



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUACUTITLÁN**  
**CAMPO 1**

---

---

**ANÁLISIS DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DIVERSAS POR  
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

SELENE GAYTÁN BARRERA

TUTOR: DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Este trabajo fue realizado en el L-401 Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analítico edificio L-4 y en la Nave 3000 de Química Industrial. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.**

*Dios concédeme la Serenidad para  
aceptar las cosas que no puedo  
cambiar..... Valor para cambiar  
aquéllas que puedo..... y  
Sabiduría para reconocer la  
diferencia.....*

## **Dedicatoria**

### **A Dios**

Por darme la fortaleza espiritual para culminar con mi carrera, objetivos y metas. Gracias por la fuerza que me inyectaste para vencer todos los obstáculos

### **A mi familia con cariño**

Por el apoyo incondicional, cariño y confianza que me brindaron todo este tiempo y por la oportunidad de ser una profesionista. Les ofrezco este triunfo que sin su ayuda no hubiera podido lograr. Los amo

### **A Agustín**

Gracias por tu apoyo y confianza que me brindaste para poder culminar con este proyecto. Por llenar mi vida de alegría, por los momentos vividos y por enseñarme lo que es amar. Te amo

### **A mis amigos**

Gracias por hacerme pasar ratos muy gratos y por estar conmigo en las buenas y las malas los quiero: Gusano, Piquitin, Pepe, Vivizu, Ana, Salvador, Viquez y Yurika  
Gracias por los momentos compartidas.

### **A mis compañeros de laboratorio**

Por todos los momentos y locuras que pasamos a lo largo de mi estancia, y por las muchas cosas que aprendí de ustedes. Gracias

## **Agradecimientos**

### **A Gabriela Vargas**

Por la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, por tus conocimientos y experiencias compartidas mil gracias

### **A Alma**

Gracias por el apoyo y los conocimientos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

### **A la UNAM**

Por darme la oportunidad de formar parte de ella y permitirme lograr mis sueños y a todos los profesores que colaboraron en mi formación académica.

### **A la FES C1**

Por ser como mi segunda casa, por los momentos vividos, experiencias, por los cientos de borracheras y por permitirme encontrar a mi gran Amor.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) proyecto PAPIIT IN229403-3, pro el financiamiento aportado y por la beca otorgada.

Al proyectos **PAPIME PE203405**, por el financiamiento aportado, mil gracias

*Sinceramente Selene*

## Índice General

	Páginas
Glosario de Abreviaturas	
Introducción	1
Justificación	3
Objetivos	7
<b>CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO</b>	8
1.Micotoxinas	9
1.1 Generalidades	9
1.1.2 Historia de las micotoxinas en los alimentos	12
1.1.3 Aluencia tóxica alimentaria (ATA)	14
1.2 Aflatoxinas	15
1.2.1Generalidades	15
1.2.2 Estructura química de las aflatoxinas	17
1.2.3Presencia en alimentos	18
1.2.4 Efecto toxico de las aflatoxinas	18
1.3 Legislación sobre las aflatoxinas	21
1.3.1Normatividad Mexicana	22
1.3.2 Legislación de los Estados Unidos de Norteamérica	23
1.3.3Legislación sobre aflatoxinas vigente en la Unión Europea	24
1.3.4Mecanismo de acción de las aflatoxinas en el organismo	25
1.4Ciclodextrinas	27
1.4.1Generalidaes	27
1.4.2Apliacaciones de las ciclodextrinas	29
1.4.3Uso de las ciclodextrinas en espectrofotometría de fluorescencia	30
1.4.4Implementación de las ciclodextrinas en la determinación de las aflatoxinas	30
<b>CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS ANALITICOS</b>	31
2.Fundamentos analíticos	32
2.1La cromatografía como herramienta analítica	32
2.2Cromatografía de líquidos de Alta Resolución	32
2.3Intrumentacion en cromatografía de líquidos de alta resolución	33
2.4Detector de Fluorescencia	34
2.5Fundamentos de la espectroscopia de fluorescencia	34
2.6Efecto de apagado	36
2.7Cromaografía de líquidos de lata resolución, en la identificación de aflatoxinas	37
<b>CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	38
3.Desarrollo experimental	39
3.1Reactivos y Materiales	39
3.2Equipos	39
3.3Métodos	40
3.3.1Criterios de pureza de estándares de aflatoxinas	40
3.4Calculo del factor de corrección	40
3.5Soluciones patrón de aflatoxinas	41
3.6Método de análisis para las aflatoxinas	42
3.7Derivatización de aflatoxina B <sub>1</sub> y aflatoxina G <sub>1</sub>	42
3.8Preparación de soluciones para la cuantificación por CLAR - Fluorescencia	42
3.9Preparación de las soluciones para la medición de los espectros de emisión de fluorescencia con ciclodextrinas	43

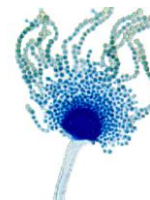
## Índice General

	Páginas
<b>CAPITULO 4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS</b>	44
4. Estandarización de las Aflatoxinas	45
4.1 Criterio de pureza para las soluciones estándar de Aflatoxinas (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> )	45
4.1.2 Curva de calibración para cuantificación de Aflatoxina B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>	47
4.2 Limite de detección y cuantificación	49
4.2.1 Limite de detección AFB <sub>1</sub>	49
4.2.2 Limite de cuantificación AFB <sub>1</sub>	49
4.2.4 Limite de cuantificación AFB <sub>2</sub>	49
4.3 Separación de las aflatoxinas según la NOM-188-SSA1-2002	50
4.4 Influencia de la forma de preparación del derivado	52
4.4.1 Procedimiento A	52
4.4.2 Procedimiento B	52
4.4.3 Procedimiento C	52
4.5 Análisis de aflatoxinas en muestras diversas	54
4.5.1 Muestras de hígado de pollo	55
4.5.2 Dulces típicos Mexicanos	57
4.6 Influencia de las CD's en la emisión de Fluorescencia de las aflatoxinas	61
<b>CAPITULO 5. CONCLUSIONES</b>	63
5. Conclusiones	64
5.1 Perspectivas	66
<b>ANEXOS</b>	67
A. Procedimiento para la obtención de las muestra de hígado de pollo contaminados con AF	68
B. Procedimiento para la obtención de las muestras de dulces típicos mexicanos contaminados con AF	69
C. Áreas cromatográficas, curva de calibración y concentraciones determinadas en las muestras analizadas	74
D. Procedimiento de limpieza y descontaminación	77
E. Medidas preventivas para evitar la presencia de aflatoxinas	78
<b>REFERENCIAS</b>	79



## Glosario de Abreviaturas

<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución)
$\epsilon$	Coefficiente de absortividad molar
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación
<b>A</b>	Absorbancia
<b>AcN</b>	Acetonitrilo
<b>AF</b>	Aflatoxinas
<b>AFB<sub>1</sub></b>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
<b>AFB<sub>2</sub></b>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
<b>AFG<sub>1</sub></b>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
<b>AFG<sub>2</sub></b>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
<b>AOAC</b>	American Organization of Analytical Chemistry (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
<b>ATA</b>	Aluencia tóxica alimentaria
<b>ATF</b>	Ácido trifluoroacético
<b>Bursa de Fabricio</b>	La Bursa de Fabricio es un importante órgano linfoide presente únicamente en las aves, de morfología sacular, con pliegues internos que surgen desde la cloaca dorsal en cuyo lumen sobresale 12 a 15 pliegues longitudinales llenos de folículos linfoides, conteniendo Linfocitos B, cuya función es sintetizar los anticuerpos humorales.
<b>C<sub>18</sub></b>	Nomenclatura empleada para definir el tipo de cadena de una fase estacionaria en cromatografía Octadecilsilano (ODS)
<b>Ca</b>	Calcio
<b>CD</b>	Ciclodextrinas
<b>CLAR</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
<b>Cu</b>	Cobre
<b>Diana</b>	Se le llama diana al órgano o célula donde se dirige la acción de un reactivo, medicamento, enzima, etc.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EEUU</b>	Estados Unidos de América
<b>EU</b>	Unión Europea
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FC</b>	Factor de corrección
<b>Fe</b>	Hierro
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>Nc</b>	<i>Nocardia corynebacteroides</i>
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>K</b>	Potasio
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>Pienso</b>	Porción de alimento seco que se le da al ganado
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>UV-vis</b>	Radiación ultravioleta-visible



---

---

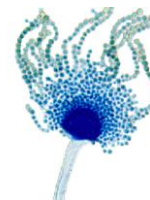
## **Introducción**

El estudio de las aflatoxinas y su cuantificación en alimentos tanto para el ganado como para el hombre ha captado la atención de una gran cantidad de científicos e instituciones en todo el mundo a partir de 1960, año en el cual se llevó a cabo el descubrimiento de estas sustancias tóxicas. Su nombre procede de la toxina del *Aspergillus flavus* y fue propuesto en 1962 por sus descubridores (Previdi et al, 1986).

En la actualidad más de 50 países han establecido límites de contaminación con micotoxinas en alimentos destinados al consumo humano y animal (León et al., 2000). En especial se ha legislado sobre la contaminación por aflatoxinas debido a su gran capacidad **carcinogénica, teratogénica y mutagénica** (Jaimez et al., 2000).

La contaminación por aflatoxinas en diversos alimentos de consumo humano y animal, es un grave problema de salud pública que enfrenta México, por lo cual es importante asegurar la confiabilidad del método sugerido por la norma, con el cual se pueda identificar y determinar la cantidad de cada una de las aflatoxinas en los alimentos, De ahí la importancia de aplicar un método confiable para el pre-tratamiento, identificación, separación y cuantificación de cada una de las aflatoxinas, se basa en que debido a la gran diferencia en la toxicidad de cada una de estas, el analizarlas por separado nos aporta una mayor información acerca de la verdadera toxicidad presente en cada una de las muestras, además de que es el método indicado para confirmar su presencia.

La presencia de aflatoxinas en los alimentos para animales presenta un desafío para la industria ya que por lo regular la intoxicación se da por varias aflatoxinas al mismo tiempo y los efectos se complican por la presencia de otros factores.

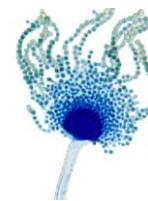


El éxito en el control de las aflatoxinas en los productos que se sospechan de contaminación, depende (sobre todo en países en desarrollo como el nuestro), de contar con metodologías eficientes que sea barato, confiable y rápido para que de una forma realista pueda ejercerse un control de la contaminación de estas sustancias en los productos de comercialización. Lo cual beneficiaría tanto a productores como consumidores de las mismas ya que se disminuiría la contaminación e intoxicación de aflatoxinas en la población.

Para la cuantificación existen diferentes métodos de análisis que pueden ser utilizados pero la selección siempre se debe basar en que el método a utilizar sea confiable, aplicable y práctico. La confiabilidad se refiere a su exactitud en la determinación y a su variabilidad o precisión y es el parámetro más importante a considerar desde el punto de vista analítico. Además es necesario que el método sea aplicable a una variedad amplia de muestras y que sea práctico con respecto al costo, tiempo de análisis y capacitación para su realización.

El método de Cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR) es un método exacto y preciso que ha sido aceptado como método oficial (AOAC Internacional 994.08) y como método de referencia para algunas micotoxinas.

Se llevó a cabo por CLAR debido a que este es el método confirmatorio, ya que la determinación de aflatoxinas totales por columnas de inmunoafinidad es solo un método de monitoreo. Es importante saber que aflatoxina está presente en la muestra, ya que cada una de ellas varía enormemente en su toxicidad.



---

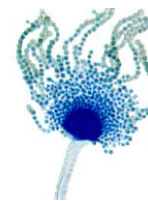
---

### **Justificación del Trabajo Realizado**

El deficiente almacenamiento de granos básicos realizado por los productores nacionales, especialmente en quienes utilizan covachas, genera pérdidas anuales de entre 500 y mil millones de dólares anuales a México. Uno de los granos en que se basa la alimentación en nuestro país es el maíz consumiéndose principalmente en forma de tortilla, además también se utiliza en grandes cantidades para la alimentación animal. En el maíz hay especies de hongos del género *Aspergillus*, los más notables *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* los cuales generan las sustancias tóxicas productoras de cáncer (en animales y humanos) más potentes que se conocen por contaminación natural: las aflatoxinas (AF). Desafortunadamente, este hongo puede invadir al maíz en el campo, pero también en el almacén, cuando la humedad del grano es alta.

Las AF que son ingeridas por seres humanos o animales provienen de los alimentos contaminados directamente por el hongo o de alimentos de animales que consumieron la toxina. La contaminación del maíz por AF, en México es un grave problema de salud pública a nivel nacional, al que no se le ha dado la debida atención, ya que se ha encontrado relación entre las AF y el cáncer de hígado cuando hay una ingesta elevada y continua de las mismas. En México, la información disponible sobre la importancia y el impacto de salud y económico de las AF es escasa; sin embargo, varios de los estados productores de grano en México poseen características climáticas que favorecen la presencia y el crecimiento de los hongos productores de micotoxinas.

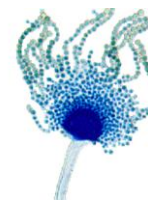
Por otra parte, en muchas regiones del país, no existe información actualizada sobre la presencia de AF en alimentos para consumo humano, que ayuden a conocer cuales son los productos que poseen una mayor contaminación con estos compuestos, siendo



---

primordial cuando estos alimentos son ampliamente consumidos por la población en general. Uno de estos alimentos son los dulces mexicanos (como palanquetas, pepitorias alegrías, cocadas etc.) los cuales se comercializan con gran éxito en todo el país y generalmente provienen de una elaboración artesanal de pequeños productores. Sus ingredientes principales incluyen semillas de varios tipos como cacahuete, pepita de calabaza, coco seco y rayado, amaranto etc., en los cuales no se garantiza un control de la presencia de micotoxinas de inicio en sus ingredientes y que durante su almacenamiento también pueden existir. Esto hace que el control de este tipo de sustancias sea una prioridad para la salud pública de la población en general.

En México, los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos para consumo humano están regulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, y no debe rebasar los 20 mg/Kg para el contenido total de AF, mientras que se tolera desde 21 mg/Kg a 300 mg/Kg para el consumo animal dependiendo de la especie. La gran mayoría de los laboratorios terceros autorizados auxiliares para el control sanitario ante la COFEPRIS realizan el monitoreo de las AF totales utilizando columnas de inmunoafinidad. Dentro de los inconvenientes de este método es que se considera solo un método de monitoreo, siendo esta una técnica indirecta que no mide la micotoxina, sino la formación de un fluoróforo (ya que existe un paso de revelado, y esto implica baja especificidad), además del hecho de no existir una relación lineal entre concentración de analito y la emisión de fluorescencia obtenida, pues no se sabe cual AF aporta más a la fluorescencia. La realidad en nuestro país es que el monitoreo de AF no se realiza de manera rutinaria en la mayoría de los granos que salen a la venta, sino solo en los que se destinan a exportación y este monitoreo se realiza de acuerdo a la regulación que el comprador final requiere (datos Sanidad Vegetal, SENASICA). Por ejemplo para la unión europea, es necesario especificar además de contenido total de



---

AF, el contenido específico de AFB<sub>1</sub>, ya que su toxicidad es mucho mayor a las restantes. Esto hace necesario que existan laboratorios que lleven a cabo en nuestro país la determinación de AF's por el método de HPLC, ya que es necesario por razones de exportación, además de que resulta indispensable cuando se realizan estudios de toxicidad de productos nacionales y extranjeros, pues los efectos tóxicos difieren considerablemente entre cada una de estas. En nuestro país existen muy pocos laboratorios que realicen este tipo de determinación (Grupo IDISA, Tehuacan, Puebla, Lab. De Control Tóxicológico, CIAD, Hermosillo, Sonora y el Lab. De Control del INAFAP) ya que a pesar de ser el método especificado para la confirmación de estas en la norma, nuestra legislación en México resulta muy poco efectiva en cuanto al aseguramiento de la inocuidad en los diversos productos alimenticios que pueden contenerlas. Por poner un ejemplo, en la Norma Europea los niveles de AF en maíz se especifican deben ser menor de 5 µg/Kg para la AFB<sub>1</sub> y no mas de 10 µg/Kg para el contenido de AF total, por lo que es forzosa la utilización de la técnica de HPLC con la finalidad de discriminar (separar y cuantificar) entre cada una de estas.

