista debe estar consciente que la derivatización de AFB_{2a} y AFG_{2a} no es estable en metanol, por lo que los disolventes utilizados de inyección deben ser usados con precaución, se recomienda la mezcla de acetonitrilo-agua ya que no degrada rápidamente a la AFB_{2a} y AFG_{2a}.

Diferentes métodos en fase reversa han sido publicados, incluyendo tres comparaciones con el método CB. Stubblefield y Shotwell (1977) encontraron que la AFM₁, AFM₂, AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ tienen una buena resolución y son visualizadas con el detector de luz UV a 350nm usando cromatografía en fase reversa, más una columna C₁₈ (10µm, 4mm x 30cm) y con solventes de elución: acetonitrilo-agua (35-65), con una velocidad de 1.5ml/min. Los métodos propuestos por Hutchins y Hagler (1983), Devries y Chang (1982) y Tarter y col. (1984) utilizan ácido trifluoroacético para la derivatización.

Diebold y col., (1979) utilizaron un fluorómetro de láser para la detección de aflatoxinas B_{2a} después de la cromatografía en fase reversa. Davis y Diener (1980) encontraron que la derivatización de AFB₁ con yodo puede ser usada para el desarrollo de un método

en fase reversa con el detector de fluorescencia para esta derivatización. Este trabajo ha conducido al desarrollo de un método de post-columna de ionización, que aumenta la fluorescencia de B_1 y G_1 después de de la cromatografía en fase inversa, el límite de detección para B_1 es de 20 picogramos(pg).

En la cromatografía en fase normal los compuestos que son eluidos primero son los no polares y los menos polares. En varias publicaciones los sistemas de disolventes para la resolución de las toxinas en CLAR fase normal utilizan columnas de sílica gel activada y como eluyente mezcla de agua-cloruro de metileno y/o cloroformo (3-5, 7), pero no hay posibilidad de reproducir la separación, probablemente porque las variaciones de temperatura en el laboratorio cambian la cantidad de agua disuelta en fase móvil.

Se introdujo una innovación en las separaciones de aflatoxinas detectadas en CLAR en fase normal bajo columnas de micropartículas de sílica gel, unidas al detector de fluorescencia sobre una celda de flujo empacada de sílica gel, para permitir la detección sensible de las aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 en niveles de 0.1-0.2 nanogramos(ng) (Pons, 1979).

En general la cromatografía líquida en fase reversa es preferible a la fase normal, porque la fase móvil es más económica y fácil de preparar y no es necesario un tiempo largo de equilibrio (Tarter, 1984). Según Munck (1989), si se cuenta con un buen eluyente, la detección por fluorescencia es más sensible que aquella por absorción ultravioleta.

Las principales ventajas del CLAR son: la rapidez, exactitud, precisión y automatización y la eliminación de variables ambientales que causan la degradación de las aflatoxinas (Stubbefield y Shotwell, 1977).

II.4 MÉTODOS DE INMUNOAFINIDAD

En estos métodos la purificación de la aflatoxina se efectúa por medio de columnas que contienen anticuerpos monoclonales, los cuales son capaces de reconocer y fijar la aflatoxina en un sitio activo, dejando libre el material extraño a la aflatoxina.

Los anticuerpos monoclonales son producidos por especies eucarióticas superiores como una respuesta a la exposición de un reactivo químico de alto peso molecular ajeno a ella. Ciertas clases de anticuerpos pueden destruir directamente al invasor mientras que otros los inmovilizan facilitando su destrucción. El anticuerpo tiene la habilidad para reconocer específicamente al invasor y enlazarlo en un sitio químico único (Fig. 3).

Históricamente, los anticuerpos han sido producidos en el laboratorio inyectando a los animales con un reactivo químico contra el cual se requiere de anticuerpos o también por la inyección de moléculas estructuralmente similares. Después de una serie de inyecciones, la sangre es colectada y se aíslan los anticuerpos. Esta técnica produce una mezcla de anticuerpos llamada anticuerpos policlonales los cuales, a pesar de que todos reconocen la molécula de interés, lo hacen con diferente

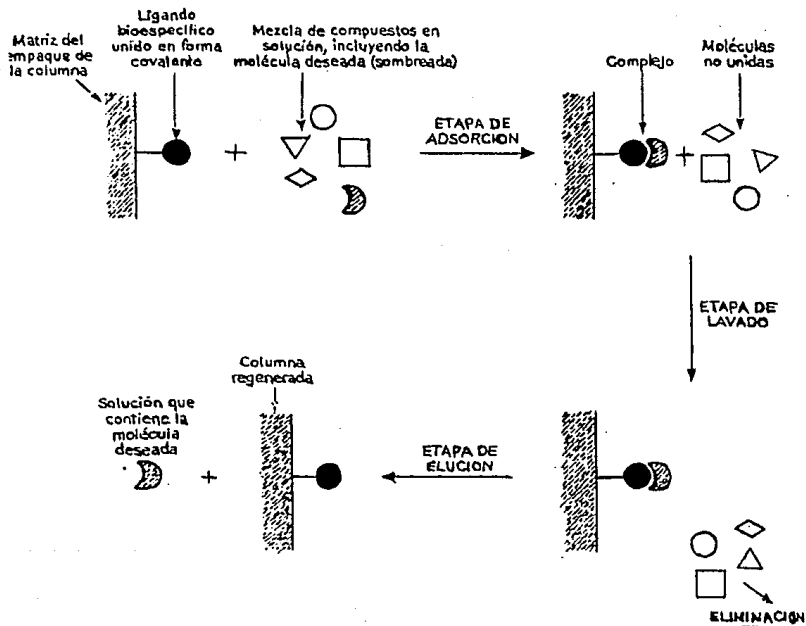


Fig. 3 REPRESENTACION DE LA IDEA DE UNA SEPARACION
EN UNA COLUMNA DE AFINIDAD

eficiencia. La principal desventaja es que dos animales no producen el mismo "cocktail" de anticuerpos ya que cada animal es individual y obviamente tiene un límite de vida.

Por otro lado los anticuerpos monoclonales son producidos por la remoción del bazo de los animales inyectados y la separación de éstos, dentro de sus componentes celulares. Estos son fusionados con células cancerígenas y la resultante es un hibridoma (que son células que tienen la habilidad de crecer en tubos de ensayo y producir anticuerpos). Como las células del bazo han sido fusionadas, solamente un anticuerpo está presente en alguna preparación de anticuerpos monoclonales. Con este procedimiento se puede asegurar la producción de anticuerpos con características definidas. Una ventaja futura es que estos anticuerpos son más específicos y, comparativamente, realizan menos reacciones cruzadas con las sustancias contaminantes que las mezclas de los típicos anticuerpos de las preparaciones policlonales.

A continuación se presentan algunos de los métodos basados en estos principios.

a) METODO "ELISA"

La aflatoxina B₁ en maíz puede determinarse usando técnicas en fase sólida de radio-inmunoensayos (RIA) o ensayo inmunoabsorbente conjugado con una enzima (ELISA).

La principal ventaja de este método es la rapidez, la facilidad en la preparación de las muestras y su costo por análisis. Su

principal desventaja incluye la especificidad para las aflatoxinas B_1 y M_1 así como la reactividad cruzada con otras aflatoxinas. Actualmente, este se considera un método cuantitativo o semicuantitativo y su principal aplicación es para predeterminar pequeñas concentraciones de aflatoxina B_1 . La cantidad presente de AFB_1 se determina mediante la reacción de la enzima desarrollando el color. La técnica de ELISA necesita un avance más sofisticado ya que es necesario desarrollar métodos que puedan distinguir entre AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 y AFG_2 , individual o colectivamente.

Si bien el método ELISA es sensible y sencillo, el ensayo es todavía propenso a algunas interferencias. El tiempo reportado para el método ELISA es de 2 horas. Chu y col. (1987) disminuyeron el tiempo de ensayo hasta en una hora, debido a la optimización de la capa del suero hiperinmune y la incorporación de sustratos más sensibles. Cuando existe la presencia de grandes cantidades de otras aflatoxinas, se establece la reacción de cruzamiento del anticuerpo con éstas que, en el método ELISA es esencial para la interpretación final (Chu y Rachel, 1988).

b) Método de "Agri-Screen"

El método de análisis de Agri-Screen es un sistema basado en el uso de anticuerpos, los cuales utilizan un lector de microcelda para cuantificar los resultados (Koeltzow, 1989).

c) Método de "EZ-Screen"

El análisis de EZ-Screen (también llamado Signal Quick Card) fue desarrollado por Environmental Diagnostics, Inc. Constituye un análisis de ELISA modificado (Koeltzow, 1989).

d) Método tipo "OXOID"

Este método combina la especificidad de la aflatoxina y del anticuerpo con la detección de aflatoxina en una columna de tipo de Holaday-Velasco (Koeltzow, 1989).

e) Método inmunoenzimático homogéneo de aflatoxina B₁

Este método se basa en el efecto de inhibición de la reacción enzimática que produce la adición del anticuerpo sobre un conjugado de toxina-enzima, utilizando el derivado de la aflatoxina B₁-carboximetil-albúmina bovina modificada (Escobar y col., 1988).

f) Método columnas de afinidad-fluorómetro (Aflatest)

Aflatest patentó y comercializó una prueba cuantitativa que permite la detección total de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁ en forma rápida y con alto grado de precisión. Dentro de las ventajas que tiene se encuentran la rapidez (10 minutos), que es cuantitativo (comparable a la CLAR), seguro y de bajo costo de inversión en un equipo de fluorometría. Para el desarrollo del método se necesita primero de una extracción usando un disolvente afín a la polaridad de las aflatoxinas con agitación mecánica y de una purificación que se lleva a cabo utilizando columnas de inmun afinidad. Estas columnas utilizan anticuerpos monoclonales

que enlazan únicamente a las aflatoxinas dejando pasar el material extraño. Los lavados de esta columna son mucho más sencillos. Finalmente, se realiza una cuantificación por medio de un fluorómetro, donde la aflatoxina ya purificada se hace reaccionar con el revelador (yodo 0.2%), para ser cuantificada fluorométricamente. Sin embargo, las columnas son sumamente costosas.

Con base en la disponibilidad de equipo existente en los laboratorios del Centro Nacional de Investigación Certificación y Capacitación (CENICC) de los Almacenes Nacionales de Depósito, ANDSA y de la Facultad de Química de la UNAM, se seleccionaron cuatro metodologías para la cuantificación de las aflatoxinas:

	EXTRACCION Y PURIFICACION	CUANTIFICACION
Método I	CB (AOAC)	CLAR
Método II	AFLATEST	FLUOROMETRO
Método III	AFLATEST	CLAR
Método IV	THEAN y Col., (1980)	CLAR

En los siguientes capítulos se presenta en forma extensa esta evaluación de metodologías.

III. MATERIALES Y METODOS

Materiales

Como se mencionaba en la justificación de este trabajo, se tienen almacenadas cantidades muy considerables de maíz contaminado con aflatoxinas, las cuales no han sido destruidas con la esperanza de encontrar sistemas de desintoxicación cuyos costos sean menores a los del propio grano. Por ello, para esta tesis se utilizó maíz proveniente del silo 85, contaminado naturalmente en el campo, molido, tamizado por malla 10 y malla 20 y caracterizado mediante un análisis bromatológico. El maíz fue proporcionado por Almacenes Nacionales de Depósito, S.A., (ANDSA) De un lote de 5kg de maíz que, originalmente fue obtenido de un muestreo a granel, se empleó el método de cuarteo para obtener muestras de 50g para cada determinación analítica. En el apéndice III se presentan las metodologías más comunes usadas para muestrear granos en silos, contenedores, sistemas de transporte, etc.

También se usó maíz contaminado artificialmente con objeto de validar las metodologías usadas. A grano sano, originario de Toluca al cual previamente se le realizó un análisis para corroborar que no había aflatoxinas presentes en la muestra, se adicionaron estándares de aflatoxinas a muestras de 50g. Las adiciones fueron de 25ppb (microgramos de aflatoxinas por kilogramo de grano) de aflatoxina total (20ppb de AFB₁ y 5ppb de AFB₂) y 20ppb (15ppb de AFB₁, 3ppb de AFB₂, 1ppb de AFG₁ y 1ppb de AFG₂).

Para la contaminación de las muestras, se pesaron previamente 50g de maíz molido y tamizado en un matraz elermeyer de 250ml, al que se le adicionaron volúmenes equivalentes a la concentración deseada de cada aflatoxina utilizando microgoteras, ya que las aflatoxinas se encontraban disueltas en benceno-acetonitrilo (98:2) a una concentración de 1mg/Lt, la solución de las aflatoxinas fue dispersa en toda la muestra, posteriormente se realizó una homogenización por medio de agitación mecánica durante 30 minutos. Las muestras se dejaron reposar 24 horas en refrigeración antes de ser analizadas.

Métodos analíticos

Las combinaciones de los métodos usados, como se mencionó en el capítulo anterior, fueron el método tradicional CB (AOAC, 1990) para la extracción y purificación, acoplado con la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), el método columnas de afinidad-fluorómetro (Aflatest, 1990) de acuerdo a las instrucciones del manual, el método columnas de afinidad-CLAR empleando el método Aflatest (1990) para la extracción y purificación de las aflatoxinas y la cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución y el método de Thean y col. (1980) utilizando para la purificación columnas empacadas de sílica gel (sep-pack) y la cuantificación por CLAR. Los métodos utilizados se presentan con detalle en el apéndice IV.

Análisis estadísticos:

Los resultados analíticos obtenidos fueron evaluados

estadísticamente siguiendo las metodologías del análisis de varianza, desviación estandar, coeficiente de variación y media aritmética (Daniel, 1982).

X = media aritmética

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

n = número de valores de la muestra

x = valores específicos de cada muestra

S = desviación estándar

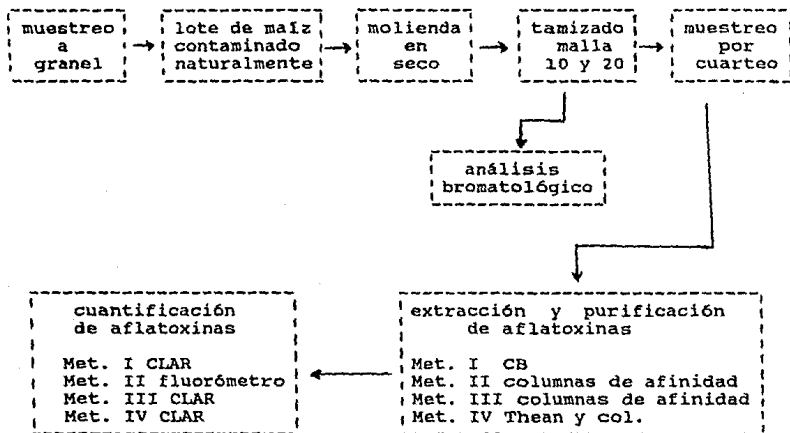
$$S = s^2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x)^2}{n-1}}$$

C.V. = coeficiente de variación

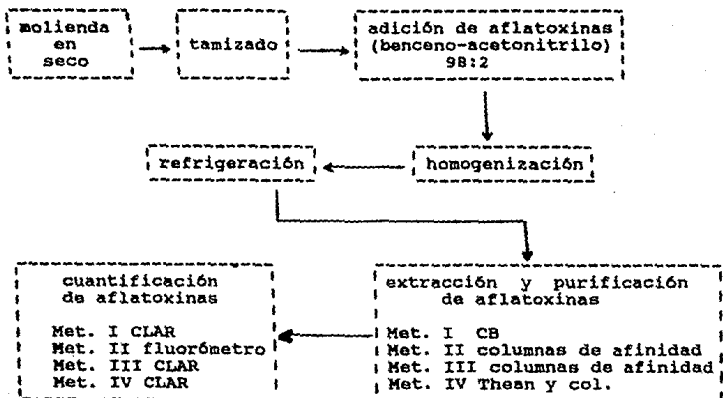
$$C.V = \frac{s}{x} (100)$$

DIAGRAMA DE BLOQUES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Para maíz contaminado naturalmente



Para maíz contaminado artificialmente



IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Se hizo un análisis bromatológico del maíz contaminado que se presenta en la tabla A. Los resultados obtenidos de estos experimentos se presentan en las tablas 1 a la 14. En las primeras nueve se tienen los datos obtenidos de los diferentes métodos aplicados a la cuantificación de aflatoxinas, tanto en maíz contaminado de manera natural (silo 85), como del grano sano que fue artificialmente contaminado con soluciones conocidas de aflatoxinas. Asimismo, se presentan fotocopias de algunos de los cromatogramas obtenidos (Fig. 4 a 9). De las tablas 10 a la 14 se presentan los costos y el tiempo de realización de cada método. En el apéndice IV se adjuntan otras tres tablas que incluyen resultados adicionales.

Los datos para maíz contaminado naturalmente se presentan en las tablas 1 a la 3. Es importante mencionar que aunque los 5kg de maíz contaminado naturalmente fueron homogenizados lo mejor posible, las muestras de 50g no resultaron ser totalmente homogéneas. Esto se observa en los datos reunidos.

La tabla 1 da los resultados obtenidos por el método CB-CLAR. Para las muestras malla 10, (de 20 análisis realizados se escogieron los ocho valores más parecidos entre si), el contenido de aflatoxinas $B_1 + B_2$ fue alrededor de 15ppb, en estas muestras se adicionaron 10ppb de AFG₁ como estándar interno, con el fin de determinar el error del analista, de aquí que el total de aflatoxinas fue de 26ppb. Con respecto a los coeficientes de variación para las aflatoxinas $B_1 + B_2$ es de 8.13, pero de 50.72 para la AFB₂. Esto puede indicar que la aflatoxina B_2 se

encuentra distribuida de una manera más heterogénea que la aflatoxina B₁ ó que al encontrarse en concentraciones más bajas, las etapas de purificación pueden afectar la determinación final.

Para las muestras de malla 20, obtenidas por tamizado de la muestra original, la variación es considerable entre ellas (86.15 para AFB₁, 80.126 para AFB₂ y 85.85 para AFB₁ + AFB₂). Los coeficientes de variación son bastante altos, lo que indica la baja precisión del método. Particularmente para la muestra 9 los extractos fueron divididos equivolumétricamente en 3 columnas y extraídos con cloroformo. Esto se realizó con el fin de observar si la variación de los resultados se debía a la distribución heterogénea de las aflatoxinas o a la etapa de purificación del método. Los resultados condujeron a concluir que es en la etapa de purificación donde existe una gran pérdida de las aflatoxinas, ya que esta etapa se ve muy afectada por la forma de empaque de las columnas y por la calidad de los reactivos químicos utilizados.

Con relación a la variación en el tamaño de partícula, se muestra la diferente distribución de las aflatoxinas en el grano, ya que para el total de aflatoxinas (B₁ + B₂) para malla 10 da una media de 15 y 11ppb para malla 20.

La tabla 2 presenta los resultados obtenidos usando columnas de afinidad en la etapa de extracción y purificación y la cuantificación por medio del fluorómetro y CLAR. En los resultados obtenidos por medio de columnas de afinidad-fluorómetro, aparentemente la medida de la malla no juega un

papel importante (los coeficientes de variación son de 9.41 contra 9.27) para la cantidad total de aflatoxinas que va de 52 a 60ppb. Para el tamaño de partícula malla 10, los valores del contenido total de aflatoxinas son muy similares por ambos métodos: para el método columnas de afinidad-CLAR es de 51.23, y 52.80 para el método columnas de afinidad-fluorómetro. Sin embargo, para las muestras malla 20, existe una variación considerable entre ambas metodologías, ya que el contenido total de aflatoxinas, es siempre un tercio menos por el método columnas de afinidad-CLAR con respecto al obtenido por el método columnas de afinidad-fluorómetro (40.38 contra 60.5). Esto, nuevamente, se puede atribuir a una variación en la calidad de los reactivos químicos utilizados.

Comparando los coeficientes de variación para ambas metodologías y entre los dos tipos de malla, se observa que son muy semejantes a excepción de la AFB₂.

Para el método de Thean y col. (tabla 3) los coeficientes de variación fluctúan entre 30.981 para el contenido total de aflatoxinas, 55.63 para la aflatoxina B₁ y 56.29 para la aflatoxina B₂ cuando el tamaño de partícula es 10. Valores semejantes resultan para la malla 20 (30.552 para AFB₁, 40.541 para AFB₂ y 38.758 para el total de aflatoxinas). Estos valores indican que el método no es preciso. Asimismo, comparando el contenido total de aflatoxinas entre las dos mallas se observa una marcada diferencia (40.516 contra 17.057ppb).

De la tabla 4 a la 8 se muestran los resultados obtenidos de los

análisis realizados a las muestras de maíz contaminado artificialmente.

En la tabla 4, se muestran los resultados del método CB-CLAR para muestras contaminadas con 25ppb de aflatoxina total (20ppb de AFB₁ y 5ppb de AFB₂). Se observa que los resultados son extremadamente bajos, si se compara la cantidad obtenida (20ppb contra un promedio de 5.3ppb de AFB₁, 5 contra un promedio de 1.5ppb de AFB₂). Si se eliminan las muestras 33 y 34 los resultados mejoran un poco (20 contra un promedio de 8.23ppb de AFB₂ y 5 contra un promedio de 2.3ppb de AFB₂). Sin embargo, estos resultados señalan que el método no es exacto.

Por lo que respecta a los coeficientes de variación estos son bastante altos, aún si se eliminan las muestras 33 y 34, lo que indica que el método no es muy preciso y por consiguiente, poco reproducible. Por lo tanto se induce que la pérdida de aflatoxina ocurre en la etapa de extracción y purificación de la muestra ya que influyen varios factores como la preparación de la columna, la calidad de los reactivos químicos y el tiempo de elución, los cuales afectan la recuperación de las aflatoxinas, dando lugar a una pérdida de aproximadamente el 50% del contenido adicionado originalmente en la muestra. Para corroborar esta hipótesis se llevó a cabo otro experimento en el cual el extracto recuperado de la muestra 36 fue dividido equivolúmicamente en tres muestras de 50ml cada uno, las cuales fueron purificadas en tres columnas, preparadas de la misma forma y eluidas con los mismos reactivos de acuerdo al método CB (tabla 5). Se puede observar

que los datos encontrados tienen valores completamente diferentes. Por lo tanto, se induce que la pérdida se da en esta etapa. Si se elimina el dato 36-B para mejorar el análisis estadístico, los resultados mejoran un poco, aunque siguen el mismo comportamiento que el anterior (tabla 4).

El cambio de la malla 10 a la malla 20 no ofrece diferencia significativa entre los resultados obtenidos.

Para los resultados obtenidos en la tabla 6, donde se utilizaron como metodologías columnas de afinidad-fluorómetro y columnas de afinidad-CLAR, se observa que el método columnas de afinidad-fluorómetro da resultados de 100% más de la cantidad adicionada originalmente (25ppb contra 44.6ppb de aflatoxina total). En este caso parece ser que los solventes de los estándares de aflatoxinas interactúan con la solución reveladora que utiliza este método para llevar a cabo la cuantificación fluorométrica. Este problema será tema de otro estudio, por lo tanto, no será discutido posteriormente.