Dadas las características del comercio actual donde se importan y exportan productos a diario en todo el mundo, pueden producirse micotoxicosis por alimentos contaminados, cultivados localmente o importados, tanto en países en desarrollo como desarrollados. Por consiguiente, el control estricto de los alimentos y los piensos, así como medidas adecuadas de salud pública, desempeñan un papel importante en la reducción de los riesgos para la salud humana y animal. Por todo lo anterior, resulta muy importante el implementar el método de HPLC en laboratorios como el nuestro en la UNAM, para poder contribuir al aseguramiento de la inocuidad alimentaría en nuestro país, así como para apoyar a otros investigadores en sus labores de investigación en torno a la obtención de datos toxicológicos de alimentos no reportados (dulces mexicanos), así



---

---

como en metodología para la disminución de la toxicidad de las AF en animales de consumo humano (pollos), mediante exposición a microorganismos como es la *Nocardia corynebacteroides*.



---

---

### **Objetivos General**

Realizar la adecuación del método oficial NOM en la determinación de aflatoxinas para ser utilizado en el laboratorio de investigación de la Nave 3000, utilizando un equipo de CLAR Thermo Separations FL300, con detector de emisión de fluorescencia con la finalidad de aplicarlo para la determinación de aflatoxinas en muestras diversas.

### **Objetivos Particulares**

Realizar la reestandarización de los reactivos analíticos de aflatoxinas, con la finalidad de contar con estándares confiables.

Realizar un estudio para la selección de las condiciones óptimas para la derivatización de las aflatoxinas B1 y G1, con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método.

Evaluar algunos parámetros estadísticos para asegurar la confiabilidad del método analítico utilizado y poder aplicarlo al análisis de muestras diversas.

Aplicar el método optimizado al análisis de aflatoxinas en dulces típicos mexicanos ya que no existen reportes al respecto.

Aplicar el método optimizado al análisis de aflatoxinas en hígados de pollo sometidos a una dieta con maíz contaminado con fines toxicológicos posteriores.

Realizar un estudio para ver el efecto de la presencia de Ciclodextrina, en la emisión de fluorescencia de las aflatoxinas bajo estudio

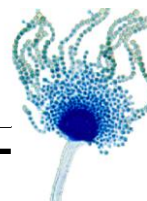




---

---

# Capítulo 1



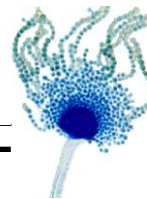
## 1. Micotoxinas

### 1.1. Generalidades

Las micotoxinas son compuestos químicos de bajo peso molecular, producidos por hongos, que tiene efectos patológicos tanto en humanos como en animales, las micotoxinas llegan a afectar sistemas específicos del organismo pero generalmente dañan a el hígado o a los riñones por lo que alteran los procesos metabólicos del animal produciendo condiciones adversas que llevan a efectos como hígado pálido, agrandado y friable, inflamación de riñones, lesiones orales, disminución de la respuesta inmunológica, mala absorción de nutrientes, reducción del crecimiento, alteración de la fertilidad, etcétera. Al menos 14 micotoxinas son carcinogénicas, siendo entre éstas las aflatoxinas los agentes cancerígenos más potentes.

Las micotoxinas son producidas como metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios de los hongos, así como de otros microorganismos, son aquellos compuestos indispensables para su crecimiento. Los metabolitos secundarios son producidos al final de la fase de crecimiento exponencial y carecen de importancia aparente para el microorganismo que los produce con respecto a su crecimiento o a su metabolito (Jay, 1994).

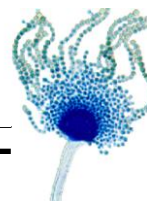
La formación depende de la sepa específica del hongo que prolifere en el sustrato y de factores ambientales como la humedad, la temperatura y el oxígeno. La contaminación por micotoxinas puede variar según las condiciones geográficas, climáticas, métodos de producción, tipos de almacenamiento y también del tipo insumo. En la Ilustración 1, se observan los factores que influyen más frecuentemente en la contaminación de alimentos con micotoxinas.



**Ilustración 1. Factores que influyen en la contaminación de los alimentos por micotoxinas**

De acuerdo con algunas estimaciones, se han identificado cerca de 100,000 hongos filamentosos, de los cuales 400 pueden ser consideradas potencialmente tóxicos por si o por los metabolitos que generan (Bata y Lásztity, 1999). Entre las micotoxinas de mayor preocupación para la industria pecuaria se pueden mencionar: Aflatoxinas, Tricotecenos (Vomitoxina, Nivalenol, Neosolaniol, Toxina T2, Diacetoxyscirpenol), Zeralenona, Fumonisinias, Ocratoxina A, Citrinina, Esterigmatocistina, Ácido Cliopiazónico, Patulina, Alcaloides del ergot y Moniliformina. Estas micotoxinas se encuentran en la mayor parte de los insumos de la industria pecuaria, entre los que se pueden mencionar el maíz, el sorgo, la soya, los ensilados, la pasta de algodón e incluso la leche (Lara *et al.*, 1998, 2000).

El papel de las micotoxinas en la vida de los hongos no ha sido establecido claramente, aunque una importante función parece ser la competición reguladora con otros organismos. Las micotoxinas son muy diferentes en estructura molecular, desde simples moniliformes (cuya disposición es similar a las cuentas de un collar) hasta complicados polipéptidos de peso molecular alrededor de 2000. En general estos compuestos no son volátiles y permanecen asociados a la estructura de los hongos, esporas incluidas, o en el substrato en el que crecen los hongos. Aunque la formación de toxinas por parte de los



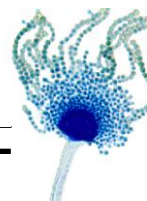
hongos no es un proceso totalmente generalizable, se parte de la idea de que si un hongo que produce toxinas está presente en el ambiente, probablemente su toxina también lo estará (ACGIH, 1989).

Las aflatoxinas son un grupo de sustancias producidas por algunos hongos en pequeña cantidad, como metabolitos secundarios. Actualmente se conocen unos 20 compuestos químicamente similares, de elevada toxicidad y carcinogenicidad. (Previdi et al, 1986)

Los efectos nocivos de las micotoxinas sobre la salud humana son conocidos desde hace tiempo. La enfermedad de "La feria de San Antonio", por ejemplo, adquirida por los espigadores de centeno (contaminado por hongos toxicogénicos) en los campos después de la cosecha se halla documentada desde la Edad Media. A principios de los años 60 murieron cerca de 100.000 pavos en Inglaterra después de haber comido pienso contaminado con hongos *Aspergillus*. Desde entonces se han publicado diferentes estudios sobre la toxicología de las micotoxinas, que suelen afectar, aparte de órganos concretos, a los sistemas inmune y nervioso y presentan carácter carcinogénico (ACGIH, 1989).

Varios tipos de hongos producen micotoxinas como productos de desechos (metabolitos secundarios). Estos hongos pueden crecer en productos agrícolas antes o después de su cosecha o durante el transporte o almacenamiento.

Otros productos afectados por micotoxinas como resultado de la alimentación con productos contaminados son la carne, la leche y los huevos. Por lo que se ha comprobado que las micotoxinas son dañinas para los animales y los seres humanos mediante una amplia gama de efectos. En general disminuyen la resistencia a enfermedades, aumentan la sensibilidad al estrés y generalmente afectan los síntomas de digestión internos (riñón e hígado en particular). Esto trae como consecuencia una mayor mortalidad, un aumento en los costos de medicamentos y una menor producción.



Los tres principales géneros productores de micotoxinas son: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En la tabla I que se presenta a continuación se muestran las principales especies productoras de micotoxinas así como los compuestos que producen, se han identificado una gran cantidad y variedad de micotoxinas que afectan a la salud del hombre, el cual se encuentra constantemente expuesto a estas sustancias como resultado del consumo de productos vegetales, carne, leche o huevos. Por otro lado, la contaminación de estos alimentos por mohos y sus toxinas representan graves pérdidas económicas, que en muchas ocasiones resultan inevitables.

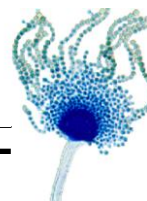
**Tabla 1. Principales especies productoras de micotoxinas y efecto adverso**

<b>TOXINA</b>	<b>PROCEDENCIA FÚNGICA</b>	<b>PRINCIPALES ALIMENTOS AFECTADOS</b>	<b>EFFECTOS FARMACOLOGICOS POR INGESTA</b>
Toxinas de <i>Aspergillus</i> Aflatoxinas	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Cacahuates, semillas, oleaginosas, cereales, legumbres y otros, residuos de alimentos de origen animal.	Patógenas para el hígado; hepatocancerígenas en varios animales y posiblemente en el hombre.
Esterigmatocistina	<i>A. nidulans</i> , <i>A. versicolor</i>	Granos de cereales.	Tóxicas hepatocancerígenas para las ratas.
Ocratoxinas	<i>A. ochraceus</i> <i>P. viridicatum</i>	Granos de cereales; granos de café; residuos en animales.	Tóxicos renales en ratas.
Toxinas de <i>Penicillium</i> Luteosquirina	<i>P. islandicum</i>	Arroz y otros cereales.	Tóxico, posiblemente hepatocancerígenas para la rata.
Patulina	<i>P. articae</i> ; <i>P. claviforme</i> ; otros.	Productos de manzanas, cereales, trigo.	Edema, tóxico renal en la rata.
Toxinas de <i>Fusarium</i> Zearalenona	Gibberellazeae	Maíz, trigo, cebada, avena.	Hiperestrogenismo en cerdos y animales de experimentación.
Aleucia tóxica alimentaria (ATA)	<i>F. poae</i> , <i>sporotrichioides</i>	<i>F.</i> Mijo y otros cereales.	Panleucocitopenia por lesión de la médula ósea, hasta 96% de mortandad en epidemias humanas.
12, 13-epoxi-tricoentenos	<i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Glicotricothecium</i> spp.	Maíz, otros cereales	Colapso cardiovascular, tiempo de coagulación aumentado, leucopenia; en el hombre podría haber estado implicada la ATA.

Fuente: Fennema, O. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia. España. P. 797

## 1.2. Historia de las micotoxinas en alimentos.

Las micotoxicosis son enfermedades causadas por micotoxinas, metabolitos secundarios de los mohos. Aunque se producen con más frecuencia en las regiones con clima cálido y húmedo, propio para el crecimiento de los mohos, también se dan en zonas templadas. La exposición a las Micotoxinas se produce sobre todo por ingestión, pero



también por contacto cutáneo y por inhalación. A menudo los médicos no reconocen la micotóxicosis, salvo cuándo afecta a un gran número de personas.

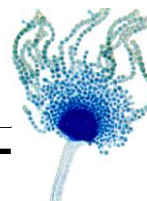
Los efectos adversos de los mohos y de los hongos se conocían ya en la antigüedad (Vergilius PM, 1994). En los siglos VIII y VII a.C. se instauró el festival de “Robigalia” en honor del dios Robigus, a quien era necesario propiciar para proteger el grano y los árboles. Se celebraba el 25 de abril, por ser la época del año en la que era más probable que las cosechas resultaban atacadas por las roñas o maldú (Ovidus PN, 1845).

En la Edad Media, los brotes de ergotismo causados por alcaloides ergóticos de *Claviceps purpurea* alcanzaron proporciones de epidemia, mutilando y matando a miles de personas en Europa. El ergotismo se conocía también como *ignis sacer* (fuego sacro) o fuego de San Antonio, por que a la sazón se creía que una peregrinación del santuario de San Antonio aliviaría la intensa sensación de quemazón que padecían las personas afectadas (Van Dogen PWJ et al, 1995).

De siglo X al XI se presentaron severas epidemias de ergotismo cada 5 a 10 años principalmente en Francia dadas las condiciones de baja temperatura y humedad, favorables para el desarrollo del cornezuelo. En el año 944 d.C. 40 000 personas murieron de ergotismo en el sur de Francia. Debido a que la causa era desconocida no había cura disponible.

No fue sino hasta 1670 cuando un médico francés, el Dr. Thuillier estableció una relación de causa-efecto entre el consumo de centeno infectado con cornezuelo y la enfermedad conocida como “Fuego de San Antonio”. Sin embargo, nunca pudo convencer a los granjeros de que la causa de aquella terrible enfermedad y tuvieron que pasar 200 años para que esto ocurriera.

Hacia mediados del siglo XIX, el micólogo René Tulasne estudió el ciclo de vida del cornezuelo de centeno, el cual, en condiciones de humedad y temperaturas



adecuadas invade los granos individuales y forma un esclerocio. El esclerocio es una formación ligeramente curvada, de color negro a púrpura y de unos 6 cm de longitud que constituye la fase de reposo del *Claviceps* y que permanece viable en condiciones de sequedad, para germinar cuando dispone de humedad (Shibamoto, 1996).

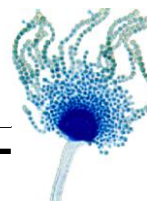
Actualmente se sabe que alrededor de 50 especies de *Claviceps* pueden contaminar alimentos y piensos produciendo la intoxicación debida al cornezuelo denominado “ergotismo”.

En Rusia ocurrió en 1926-27 con 10 000 casos reportados; en Inglaterra en 1927, con 200 casos y el último ocurrió en Francia en 1951. Estas intoxicaciones aguda o crónica, se caracteriza generalmente por diarrea, vómitos, cefalea, vértigo, convulsiones y gangrena seca de los dedos, orejas o nariz, debido al espasmo prolongado de las arteriolas.

### ***1.1.3. Aleuncia Tóxica Alimentaría (ATA)***

Otra micotoxicosis que ha afectado severamente a la humanidad es la aleuncia tóxica alimentaría (ATA). Ha sido señalada principalmente en Rusia, desde el siglo XIX. Se produjeron brotes en 1913, 1932 y finales de la Segunda Guerra Mundial. Las descripciones rusas de los síntomas de esta enfermedad incluyen: fiebre, enrojecimiento hemorrágico, hemorragias de nariz, garganta y encías, angina necrótica, leucopenia grave, agranulocitosis, sepsis y modificaciones de la médula ósea. Los brotes de la enfermedad fueron bruscos y la mortalidad superó al 50% de los afectados (Shibamoto, 1996)

Aunque los tricótesenos juegan un cierto papel en la etiología de la ATA, “la enfermedad no pudo adjudicarse a una sola sustancia y la compleja interacción de los tricótesenos con las variables del hospedador deben ser desentrañadas antes de que pueda comprenderse la etiología de la ATA” (Shibamoto).



## 2. Aflatoxinas

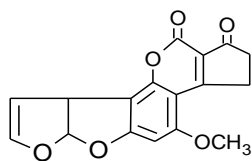
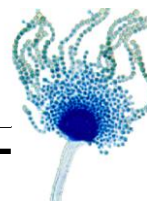
### 2.1 Generalidades

El interés general por las micotoxinas aumentó en 1960, cuando se declaró en animales de granjas de Inglaterra una micotoxicosis transmitida por el pienso y denominada enfermedad X del pavo (necrosis aguda del hígado e hiperplasia del conducto biliar), de la que más tarde se comprobó que era causada por aflatoxinas. Se descubrió ulteriormente que éstas son potentes hepatocarcinógenos en animales y seres humanos, lo que fomentó la investigación sobre las micotoxinas.

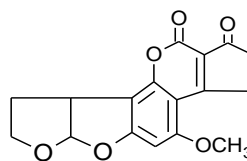
El crecimiento de este hongo se ve afectado por la termohigrotropía, es decir que responde al estímulo de la temperatura y la humedad relativa de la atmósfera y del sustrato. Así, la formación de aflatoxinas en el maní tiene lugar si este se almacena entre 20° y 40°C con un 10-20% de humedad y con un 70-90% de humedad relativa en el aire: el crecimiento del hongo se ve favorecido si los granos están dañados por insectos o roedores. Pero, aún en ausencia de estas condiciones, si ya han germinado algunas esporas en el sustrato, se pueden formar "nichos ecológicos" que favorecen el desarrollo de sectores con micelios generadores de aflatoxinas porque al crecer produce agua por respiración aumentando así la humedad de algunas semillas o granos .

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos tóxicos que presentan diversas estructuras químicas (figura 2.1). Como ya se mencionó, estos compuestos son producidos por hongos microscópicos (*Aspergillus flavus*, *aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*) y pueden contaminar granos básicos y alimentos procesados que se han formulado con ellos. Dichas sustancias al ser ingeridas y metabolizadas, son capaces de producir reacciones tóxicas que pueden causar efectos adversos en la salud humana; hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, gastroentéricos, cancerígenos e inmunosupresivos y aún la muerte en animales superiores; representando un riesgo potencial para los animales (ratas, ratones y truchas, etc.), incluso el hombre (Blesa *et al.*, 2004).