Para la detección con CLAR, después del uso de las columnas de afinidad, los resultados dan siempre valores muy parecidos a las cantidades adicionadas originalmente (20 contra 21.7ppb para AFB₁ y 5 contra 4.87ppb para AFB₂). Confirmando la hipótesis sobre los problemas presentados en la etapa de purificación del método CB. Si se comparan los coeficientes de variación para ambos métodos, se observa que estos son bajos, lo que indica la precisión del método y la reproducibilidad del mismo. En este caso únicamente se usaron muestras malla 10.

Empleado el mismo procedimiento para las muestras contaminadas artificialmente con las cuatro aflatoxinas y con un tamaño de partícula malla 20 (tabla 7), nuevamente se observa que el método columnas de afinidad-fluorómetro da valores ligeramente más altos que los adicionados originalmente (20 contra un promedio de 26.5ppb del total de aflatoxina). Estos valores no son tan altos como en la malla 10 para la mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂, pero no obstante son altos. Por el contrario la cuantificación por CLAR da valores ligeramente más bajos que las cantidades, adicionadas originalmente (15 contra 8ppb de AFB₁, 3 contra 2.6ppb de AFB₂, 1 contra 1.531ppb de AFG₁ y 1 contra 0.539 de AFG₂). Estas diferencias pueden ser atribuidas al tamaño de partícula que interfiere en las extracciones.

En la tabla 8 se encuentran los resultados obtenidos usando el método de Thean y col. Se observa una deficiente recuperación de las aflatoxinas (15 contra un promedio de 9.99 de AFB₁, 3 contra un promedio de 1.3ppb de AFB₂ y 1 contra un promedio de 0.1ppb de AFG₂). Estas pérdidas de aflatoxinas se atribuyen nuevamente a la etapa de extracción y purificación del método.

En la tabla 9 se hace una comparación de cada método, tomando en cuenta el tamaño de partícula de la muestra, la cantidad de aflatoxina detectada y el coeficiente de variación. De acuerdo a esta tabla los métodos que proporcionan una mejor recuperación de las aflatoxinas son columnas de afinidad-fluorómetro, los cuales presentan los coeficientes de variación más bajos.

En las tablas de la 10 a la 13, se reportan los costos de reactivos y equipo para cada método.

En la tabla 10 se tienen los costos para el método CB. Se puede observar que el 80% del costo total se debe a la gran cantidad de reactivos químicos que son empleados en la metodología, el 20% restante representa el costo del equipo.

La tabla 11 presenta los costos para el método columnas de afinidad-fluorómetro. Como se puede ver en esta tabla el 80% del costo total se atribuye al precio de la columna de afinidad, la cual es demasiado cara debido a que solo hay un distribuidor en el mercado mexicano. Es probable, que si se busca otro distribuidor en el extranjero, la competencia de lugar a una reducción en el costo de la columna y de esta forma el método sería accesible y competitivo con los demás.

La tabla 12 presenta los costos para la metodología columnas de afinidad-CLAR. Nuevamente se observa que el 78% del costo total se debe a la columna de afinidad. Si se lleva a cabo lo mencionado anteriormente, el método será competitivo con los demás.

En la tabla 13 se tiene los costos para el método Thean y col. Se puede ver que aunque el método es de bajo costo, el 74% del costo total se atribuye a los reactivos.

En la tabla 14 se presenta el promedio de costos de los métodos usados para la cuantificación de aflatoxinas, así como el tiempo empleado en su realización por muestra. Se observa que las metodologías más costosas son columnas de afinidad-CLAR y columnas de afinidad-fluorómetro, sin embargo son las que emplean

el menor tiempo en su realización. Los métodos menos costosos son el Thean y col. y el CB-CLAR, sin embargo emplean más tiempo en su realización y su bajo costo no justifica su imprecisión.

Tabla A. Resultados de los análisis bromatológicos del maíz silo 85 (contaminado naturalmente)

Humedad	Proteína	Cenizas	Grasa	Fibra cruda
12.07%	11.63%	1.43%	2.36%	37.84%

Tabla 1. Resultados obtenidos usando el método CB-CLAR para las aflatoxinas presentes en maíz contaminado naturalmente (silo 85)

Muestra malla 10	AFB1 ppb	AFB2 ppb	B1 + B2 ppb	AFG1, E.I. ppb	Total ppb
blanco	10.788	0.279	11.067	1.463	
1	17.17	0.807	17.977	9.9	27.87
2	14.09	0.676	14.766	11.09	25.86
3	14.064	0.588	15.192	9.711	24.903
4	13.242	0.933	14.175	11.23	25.405
5	13.918	0.924	14.842	12.326	27.168
6	13.438	0.777	14.215	11.049	25.264
7	15.845	0.089	15.934	11.986	27.92
8	15.81	0.208	16.018	12.146	28.16
X	14.609	0.625	15.389	11.179	-
S	1.401	0.317	1.251	0.979	-
C.V.	9.536	50.72	8.132	8.764	-

Muestra malla 20					
9A*	7.017	0.754	-	-	7.771
9B*	24.239	1.741	-	-	25.98
9C*	3.587	0.515	-	-	4.102
10	3.051	-	-	-	3.051
11	12.88	0.993	-	-	13.873
X	10.154	0.800	-	-	10.955
S	8.792	0.641	-	-	9.405
C.V.	86.585	80.126	-	-	85.850
X*	11.61	1.003	-	-	12.617
S*	11.066	0.649	-	-	11.716
C.V.*	95.287	64.775	-	-	92.852

X = media

S = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

E.I. = estándar interno (10 ppb AFG₁)

* extractos recuperados en muestras equivolumetricas de 50ml y purificadas en columnas

Tabla 2. Resultados obtenidos usando los métodos de columnas de afinidad-fluorómetro y columnas de afinidad-CLAR para aflatoxinas presentes en maíz contaminado naturalmente (silo 85)

Muestra malla 10	lectura fluorómetro ppb	cuantificación CLAR		Total ppb
		AFB ₁ ppb	AFB ₂ ppb	
12	57	54.137	2.002	56.138
13	56	52.31	2.03	54.34
14	49	44.106	2.166	46.272
15	46	41.54	2.04	43.582
16	56	53.80	2.02	55.82
X	52.800	49.178	2.051	51.230
S	4.969	5.912	0.065	5.871
C.V.	9.412	12.022	3.191	11.461

Muestra malla 20				
17	62	45.789	1.094	46.88
18	59	36.019	0.704	36.72
19	50	33.99	1.554	35.55
20	65	34.906	1.660	36.56
21	65	38.38	0.687	39.077
22	62	35.20	0.350	35.55
X	60.5	37.380	1.008	38.389
S	5.612	4.380	0.521	4.354
C.V.	9.276	11.717	51.712	11.343

x = media

S = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

Tabla 3. Resultados obtenidos usando el método de Thean y col. (1980) para aflatoxinas presentes en maíz contaminado naturalmente (silo 85)

Muestra malla 10	AFB ₁ ppb	AFB ₂ ppb	Total ppb
23	17.859	6.176	42.035
24	59.051	5.141	64.192
25	34.754	1.568	36.322
X	37.221	4.295	47.516
S	20.70	2.417	14.727
C.V.	55.63	56.29	30.981

Muestra malla 20	AFB ₁ ppb	AFB ₂ ppb	Total ppb
26	12.687	1.284	13.971
27	14.561	0.625	15.186
28	9.841	0.473	10.314
29	26.543	1.257	27.8
30	17.147	0.867	18.014
X	16.155	0.901	17.057
S	6.390	0.365	6.610
C.V.	39.552	40.541	38.758

x = media

S = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

Tabla 4. Resultados obtenidos usando el método CB-CLAR para aflatoxinas presentes en maíz contaminado artificialmente (20 ppb AFB₁ + 5 ppb AFB₂)

Muestra malla 10	AFB1 ppb	AFB2 ppb	B1 + B2 ppb	AFG1, E.I. ppb	Total ppb
31	4.878	1.751	6.629	9.339	15.968
32	10.602	2.645	13.247	8.663	21.91
33*	1.721	0.741	2.462	9.216	11.678
34*	0.262	-	0.262	9.386	9.648
35	9.225	2.488	11.713	10.445	22.158
X	5.337	1.525	6.861	9.409	-
S	4.524	1.137	5.639	0.646	-
C.V.	84.763	74.572	82.187	6.87	-
X*	8.235	2.294	10.529	9.487	-
S*	2.987	0.477	3.464	0.899	-
C.V.*	36.280	20.801	32.828	9.487	-

x = media

S = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

E. I. = Estándar interno (10 ppb AFG₁)

Tabla 5. Resultados obtenidos usando el método CB-CLAR para aflatoxinas presentes en maíz contaminado artificialmente (20 ppb AFB₁ + AFB₂) pero distribuyendo todos los extractos recuperados en muestras equivolumetricas de 50mL y purificandolas en columnas de acuerdo al método CB

Muestra malla 10	AFB ₁ ppb	AFB ₂ ppb	Total ppb
36A	5.408	2.169	7.577
36B*	0.749	0.961	1.71
36C	7.942	2.572	10.24
X	4.699	1.900	6.509
S	3.648	0.838	4.364
C.V.	77.631	44.108	67.047
X*	6.675	2.370	8.908
S*	1.791	0.284	1.883
C.V.*	26.843	12.021	21.137

malla 20			
37A	6.158	2.387	8.545
37B	4.417	1.993	6.41
37C	7.01	0.666	7.676
X	5.861	1.682	7.543
S	1.321	0.901	1.073
C.V.	22.547	0.536	14.232

x = media

S = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

* sin los datos de la muestra 36B

Tabla 6. Resultados obtenidos usando los métodos columnas de afinidad-fluorómetro y columnas de afinidad-CLAR para aflatoxinas presentes en maíz contaminado artificialmente (20 ppb AFB₁ + 5 ppb AFB₂)

Muestra malla 10	Lectura fluorómetro ppb	Cuantificación CLAR		Total ppb
		AFB1 ppb	AFB2 ppb	
38	43	24.895	4.714	27.25
39	43	20.643	4.877	25.51
40	48	21.139	4.580	25.719
41	42	22.158	5.158	27.25
42	47	19.652	5.041	24.693
blanco	0			
X	44.6	21.697	4.874	26.084
S	2.701	2.002	0.234	1.131
C.V.	6.057	9.230	4.818	4.335

x = media

S = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

Tabla 7. Resultados obtenidos usando los métodos columnas de afinidad-fluorómetro y columnas de afinidad-CLAR para aflatoxinas presentes en maíz contaminado artificialmente (15 ppb AFB₁, 3 ppb AFB₂, 1 ppb AFG₁ y 1 ppb AFG₂)

Muestra malla 20	lectura fluorómetro ppb	cuantificación			CLAR	Total ppb
		AFB1 ppb	AFB2 ppb	AFG1 ppb	AFG2 ppb	
43	27	8.730	2.545	1.804	0.149	13.23
44	25	8.147	2.120	1.780	0.020	12.068
45	26	8.403	2.282	1.365	0.832	12.883
46	29	9.135	2.901	1.657	0.626	14.320
47*	28	3.242	2.563	0.928	1.021	7.755
48	24	9.828	3.074	1.654	0.583	15.141
blanco	1	0	0	0	0	0
X	26.5	7.914	2.580	1.531	0.539	12.566
S	1.870	2.363	0.360	0.334	0.387	2.593
C.V.	7.059	29.869	13.959	21.829	71.826	20.642
X*	26.2	8.848	2.584	1.652	0.442	13.528
S*	1.923	0.660	0.402	0.174	0.342	1.210
C.V.*	7.342	7.466	15.581	10.566	77.533	8.951

x = media

S = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

* sin los datos de la muestra 47

Tabla 8. Resultados obtenidos usando el método Thean y col. (1980) para aflatoxinas presentes en maíz contaminado artificialmente (15 ppb AFB₁, 3 ppb AFB₂, 1 ppb AFG₁, 1 ppb AFG₂)

Muestra malla 10	AFB1 ppb	AFB2 ppb	AFG1 ppb	AFG2 ppb	Total ppb
49	10.628	1.322	-	0.128	12.078
50	9.6	1.269	0.902	0.095	11.866
51	10.752	1.387	-	0.143	12.282
52	9.226	1.237	-	0.081	10.544
53	9.3	1.290	-	0.089	10.679
X	9.991	1.301	-	0.107	11.489
S	0.734	0.057	-	0.026	0.816
C.V.	7.422	4.395	-	25.034	7.206

x = media

S = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

Tabla 9. Comparación entre los métodos analíticos usados para la determinación total de aflatoxinas en muestras de maíz contaminado naturalmente y artificialmente.

	maíz contaminado naturalmente		maíz contaminado artificialmente		
	AF's ppb	C.V.	AF's ppb	C.V.	
CB-CLAR	malla 10	15.39	8.13	9.5 (25)	9.49
	malla 20	10.96	85.85	-	-
CA-F	malla 10	52.8	9.41	44.6 (25)	6.06
	malla 20	60.5	9.28	26.5 (20)	7.06
CA-CLAR	malla 10	51.23	11.46	26.1 (25)	4.34
	malla 20	38.39	11.34	13.5 (20)	8.95
Thean y col.	m 10	47.52	30.98	11.5 (20)	7.21
	m 20	17.06	38.76	-	-

TABLA 10. Costos para el método CB (Pesos mexicanos)

Reactivos	Cantidad	Costos reactivo	Cantidad reactivo	Costos análisis
Celite	35g	30,000	500g	2100.00
Sulfato de sodio	20g	168,340	10kg	336.68
Silica gel	10g	190,575	1000g	1905.75
Carbonato de cobre	0.3g	51,475	500g	30.88
Fibra de vidrio	2g	17,000	500g	68.00
Cloroformo	400ml	32,175	1000ml	12,870.00
Hexano	150ml	6,500	1000ml	975.00
Eter etílico	150ml	160,564	18000ml	1,337.70
Metanol	4.5ml	14,220	9000ml	7.11
TFA	0.2ml	21,458	100ml	42.91
Papel Whatman	1	250	100	2.50
Agua destilada	25ml	6,000	18lts	8.30
Hipoclorito de sodio	20ml	5,700	1000ml	114.00
Metanol CLAR	8.5ml	67,827	4lts	143.976
Ac.acético	2.8ml	20,303	1lt	57.461
NaOH	0.113ml	31,274	500g	7.08
Total reactivos				\$ 20,018.55
Equipo	Número piezas	Costo unitario	Depreciación a 5 años y energía	Tiempo de uso (por análisis)
Agitador	1	2,128,000	36.9	30
Rota-vapor	1	2,912,829	252.8	30
Campana de extracción	1	27,500,000	716.1	45
Bomba de vacío	1	730,588	0.8	2
Tanque de nitrógeno	1	380,000	2.2	10
Cromatógrafo de líquidos	1	82,000,000	4,270.8	90
Balanza granataria	1	386,400	1.1	5
Total de equipo			\$ 5,280.77	
Costo total por análisis			\$ 25,299.25	

Tabla 11. Costos para el método Columnas de afinidad-fluorómetro (pesos mexicanos)

Reactivos	Cantidad	Costo reactivo	Cantidad reactivo	Costo análisis
Metanol	80ml	51,147.4	4lts	1,022.94
Agua destilada	80ml	6,000	1.8lts	27.00
Metanol HPLC	1ml	67,827	4lts	16.95
Revelador	1ml	7,214,065	30ml	2,404.00
NaCl	5g	5,000	1kg	25.00
Papel predoblado	1	149,408	100	1,494.08
Papel fibra de vidrio	1	249,211.9	100	2,492.11
Columna Aflatest y celda	1	4,601,766.4	100	46,018
Hipoclorito de sodio	5	5,700	1lt	28.5
Total reactivos				\$ 53,528.28
Equipo	Número piezas	Costo unitario	Depreciación a 5 años y energía	Tiempo de uso (por análisis)
Campana de extracción	1	27,500,000	716.1	45
Fluorómetro	1	62,000,000	3,500.0	1.5
Balanza granataria	1	386,400	1.1	5
Total de equipo			\$ 4,217.2	
Costo total por análisis		\$ 57,745.48		

Tabla 12. Costos para el método de columnas de afinidad-CLAR

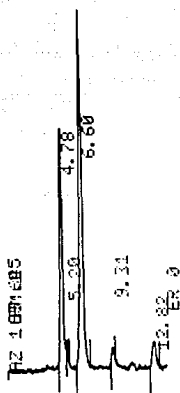
Reactivos	Cantidad	Costo reactivo	Cantidad reactivo	Costo análisis
Metanol	80ml	51,147.4	4lts	1,022.94
Agua destilada	80ml	6,000	1.8lts	27.00
Revelador	1ml	72,140.65	30ml	2,404.00
Acetonitrilo	2ml	153,895	1lt	303.79
HPLC				
Hexano HPLC	0.2ml	177,100	4lts	8.85
NaCl	5g	5,000	1kg	25.00
Papel predoblado	1	149,408	100ml	1,494.08
Papel fibra de vidrio	1	249,211.9	100	2,492.11
Columna Aflatest y calda	1	4,601,766.4	100	46,018.00
Metanol HPLC	7.07ml	67,827	4lts	119.96
TFA	0.2ml	21,458	100ml	42.91
AC.acético	2.3ml	20,303	1lt	47.87
NaOH	0.094g	31,274.25	500g	5.87
Hipoclorito de sodio	5ml	5,700	1lt	28.5
Total reactivos				\$ 54,049.43
Equipo	Número piezas	Costo unitario	Depreciación a 5 años y energía	Tiempo de uso (por análisis) min
Campana de extracción	1	27,500,000	716.1	20
Cromatógrafo de líquidos	1	82,000,000	4,270.8	20
Balanza granataria	1	386,400	1.1	5
Tanque de nitrógeno	1	380,000	2.2	10
Total de equipo			\$ 4,990.2	
Costo total por análisis		\$ 59,039.63		

Tabla 13. Costos para el método Thean y col. (1980) (pesos mexicanos)

Reactivos	Cantidad	Costo reactivo	Cantidad reactivo	Costo análisis
Celite	10g	30,000	500g	600
Sulfato de amonio	6g	60,569	1kg	363.41
Metanol	160ml	14,220	9lt	252.80
Agua destilada	120ml	6,000	18lt	40.00
Cloroformo	12.8ml	32,175	1lt	413.45
Hexano	3.5ml	6,500	1lt	26.00
Eter etílico	2.0ml	160,524	18lt	17.84
Etanol	0.15ml	8,500	1lt	1.28
Cartucho sep-pack	1	653,683.00	50	13073.66
Hipoclorito de sodio	20ml	5,700	1lt	114.00
NaOH	0.113g	31,274.25	500g	7.08
Ac.acético	2.83ml	20,303	1litro	57.46
Metanol HPLC	8.5ml	67,827	4litros	143.97
Total reactivos				\$ 15,122.16
Equipo	Número piezas	Costo unitario	Depreciación a 5 años y energía	Tiempo de uso (por análisis) min
Agitador	1	2,128,000	36.9	30
Rota-vapor	1	2,912,829	252.8	150
Campana de extracción	1	27,500,000	716.1	45
Bomba de vacío	1	730,588	0.8	2
Tanque de nitrógeno	1	380,000	2.2	10
Cromatógrafo de líquidos	1	82,000,000	4,270.8	90
Balanza granataria	1	386,400	1.1	5
Total de equipo			\$ 5,280.7	
Costo total por análisis			\$ 20,404.86	

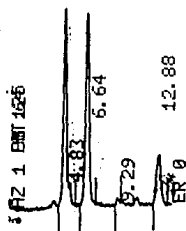
Tabla 14. Promedio de costos de los métodos usados para la cuantificación de aflatoxinas (pesos mexicanos)

Estándar aflatoxina	Cantidad g	Costo \$ PM	Cantidad reactivo, g	Costo muestra \$ PM
B ₁	1.50E-08	57,725	0.001	0.79
B ₂	1.50E-08	90,187	0.001	1.35
G ₁	1.50E-08	61,050	0.001	0.92
G ₂	1.50E-08	99,345	0.001	1.49
Total				4.55
Método	Reactivos \$ PM	Uso de equipo \$ PM	Tiempo min	costo total \$ PM
CB-CLAR	20,018.55	5,280.7	210	25,299.25
CA-F	53,528.28	4,217.2	10	57,745.48
CA-CLAR	54,049.43	4,990.2	60	59,039.63
Thean y col.	15,122.16	5,280.7	260	20,402.86



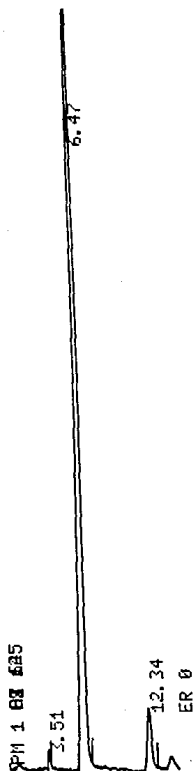
NAME	PPB	RT	AREA BC	RF
AFLA G1	11.363	4.78	546037 02	48053.547
2	0.	5.20	34485 03	
AFLA B1	17.17	6.00	1116546 01	65028.893
4	0.	9.31	28172 01	
AFLA B2	0.807	12.82	97263 01	120524.164
TOTALS	29.34		1822503	

Fig. 4 Cromatograma de la cuantificación de aflatoxinas por el método CB-CLAR para maíz silo 85.
 * AFG₁ es el estándar interno



NAME	PPB	RT	ARÉA BC	RF
AFLA G1	11.073	4.83	532187 01	48061.682
AFLA B1	9.225	6.64	602398 01	65300.596
AFLA G2	1.082	9.29	12455 01	1.
AFLA B2	2.488	12.88	202562 01	81415.595
<u>TOTALS</u>	<u>22.704</u>		<u>1349602</u>	

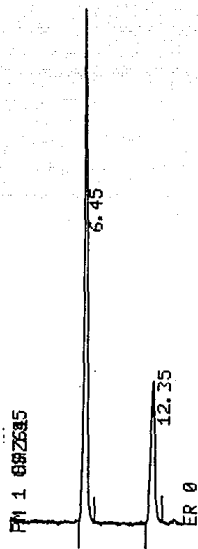
Fig. 5 Cromatograma de la cuantificación de las aflatoxinas por el método CB-CLAR para maíz contaminado artificialmente (20ppb de AFB₁ y 5ppb AFB₂)
 * AFG₁ es el estándar interno



NAME	PPB	RT	AREA	BC	RF
1	0.	3.51	27690	01	
AFLA B1	58.705	6.47	3056647	01	52067.916
AFLA B2	1.403	12.34	234718	01	167297.22

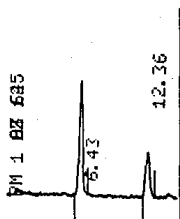
TOTALS 60.108 3319055

Fig. 6 Cromatograma de la cuantificación de aflatoxinas por el método columnas de afinidad-CLAR para maíz contaminado naturalmente silo 85



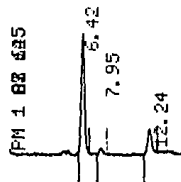
NAME	PPB	RT	AREA BC	RF
AFLA B1	26.466	6.45	1518405 01	57371.911
AFLA B2	6.253	12.35	549466 01	87872.381
TOTALS	32.719		2067871	