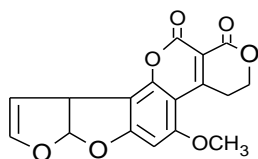




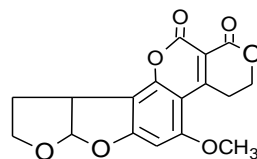
Aflatoxina B<sub>1</sub>



Aflatoxina B<sub>2</sub>



Aflatoxina G<sub>1</sub>



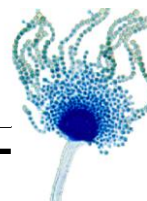
Aflatoxina G<sub>2</sub>

Figura 2.1. Estructura química de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (ACD/ChemSketch Freeware, 2006)

La actividad biológica de las aflatoxinas las habilitan a funcionar como potentes toxinas carcinógenas, teratógenas y/o mutágenas. (5). Aflatoxicosis es el nombre que recibe el efecto tóxico en los animales que han consumido alimentos contaminados con Aflatoxinas.

Los primeros síntomas clínicos de la aflatoxicosis crónica en las especies de mamíferos y aves estudiadas son típicamente: carencia del apetito (1), reducción del crecimiento (6), pérdida de peso (10). Observaciones patológicas de bajos niveles de intoxicación manifiestan ictericia generalizada y cirrosis del hígado con proliferación de células en el conducto biliar y fibrosis periportal, envenenamientos agudos resultan en ictericia de la membrana mucosa, desarrollo de hemorragias (3) y acumulaciones de grasa en el hígado. (15).

La mayoría de los estudios de metabolismo en mamíferos han sido concentrados sobre AFB<sub>1</sub> porque es la más potente y la más comúnmente encontrada de las toxinas



producidas por hongos. La información dada a continuación muestra que el valor de DL50 para patipollos de un día de nacidos al darseles AFB1 oral es 0.36 mg/kg (17).

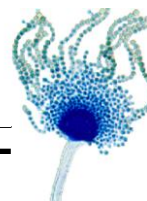
Los efectos biológicos de las aflatoxinas pueden clasificarse en 2 categorías: efectos a largo plazo que incluyen toxicidad crónica, cáncer, defectos al nacer y alteraciones genéticas. Los efectos a corto plazo comprenden toxicidad aguda y efectos genéticos, efectos teratogénicos. (7)

## 2.2. Estructura química de las aflatoxinas

Las aflatoxinas constituyen un grupo de metabolitos heterocíclicos (Leasson *et al.*, 1995). Recientemente, se han identificado por lo menos 18 aflatoxinas, sin embargo, solamente las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son sintetizadas naturalmente. Las otras aflatoxinas (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>, G<sub>2a</sub>, B<sub>2a</sub> y aflatoxicol, etc.), son productos del metabolismo microbiano o de animales (Lindner, 1995). El nombre de cada aflatoxina fue acuñado por los investigadores que las identificaron dando las letras B y G por sus fluorescencias (azul y verde en inglés), si eran derivadas de la leche (M) o de otros productos.

Químicamente, las aflatoxinas son difurocumarolactonas. su estructura consiste en un dihidrodifurano o tetrahidrodifurano unido a una cumarina substituida. Las aflatoxinas B y M presentan un anillo de pentenona y las G un anillo de seis miembros o lactona (Figura 1.1) (ACD/ChemSketch Freeware, 2006). Existen diversas aflatoxinas, sin embargo, se ha reportado que la más peligrosa es la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), debido a que es un potente teratógeno, mutágeno y hepatocarcinógeno (Akiyama, 1999).

Los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* sintetizan de manera predominante la AFB<sub>1</sub>, la cual es el compuesto más tóxico del grupo. *A. flavus* produce solamente AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, mientras *A. parasiticus* llega a producir las cuatro aflatoxinas. El genotipo de cada especie determina la aflatoxicidad. Algunos factores biológicos,



químicos y ambientales determinan la cantidad de aflatoxinas producidas por las cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus sp.*, sobre un sustrato (Leeson *et al.*, 1995).

### **2.3. Presencia en alimentos**

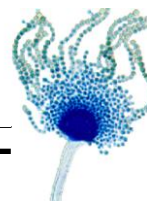
Las aflatoxinas fueron detectadas inicialmente en el maní. Este alimento contaminado contenía el agente etiológico de la epidemia del "Pavo X" enfermedad que apareció en Inglaterra en 1960. Desde entonces las aflatoxinas se han encontrado en muchos otros alimentos y piensos, el causante de esto es el crecimiento de cepas aflatoxigénicas de *A. parasiticus* o *A. flavus*; sobre todo de esta última. Si se le da un ambiente apropiado, estos hongos son muy eficientes produciendo aflatoxinas. Es sabido que el contenido de aflatoxinas en el alimento del ganado lechero propicia la contaminación de la leche.

El crecimiento de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas en varios productos agrícolas depende de varios factores: sustrato, humedad relativa, humedad, temperatura, tiempo, maduración y condiciones de almacenamiento, etc. Las condiciones ambientales bajo las cuales los productos agrícolas son cosechados, el transporte, manejo y almacenamiento pueden determinar la extensión de la contaminación en estos productos.

Las temperaturas mínima, óptima y máxima para el crecimiento del *Aspergillus flavus* son: 6 - 8 °C, 36 - 38 °C y 44 - 46 °C respectivamente. Se requiere de una humedad relativa mínima de 80-90 por ciento para su crecimiento y para la esporulación una mínima de 85 por ciento pero los requerimientos de humedad dependen de la temperatura así como de los nutrientes.

### **2.4. Efectos tóxicos de las aflatoxinas**

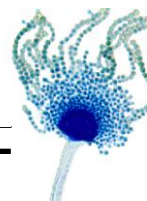
La acción cancerígena de las aflatoxinas ha sido demostrada en ratas, truchas y hurones. Usando alimento, contaminado con aflatoxinas, se demostró que 0.5 mg kg<sup>-1</sup> en la



dieta inducen daño y producen carcinoma en animales de laboratorio (D'Mello *et al.*, 1997). Como se mencionó, durante 1960 fallecieron 100,000 pavos a causa de una severa intoxicación por metabolitos que provenían de hongos filamentosos. Estos compuestos se encontraron en harina infestada por *Aspergillus flavus*, ya que este hongo se desarrolla en un periodo de almacenamiento (Holcomb *et al.*, 1992; Jaimez *et al.*, 2000). Diversos estudios permitieron determinar una serie de compuestos fluorescentes a los cuales se les denominó en su conjunto como aflatoxinas (AF), destacando cuatro de ellas por su alta actividad cancerígena y teratógena, aún en muy bajas concentraciones. Al mismo tiempo, en Estados Unidos de América, EEUU, se observaron hematomas que fueron relacionados con la contaminación por aflatoxinas en las dietas de peces (Otta *et al.*, 2000).

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las aflatoxinas en los humanos son: biodisponibilidad, la toxicidad, la cantidad de toxina ingerida diariamente en función de la concentración de aflatoxina y de la cantidad de alimento ingerido, la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado; el peso del individuo y del estado fisiológico y de salud de éste; la edad del individuo (Gímeno y Martins, 2004). Las aflatoxinas tienen efectos tóxicos inmediatos, además de inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos. El principal órgano diana de los efectos tóxicos y carcinogénicos es el hígado (Peraica M *et al.*, 1999). También inducen tumores en riñón, colon y pulmón.

En estudios epidemiológicos en diversas partes del mundo donde es frecuente el cáncer de hígado se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el nivel de contaminación con aflatoxinas, y esta enfermedad. Esta enfermedad causa por lo menos 300,000 muertes por año. Los estudios epidemiológicos han encontrado un aumento en la incidencia de cáncer y hematomas en las regiones donde ha aumentado la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas (Guzmán, 2001; Williams y Wilson, 1999). Investigaciones realizadas en 185,000 muestras de cacahuete provenientes de Brasil, Guatemala, Irlanda, México, Suiza, Reino Unido, EEUU y la URSS indican que, el 1% del total de las muestras en estudio presentan niveles de aflatoxinas menores a  $20 \text{ mg kg}^{-1}$

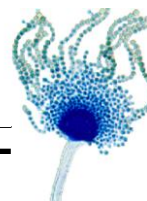


(FAO, 1991; García *et al.*, 2001). Estos estudios han demostrado la presencia de diversas micotoxinas como las aflatoxinas, fumonisinas, zeralenona, etc. En la India, por ejemplo, se han encontrado valores de aflatoxinas totales que oscilaban entre 6.25-15.6 mg de AF kg<sup>-1</sup> de maíz; cantidades que provocan daño hepático agudo. También en 1974 fueron documentados 108 casos de pacientes que habían consumido maíz contaminado con aflatoxinas en niveles que oscilaban entre 0.25 y 15 mg de AF por kg de dieta. En todos estos casos se detectó cirrosis hepática en niños. Por otra parte, el síndrome de Reye con encefalitis y degeneración de grasa de vísceras en niños se ha asociado con la ingesta de aflatoxinas (Jaimez *et al.*, 2000; Lindner, 1995; Nelson *et al.*, 1980).

En países asiáticos como Tailandia, la presencia de aflatoxinas son un mal endémico y las aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> han sido aisladas en hígado de humano determinándose la presencia de sus metabolitos (P1 y Q1), en dicho tejido. Estos derivados de aflatoxinas se han relacionado de forma directa con cáncer (Jaimez *et al.*, 2000).

Otros estudios realizados en el sur de Guangxi, China durante 19990, sugieren un riesgo potencial a desarrollar cáncer hepático por la exposición a dosis diarias de aflatoxinas en niveles que van de 16.9 a 20 mg de aflatoxina por kg de peso corporal, lo cual resulta ser significativamente menor a lo observado en estudios con ratas macho. Adicionalmente, se correlacionó esta susceptibilidad con la presencia de infecciones por hepatitis B (Lippmann, 2000).

El hombre con una dieta deficiente nutricionalmente es más susceptible a los efectos tóxicos de las aflatoxinas, que pueden ejercerse directamente y provocar toxicosis aguda o toxicosis crónica subletal que tiene como manifestación el cáncer (Oyelami OA, 1997). En estudios recientes se hallaron aflatoxinas en el cerebro y los pulmones de niños fallecidos por Kwashiorkor y en niños controles que habían muerto por otras enfermedades. Esto podía deberse a un desequilibrio metabólico o al fracaso de los mecanismos excretorios en los niños con enfermedades como el sarampión (que precede al Kwashiorkor en 25 % de



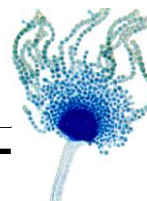
los casos), insuficiencia renal, estenosis pilórica o gastroenteritis, y a menor depuración de las aflatoxinas en las neuropatías (Oyelami OA, 1997).

En 1966 se demostró que el mecanismo de acción de las aflatoxinas incluía la inhibición del DNA y el RNA, la inhibición de la mitosis y la producción de alteraciones cromosómicas, lo que evidenció su efecto como agente carcinogénico, teratogénico y mutagénico. Por esto se ha planteado que las aflatoxinas son un factor de inducción de neoplasia en el hombre.

La aflatoxina una vez absorbida en el intestino delgado es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado vía portal, donde es metabolizada por las enzimas oxidasas que las biotransforman en metabolitos, algunos altamente reactivos que tienen la capacidad de unirse covalentemente con centros nucleofílicos de macromoléculas celulares como el DNA, RNA, y proteínas. Esto implica un riesgo biológico para la célula ([scielo.sld.cu/scielo.php](http://scielo.sld.cu/scielo.php)).

## **2.5. Legislación sobre las aflatoxinas**

Por otra parte, el reconocimiento de la actividad cancerígena de las aflatoxinas a llevado a interrogantes concernientes al peligro que presentan para la salud pública la contaminación de los alimentos con hongos. Un estudio realizado por la comisión de Codex Alimentarius en 1997, concluyó que una disminución en los límites permisibles de aflatoxinas de 20 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en la dieta europea, no tenía efecto medible en la incidencia de cáncer hepático. No obstante, el riesgo de cáncer por la influencia de dichos compuestos aumenta en las regiones en donde la población ingiere con mayor frecuencia los alimentos contaminados con aflatoxinas y donde la nutrición proteica es deficiente, combinado con la hepatitis B, como en regiones de Asia y África (Steciow, 2003; Williams y Wilson, 1999). En África, la cerveza se elabora con sorgo y se ha identificado la presencia de AFB1, tanto en este cereal como en la propia cerveza. Consecuentemente, la exposición de los individuos a las micotoxinas por ingestión de frutos secos, cereales y animales o bebidas elaboradas con ellos, continúa siendo muy preocupante (Sendra y Carbonell, 2004).



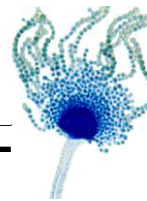
Los límites obligatorios para el contenido de aflatoxinas en los alimentos vulnerables a ellas se han fijado muy cerca del límite de detección de la metodología analítica, con base en el principio de que no existe ningún nivel inocuo conocido para el ser humano; la norma dictada por la "Food and Drug Administration" (FDA) de los EEUU para los alimentos agrícolas primarios y sus derivados, es de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas totales (Bogantes Ledezma, Pilar *et al.*, 2004). Los organismos de salud de los distintos países han establecido el límite máximo permisible de 5 a 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas totales. Por ejemplo, Brasil en productos para exportación permite 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas totales, mientras la India permite 120  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub> (D'Mello *et al.*, 1997).

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció el límite máximo permisible de 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para las aflatoxinas totales (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>), en varios hueros de alimentos (Papp *et al.*, 2002). Por otra parte, la Unión Europea (EU), toma esta regulación solamente para los alimentos como son las especias. Para otros alimentos, como las nueces, frutas secas, cereales, derivados para consumo humano directo o como ingredientes, establece límites más rigurosos aceptando solamente 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la presencia de AFB<sub>1</sub> y 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la presencia de aflatoxinas totales (Blesa *et al.*, 2004; Chiavaro *et al.*, 2001; Gimeno y Martins, 2004).

La comisión de Codex Alimentarius de la FAO/OMS concluyó en 1997 que las aflatoxinas deben ser consideradas como contaminantes carcinogénicos y, por lo tanto, su consumo debe ser el más bajo posible (Kok, 1994, Williams y Wilson, 1999).

A continuación se presenta los límites máximos establecidos para la presencia de aflatoxinas tomadas por diferentes países o regiones económicas.

## **2.6. Normatividad mexicana**



La Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002), establece que : a) Todos los alimentos para consumo humano no excederán de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas, b) Los cereales con una concentración mayor de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas y que se destinen para consumo directo para animales o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto en la Tabla 1.2. Cabe resaltar que en esta legislación no se contempla la regulación de AFB<sub>1</sub> sino del total de las cuatro toxinas.

**Tabla 2. Niveles máximos permitidos para aflatoxinas en México**

Especie/ etapa de producción	Límite máximo ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Aves (excepto pollos de engorda)	100
<i>Cerdos en engorda</i>	
Entre 25 y 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
<i>Rumiantes</i>	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

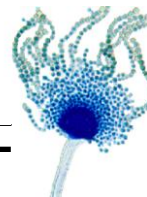
### 2.7. Legislación de los EEUU sobre aflatoxinas.

La legislación de los EEUU es una de las más laxas del mundo y es casi 10 veces más alta que la adoptada por la EU. Sin embargo, México y los países integrantes del MERCOSUR han basado sus legislaciones en ésta, A continuación en la Tabla 3, se presentan los límites permitidos en los EEUU.

**Tabla 3. Niveles máximos permitidos para aflatoxinas en los EEUU (FDA, 2000)**

Producto	Nivel ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Todos los productos, excepto leche, para consumo humano	20
Leche	0.5
Maíz para animales jóvenes y ganado vacuno	20
Maíz para ganado en reproducción, cerdos y aves maduros	100
Maíz para alimentación de cerdos en etapa de finalización	200





Maíz para alimentos de engorda en etapa de finalización	300
Semilla de algodón como ingrediente de alimentos	300
Todos los suministros diferentes al maíz	20

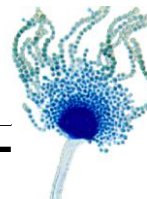
**Tabla 4. Límites máximos de aflatoxinas establecidas por el MERCOSUR (MERCOSUR, 1994)**

Alimento	Aflatoxina	Límite ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
<i>Leche</i>		
Leche fluida	$M_1$	$0.5 \mu\text{g L}^{-1}$
Leche en polvo	$M_1$	5.0
<i>Maíz</i>		
Maíz en grano (entero, partico, aplastado)	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	20
Harinas o sémolas de maíz	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	20
<i>Cacahuete</i>		
Cacahuete (sin descascarar, descascarado, crudo o tostado)	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	20
Cacahuete en pasta (pasta de maní o manteca de maní)	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	20

## 2.8. Legislación sobre aflatoxinas vigente en la Unión Europea

La legislación de la UE (Tabla 5), sobre contenidos máximos de aflatoxinas en productos alimenticios, fue publicada en la directiva CE 2174/2003 del 12 de diciembre de 2003 (DOCE 13-12-2003). Ésta es una de las legislaciones más estrictas del mundo, algunos otros países han adoptado esta misma legislación: Austria, Bélgica, España, Francia, Grecia, Hungría. Irlanda, Luxemburgo, Polonia, Reino Unido.