Fig. 7 Cromatograma de la cuantificación de aflatoxinas por el método columnas de afinidad-CLAR para maíz contaminado artificialmente (20ppb de AFB₁ y 5ppb de AFB₂)



NAME	PPB	RT	AREA BC	RF
AFLA B1	13.898	6.43	331248 01	61251.479
AFLA B2	6.169	12.36	161506 01	74461.042
TOTALS	24.027		492754	

Fig. 8 Cromatograma de la cuantificación de aflatoxinas por el método Thean y col. para maíz contaminado naturalmente silo 85



NAME	PPB	RT	AREA BC	RF
AFLA B1	9.226	6.42	346190 01	37523.304
AFLA B2	1.081	7.95	17991 01	1.
AFLAB2	1.237	12.24	89640 01	72465.643
TOTALS	10.382		453821	

Fig. 9 Cromatograma de la cuantificación de aflatoxinas por el método Thean y col. para maíz contaminado artificialmente (15ppb de AFB₁, 3ppb de AFB₂, 1ppb de AFG₁ y 1 ppb de AFG₂)

V.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Dentro de las conclusiones y recomendaciones que pueden destacarse en este trabajo, está la selección de una metodología analítica específica a las necesidades de los laboratorios de certificación y control en particular. Si el volumen de muestras es muy grande, el método de columnas de afinidad-fluorómetro (Aflatest) es el adecuado a pesar de su costo inicial, ya que es compensado por su mínimo tiempo de análisis y el prorrateo de ese costo entre el número de muestras analizadas. Además, desde el punto de vista de seguridad laboral, es el más seguro, ya que no utiliza estándares de aflatoxinas, ni solventes químicos en grandes cantidades. La desventaja que tiene el método, es que sólo cuantifica la cantidad de aflatoxina total presente en la muestra. Para trabajos de investigación, en los cuales se requiera saber la cantidad de cada aflatoxina presente en la muestra, la combinación de los métodos Aflatest-CLAR es la adecuado, por ser una combinación de métodos exactos y precisos. Asimismo, se recomienda este método en la certificación para los granos, particularmente para los granos que serán empleados en el consumo humano directo e indirecto (granos para consumo animal cuyos productos sean destinados al consumo humano) ya que es posible cuantificar cada uno de los tipos de aflatoxinas.

Respecto al método CB, aunque es un método tradicional y se encuentra registrado por la AOAC, resulta ser un método lento y laborioso así como de alto riesgo para el analista por la

cantidad de reactivos que utiliza. Además la precisión y exactitud es cuestionable ya que depende de varios factores, como la preparación de las columnas, el tiempo de elución y la calidad de los reactivos.

El método de Thean y col. (1980), aunque resultó ser el más barato, su costo no justifica su inexactitud e imprecisión así como el tiempo empleado en su realización.

Se recomienda utilizar reactivos químicos de buena calidad y de lotes uniformes. Es decir, escoger los disolventes que brindan los mejores resultados (en cuanto a recuperación de aflatoxinas por el método elegido) y su constante utilización ya que la variación de este parámetro altera los resultados en una forma considerable.

Otro factor a considerar es el muestreo, porque de éste depende que se tenga una representación real de lo que se quiere analizar. En el caso particular de las aflatoxinas es de suma importancia, porque se encuentran distribuidas de una manera heterogénea y azarosa, ya que, si se elige un método altamente confiable y no se realiza un buen muestreo, se tendrán resultados falsos.

Por último y aunque no es sujeto de este trabajo, debe existir un sistema legal que respalde un trabajo analítico ya que debido a la complejidad de las cadenas de distribución de los alimentos y a la posibilidad de conflictos de intereses, estos laboratorios analíticos pueden estar sujetos a presiones no solamente políticas sino sociales. Un resultado negativo de estas presiones

tendría como consecuencia un problema grave de salud pública. Por otro lado, en otros países el costo de estos análisis va por cuenta de los interesados, por lo que la legislación mexicana deberá contemplar, tanto los mecanismos de pago de estos análisis de calidad, como la necesidad de que estos se realicen también a los alimentos de importación estableciendo normas que garanticen la salud de la población.

BIBLIOGRAFIA

AOAC, 1986. American Association of Cereal Chemists. Aflatoxin in corn: presumptive test. Revisions to Approved Methods. Method 45-15: 1-4.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. W. Horwitz, Ed. 15ava. Edición. Pag. 429 (26.018, 26.019).

ARMBRECHT, B.H., SHALKOP, W.T., WISEMAN, H.G., JACKSON, J.F. y ZIMMERMAN, H.E. 1969. The effects produced in brood sows by feeding aflatoxin. Editores: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. Y Renfro, B.L. Pp 51-52. Pub. CIMMYT, México D.F.

DOULLS, J.M., KLAASSEN, D.C. y AMADUR, M.O. 1986. Toxicology. Macmillan Publishing. Ed. 3ra. Edición. USA.

CYSEWSKI, S.J.; PIER, A.C.; ENGSTROM, G.W.; RICHARD, J.L.; DOUGHERTY, R.W. y THURSTON, J.R. 1968. Clinical pathologic features of acute aflatoxicosis of swine. Am. J. Vet. Res., 29:1577.

CHU, F.S., FAN, T.S., ZHANG, G.S. y XU, Y.C. 1987 Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ in agricultural commodities. J. AOAC, 70:5.

CHU, F.S. y RACHEL, C.L. 1988. Evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay of cleanup for thin-layer chromatography of aflatoxin B₁ in corn, peanuts, and peanut butter. J. AOAC, 71:5

DANIEL, W.W. 1982. Biostatística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa. México D.F.

DAVIS, N.D. y DIENER, U.L. 1980. Confirmatory test for the high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin B₁. J. AOAC, 63:107.

DIEBOLD, G.J., KARNY, N., ZARE, R.N. y SEITZ, L.M. 1979. Laser fluorometric determination of aflatoxin B₁ in corn. J. AOAC, 62:5

DEVRIES, J.W. y CHANG, H.L. 1982. Comparison of rapid high

- ESCOBAR, A. MELLA, C. y FERNANDEZ, O. 1988. Método inmunoenzimático homogéneo de aflatoxina B₁. Rev. Salud Anim. 8:169-175. Cuba.
- GARCIA A. 1989. Manual de Métodos para el Análisis de Micotoxinas en Granos. UNAM. México D.F.
- GOLDBLATT, L.A. 1974. Aflatoxin. En "Encyclopedia of Food Technology". Eds. A.H. Johnson y M.S. Peterson. Vol. 2. Pp. 12-15. The AVI Pub. Co. Inc. Westport, EUA.
- HAMILTON, P.B. 1987. Aflatoxicosis en animales de granjas. En "Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop". Editores: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. y Renfro, B.L. Pp. 51-57. Pub. CIMMYT, México D.F.
- HOLADAY y VELASCO., 1990. Minicolumn method aflatoxins in corn and peanuts. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. K. Helrich, Ed. 15ava. Edición. Pag. 1188-1190 (975.37).
- HOWARD, R. R., 1981. Food Safety. A Wiley-Interscience. Ed. EEUUA. Pp. 196-1232.
- HUTCHINS, J.E. y HAGLER, W.M. 1983. Rapid liquid chromatographic determination of aflatoxins in heavily contaminated corn. J. AOAC, 66:6.
- KOELTZOW, D.E. 1989. Comparative evaluation of commercially available aflatoxin test methods. Department of Agriculture. Federal Grain Inspection Service. Quality Assurance and Research Division. Research and Development Branch. EEUUA.
- LILLEHOJ, E.B., CIEGLER, A. y DETROY, R.W. 1970. Fungal toxins en essays in toxicology. Ed. F.R. Blood, Academic Press. EEUUA.
- MARTIN, N.C. MULHOLLAND, F. y GARNER, C. 1987. Aflatoxins in animal feedstuffs. Creative Press. Ltd. EEUUA.
- MORENO, M. y GIL, G. 1990. Aspergillus flavus y la producción de Aflatoxinas. ANDSA. México D.F.
- MUNCK, L. 1989. Fluorescence Analysis in Food. Longman Scientific and Technical., EEUUA.

- PEERS, F., BOSCH, X., KALDOR, J., LINSELL, A. y PLUIJMEN, M. 1987. Aflatoxin Exposure, Hepatitis B, Virus Infection, and Liver Cancer in Swaziland. *Int. J. Cancer*: 39:545-553.
- PIER, A.C. 1987. Aflatoxicosis e inmunosupresión en animales mamíferos. En "Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop". Editores: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. y Renfro, B.L. Pp. 58-65. Pub. CIMMYT, México D.F.
- PONS, W.A. 1975. Resolution of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. AOAC.*, 59:1.
- PONS, W.A. 1979. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in corn. *J. AOAC*, 62:3.
- ROMER, T. 1990. Minicolumn method aflatoxins in foods and feeds. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. K. Helrich, Ed. 15ava. Edición. Pag.1187-1188. (975.36).
- ROSILES, R. 1987. Aflatoxicosis en animales de granja. En "Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop". Editores: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. y Renfro, B.L. Pp. 66-70. Pub. CIMMYT, México D.F.
- SHANK, R.C. 1981. Micotoxins N-Nitroso Compounds Environmental risks. Vol.II. CRC Pub. Inc. Boca Raton, EUA. Pp. 130-135.
- STOLOFF, L. 1979. Mycotoxin residues in edible animal tissues. En Interactions of mycotoxins in animal production. National Academy of Science (USA). Washington, D.C. Pp. 157-166. EUA.
- STUBBLEFIELD, R.D. y SHOTWELL, O.L. 1977. Reverse phase analytical and preparative high pressure liquid chromatography of aflatoxins. *J. AOAC*, 60:4.
- TARTER, E.J., HANCHAY, J.P. y SCOTT, P.M. 1984. Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. *J. AOAC*, 67:3
- THEAN, J.E., LORENZ, D.R. y WILSON, D.M. 1980. Extraction, cleanup, and quantitative determination of aflatoxins in corn. *J. AOAC*, 63:3

WOGAN, G.N. 1975. Micotoxins. Annual Rev. Pharmacol. Vol. 15, P. 437.

YEH, F., YU, M.C., MO, CH., LUO, S., TONG, M.J. y HENDERSON, B.E. 1989. Hepatitis B Virus, Aflatoxins, and Hepatocellular Carcinoma in Southern Guangxi, China. Cancer Res., 49:2506-2509 (1989).

APENDICE I

LABORATORIOS ANALITICOS PARA AFLATOXINAS

Todas las dependencias oficiales y privadas asignadas para efectuar el análisis cualitativo y cuantitativo de aflatoxinas, involucran el uso de reactivos químicos peligrosos para la salud, incluidos los propios estándares de las aflatoxinas. Por ello, el personal adscrito a estas tareas requiere de exámenes médicos periódicos. Es importante que, como en todo laboratorio que use sustancias químicas, se conozcan las recomendaciones que involucran su uso y, particularmente, en el análisis de aflatoxinas se requiere de un entrenamiento para su manejo.

Los análisis requeridos durante esos exámenes médicos periódicos son:

- * Audiograma,
- * Análisis de la química sanguínea (función hepática TGO, TGP),
- * Análisis de orina (creatinina, urea, glucosa),
- * Citología de esputo,
- * Citología del sedimento urinario,
- * Historial médico con especial atención a la ingestión de bebidas alcohólicas,
- * Rayos X del tórax.