Dicha legislación estipula que los límites máximos se aplican a la parte comestible de los cacahuates, frutos de cáscara y frutos secos. Los cacahuates, frutos de cáscara,

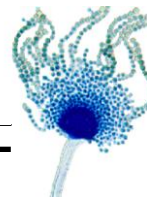


frutos secos y el maíz que no cumplan con los contenidos máximos de aflatoxinas establecidos podrán ser puestos en circulación a condición de que:

- a. No se destinen al consumo humano directo, ni se usen como ingredientes de productos alimenticios.
- b. Cumplan con los contenidos máximos establecidos para los cacahuates, para los frutos de cáscara, frutos secos y para el maíz.
- c. Sean sometidos a un tratamiento posterior de selección u otros métodos físicos, de forma que después de dicho tratamiento no se superen los límites máximos establecidos y que el tratamiento mismo no provoque otros residuos nocivos.
- d. Estén etiquetados de forma que se demuestren claramente su destino, incluida la indicación “Producto destinado a ser sometido obligatoriamente a un tratamiento de selección u otros métodos físicos con objeto de reducir el nivel de contaminación de aflatoxinas antes de su consumo o su utilización como ingrediente de productos alimenticios”.

**Tabla 5. Niveles máximos permitidos de aflatoxinas por la legislación de la Unión Europea (directiva CE 2174/2003)**

Producto	Contenido máximo ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		
	B1	B1 + B2 + G1 + G2	M1
<b>Cacahuates, frutos de cáscara y frutos secos</b>			
Cacahuates, frutos cáscara, frutos secos y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	2 (a)	4 (a)	
Cacahuates destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	8 (a)	15 (a)	

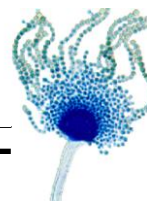


Frutos de cáscara y frutos secos destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	5 (a9)	10 (a)	
<b>Cereales (incluido el alforfón, <i>Fagopyrum sp</i>)</b>			
Cereales (incluido el alforfón, o trigo negro, <i>Fagopyrun sp</i> ) y productos derivados de su transformación destinados al consumo humano directo o hacer usados como ingrediente en los productos alimenticios	2	4	
Cereales (incluido el alforfón, o trigo negro, <i>Fagopyrum sp</i> ), salvo el maíz destinada a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	2	4	
Maíz destinado a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	5	10	
Leche (cruda, para fabricación de productos lacteos y tratada térmicamente tal como se establece en la directiva 94/46/CEE del consejo, cuya ultima modificación la construye el reglamento CE No. 806/2003			0.05
Los siguientes tipo de especies:  - <i>Capsicum spp.</i> (frutos desecados, enteros o triturados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón) - <i>Piper spp.</i> (frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra) - <i>Myristica fragans</i> (nuez moscada) - <i>Zingiber officinale</i> (jengibre) - <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma)	5	10	

## 2.9.Mecanismo de acción de las aflatoxinas en el organismo

En 1966 se demostró que el mecanismo de acción de las aflatoxinas incluía la inhibición del DNA y el RNA, la inhibición de la mitosis y la producción de alteraciones cromosómicas, lo que evidenció su efecto como agente carcinogénico, teratogénico y mutagénico. Por esto se ha planteado que las aflatoxinas son un factor de inducción de neoplasia en el hombre.

La aflatoxina una vez absorbida en el intestino delgado es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado vía portal, donde es metabolizada por las enzimas oxidasas que las biotransforman en metabolitos, algunos altamente reactivos que tienen la capacidad de unirse covalentemente con centros nucleofólicos de macromoléculas



celulares como el DNA, RNA, y proteínas. Esto implica un riesgo biológico para la célula (Bolet Astoviza, y Socarras Suarez, 2005).

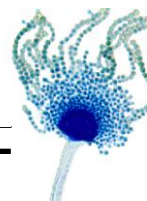
Las aflatoxinas son compuestos extremadamente tóxicos y carcinogénicos, especialmente la B1 que a su vez es la más frecuente y probablemente constituye el agente cancerígeno más potente que se conoce (su límite de tolerancia en el maíz es 20 ppb). Tienen un tropismo sobre el parénquima hepático en el que ocasionan daño celular al interrumpir la síntesis proteica y bloquear de esta manera la regeneración hepatocelular.

Debido a la interrupción enzimática, la oxidación y fosforilación de grasas no se lleva a cabo, dando lugar a una lipidosis hepática y, al mismo tiempo, una reacción de los conductos biliares ante el cuadro tóxico, que se denomina hiperplasia de los conductos biliares (Galván, 1992).

Como también las aflatoxinas alteran el metabolismo de los minerales y vitaminas, lo que corresponde al Ca y P se interpreta como causal de algunos problemas de patas y de fragilidad ósea, más aún por la relación que existe entre el metabolismo del Ca y el de la vitamina D. También se han reportado interferencias en el metabolismo del Fe y Cu. Por otro lado, Osuna (1991) refiere que las aflatoxinas afectan la producción de huevos no solamente en cantidad sino también en tamaño.

Por ser sustancias inmunosupresoras potentes, disminuyen la eficiencia fagocítica de las células de la serie blanca y macrófagos, atacando también al timo y a la Bursa de Fabricio, con deficiente producción de linfocitos T y B con lo que se incrementa la susceptibilidad de los animales a diversas enfermedades.

## **2.10. Problemática del uso de granos contaminados**

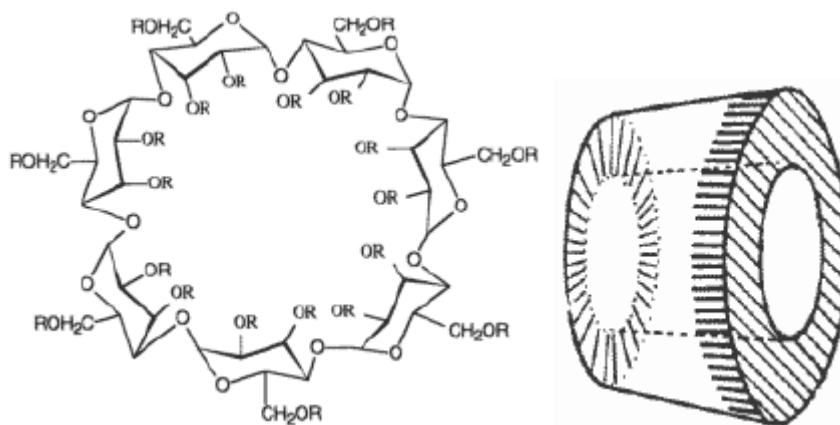


### 3. Ciclodextrinas

#### 3.1 Generalidades

Las ciclodextrinas (CD) son macromoléculas formadas por distinto número de residuos de D(+) glucopiranosos unidos mediante enlaces alfa(1-4). Las más utilizadas son las alfa-,beta- y gamma-CD que contienen 6,7 y 8 moléculas de glucopiranosos respectivamente. A pesar de que son muy hidrosolubles, el interior de la cavidad de las ciclodextrinas es apolar, por lo que son capaces de formar complejos de inclusión con distintos tipos de moléculas que se alojan en su interior. La mayoría de las aplicaciones de las ciclodextrinas en la industria están encaminadas a mejorar las características del producto terminado (solubilidad, caracteres organolépticos) y a incrementar la estabilidad de los compuestos lábiles.

Aunque son solubles en agua, tiene una forma de cono truncado (Dodziuk Helena, 1994 (Ilustración 1)), el interior de su cavidad es hidrófobo e hidrofílicas por fuera, lo que le permite a moléculas relativamente pequeñas e hidrófobas acomodarse en su interior, formando lo que se conoce como complejos de inclusión estables apolares y de tamaño adecuado tales como fármacos, contaminantes, pesticidas, tensoactivos. Su eficacia y aplicabilidad pueden incrementarse si se incorporan dentro de una estructura polimérica (Ej. una red tridimensional insoluble).



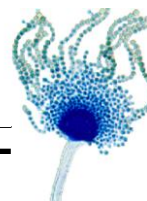
Ilustración 2.  $\beta$ -Ciclodextrina y cavidad de las ciclodextrinas

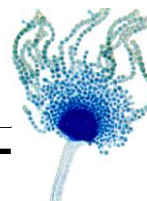
Tabla 6. Tipos de ciclodextrinas que hay en la naturaleza

Ciclodextrina	P.M	Diámetro Interno (nm)	Diámetro de la cavidad (nm)		Solubilidad g/kg H <sub>2</sub> O	Hidratación en H <sub>2</sub> O	
			interior (nm)	exterior (nm)		cavidad	exterior
$\alpha$ (glucosa) <sup>6</sup>	972	1.52	0.45	0.53	129.5	2.0	4.4
$\beta$ (glucosa) <sup>7</sup>	1134	1.66	0.60	0.65	18.4	6.0	3.6
$\gamma$ (glucosa) <sup>8</sup>	1296	1.77	0.75	0.85	249.2	8.8	5.4

Existen ciclodextrinas que han sido modificadas químicamente agregándoles grupos que les confieren mayor solubilidad y mayor afinidad con algún tipo de compuestos. Como CM $\beta$ CD, SBR, M, TM, etc. Las ciclodextrinas son capaces de admitir varias clases de moléculas dentro de su cavidad, con lo que se forman estructuras llamadas complejos de inclusión.

La parte más ancha del cono presenta al disolvente grupos hidroxilo secundarios y la más angosta grupos hidroxilo primarios. La parte interior del cono es hidrofóbica debido al ambiente rico en electrones de los átomos de oxígeno de los enlaces glicosídicos. Las interacciones Van der Waals, los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas permiten que los compuestos formados sean estables.

El equilibrio de la formación de los complejos depende de la concentración de la Ciclodextrina, de la sustancia con la que se forma el complejo y del agua. Su velocidad de formación esta determinada en gran medida por la facilidad con la que las moléculas de interés se acomoda en la cavidad de la Ciclodextrina (tamaño y forma) y por la suma de las fuerzas termodinámicas que dirigen le fenómeno (Connors T Hinguchi, 1985).



Varios eventos energéticos favorables contribuyen a la rapidez de formación de los complejos de inclusión:

- Regreso de las moléculas de hidratación al medio
- Desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad hidrofóbica de la CD
- Remoción de la molécula de interés (hidrofóbica) de un medio hostil.
- Instalación de la molécula hidrofóbica en la cavidad de la CD.

Una vez que la molécula está dentro de la cavidad, la mejor posición esta determinada por la interacciones débiles que allí tiene lugar, estas pueden crear interacciones selectivas similares a las enzimas. La disociación es generalmente un proceso igualmente rápido, que puede ser causado por el incremento del número de moléculas de agua que salen de la cavidad de la CD (Connors T Hinguchi, 1985).

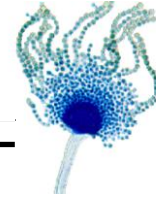
Mucho del potencial de estos complejos ha sido aprovechado en aplicaciones farmacéuticas, por su costo, su disponibilidad, baja toxicidad y la adecuada solubilidad en agua de muchos fármacos de interés.

### **3.2 Aplicaciones de las CD**

Algunas de las aplicaciones más importantes de las CDs son farmacéuticas como ya se mencionó, pero no son las únicas, también se usan en la industria alimentaría, industria de cosméticos, en la agroquímica, química analítica, en modelos enzimáticos, en catálisis, metalurgia, etc.

### **3.3 Uso de CD en espectrofotometría de fluorescencia**

Las CD incrementan la intensidad de fluorescencia causado por la hidrofobicidad en el medio de la cavidad. Previene el contacto con sustancias que disminuye la fluorescencia, incrementa el limite de detección causado por el crecimiento de la



solubilidad, aumenta la intensidad de quimioluminiscencia y hace a la molécula sea más rígida, evitando que pierda energía por otras formas de relajación (ej. Calor).

### **3.4 Implementación de CD en la identificación de Aflatoxinas**

Debido a que la AF B1 y G1, probablemente tienen diferencias estructurales, concretamente en el doble enlace en el anillo furánico. De forma tal que el doble enlace pareciera ser muy importante para las propiedades fotofísicas de la medida de estos derivados justo antes de ser estudiados espectroscópicos de la medida de estos derivados justo antes de ser estudiados espectroscópicos (M.N. Dirr, 1987; D.L. Orti, 1989). De tal forma que al poner las ciclodextrinas en la fase móvil, estas incrementan la respuesta natural de fluorescencia, debido a que estabiliza a la molécula en el estado excitado. Provocando que disminuya la pérdida de energía ganada por otras formas de relajación.





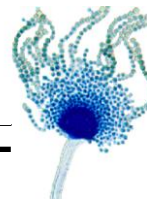
# Capítulo 2

## **4. Fundamentos analíticos**

### **4.1 La cromatografía como herramienta analítica**

En la actualidad, los métodos cromatográficos se usan ampliamente para el análisis y separación de muestras, dado que presentan gran selectividad por los solutos. Debido a ello, se pueden separar muestras complejas y multicomponentes.

La cromatografía es un técnica de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza al contacto de la primera. La elución (proceso en el cual, se separan los solutos a través de una fase estacionaria por el movimiento de una fase móvil) a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación. De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es el



que tiene el mayor campo de aplicabilidad y por ello, ocupa una posición dominante (Rouessac y Rouessac, 2003).

#### **4.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)**

La CLAR es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria (Bermejo, F. 1991). Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, D. 2001). Debido a estas presiones el equipo para HPLC es elaborado y costoso (Skoog, D. A. Et al. 2005).

Deriva de una evolución de la cromatografía en columna, cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.

Es la técnica más utilizada de todos los tipos de cromatografía de elución, conociéndose como tal al desplazamiento de un soluto de la fase estacionaria por un disolvente.

##### **4.2.1 Instrumentación en cromatografía a de líquidos de alta resolución**

Los componentes básicos de un sistema para CLAR son: (Figura 2.1)

- A) Reservorio para la fase móvil (disolventes)
- B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- C) Indicador de presión
- D) Sistema de inyección de muestras
- E) Columna cromatográfica
- F) Detectores
- G) Reservorio para desechos
- H) Sistema para el tratamiento de datos y registrador

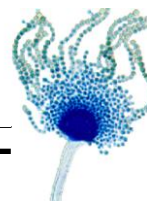


Figura 2.1 Instrumentación básica en cromatografía líquida de alta resolución.

#### 4.2.2 Detector de fluorescencia

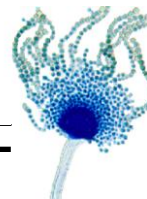
Estos detectores presentan una gran variedad de diseños. Existen fluorómetros de filtros, como monocromador en el sistema de excitación y filtro en de emisión, también los hay con dos monocromadores. Estos instrumentos emplean diferentes fuentes de radiación para trabajar en la región ultravioleta. Para ello, son comúnmente empleadas lámparas de xenón, deuterio y lámparas de mercurio con o sin fósforo.

En estos detectores son muy eficientes y altamente sensibles para sustancias que exhiben fluorescencia; sin embargo, pueden presentarse inconvenientes en la espectroscopia de fluorescencia, asociados a la cromatografía, como puede ser el oxígeno disuelto en la fase móvil, lo cual reduce la señal de fluorescencia (efecto de apago, "quenching"). El detector de fluorescencia se fundamenta en la teoría de la espectroscopia de fluorescencia. Debido a ello, el detector presenta una alta sensibilidad sobre sustancias capaces de fluorescer al ser excitadas por la radiación UV (Skoog et al., 2005)

#### 4.3 Fundamentos de la espectroscopia de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual es, con frecuencia, de uno a tres ordenes de magnitud mejor que las de la Espectroscopía de absorción. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que se pueden hacer fluorescer.

En la figura 2.2 se muestran las etapas en las que sucede el proceso de fluorescencia en el cual se observa que, como primer paso, las moléculas se excitan (I), por la fuente de iluminación, pasando de un estado basal a un estado singulete excitado ( $S_1$ ) o ( $S_2$ ) del cual,



en un tiempo determinado, retornan a su estado basal ( $S_0$ ), mediante la emisión de un fotón (IV).