1. REGLAS DE SALUD Y SEGURIDAD

El personal que trabaja en el laboratorio de análisis de aflatoxinas debe guardar las siguientes medidas de control:

- (a) Almacenar los reactivos y el equipo fuera de la campana,
- (b) Almacenar en el refrigerador las soluciones estándares. de aflatoxinas,
- (c) Almacenar los reactivos químicos en lugares donde no obstaculicen los movimientos o causen desorden en la mesa de trabajo. No almacenar soluciones a una altura superior a 1m arriba del nivel del piso,
- (d) Etiquetar todos los frascos y contenedores,
- (e) No fumar, comer, beber dentro del laboratorio,
- (f) Lavarse las manos inmediatamente comer, fumar, beber,
- (g) Usar bata de laboratorio, guantes tipo vinil, un casco o una gorra, mascarilla y lentes de seguridad cuando se trabaja.
- (h) La mascarilla debe ser del tipo 3M modelo 8710 o tipo moldex modelo 2200,
- (i) No usar la ropa de protección fuera del laboratorio para evitar contaminaciones externas,
- (j) Moler las muestras en un recinto cerrado con control de salida de gases. Estos deben ser evacuados a una velocidad adecuada para limitar y transportar las partículas lejos del área del laboratorio acumulándolas y tratándolas con hipoclorito de sodio antes de eliminarlas,
- (k) Analizar las muestras con luz "negra" solamente sobre superficies planas no reflexivas,
- (l) Preparar las soluciones y efectuar los análisis dentro de la la campana, cuyos gases sean dirigidos al mismo ducto del cuarto de molienda,
- (m) Colocar los disolventes usados (cloroformo, tolueno, acetona,

etc) y soluciones en frascos etiquetados, impermeables y herméticamente sellados para su confinamiento controlado. La cantidad total de desechos químicos en el laboratorio no debe exceder de 4 litros por día (para líquidos). También es indispensable que se tengan los mecanismos para disponer de todos desechos generados, de acuerdo con las leyes existentes. Si se cuenta con la infraestructura, es importante que los disolventes usados puedan ser reducidos en volumen por evaporación, para minimizar los problemas de disposición,

- (n) Poner todo el material de vidrio utilizado en una cubeta que contenga una solución de hipoclorito al 5 %. Lavar el material en esta solución y dejarlos por espacio de 15 minutos y lavar después perfectamente con agua antes de ser reutilizados,
- (o) Poner todas las muestras sobrantes y todas las porciones de muestras, desde lotes, sublotes y minicolumnas positivas, en bolsas impermeables y etiquetadas como "material biopeligroso". Si al final de la experimentación con las muestras, el lote o sublote es positivo proceder a la descontaminación antes de eliminarlo,
- (p) Descontaminar todos los desechos contaminados con una solución de hipoclorito antes de ser enviados a su destino final,
- (q) Limpiar las áreas y materiales contaminados por accidentes ocurridos (i.e. esparcimiento del contenido de frascos rotos con soluciones de aflatoxinas, con hipoclorito de sodio al 5

o 6%. Usar una parte de blanqueador por 10 partes de material desparramado. El tiempo de contacto debe ser de 15 min. Poner los materiales descontaminados y limpios en un fregadero, lavarlos con agua y expulsar los desechos líquidos a la alcantarilla. Poner los desechos sólidos en una bolsa de plástico, cerrarlos perfectamente y enviarlos a los tiraderos controlados etiquetados como residuos peligrosos. En el caso de disolventes desparramados, absorberlos de las mesas de trabajo o lugar contaminado con un material absorbente y poner ese material bajo la campana hasta que todo el disolvente haya sido evaporado del material absorbente y depositarlo en una bolsa de plástico y enviarlo al lote que va al tiradero controlado,

(r) Colocar las muestras sobrantes, los lotes y sublotes positivos y las minicolumnas positivas, los desechos de la molienda, el papel filtro, las puntas de pipeta usadas, los guantes y lentes de plástico desechables usados, en una bolsa de plástico, colocar esta bolsa dentro de una segunda bolsa de plástico y cerrarla perfectamente etiquetando la bolsa como "material tóxico" y ponerla en el mismo lote que va al tiradero controlado,

(s) La ropa de laboratorio lavable usada durante la molienda y análisis de las muestras, debe ser depositada en bolsas etiquetadas para mandarla a una lavandería especial que emplee hipoclorito de sodio,

(t) Limpiar las áreas de trabajo y todas las superficies del laboratorio con una solución de hipoclorito al 5-6% al final de cada día de trabajo,

2. INSTALACIONES FISICAS

Los responsables de los laboratorios analíticos deben garantizar que existan áreas de trabajo con superficies planas no reflectivas y de fácil acceso para que el examen rutinario con luz "negra" indique la existencia de áreas contaminadas. Para ello es importante que no haya ventanas o que éstas cierren herméticamente para evitar la entrada de luz, al realizar este trabajo.

Deben de existir recipientes de metal inoxidable resistente al hipoclorito de sodio impermeables y perfectamente sellados en los cuales se almacenen temporalmente los líquidos inflamables y el material biológico (antes de ser enviados a los confinamientos controlados).

En países desarrollados, con normas ecológicas estrictas, se han aprobado disposiciones para facilitar el envío de estos residuos peligrosos a los confinamientos o tiraderos controlados.

Deben existir en los laboratorios señalamientos como las siguientes: "Material biopeligroso, no ingerir alimentos o bebidas ni fumar", "usar mascarilla, bata y lentes de seguridad", "material inflamable presente". En los refrigeradores y otros sitios de almacenamiento debe especificarse con esos letreros que hay "material biopeligroso presente, no introducir alimentos o bebidas".

Otra recomendación importante es la de mantener un almacén, limitado de reactivos inflamables en el laboratorio (es deseable que no sobrepase de 10 litros).

Con respecto de la ubicación del propio laboratorio analítico y, particularmente del que analiza aflatoxinas, si éste está localizado en un edificio en el cual existan otros departamentos se debe contar con las siguientes condiciones mínimas:

- 1) Localización: El laboratorio debe estar localizado a una distancia mínima de 30 m de la base de cualquier elevador a la parte superior del edificio. Esta distancia deberá estar sujeta a negociación para evitar la posible entrada de contaminantes al cubo del elevador,
- 2) El laboratorio analítico de aflatoxinas debe estar aislado de los laboratorios no ocupados por una barrera contra el fuego, teniendo como mínimo una hora de resistencia la fuego. La barrera consistirá de pisos, techos y paredes interiores. Todos los pasillos y otras entradas que conduzcan a su interior deberán ser provistas con puertas resistentes al fuego teniendo 1 hora de resistencia. La entrada de estas puertas no deberá estar bloqueada. Finalmente, el espacio disponible para las determinaciones analíticas de aflatoxinas debe estar separado de los sistemas de calefacción central, ventilación y aire acondicionado por un regulador de cierre automático de fuego en los ductos de la calefacción, ventilación y aire acondicionado cercanos a la barrera de fuego ó por el uso de un separador de los sistemas de

calefacción, ventilación y aire acondicionado para el laboratorio.

- 3) Sistema eléctrico: El espacio del laboratorio deberá estar provisto con un generador eléctrico propio para el caso de una emergencia. Debe tener iluminación artificial suficiente y brillante, de acuerdo a los estándares internacionales. Un sistema trifásico es satisfactorio. Las instalaciones de corriente eléctrica deberán ser instaladas a través de un techo que sirva como una barrera al fuego. Las instalaciones suspendidas abajo de los techos son aceptables.
- 4) Plomería: El laboratorio deberá estar provisto de una instalación que tenga agua potable fría y caliente y de conexiones a fosas sépticas donde pueda introducirse el hipoclorito de sodio antes de enviar los efluentes líquidos a la red de alcantarillado.
- 5) Campanas: El laboratorio deberá contar con campanas que tengan ductos controlados donde los gases sean tratados con disoluciones de hipoclorito de sodio antes de que salgan al exterior del edificio. Estos ductos requieren de una abertura de 15 a 20 cm de diámetro en la salida para evitar caídas de presión elevadas.

Es recomendable que estos laboratorios analíticos para aflatoxinas estén ubicados en edificios pequeños usados exclusivamente para este propósito.

Si la construcción es adecuada, no se requiere una barrera para el fuego. Tampoco son necesarias las puertas resistentes al fuego, los reguladores del fuego en calentamiento y los ductos de ventilación y aire acondicionado.

Será necesario establecer programas continuos de entrenamiento del personal adscrito al laboratorio analítico de aflatoxinas, a través de una oficina de entrenamiento ó un programa de entrenamiento para los empleados del laboratorio, sobre los señalamientos que deben acatarse, ya que la rutina genera laxitud en el seguimiento de las normas de seguridad. El programa periódico debe incluir:

- a) Información actualizada de las condiciones y manejo de las aflatoxinas
- b) Etapas necesarias para protegerse contra las aflatoxinas, incluyendo higiene personal, equipo de protección personal y métodos para descontaminar
- c) Propósito, cuidados adecuados y limitaciones del uso de mascarillas y otros equipos de protección
- d) Propósito y descripción del programa médico
- e) Ingeniería, prácticas de trabajo y controles, incluyendo métodos
- f) Revisión de las normas vigentes ecológicas y de salud.

APENDICE II

LEGISLACION SOBRE MANEJO DE ALIMENTOS CONTAMINADOS CON AFLATOXINAS

La Organización de las Naciones Unidas, (ONU), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los comités internacionales de expertos sobre la nutrición han recomendado que los niveles de aflatoxinas en suplementos proteínicos no deben exceder de 30 ppb, aunque un límite más bajo (incluso cero) sea preferido si las necesidades y disponibilidad de fuentes de proteína no son críticas.

Para forrajes, en varios países se sigue el código de prácticas preparado por la Asociación Nacional de Productores de Alimentos Balanceados de los EEUU. Este código recomienda la limitación sobre el uso de suplementos proteínicos contaminados con micotoxinas en mezclas de alimentos para animales. Dependiendo de la edad y la especie sugieren concentraciones que van, desde cero para aflatoxinas en alimentos para patos, pavos, pollitos, hasta un máximo de 2.5% para ganado bovino no lactante y 5% para ovejas.

En Estados Unidos, la oficina responsable de la regulación de alimentos y medicamentos "Food and Drug Administration" (FDA), ha declarado que no hay tolerancia para las aflatoxinas en ningún alimento, ya sea para personas o animales. Sin embargo, se ha aceptado un límite, por debajo del cual no, se aplican sanciones, como la destrucción del lote contaminado por incineración. Este límite es de 20 microgramos por kilogramo de muestra en análisis rutinarios de productos.

La dilución para lograr niveles inferiores a 20 microgramos de aflatoxinas por kilogramo de producto no está vedada en Estados Unidos, lo que promueve esta práctica desleal, sobre todo para exportaciones a países con legislaciones poco proteccionistas, como, la de México.

Hasta la fecha, las normas reguladoras internacionales se basan más en consideraciones legales que en la información experimental. Las cifras actuales de normatividad legal son el resultado de experimentos que pretenden demostrar un efecto y no establecer niveles de seguridad para la salud pública. Consecuentemente, se ha ignorado uno de los aspectos más importantes de las aflatoxinas: su capacidad de interactuar con otros factores. Los experimentos mejor diseñados y los análisis estadísticos han demostrado la imposibilidad práctica y teórica de determinar en el laboratorio una dosis máxima permisible de aflatoxinas en alimentos para consumo animal. Estudios epidemiológicos combinados con experimentos de laboratorio y análisis estadísticos confiables, han permitido establecer una dosis máxima permisible basada en criterios de seguridad de 10 ppb (microgramos de aflatoxina por kilogramo de alimento). Sin embargo, son necesarios nuevos experimentos que permitan sentar las bases teóricas de las interacciones de las aflatoxinas, antes de que sea posible determinar una dosis máxima en las dietas. En consecuencia, en la comunidad científica mundial, se considera que ningún nivel de aflatoxina está exento de peligro y que, consecuentemente, no deben mantenerse los lotes contaminados sino destruirse.