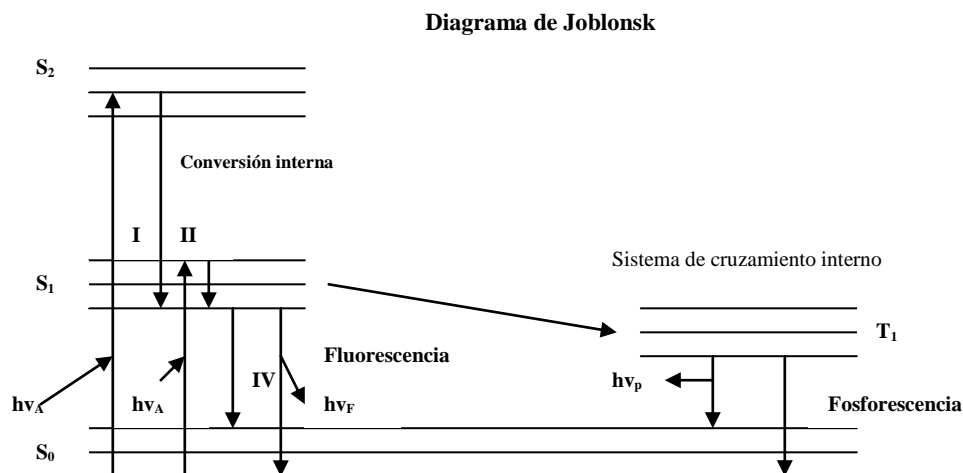


Figura 2.2. Esquemización del proceso de fluorescencia

donde:

$S_0$  Estado basal de la molécula

$S_1, S_2$  Estados excitados de la molécula

I Proceso de excitación (absorbe energía electrónica)

II Proceso de pérdida de energía (pasa de un nivel energético inferior)

IV Proceso de emisión de un fotón (llega a estado basal por liberación de un fotón)

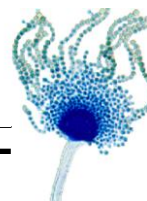
$h\nu_A$  Energía de excitación

$h\nu_F$  Energía liberada en un fotón (fluorescencia)

$h\nu_P$  Energía liberada en un fotón (fosforescencia)

$T_1$  Sistema de cruzamiento interno (proceso de fosforescencia)

Durante la excitación (Proceso I), las moléculas adquieren energía vibracional en forma de energía, llegando algún subnivel vibracional del estado electrónico excitado. Las moléculas tienen una fuerte tendencia a llegar a un nivel vibracional inferior, perdiendo energía a través de colisiones (Proceso II). Esta pérdida de energía se detiene en un estado electrónico excitado singlete ( $S_1$ ), desde donde retornan al estado basal mediante la emisión de un fotón (Proceso IV) (Galen, 1985). A esta serie de procesos se les conoce como fluorescencia, durante los cuales la transición energética no provoca cambios en el espín del electrón. La espectroscopia de fluorescencia es un método espectroscópico que

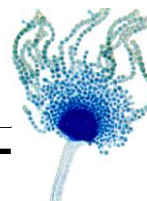


presenta alta sensibilidad (partes por trillón) y especificidad (Willard, 1988). Esta técnica se encuentra encaminada al estudio de compuestos que presentan la propiedad de fluorescer.

Dentro de las aplicaciones de dicha técnica se encuentran el estudio de moléculas de origen biológico como son las lecitinas, ácidos nucleicos, proteínas, toxinas, etc. También se pueden determinar contaminantes trazas como quinonas, drogas y tóxicos de origen natural o sintético (ácido dietilamin-lisérgico, LSD), entre otros (Willard, 1988). Con el empleo de la espectroscopia de fluorescencia en la determinación de sustancias fluorescentes como las aflatoxinas, el límite de detección aumenta en dos órdenes de magnitud con respecto a métodos convencionales (Wehry, 1981).

### **2.2.1 Efecto de "apagado"**

Se le denomina efecto de apagado ("quenching" por su nombre en inglés), a la reducción en la intensidad de la fluorescencia esperada para la solución. Este efecto puede ocurrir como resultado de una absorción excesiva o por la emisión de la radiación por la misma solución. A la concentración en la cual ocurre dicho fenómeno, se le ha denominado concentración de apagado ("quenching"). El efecto de apagado puede ser causado por pérdidas de energía no radiante de moléculas excitadas. Un agente de apagado facilita la conversión de las moléculas de un estado excitado sigulete a un nivel de triplete en donde la emisión no ocurre. Este efecto se presenta en muchos compuestos aromáticos debido a la presencia de oxígeno disuelto. También se puede presentar dicho fenómeno debido a factores químicos y físicos. la intensidad de la fluorescencia de muchos compuestos depende de la temperatura, por lo que este factor físico presenta un problema en el análisis, ya que provoca variaciones en las mediciones. Otro aspecto importante que puede causar un descenso en la intensidad de fluorescencia es la gran facilidad con que se pueden contaminar las muestras con sustancias en cantidades indetectables. entre los contaminantes más comunes se encuentran la baquelita, los plásticos o polímeros comerciales, el cromo, etc. (Wehry, 1981)



#### 4.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en la identificación de aflatoxinas

Es la técnica más usualmente utilizada en la determinación de aflatoxinas empleaban detectores UV; sin embargo, diversos estudios mostraron que la detección de estas toxinas no era tan sensible y selectiva como la detección por fluorescencia y los picos de interferencias era muy comunes. Por ello, surgió la necesidad de introducir el empleo de la detección por fluorescencia.

El uso de CLAR con detección de fluorescencia es uno de los métodos actualmente más aceptados para la determinación de aflatoxinas. La elección de este método permite un análisis cualitativo y cuantitativo de las aflatoxinas, ya que ellas presentan fluorescencia. La longitud de onda de excitación  $\lambda_{ex}= 360$  nm puede usarse para las cuatro aflatoxinas y la longitud de emisión, para B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>  $\lambda_{em}= 440$  nm. La de 470 nm puede usarse para G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

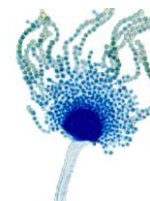
Este método instrumental presenta varias ventajas sobre otras técnicas, siendo la más importante la capacidad de automatización. Con este método se puede trabajar en fase normal y fase reversa. La fase reversa es más empleada que la normal. En esta variante se emplean columnas con fases unidas químicamente como son las de ocradecil y fenilpolisilano que son fases no polares. La fase móvil tendrá que ser más polar, a fin de poder realizar la separación de los analitos (Holcomb *et al.*, 1992).

Recientemente Blesa *et al.*, 2004 determinó aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> Y G<sub>2</sub>) en alimentos provenientes de los mercados y supermercados de Valencia, España. en este estudio la extracción se realizó mediante un método de matriz dispersa en fase sólida, se realizó una derivatización precolumna para que posteriormente los analitos se separación y cuantificaran mediante CLAR-fluorescencia.



# Capitulo 3





## **5. Desarrollo Experimental**

Para alcanzar los objetivos propuestos en esta investigación, de aplicar la determinación de aflatoxinas como lo establece la NOM y de desarrollar una nueva metodología que permita identificar y cuantificar la presencia de aflatoxina B1, B2, G1 y G2 en muestras diversas , en este capítulo se presentan los pasos seguidos.

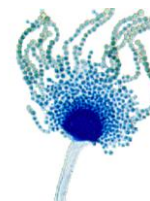
### **5.1 Reactivo y Materiales**

Para el desarrollo de la presente investigación se emplearon los siguientes reactivos y disolventes: Acetonitrilo y Metanol grado HPLC, estándares de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 proporcionados por Sigma-Aldrich Química (St. Louis, MO, USA), ácido acético glacial, ácido trifluoroacético que fueron adquiridos de J.T. Baker (Xalostoc, Edo. de Méx., México). El agua desionizada fue obtenida de un sistema Milli-Q Plus (Molsheim, Francia).  $\beta$ -Ciclodextrina que fue proporcionada por Sigma-Aldrich Química (St. Louis, MO, USA).

Las muestras de hígado de pollo (previamente sometidos a un adieta de maíz contaminado con aflatoxinas) fueron adquiridas de Ciudad Universitaria . Las muestras de dulces típicos mexicanos (coco, nuez, pasas , pepitoria, pepita, alegría, cacahuete, etc) fueron adquiridas del Laboratorio Postcosecha de Productos Vegetales del Centro de Asimilación Tecnológica de la UNAM. Las muestras ya estaban tratadas, yo solo las evaporaba y las reconstituía en Acetonitrilo o en fase móvil metanol: agua (40:60 % v/v), para su inyección

### **5.2 Equipos**

Se utilizó un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Thermo Separations Products, Inc. (San José California, EEUU) acoplado a un detector de fluorescencia, con una longitud de onda de excitación de 360 nm (xenón ión láser) y una longitud de onda de emisión a 440 nm. Con una columna LC<sub>18</sub> -DB 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 $\mu$ m, Supelco. Un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer() y un



espectrofotómetro de fluorescencia Varian, Cary Eclipse. Un baño de ultrasonido Transsonic T570, Elma® (Alemania) y Una bomba de vacío Benchtop vacuum station Alltech y Applied Science México S.A. de C.V. (Col. del valle, México, D.F.).

## **5.3 Métodos**

### **5.3.1 Criterios de pureza del los estándares de aflatoxinas**

*Obtención del espectro de absorción y determinación de la longitud máxima de absorción para AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.*

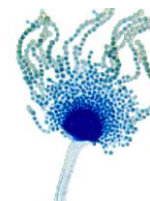
La longitud de onda de máxima absorción para cada aflatoxina, se determino empleando un espectrofotómetro UV-visible (Perkin Elmer) el cual se ajusto a cero de absorbancia mediante un blanco de solución benceno-acetonitrilo (98:2). Posteriormente, se realizo un barrido de 330 a 370 nm de cada una de las soluciones.

### **5.4 Calculo del factor de corrección del equipo (FC)**

Se preparo una solución con 1L de ácido sulfúrico 0.018 N y 78 mg de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (método establecido por NOM). De la solución resultante (0.25 mM K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) se tomaran alícuotas para preparar dos soluciones de concentraciones de 0.125 mM y 0.0625 mM respectivamente. Posteriormente, se calibro el espectrofotómetro UV-vis a cero de absorbancia con solución de ácido sulfúrico 0.018N como blanco. a continuación se procedió a leer la absorbancia de las tres soluciones de dicromato de potasio de menor a mayor concentración, ala longitud de onda máxima de absorción para cada una de las aflatoxinas. Con los valores obtenidos se procedió a calcular el coeficiente de extinción molar mediante la siguiente ecuación:  $\epsilon = (Ax100)/[mM]$ . el valor del coeficiente de extinción molar sirvió para calcular el factor de corrección del equipo mediante la siguiente ecuación:

$$FC = \epsilon_{\text{promedio}} / 3160$$

donde **3160** es el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) para soluciones de dicromato de potasio y  $\epsilon_{\text{promedio}}$  es el coeficiente de extinción experimental para soluciones de dicromato de potasio.



una vez verificado que el valor de FC se encontraba en el intervalo de la concentración de aceptación, 0.95 a 1.05, se procedió a calcular la concentración real de las cada una de las soluciones de aflatoxinas (método NOM) mediante la ecuación que a continuación se detalla:

$$\mu\text{g de AF mL}^{-1} = (A \times \text{PM} \times 1000 \times \text{FC}) / \varepsilon$$

donde:

**A**= Absorbancia

**PM**= Peso molecular

**FC**= Factor de corrección del equipo

$\varepsilon$ = Coeficiente de extinción molar para soluciones de AF

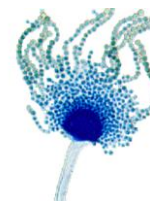
### **5.5 Soluciones patrón de Aflatoxinas**

La preparación de las soluciones estándar de AF B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, se realizó según se describe en el método de la NOM. Para ello, se disolvió cada uno de los estándares con una mezcla de benceno:acetonitrilo (98:2), para obtener una concentración aproximada de 100 mg mL<sup>-1</sup>. De esta solución se tomaron 10 mL y se aforaron a 100 mL con la mezcla de benceno:Acetonitrilo (98:2). De esta solución estándar se partió para preparar la curva de calibración con concentraciones de 99 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , de 20 a 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; de 60 a 160  $\mu\text{g L}^{-1}$  y de 20 a 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Estas concentraciones se transforman a ng (concentración absoluta) de cada una de las aflatoxinas se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  (volumen de análisis), de cada uno de los puntos de la curva. Esto se realizó con el fin de evitar cambios de unidades de concentración en las soluciones ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y las muestras en ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Al cuantificar las muestras se consideró el factor de dilución y se obtuvo la concentración de las toxinas en  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ .

### **5.6 Método de análisis para las aflatoxinas**

#### **5.6.1 Preparación de las muestras**

Muestras de hígado de pollo. Inicialmente los animales fueron inducidos a una dieta contaminada de maíz con aflatoxinas, posteriormente se extrajo el hígado, el cual fue sometido a una molienda y extracción con diclorometano. Las muestras fueron evaporadas con



nitrógeno y reconstituidas con 1 ml de acetonitrilo grado CLAR, posteriormente se pasaron por una membrana 0.45  $\mu\text{m}$ . En el anexo 1 se explica detalladamente la secuencia metodológica de la técnica.

Muestras de dulces típicos mexicanos. Las muestras inicialmente se encontraban en metanol, así que se evaporaron con nitrógeno y se reconstituyeron en 1 mL acetonitrilo grado CLAR posteriormente se pasaron por una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . Cabe mencionar que las muestras se monitorearon en dos zonas :Zona I, Coyoacán y Zona II, La merced. En el anexo 2 se explica detalladamente la secuencia metodológica de la técnica.

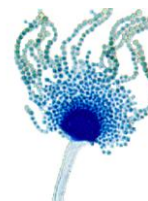
### ***5.7 Derivatización de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub>***

La derivatización de estos estándares se realizó tomando 100  $\mu\text{L}$  de las soluciones estándar de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> en un vial de 0.5  $\mu\text{L}$ , a este volumen se le agregó 350  $\mu\text{L}$  de la solución derivatizadora (10 mL ATF, 5 mL ácido acético glacial y 35 mL de agua desionizada), se agitaron con vortex durante 30 segundos. Los viales se mantuvieron en baño de agua a una temperatura de 65°C por 10 minutos (NOM). Una vez transcurrido el tiempo se enfriaron al chorro del agua, hasta temperatura ambiente.

### ***5.8 Cuantificación por CLAR-fluorescencia***

La cuantificación de AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub> se realizó mediante un cromatógrafo de líquidos consistente en una bomba cuaternaria, equipado con un inyector Rheodyne con un rizo (loop) de 20  $\mu\text{L}$  y un detector de fluorescencia (Thermo Separations FL300, EEUU). La separación se llevó a cabo mediante una columna LC<sub>18</sub>-DB en fase reversa, de 4.6 mm D.I., x 250 mm x 5  $\mu\text{m}$  (Supelco, EEUU).

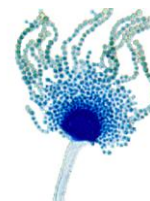
Todos los disolventes fueron desgasificados por 45 minutos usando un baño de ultrasonido, Transsonic T570. el agua grado cromatográfico fue obtenida por la filtración de agua destilada y desionizada, de un sistema Milli-Q Plus (Molsheim, Francia).



La fase móvil presento la siguiente composición: agua: acetonitrilo: metanol (60:20:20). La columna se mantuvo a temperatura ambiente con un flujo de la fase móvil de 1.0 mL min<sup>-1</sup>. la longitud de onda de excitación y de emisión del detector de fluorescencia se ajustaron a 360 y 440 nm respectivamente. El volumen de inyección fue de 20 µL. La identificación y cuantificación de las AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, en las muestras de hígado y de dulces típicos se realizó por comparación del tiempo de retención del estándar y de las áreas bajo la curva con la obtenida de la solución del estándar.



# Capítulo 4



## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4. Estandarización de las Aflatoxinas estándar

Debido a que las aflatoxinas no son patrones primarios (aun tomando en cuenta que su origen fue del proveedor Sigma-Aldrich que indica en la etiqueta cierta pureza) estos son compuestos inestables a condiciones de luz y aire, por tal razón es necesaria la estandarización para conocer la concentración real cuando ya se tienen en solución.

#### 4.1. Criterio de pureza para las soluciones estándar de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2)

Con la finalidad de estandarizar las soluciones de aflatoxinas ya preparadas se utilizó el procedimiento descrito en el apartado 5.4. A continuación en la Tabla 4.1, se muestran los datos experimentales con los cuales se procedió a calcular el factor de corrección del equipo (FC) y la concentración real de la aflatoxinas en la solución madre utilizando las siguientes ecuaciones:

$$FC = \frac{\epsilon_{\text{promedio}}}{3160} \quad \text{y} \quad \frac{\mu\text{gAF}}{\text{ml}} = \frac{A \times PM \times 1000 \times FC}{\epsilon_{\text{promedio}}}$$

Tabla 4.1. Resultados de la calculo del factor de corrección del equipo

Solución de dicromato de potasio [mM]	Absorbancia promedio a $\lambda_{\text{máx}}$ (350 nm)	$\epsilon = (A \times 100) / [\text{mM}]$
0.25	0.84062	3362.48
0.125	0.42037	3362.96
0.0625	0.21342	3414.72
$\epsilon$ promedio =		3380.05

Nota: Las lecturas de absorbancia se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones de dicromato de potasio

El factor de corrección del equipo se calculó como sigue,  $FC = [3380.05/3160] = 1.0086$



El factor de corrección para la señal del equipo ( $FC=1.0086$ ), se encuentra dentro del intervalo ( $0.95 < FC < 1.05$ ), establecidos por el criterio de la norma. Con este valor experimental se procedió a calcular la concentración real para  $AFB_1$ ,  $AFB_2$ ,  $AFG_1$  y  $AFG_2$  en la solución de referencia. Las soluciones de aflatoxinas se estandarizaron y las concentraciones resultantes pueden ser observadas en la Tabla 4.1.2, así como en la Grafico4.1

Tabla 4.1.2. Absorción máxima para cada una de Aflatoxinas

Aflatoxina	Amax a 350 nm	PM	Coefficiente de extinción ( $\epsilon$ )	$\mu\text{g AF/mL}$
B1	0.16329	312	19800	2,60
B2	0.68498	314	20900	10,38
G1	0.27329	328	17100	5,29
G2	0.40194	330	18200	7,35
		FC=	1.008578681	



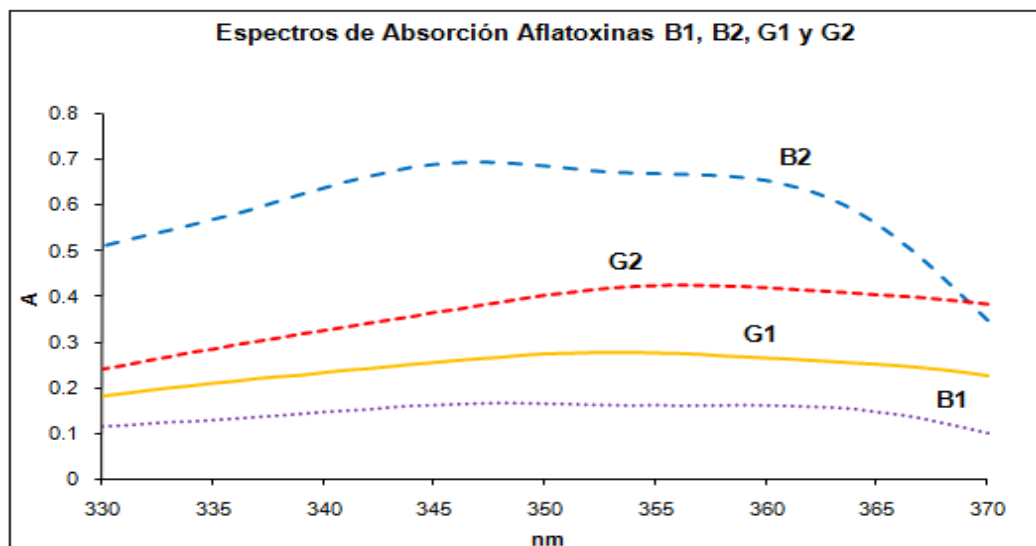
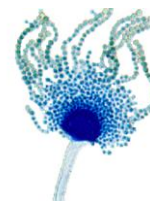


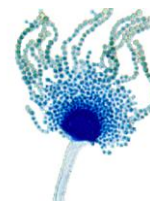
Gráfico 4.1. Espectros de absorción máxima (350 nm)

La concentración determinada para cada una de las aflatoxinas fue  $2.60 \mu\text{g mL}^{-1}$  lo cual equivale al 26 % de pureza del estándar para AFB<sub>1</sub>;  $10.38 \mu\text{g mL}^{-1}$  lo cual equivale al 103.8% de pureza del estándar para AFB<sub>2</sub>;  $5.29 \mu\text{g mL}^{-1}$  lo cual equivale a 52.9 % de pureza del estándar y  $7.35 \mu\text{g mL}^{-1}$  lo cual equivale a 73.5 % de pureza del estándar.

#### 4.1.2. Curva de calibración para cuantificación de AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>

Como se menciona en el capítulo anterior, las curvas de calibración abarcan concentraciones de  $38$  a  $91 \mu\text{g mL}^{-1}$  para AFB<sub>1</sub> y de  $31$  a  $71 \mu\text{g mL}^{-1}$  para AFB<sub>2</sub>. En los gráficos 4.1.2 y 4.1.3 se muestran las curvas de calibración para ambas aflatoxinas con sus intervalos de confianza, la ordenada al origen, la pendiente de la recta y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Las inyecciones para la curva de calibración se realizaron por triplicado y se comprobó que el método sigue un modelo lineal si se analiza por áreas con una  $r^2$  de 0.9832 para la AF B<sub>1</sub> y de 0.9925 para la AF B<sub>2</sub>, en cuanto al análisis con alturas la  $r^2$  no cumple



con los requisitos par decir que sigue un modelo lineal. Por esta razón se decidió cuantificar a las muestras en cuanto a sus áreas.

Curva de Calibración Afla B1

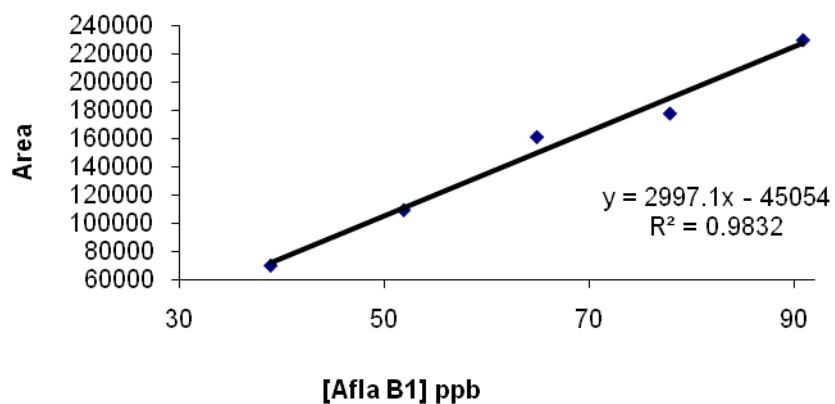


Grafico 4.1.2. Curva de calibración para AFB<sub>1</sub> de 99 a 200 µg mL<sup>-1</sup>

Curva de Calibración Afla B2

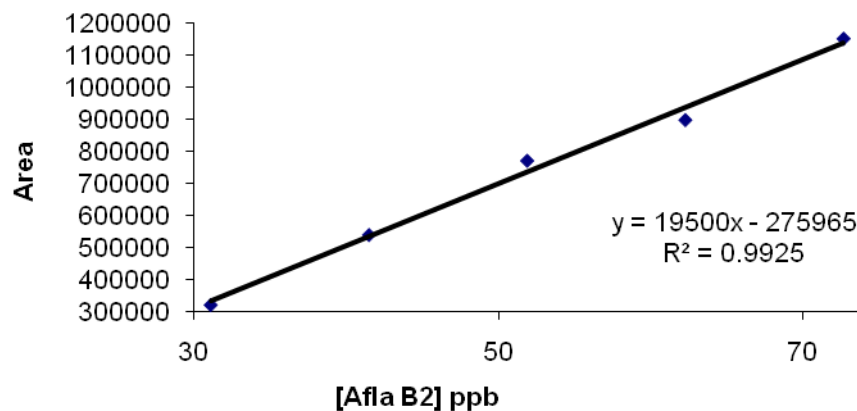
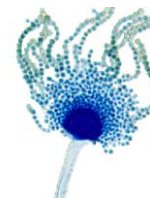


Grafico 4.1.3. Curva de calibración para AFB<sub>2</sub> de 20 a 40 µg mL<sup>-1</sup>



## 4.2 Limite de detección y cuantificación

### 4.2.1 Limite de detección AFB<sub>1</sub>

La desviación estándar de la ordenada al origen  $Sb_0$  tiene un valor de 7506.3, mientras que el valor de la pendiente  $m$ , es 669.061, por lo que el estimado\* del límite de detección (LD) es:

$$LD = \frac{3.3 \times Sb_0}{m} = \frac{3.3 \times 7506.3}{669.061} = 37.02 \text{ ppm}$$

### 4.2.2 Limite de cuantificación AFB<sub>1</sub>

La desviación estándar de la ordenada al origen  $Sb_0$  tiene un valor de 7506.3, mientras que el valor de la pendiente  $m$ , es 669.061, por lo que el estimado\* del límite de detección (LC) es:

$$LC = \frac{10 \times Sb_0}{m} = \frac{10 \times 7506.3}{669.061} = 112.19 \text{ ppm}$$

### 4.2.3 Limite de detección AFB<sub>2</sub>

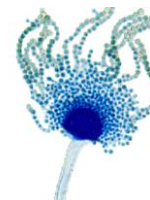
La desviación estándar de la ordenada al origen  $Sb_0$  tiene un valor de 7506.3, mientras que el valor de la pendiente  $m$ , es 669.061, por lo que el estimado\* del límite de detección (LD) es:

$$LD = \frac{3.3 \times Sb_0}{m} = \frac{3.3 \times 35480.6}{3622.43} = 32.32 \text{ ppm}$$

### 4.2.4 Limite de cuantificación AFB<sub>2</sub>

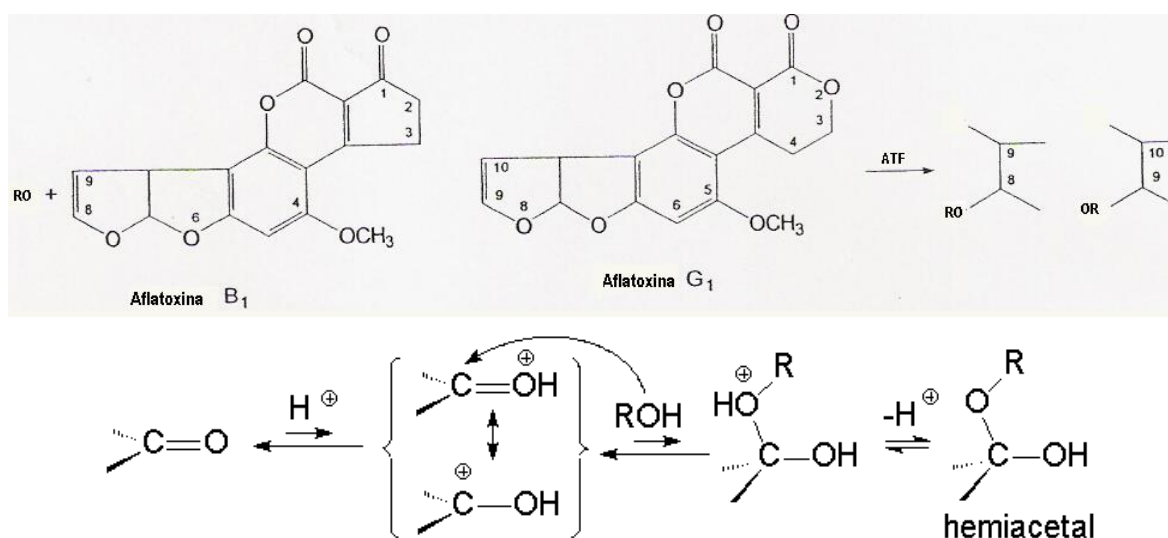
La desviación estándar de la ordenada al origen  $Sb_0$  tiene un valor de 7506.3, mientras que el valor de la pendiente  $m$ , es 669.061, por lo que el estimado\* del límite de detección (LC) es:

$$LC = \frac{10 \times Sb_0}{m} = \frac{10 \times 35480.6}{3622.43} = 97.95 \text{ ppm}$$



### 4.3 Separación de aflatoxinas según la NOM-188-SSA1-2002

La aflatoxinas eluyen naturalmente en el siguiente orden: G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, como se muestra en la Figura 4.3.1, sin embargo tanto la AF G<sub>1</sub> y B<sub>1</sub> no fluorescen naturalmente por ello la necesidad de derivatizar. El uso de ácido trifluoroacético (ATF) para la derivatización de aflatoxinas, transforma a estas en hemiacetales AFG<sub>2a</sub> y AFB<sub>2a</sub> los cuales fluorescen altamente (J, Jaimez, 2000), dicha saturación de la estructura no afecta en la conversión a las AFG<sub>2</sub> y AFB<sub>2</sub>. Figura 4.3.1.



La derivatización con ATF es ampliamente utilizada para la determinación de aflatoxinas en una gran variedad de alimentos. La mayor desventaja de el uso de ATF es la baja estabilidad de AFB<sub>2a</sub> y AFG<sub>2a</sub> derivadas en metanol, probablemente a la formación de metil acetatos (R.M. Beebe, 1978). Por otro lado el ATF es un agente corrosivo y toxico.

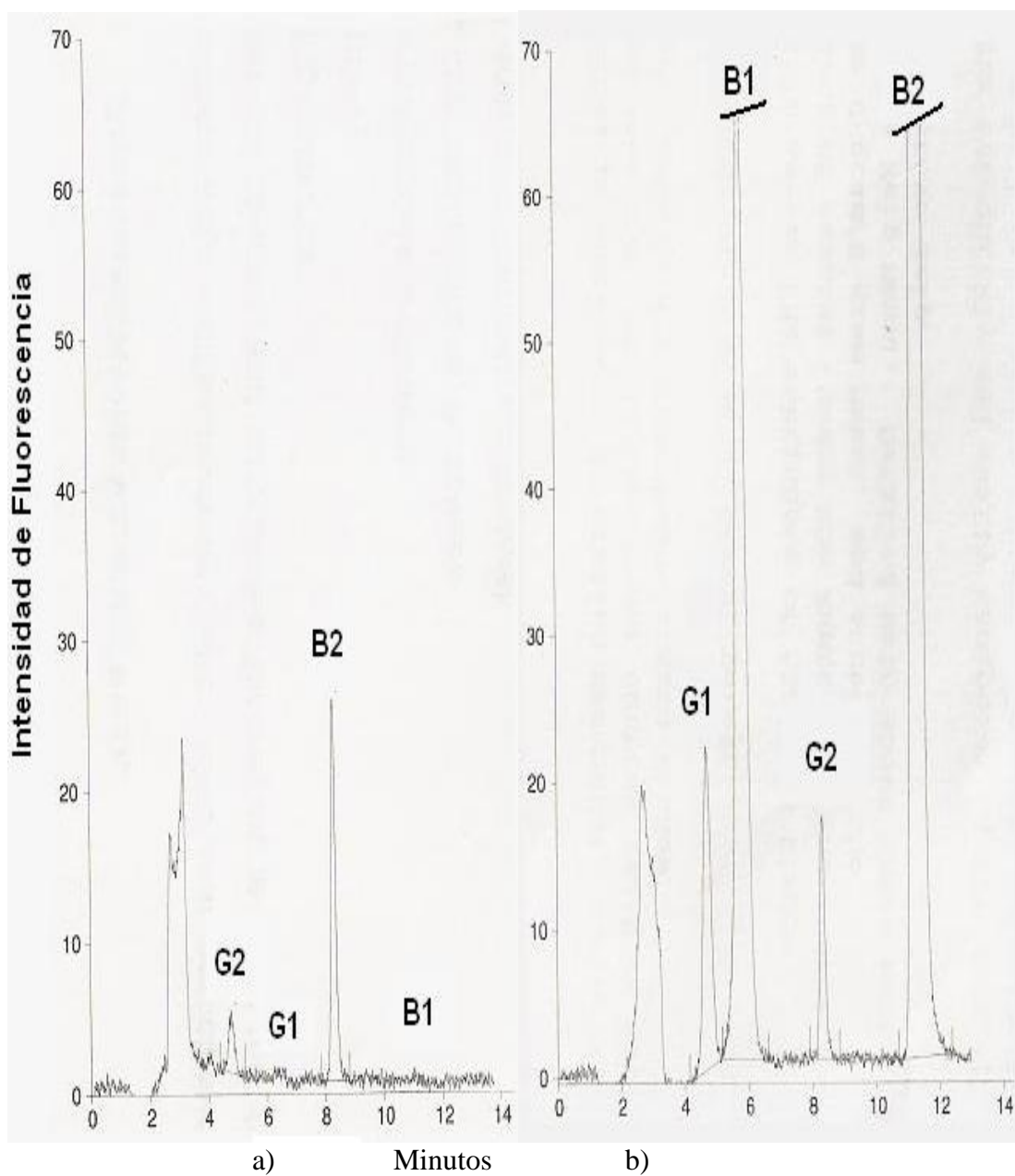
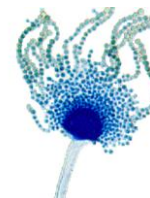
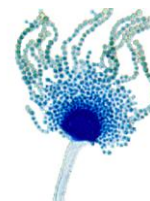


Figura 4.3.1. Cromatogramas de una solución estándar de AF, a) sin derivatización y b) con derivatización usando ATF. Condiciones: Columna Supelco ODS, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, fase móvil MeOH:AcN:H<sub>2</sub>O (20:20:60), inyección 20  $\mu$ l.