APENDICE III

MUESTREO

Dentro de las técnicas de cuantificación de las aflatoxinas es de vital importancia considerar los métodos de muestreo, ya que se necesita obtener muestras representativas. Es importante debido a que el resultado podrá ser muy preciso pero no exacto y tal vez esté muy alejado del valor real, lo que lleve a la toma de decisiones equivocadas.

El muestreo consiste en la obtención de una porción representativa de un lote, estiba, unidad de transporte o bodega, con el fin de conocer su calidad a través de su análisis. Esta operación se debe hacer teniendo la conciencia de que el análisis que se efectúe indicará la calidad del producto. Un muestreo deficiente producirá resultados erróneos aunque el análisis sea muy preciso.

El muestreo deberá realizarse con el equipo idóneo y por el personal calificado que haya sido entrenado para ello. Aún cuando se sabe que el tiempo es una variable muy importante, sobre todo para los distribuidores de alimentos, es necesario tomarse el tiempo mínimo preciso para hacer el trabajo correcto, informando lo que se considere de utilidad al realizar el análisis, por ejemplo:

- presencia de palomilla
- presencia de gorgojos
- presencia de foco de calentamiento y/o apelmazamientos

- presencia de piedras, excretas de roedores, productos metabólicos de hongos o bacterias y cualquier otro contaminante.

El equipo de muestreo debe seleccionarse de acuerdo con el alimento que va a ser estudiado, considerando sus características físicas y químicas y la forma en que está almacenado (a granel o envasado). Para ello, se requieren, por ejemplo:

- a) Caladores de mano (productos envasados)
- b) Sondas de alvéolos (para muestreo de productos a granel)
- c) Muestreador de profundidad tipo bala
- d) Muestreador tipo pelícano
- e) Muestreador Ellis
- f) Muestreador mecánico de banda de cangilones

Para los caladores de mano, las dimensiones más comunes son:

Tipo de grano	Longitud (cm)	Diámetro (cm)
maíz y frijol	35 a 55	3.0
trigo y sorgo	35 a 55	2.5
arroz y ajonjolí	25 a 35	2.0

Las sondas de alvéolos pueden ser de aluminio o de bronce y diferentes medidas:

Longitud, m	No. de alvéolos o aberturas
1.60	11
1.80	12
2.40	16
3.00	20

Los muestreadores de profundidad tipo bala se emplean cuando los granos presentan profundidades hasta de 7 m. Para su uso se emplean extensiones de varilla de 1 m que se acoplan al calador de acuerdo a los requerimientos del muestreo.

Los muestreadores de tipo pelícano se usan para flujos o corrientes de grano a granel en bandas transportadoras y sobre todo en las caídas de carga o descarga. Están contruídos de lona o piel y tienen una longitud de 45 cm, un ancho de 25 cm y una profundidad de 15 cm.

El muestreador tipo Ellis obtiene muestras de productos a granel en movimiento de una banda transportadora y está fabricado, en general, con aluminio.

El muestreador mecánico requiere de menor labor manual. Está instalado al final de una banda transportadora o en algún conducto, obteniéndose la muestra por cortes periódicos regulados por un cronómetro eléctrico.

El muestreo y análisis debe efectuarse principalmente en las siguientes situaciones:

- A) Antes del almacenamiento: para conocer su calidad y los factores determinantes para su conservación.
- B) Durante el almacenamiento: periódicamente para vigilar su calidad y estado de conservación.
- C) Después del almacenamiento: conocer la calidad después del almacenamiento en bodegas o en el transporte.

D) En puertos y fronteras: certificar su calidad en furgones, barcazas y barcos.

El procedimiento de muestreo varía de acuerdo al volumen y la forma de almacenamiento o manejo del grano, teniéndose las siguientes alternativas.

1. GRANOS ENCOSTALADOS (COSTALES DE FIBRAS NATURALES O SINTETICAS)

Por medio de caladores de mano su manejo es fácil y se obtienen muestras con relativa rapidez.

Se introduce el calador a los bultos hasta el mango y con pequeños movimientos el grano es extraído y recibido en una bolsa de polietileno para evitar la influencia de factores ambientales como humedad. Una vez que se extrae la muestra se cierra la malla con la punta del calador, trazando una cruz o varias hasta conseguirlo.

La experiencia ha mostrado que el número mínimo de sacos a muestrear en un lote grande está dado por la raíz cuadrada del total de sacos. Esto es, cuando todos los bultos están accesibles para el muestreo, tanto en la carga como en la descarga de unidades de transporte. Para muestrear bultos al azar, se recomienda la siguiente tabla:

Total de bultos	Bultos a muestrear
1 - 49	5
50 - 99	10
100 - 199	15
200 - 299	20
300 - 499	30
500 - 799	40
800 - 1299	55
1300 - 3199	75
3200 - 7999	90
8000 - 21999	150

No siempre se puede usar este esquema, dado que los costales se encuentran formando estibas, en camiones, furgones o en bodegas planas. Además, no siempre es factible contar con personas que estén muestreando en cada movimiento del grano.

Cuando el muestreo es efectuado en estibas, el calador se va introduciendo en cada uno de los costales, de las caras visibles que se encuentran sobre una línea imaginaria en zig-zag y cuando las estibas no presentan todas sus caras visibles y accesibles, el calador se introducirá en un 30% como mínimo del total de bultos.

2. MUESTREO DE GRANOS A GRANEL (EN UNIDAD DE TRANSPORTE O EN BODEGA)

Para obtener muestras a granel son empleados: sonda de alvéolos, calador de profundidad tipo bala, si el grano está estático y si esta en movimiento, se usarán el tipo pelicano, el Ellis o el mecánico.

La sonda de alvéolos, se usará para muestrear en camiones de carga (de tipo redilas o trailer), furgones y barcasas. Puede usarse la capa superficial para el caso de los graneros y silos metálicos de baja capacidad o almacenamiento con una profundida no mayor a los 2 o 3 m, según la longitud del calador y el número de alvéolos.

El procedimiento és el siguiente: El calador se introduce en el granel ligeramente inclinado con los alvéolos cerrados y hasta el mango. Se abren los alveólos girando nuevamente el manejo para que entren los granos. Una vez que se ha llenado, se cierran los alvéolos girando nuevamente el mango. Se saca el calador y se vacía el contenido sobre la lona de polivinilo limpia y seca, efectuando las siguientes observaciones: Homogeneidad de la muestra, olor, aspecto, temperatura y presencia de insectos. El mismo procedimiento se repite en varios puntos del granel para verificar que se trata de la misma clase de grano y para constatar la presencia o ausencia de focos de calentamiento o plagas.

Si las porciones son uniformes, se sigue el siguiente esquema:

	Toneladas	Sondeos
Camiones	5 - 7	5
	12 - 15	8
Furgones caja	35 - 50	11
Furgones tolva	35 - 45	9
Silos metálicos	5 - 30	5

Para las bodegas planas se miden generalmente con 5 metros de distancia de manera equidistante y a 1 metro de distancia con respecto al muro de contención o pared del almacén.

El muestreador de tipo bala se utiliza para obtener muestras de nivel de profundidad que no son alcanzadas por el calador de alvéolos, mayores y menores de 7 metros. El muestreador se adapta con los segmentos de varilla de acuerdo a la profundidad que se va a muestrear.

En grandes volúmenes deberán obtenerse tres muestras generales, como mínimo:

- Nivel superficial, utilizando la sonda de alvéolos
- Nivel medio, utilizando el de tipo bala.

Los muestreadores de tipo pelicano, Ellis y mecánico se utilizan cuando el grano está en movimiento (bandas transportadoras y caída de grano). Con ellos se obtienen cuando menos 3 muestras por cada 50 toneladas para formar una muestra representativa.

El manejo de la muestra sigue también una metodología específica. Si la muestra total que se obtiene del muestreo, es de un volumen mayor de 2 a 3 kg, debe subdividirse por homogeneización y cuarteo. Para esto se utilizarán bolsas de polietileno o una lona de polivinilo limpia, seca y libre de roturas.

Las muestras obtenidas se vacían sobre la lona o la bolsa y son homogeneizadas por rotación (12 veces como mínimo). Una

vez homogeneizadas se dividen en 4 partes iguales. Para reducir la muestra se eliminan los dos cuartos opuestos. Esta operación se realizará cuantas veces sea necesario hasta obtener un volumen de 2 a 3 kg.

APENDICE IV

DESCRIPCION DE MATERIALES Y METODOS

IV.1 METODO CB

Reactivos: Celite (Reactivos y productos químicos finos), sulfato de sodio (Productos químicos Monterrey), sílica gel (Aldrich), fibra de vidrio (Productos químicos Monterrey), carbonato de cobre (Productos químicos Monterrey), cloroformo (Tec-Química), hexano (Backer), éter etílico (Analit), metanol (Tec-Química), agua destilada, metanol grado HPLC (Merck), ácido acético (Merck), hidróxido de sodio (Tec-Química), papel Whatman 4, ácido trifluoroacético (Aldrich)

MATERIAL:

matraz Erlenmeyer de 500 mL, probetas graduadas de 100 mL y 250 mL, matraz Kitasato de 250 mL, soporte universal, pinzas para bureta, tapón de hule número 7, vial de 20 mL, vaso de precipitados de 250 mL, matraz bola 250 mL 24/40, embudo Buchner, agitador, varilla de vidrio, espátula, columna de vidrio 22X300 mm, microjeringas Hamilton de 50 y 100 microlitros.

Equipo:

Cromatógrafo de líquido de alta resolución Waters, columna para cromatografía en fase reversa, agitador mecánico, bomba de vacío

(Waters Millipore, modelo DOA-V152-AA, 115 Volts, 4 Amps), tanque de nitrógeno (Infra, alta pureza, 99.995%), balanza granataria (Triple Beam, OHAUS, capacidad 2610g), mezclador de alta velocidad "Vortex-mixer" (tipo 16700, Maxi Mix1), rotavapor (Büchi 461, Water Bath).

Este método se encuentra en los métodos oficiales aceptados por la Asociación de Químicos Analíticos de los EEUUA (AOAC, 1980). Sin embargo, la cuantificación contempla la cromatografía en capa fina como la metodología empleada. En este trabajo, específicamente, se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La técnica consiste en:

1.- Extracción:

Pesar 50g de maíz molido, en un matraz Erlenmeyer de 500mL, adicionar 25g de "celite", 25mL de agua, 250mL de cloroformo. Agitar durante 30 minutos en un agitador mecánico.

2.- Purificación:

Preparación de la columna de purificación.

La columna de vidrio se empaca con 3g de fibra de vidrio, se adiciona cloroformo hasta la mitad de la columna, después se agregan 5g de sulfato de sodio anhidro, 10g de sílica gel activada y 15g de sulfato de sodio anhidro.

Pasados los 30 minutos de agitación filtrar a través de un embudo Buchner con papel filtro y una capa de "celite", recibir el filtrado en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contiene 1g de carbonato de cobre, coleccionar 50mL de filtrado.

Posteriormente, eluir los 50mL de filtrado a través de la columna preparada, lavar la columna con 150 mL de hexano y 150 mL de éter, desechar los lavados.

Extraer las aflatoxinas de la columna con 150 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (97:3), colectar el extracto en un matraz de bola de fondo plano de 250 mL. Evaporar en un rotavapor hasta casi sequedad. Transferir el residuo a un frasco vial.

3.- Derivatización:

El residuo evaporarlo a sequedad bajo flujo de nitrógeno, adicionar 100 microlitros de ácido trifluoroacético (TFA), agitar en el "vortex" 1 min. Evaporar a sequedad bajo flujo de nitrógeno, resuspender en 4 ml de la fase de elución agitar en el vortex 1 min.