#### ***4.4. Influencia de la forma de preparación del derivado***

Durante algunos experimentos realizados en el laboratorio se observó que existe una influencia considerable del procedimiento de derivatización de las aflatoxinas G1 y B1 en la calidad de las señales obtenidas en los cromatogramas. Por lo anterior se analizaron 3 procedimientos diferentes de derivatización, con la finalidad de utilizar el que diera mejores señales. Estos procedimientos se describen a continuación:

##### ***4.4.1. Procedimiento A***

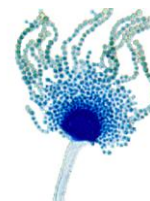
Sacar del congelador las mezclas patrón de trabajo y las muestras preparadas y descongelar a temperatura ambiente. Medir 100  $\mu\text{L}$  de cada una de ellas y adicionar 350  $\mu\text{L}$  de solución derivatizadora (10 mL ATF, 5 mL ácido acético glacial y 35 mL de agua desionizada), todo en un frasco vial de 0.5 mL. Mezclar por 30 s e incubar a 65°C durante 10 min en baño de agua. Enfriar al chorro de agua y finalmente filtrar a través de filtro para muestras de 0.45  $\mu\text{m}$  (NOM-188-SSA1-2002)

##### ***4.4.2. Procedimiento B***

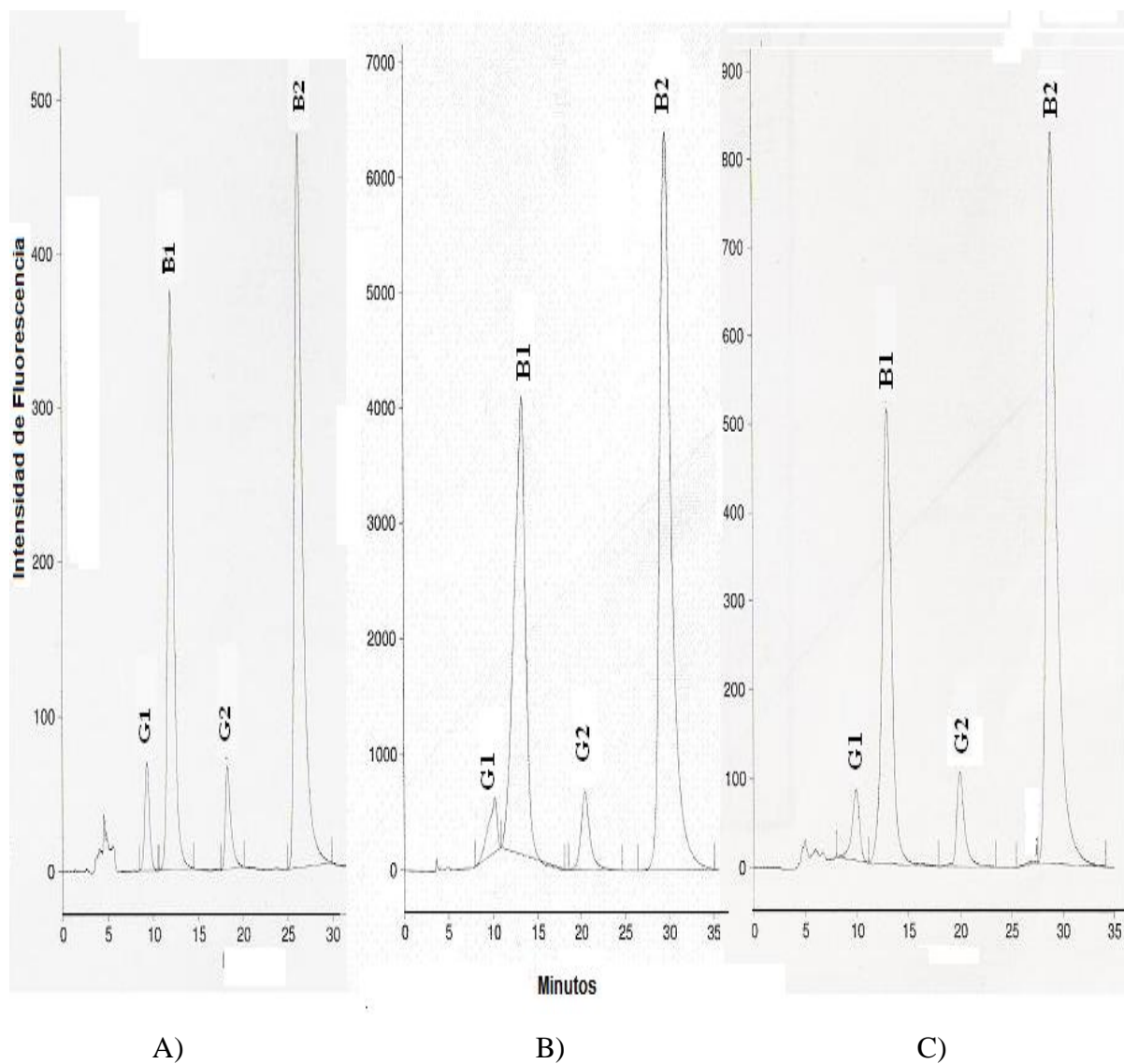
Sacar del congelador las mezclas patrón de trabajo y las muestras preparadas y descongelar a temperatura ambiente. Tomar 200  $\mu\text{L}$  de cada una de ellas y evaporar. Derivatizar con hexano-TFA (300  $\mu\text{L}$  de cada uno) y mezclar. Incubar por 10 min. a 40°C y posteriormente evaporar con nitrógeno. Reconstituir en acetonitrilo-agua (60:180  $\mu\text{L}$ ) respectivamente (Manju Sharma y Carmen Marquéz, 2001)

##### ***4.4.3. Procedimiento C***

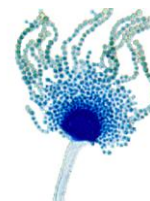
Sacar del congelador las mezclas patrón de trabajo y las muestras preparadas y descongelar a temperatura ambiente. Evaporar con nitrógeno la cantidad deseada, adicionar 100  $\mu\text{L}$  de TFA y agitar. Evaporar a 45°C y finalmente reconstituir en 1 mL acetonitrilo-agua (1:1 v/v) (Blesa J, et al., 2005)



Una mezcla de aflatoxinas se sometió a cada uno de los procedimientos anteriores y fueron inyectadas al cromatógrafo de líquidos, obteniéndose los Cromatógramas que se observan en la Fig. 4.4.1



A) B) C)  
Figura 4.4.1. Cromatógrama de la separación de una mezcla de estándares de aflatoxinas. Condiciones: Columna Supelco ODS, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, fase móvil MeOH:AcN:H<sub>2</sub>O (20:20:60), inyección 20  $\mu$ l. Procedimiento de derivatización A, B y C descrito en el texto. El orden de elución es el mismo para todos los casos.



Como se puede observar en la Fig. 4.4.1, las señales obtenidas utilizando el procedimiento de derivatización B fueron mayores (ver eje y que expresa RFU), lo cual mejora el método en término de sensibilidad. Esto se explica por el hecho de que el derivado final se reconstituye en un menor volumen (240  $\mu$ l) comparado con los otros 2 métodos. Respecto al ligero aumento de las señales de la AFB1 y AFG1 utilizando el procedimiento C comparado con el descrito en la NOM (procedimiento A), esto es debido dos causas: 1) la diferencia en el medio de derivatización utilizado, en A el solvente fue una mezcla de ATF+Ac. acético + agua y en C se utilizó solo ATF y la incubación o no de la muestra. Todo lo anterior nos haría concluir que es mejor la utilización de solo ATF como medio para derivatizar, pues no se necesita incubar la muestra y que después de la evaporación la muestra debería reconstituirse en un volumen pequeño de solvente. Lamentablemente no fue posible utilizar los procedimientos B y C para derivatizar las muestras en el análisis rutinario debido a que se presentaron los problemas siguientes:

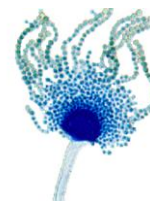
- Con el procedimiento B aun quedan restos de hexano en la muestra (inyectadas) los cuales degradan los grupos ODS presentes en la columna, por lo que después de la inyección cambian las características de retención de la fase estacionaria (se destruye la columna).
- Con el procedimiento C se presenta una clara corrosión de las tuberías, que no puede evitarse aun enjuagando el bucle (loop), debido a la presencia de ATF concentrado.

Por todo lo anterior se decidió utilizar el procedimiento de derivatización A en subsecuentes corridas.

#### **4.5. Análisis de AF en muestras de hígado de pollo**

Con el fin de evaluar la cantidad de aflatoxinas presentes en muestras de hígado de pollo alimentado con maíz con aflatoxinas, se construyeron curvas de calibración. En estas curvas fueron incluidas las aflatoxinas B1 y B2, ya que es bien sabido que son las que se encuentran presentes en maíz (Castillo P, 2005).





#### **4.5.1 Muestras de hígado de pollo.**

Las AF que son ingeridas por seres humanos y animales, proviene de los alimetros contaminados directamente por el hongo o de alimentos de animales que consumieron la toxina. Las aflatoxinas ingresan al organismos por las vías; digestiva, respiratoria y cutánea. Las principales enfermedades en humanos relacionadas con aflatoxinas son: carcinoma hepatocelular, daños en el intestino, fibrosis hepática, cáncer de pulmón, colórectal y de esófago. También puede producir aplasia de timo y disminución de la respuesta inmune. En los animales los síntomas de intoxicación por AF son muchas veces confundidos por los veterinarios por etiología con otras enfermedades y se a minimizado su efecto toxico.

El éxito en el control de AF de productos que se sospecha contaminación dependerá de metodologías eficientes, baratas, confiables y rápidas para que de una forma realista pueda ejercerse un control de contaminación de estas sustancias de los productos que se comercializan. De esta forma en un futuro se podrían establecer muchos más centros de monitoreo, tanto para productores como para comercializadores sin que esto signifique un pago de grandes sumas.

Para realizar los experimentos se utilizaron pollos de raza Ross X Ross (de un día de edad) los cuales fueron sometidos a una dieta de maíz contaminada con aflatoxinas (niveles de aflatoxinas  $>1000 \mu\text{gKg}^{-1}$ ) con y sin la adición de *Nocardia Corynebacteroides* (Nc). Posteriormente se determinaron los niveles de AF encontrados en hígado, para concluir en el efecto al animal. Para lo anterior, se extrajo el hígado del animal y fue sometido a una molienda y extracción con diclorometano (cloruro de metileno). Las muestras fueron evaporadas con nitrógeno y reconstituidas con 1 mL de acetonitrilo. Posteriormente las muestras fueron derivatizadas utilizando el procesó de derivatización A. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$ , de cada una de las muestras con un flujo de 1 mL/min. A continuación se muestran los Cromatógramas en la Figura 4.5.1. y 4.5.2, donde se encuentra presencia de  $\text{AFB}_1$  y  $\text{AFB}_2$ .

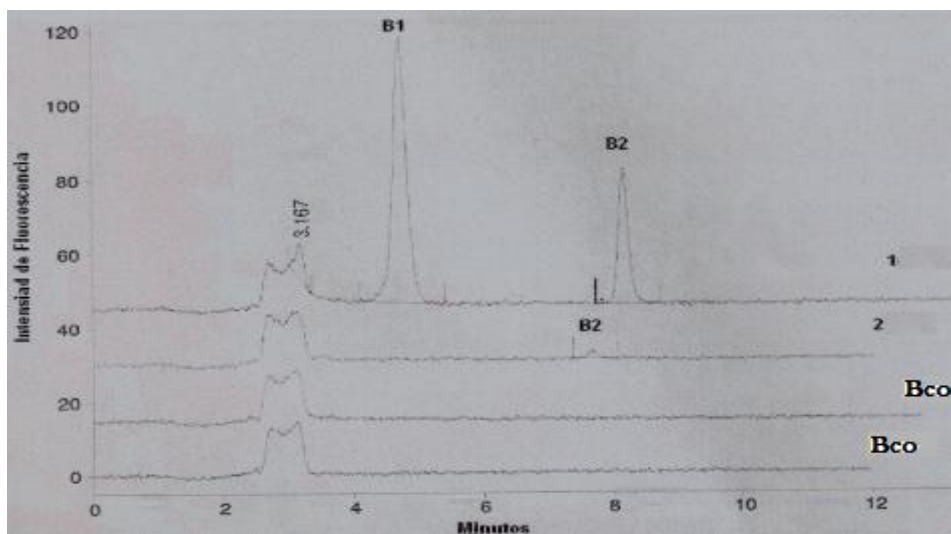
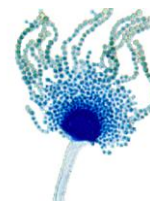


Figura 4.5.1. Cromatógrama de muestras de hígado de pollo contaminadas con AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, Condiciones: Columna Supelco ODS, 250 x 4.6 mm, 5 μm, fase móvil MeOH:AcN:H<sub>2</sub>O (20:20:60), inyección 20 μl.

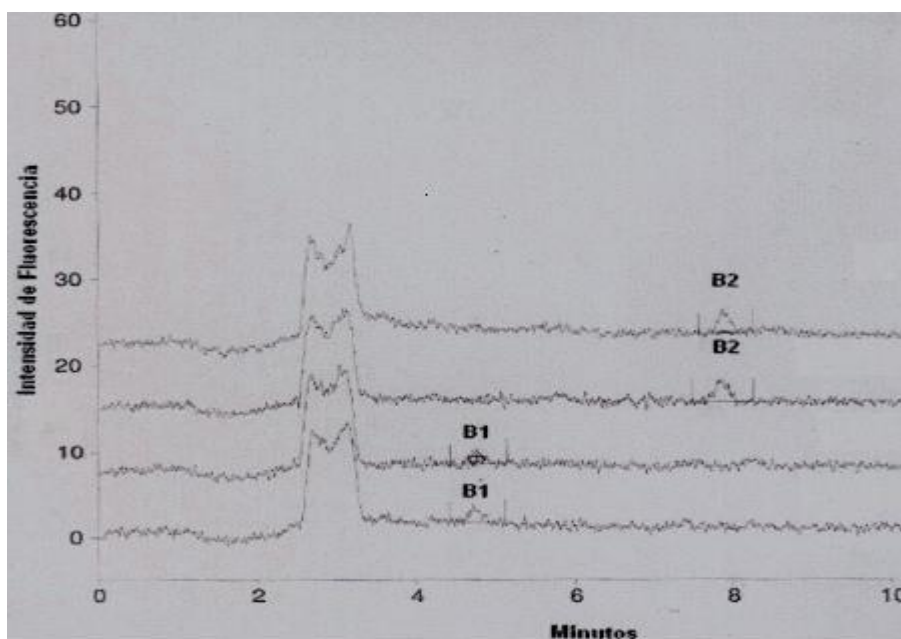


Figura 4.5.2. Cromatógrama de muestras de hígado de pollo contaminadas con AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, tratadas con (Ne) Condiciones: Columna Supelco ODS, 250 x 4.6 mm, 5 μm, fase móvil MeOH:AcN:H<sub>2</sub>O (20:20:60), inyección 20 μl.