Transferir el volumen a un vial para cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), pasándolo a través de un filtro millipore. La cuantificación se efectúa mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

IV.2 METODO COLUMNAS DE AFINIDAD-FLUOROMETRO (AFLATEST)

REACTIVOS:

Cloruro de sodio (Merck), metanol grado analítico (Mallinckrodt), metanol grado HPLC (Merck), agua destilada, revelador (Aflatest), acetonitrilo grado HPLC (Merck), hexano grado HPLC (Merck), ácido trifluoroacético (Aldrich).

MATERIAL:

Columna Aflatest, papel predoblado (Aflatest), papel filtro de 11cm de diámetro, fibra de vidrio Whatman 9348H, tubos silanizados o cubetas o celdas (Aflatest), jeringa de plástico de 30mL (bomba de impulsión Aflatest), juego de estándares fluorométricos para calibrar fluorómetro (Aflatest), adaptador para bomba (Aflatest), jeringa de vidrio de 10mL, gradilla porta celdas, licuadora Warring, autopipeteador de 1mL y 10mL, vasos de precipitados de 250mL y de 100mL, pipetas volumétricas de 10mL varilla de vidrio.

EQUIPO:

Fluorómetro con lectura digital de 0-999 con filtro de 360 a 450 nm, para lectura de aflatoxinas en granos, cereales, oleaginosas. Marca Aflatest, Sequoia-Turner, modelo 450, balanza granataria electrónica con capacidad de 1000g, mezclador de alta velocidad "Vortex-mixer".

La técnica consiste en:

- 1).- Pesar 50g de muestra de maíz molido, depositarlos en el frasco de la mezcladora con 5g de cloruro de sodio
- 2).- Agregar 100 mL de metanol al 80 %
- 3).- Mezclar a alta velocidad por 1 min
- 4).- Filtrar a través de papel filtro común 50 mL del líquido eluido
- 5).- Tomar 10 mL del filtrado, agregar 40 mL de agua destilada y mezclar a mano.
- 6).- Colocar en el adaptador una columna del aparato Aflatest, dejar la tapa de la columna puesta

- 7).- Si la solución no es clara filtrar nuevamente a través de papel de fibra de vidrio
- 8).- Con cuidado agregar 10 mL del extracto dentro de la jeringa del aparato Aflatest
- 9).- Quitar la tapa de la columna del aparato Aflatest. Pasar los 10 ml de filtrado a través de la columna usando el émbolo. El pasaje debe ser continuo y a razón de 1 mL por cada 10 segundos. Recibir el líquido en el frasco de residuos.
- 10).- Con 20 mL de agua destilada y con ayuda del émbolo, lavar la columna.
- 11).- Colocar la cubeta o celda de fluorómetro bajo la columna
- 12).- Pipetear 1 mL de metanol grado "HPLC" y pasar a través de la columna.
- 13).- Agregar 1 mL de la solución "reveladora" y mezclar por 15 segundos con el mezclador de alta velocidad "vortex"
- 14).- Secar el exterior de la cubeta o celda
- 15).- En el fluorómetro calibrado con los estándares del aparato Aflatest leer el valor correspondiente
- 16).- La lectura digital representa la cantidad global de aflatoxinas en la muestra en microgramos por kilogramo de muestra.

IV.3 METODO AFLATEST/CLAR

La extracción y purificación de la muestra se realiza empleando el aparato Aflatest y la cuantificación se hace con el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC). Esto

último permite la cuantificación específica de cada uno de los tipos de aflatoxina.

La técnica consiste en:

- 1).- Pesar 50g de muestra de maíz molido, depositarlos en el frasco de la mezcladora con 5g de cloruro de sodio
- 2).- Agregar 100 mL de metanol al 80%
- 3).- Mezclar a alta velocidad por 1 min 4).- Filtrar a través de papel filtro común 50 mL del líquido eluido
- 5).- Tomar 10 mL del filtrado, agregar 40 mL de agua destilada y mezclar a mano.
- 6).- Colocar en el adaptador una columna del aparato Aflatest, dejar la tapa de la columna puesta
- 7).- Si la solución no es clara filtrar nuevamente a través de papel de fibra de vidrio
- 8).- Con cuidado agregar 10 mL del extracto dentro de la jeringa del aparato Aflatest
- 9).- Quitar la tapa de la columna del aparato Aflatest. Pasar los 10 ml de filtrado a través de la columna usando el émbolo. El pasaje debe ser continuo y a razón de 1 mL por cada 10 segundos. Recibir el líquido en el frasco de residuos
- 10).- Con 20 mL de agua destilada y con ayuda del émbolo, lavar la columna
- 11).- Colocar la cubeta o celda de fluorómetro bajo la columna

Cuantificación: Eluir las aflatoxinas con 2 mL de acetonitrilo grado HPLC recuperándolas en la celda o cubeta. Evaporar cuidadosamente el líquido eluido bajo flujo de nitrógeno hasta sequedad.

Redisolver las aflatoxinas en 200 microlitros de hexano, agitar en el "vortex", adicionar 200 microlitros de TFA, mezclar con el "vortex".

Incubar el tubo a 40°C por 10 min. Evaporar bajo flujo de nitrógeno hasta sequedad. Redisolver la muestra en 200 microlitros de la fase móvil y cuantificar en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR).

IV.4 METODO DE THEAN Y COL. (1980)

REACTIVOS:

Celite (Reactivos y productos químicos finos), sulfato de amonio (Merck), hexano grado reactivo (Tec-Química), eter etílico anhidro (Tec-Química), metanol grado HPLC (Merck), etanol grado reactivo (Tec. Química), ácido trifluoroacético (Aldrich), metanol (Tec. Química), cloroformo (Tec.Química), agua destilada cartucho Sep-pak, chromabond SiOH, (500mg).

MATERIAL:

Pipeta Pasteur, matraz Erlenmeyer de 500mL, pipetas graduadas de 1mL, 2mL, 5mL, probeta graduada de 100mL, soporte universal, papel filtro Whatman número 2, tapón de hule número 7, vial 20mL, vaso de pp de 250mL, embudo de separación de 250mL, espátula, embudo de separación de tallo largo.

Este método, desarrollado por Thean y colaboradores (1980), se evaluó, ya que podría resultar más sencillo que los anteriores. Por ello, se evaluó en este trabajo. En este caso, aunque la metodología propuesta también emplea a la cromatografía de

líquidos de alta resolución para la cuantificación, los eluyentes empleados son diferentes. Por ello, con objeto de mantener la uniformidad en la metodología de cuantificación, se empleó la misma que para los anteriores con excepción del método propuesto por Aflatest.

Extracción:

Pesar 50g de maíz molido, adicionar 200mL de metanol/agua (80:20), mezclar durante 3 minutos a alta velocidad. Adicionar 5g de "celite". Filtrar en embudo Buchner de 9cm con vacío ligero a través de un papel filtro Whatman número 2 y coleccionar 100mL de filtrado.

Limpieza:

Medir 75mL de filtrado en un vaso de precipitados de 250mL, adicionar 75mL de una solución de sulfato de amonio y 5g de "celite", agitar 2min y filtrar a través de papel filtro Whatman número 2.

Medir 100mL de filtrado en un embudo de separación de 250mL, adicionar 5mL de cloroformo y agitar vigorosamente por 2min. Cuando se separen las fases, drenar el cloroformo (fase inferior) a un vial o tubo de ensaye (aproximadamente se coleccionan 3.5mL) y adicionar otros 5mL de cloroformo, agitar, drenar el cloroformo y mezclarlos con los primeros mililitros recolectados. Evaporar el extracto de cloroformo a sequedad con nitrógeno. Proceder con la columna de limpieza Sep-pak.

Humedecer la columna de limpieza con hexano, previo a la introducción de la muestra. Redisolver el extracto seco en 0.5mL de cloroformo, agitar en el "vortex". Diluir con 0.5mL de hexano y aplicar a la columna. Lavar la columna secuencialmente usando 2mL de hexano y 2mL de éter (usar éter reciente ya que los peróxidos que se forman durante su almacenamiento pueden destruir las aflatoxinas G más rápido que las B). Eluir las aflatoxinas con 3mL de cloroformo/etanol (95:5) y recibir en un vial, evaporar hasta sequedad bajo flujo de nitrógeno.

Derivatización:

Adicionar 100 microlitros de TFA, agitar en el "vortex", evaporar hasta sequedad, adicionar 4mL de fase de elución (agua, metanol, ácido acético e hidróxido de sodio al 40% en volumen). Filtrar con filtros millipore y pasar a un frasco vial para CLAR. Cuantificar en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR).

Especificaciones para la cuantificación de las aflatoxinas por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Cromatógrafo de líquidos, Waters 712 WISP, bomba programable Waters 590, válvula selectora de disolvente Waters 5SV detector de fluorescencia Waters 420, integrador Waters 745, columna de fase reversa, C18, Waters Millipore

Fase de elución:

Agua/metanol/ácido acético/hidróxido de sodio 40%
(325/150/50/5ml)

Flujo: 1ml/min

Velocidad del papel graficador ("Chart"): 25

Atenuación: 64

Análisis estadísticos de los resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente siguiendo las metodologías tradicionales (Daniel, 1982).

APENDICE V

RESULTADOS ADICIONALES

Tabla 1. Resultados obtenidos usando el método CB-CLAR para las aflatoxinas presentes en maíz contaminado naturalmente (silo 85)

Muestra malla 10	AFB1 ppb	AFB2 ppb	B1 + B2 ppb	AFG1, E.I ppb	Total ppb
1	19.428	0.885	20.313	10.032	30.345
2	27.724	0.116	27.84	10.306	38.146
3	13.438	0.777	14.215	12.326	27.168
4	11.678	0.608	12.286	10.823	23.169
5	16.657	1.313	17.97	11.684	29.654
6	41.525	1.2	42.725	9.748	52.473
7	26.667	0.526	27.193	10.509	37.702
8*	26.959	2.303	29.262	4.161	33.423
9*	26.243	2.125	28.368	4.194	32.562
10*	8.804	0.733	9.537	4.244	13.781
11*	28.848	2.204	31.252	4.005	35.257
12*	30.795	2.275	33.07	4.150	37.22
13*	36.108	3.299	39.098	3.853	42.951

E.I. = estándar integro (10 ppb de AFG₁), * (4 ppb de AFG₁)

Tabla 2. Resultados obtenidos usando el método de Thean y col., (1980) para las aflatoxinas presentes en maíz contaminado artificialmente (10 ppb para cada aflatoxina)

Muestra malla 20	AFB1 ppb	AFB2 ppb	AFG1 ppb	AFG2 ppb	Total ppb
14	9.493	0.352	2.279	7.373	19.497
15	6.766	0.386	1.883	5.999	15.034
16	8.424	1.356	3.223	7.379	20.382
17	7.242	0.924	3.021	5.873	17.006
18	7.233	2.787	4.694	8.662	23.376
19	4.665	0.756	1.893	4.991	12.305

Tabla 3. Resultados obtenidos usando el método de Thean y col., (1980) para aflatoxinas presentes en maíz contaminado artificialmente (20 ppb de cada una de las aflatoxinas)

Muestra malla 20	AFB1 ppb	AFB2 ppb	AFG1 ppb	AFG2 ppb	Total ppb
20	10.689	8.998	13.284	7.263	40.234
21	4.532	3.543	5.02	1.859	14.954
22	7.289	8.027	6.623	8.43	30.369
23	5.466	5.513	4.541	5.69	21.21
25	6.509	18.019	7.748	14.845	47.12
26	5.656	16.693	7.573	14.202	44.124