Para las muestras de hígado de pollo expuesto a alimento contaminado con aflatoxinas se observó la presencia de AFB1 y AFB2 a diferentes niveles ver Figura 4.5.1. Sin embargo cuando el alimento contaminado se inoculó previamente con la bacteria **Nc**, los niveles de aflatoxinas encontrados en los extractos de hígado analizados con nuestra metodología con mucho menores ver Figura 4.5.2. Esto nos indica que hay un efecto destoxicante de **Nc** al ser adicionado a la dieta de los pollos n engorda. Esto puede hacer que en un futuro próximo la adición de **Nc** al alimento que se sospecha contaminado, contribuya a la disminución del riesgo de exposición a los animales de consumo humano. Estos análisis fueron realizados dentro del proyecto de investigación de la Dra. Zoila Irma Tejeda titulado “**Valor nutritivo de las dietas para pollo de engorda contaminadas con aflatoxinas y tratadas con *Nocardia corynebacteroides***”.

#### **4.5.2 Dulces Típicos Mexicanos**

La manifestación de hongos en los dulces típicos, cereales de maíz, etc; indican un riesgo potencial para la salud del consumidor por la generación de agentes tóxicos debido a su metabolismo, haciendo notar a un más la aparición de hongos en productos alimenticios almacenados, como los frutos secos y productos elaborados a base de ellos, así como los cereales, es decir que por la localización geográfica de sus cultivos; el desarrollo es más frecuente en los climas tropicales, y subtropicales que en los climas templados.

Es importante que durante el proceso de elaboración de los dulces típicos, se tenga un buen control de la temperatura a la cual se lleva a cabo la mezcla de las materia prima con al miel previamente preparada, ya que los organismos mesófilos pueden ser termófilos debido a sus esporas, es decir, son capaces de resistir altas temperaturas sin continuar con su reproducción (Desrosier, 1997).



Por otro lado un control de humedad adecuado para el maíz almacenado es muy recomendable ya que las altas temperaturas son un factor determinante para que haya un crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz, cereales, cacahuates, etc.

En el caso del análisis de AF en dulces típicos mexicanos, éstos se monitorearon en dos Zonas del área metropolitana (Zona I Coyoacán y Zona II La Merced) posteriormente se pesaron 25 g de cada uno de los dulces (alegría de amaranto, palanqueta de cacahuete, pepitoria, cocada y dulce de coco), se extrajeron las AF's adicionando metanol al 60 % y se sometieron a una serie de filtrados. La muestra se adicionó a la columna y se realizaron dos lavados haciendo pasar agua destilada. Posteriormente se colocó un tubo de ensayo en la parte inferior de cada columna (de afinidad con anticuerpos monoclonales aflatest) y se llevó a cabo la elución de la muestra haciendo pasar 1 ml de metanol grado HPLC. Las muestras fueron evaporadas con nitrógeno y reconstituidas con 1 mL de acetonitrilo. Posteriormente las muestras fueron derivatizadas utilizando el proceso de derivatización A. Se inyectaron 20  $\mu$ L, de cada una de las muestras con un flujo de 1 mL/min.

Los resultados obtenidos para los dulces típicos solo nos indicaron la presencia de AFB1 en pepitoria para ambas Zonas. A continuación se muestran los cromatogramas en la Figura 4.5.3. y 4.5.4

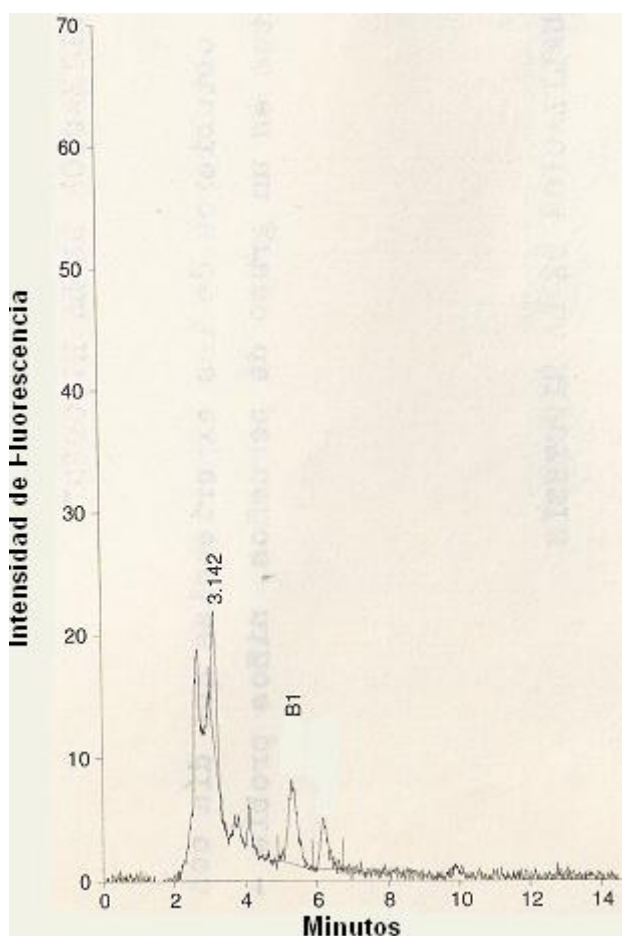


Figura 4.5.3. Cromatógrama de pepitoria contaminada con AFB<sub>1</sub> (Zona II, La Merced) Condiciones: Columna Supelco ODS, 250 x 4.6 mm, 5 μm, fase móvil MeOH:AcN:H<sub>2</sub>O (20:20:60), inyección 20 μl.

Como se puede observar en la Figura 4.5.3, la presencia de la AFB<sub>1</sub> con 5.08 μg Kg<sup>-1</sup> lo cual esta dentro del rango permitido por la normatividad mexicana (20 μg Kg<sup>-1</sup>) pero ya se encuentra muy cerca al límite de la normatividad Europea (8 μg Kg<sup>-1</sup>).

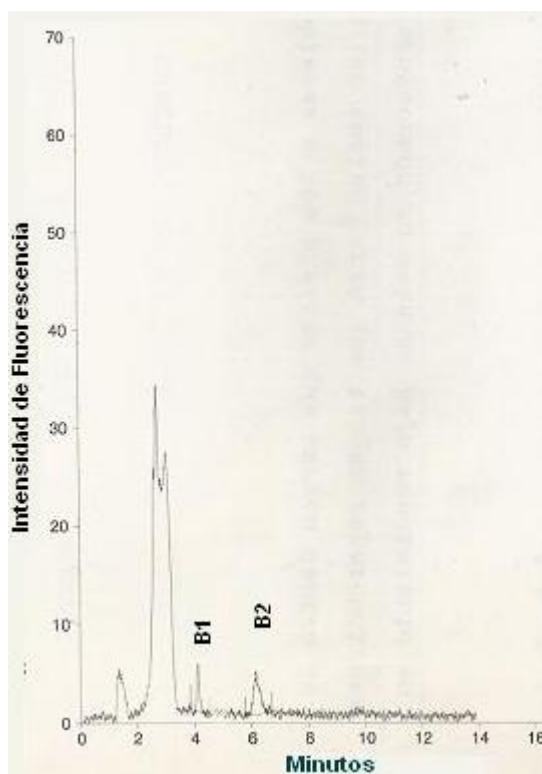
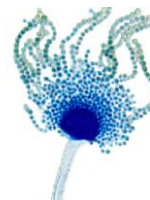


Figura 4.5.4. Cromatógrama de pepitoria contaminada con AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub> (Zona I, Coyoacán) Condiciones: Columna Supelco ODS, 250 x 4.6 mm, 5 µm, fase móvil MeOH:AcN:H<sub>2</sub>O (20:20:60), inyección 20 µl.

En cuanto a la zona I, en esta muestra se encontró a dos aflatoxina AFB<sub>1</sub> (2.23 µg Kg<sup>-1</sup>) y AFB<sub>2</sub> (1.58 µg Kg<sup>-1</sup>), los cuales se encuentran aun dentro del rango permitido por la normatividad mexicana y europea.

Concluyendo. Aunque existe la presencia de AF en pepitoria en dulces típicos, monitoreados en ambas zonas no representan un riesgo de salud para los consumidores por encontrarse en niveles aceptables.



#### 4.6 Influencia de las CD's en la emisión de fluorescencia de las aflatoxinas

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método de detección de AF de la NOM en donde se utiliza la técnica de CLAR con detección de fluorimétrica, se llevo a cabo el estudio del posible aumento en la emisión de fluorescencia de las AF al formar complejos de inclusión con ciclodextrinas (CD'S)

Durante el estudio se realizaron mediciones de las AF utilizando un Espectrofotómetro de fluorescencia Varian CARY Eclipse. Como se puede ver en la Figura 4.6.1 como primera instancia se obtuvo el espectro de excitación de la AFG1 a una longitud de onda de emisión fija de 460 nm. De acuerdo a estos resultados la longitud de onda de excitación óptima para la AFG1 es 360 nm, por lo que los subsecuentes espectros de emisión fueron a esta longitud de onda.

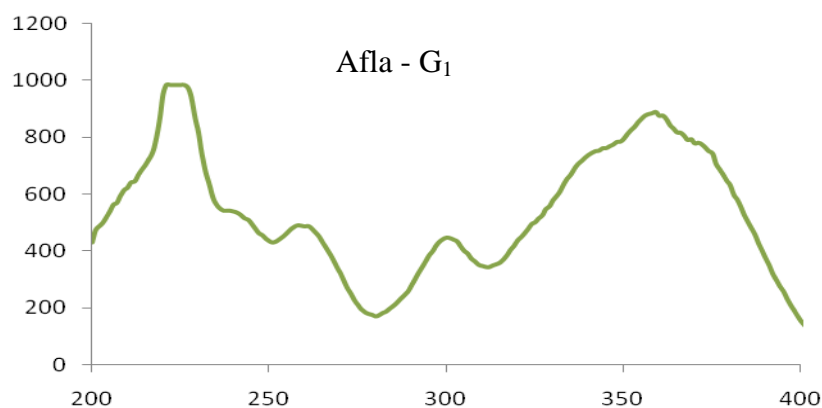
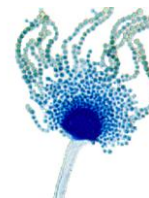


Gráfico 4.6.1 Espectro de excitación de Aflatoxina G<sub>1</sub>

Con la finalidad de estudiar la influencia de la emisión de fluorescencia observada en la AFG1 con y sin la prese  $\lambda$  (nm) se prepararon las siguientes soluciones:



Solución [ppm]	AFG <sub>1</sub> [M]	Fase móvil
50	1.542 x 10 <sup>-4</sup>	MeOH:AcN:H <sub>2</sub> O (20:20:60)
50	1.542 x 10 <sup>-4</sup>	MeOH:AcN:H <sub>2</sub> O (20:20:60) + β-ciclodextrina (10 <sup>-2</sup> M)
50	1.542 x 10 <sup>-4</sup>	MeOH:AcN:H <sub>2</sub> O (20:20:60) + DMβ-ciclodextrina (10 <sup>-2</sup> M)
50	1.542 x 10 <sup>-4</sup>	MeOH:AcN:H <sub>2</sub> O (20:20:60) + Mβ-ciclodextrina (10 <sup>-2</sup> M)
50	1.542 x 10 <sup>-4</sup>	MeOH:AcN:H <sub>2</sub> O (20:20:60) + HPβ-ciclodextrina (10 <sup>-2</sup> M)
50	1.542 x 10 <sup>-4</sup>	MeOH:AcN:H <sub>2</sub> O (20:20:60) + CMβ-ciclodextrina (10 <sup>-2</sup> M)

Se obtuvo el espectro de emisión de estas soluciones (a una  $\lambda_{\text{Excitación}} = 360$  nm) el cual se puede observar en la Figura 4.6.2. Como se puede observar casi en todos los casos la presencia de CD's en el medio provoca un aumento en la emisión de fluorescencia de éstas (con excepción de HPβ- CD), esto puede deberse a que la formación de complejos de inclusión genera una estructura rígida de las AF, estabilizándolas y disminuyendo la pérdida de energía por otras fuentes. Esto debe probarse con algunos otros estudios que en este momento están siendo realizados en el Laboratorio de Espectroscopia Láser del Instituto de Química de la UNAM. Por otro lado, podemos concluir que es posible aumentar considerablemente la sensibilidad del método de CLAR propuesto en la NOM adicionando CD's a la fase móvil, por lo que en experimentos posteriores será desarrollada esta metodología en nuestro laboratorio.

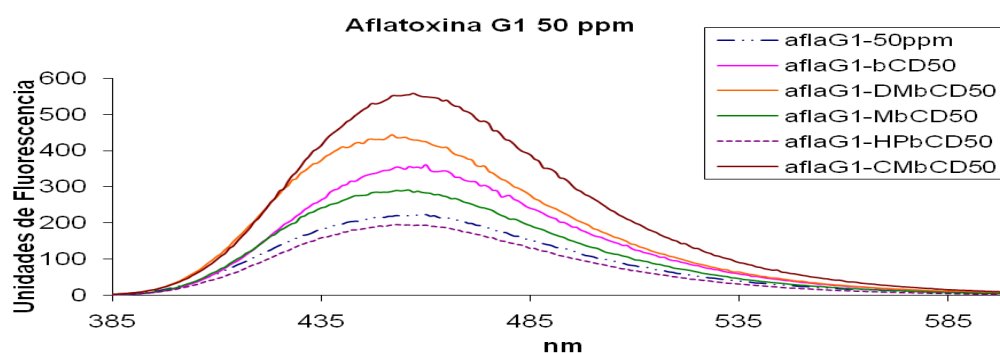


Grafico 4.6.2 Espectro de emisión de Aflatoxina G1 con diferentes ciclodextrinas.





# Capítulo 5

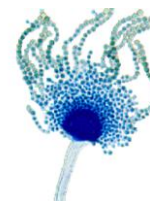


## 5. Conclusiones

- ❖ Se realizó la estandarización de las soluciones de aflatoxinas obtenidas de los reactivos SIGMA. Este paso es necesario, ya que las AF son fotosensibles y se degradan en presencia de aire, y con este parámetro nos aseguramos de que en cada estudio que se realice sabemos cuál es la concentración real.
- ❖ Se llevo a cabo exitosamente la adecuación del método oficial de la NOM-188-SSA1-2002, para la determinación de aflatoxinas B1 y B2 por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, asegurándonos por lo tanto de su confiabilidad.
- ❖ Se compararon los tres procedimientos de la derivatización para lograr la máxima emisión de fluorescencia de la AF y se decidió trabajar con el procedimiento A ya que con los otros dos procedimientos se observaron daños considerables a la columna.
- ❖ Se pudo cuantificar la cantidad de aflatoxina B1 y B2 presentes en muestras de hígado y así observar la influencia de la adición previa de NC al alimento y su efecto degradador de las AF.
- ❖ Se determino exitosamente la presencia de AF en diversos dulces típicos mexicanos, siendo este el primer reporte de la evaluación de estas toxinas, publicado al respecto, encontrándose la presencia de éstas solo en la pepitoria, aun así en concentraciones aceptables dentro del margen permitico (menor a 20  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ).



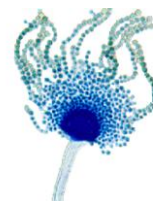
- ❖ Se realizó el estudio del efecto de la adición de CD's en la fluorescencia obtenida de la AFG1, encontrándose que la formación de estos complejos de inclusión AF-CD, en todos los casos aumenta la señal. Siendo la mas significativa con la Carboximetil- $\beta$ CD.
- ❖ Finalmente podemos afirmar que nuestro grupo de trabajo cuenta con un método confiable y que probó su utilidad al ser aplicado en análisis de muestras diversas.
- ❖ Es de vital importancia para la salud publica el contar con laboratorios que realicen el monitoreo de estas sustancias toxicas de manera confiable, ya que hasta nuestros días son muy poco los laboratorios que realizan estas labores y solo dos en el país los que utilizan la técnica de CLAR.
- ❖ Con la realización de este trabajo experimental, adquirí los conocimientos teóricos y habilidades para el manejo de CLAR, además de conocer y llevar a cabo la evaluación estadística de los parámetros que aseguran su confiabilidad. Todos estos conocimientos y habilidades adquiridos contribuyen en gran manera a mi formación profesional y me aseguran el poder ser un profesionista competitivo, considerando que más del 70 % de los métodos utilizados en el Control de Calidad de los productos en la Industria Farmacéutica, se realizan utilizando técnicas de cromatográficas.



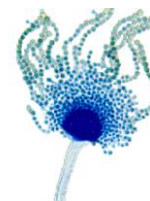
### *5.1 Perspectivas*

Al contar con un método confiables para el análisis de aflatoxinas, este puede ser aplicado a la determinación de estas sustancias en un sin número de muestras, pudiendo identificar y cuantificar de que AF se trata. Esto es importante por ejemplo específicamente para estudios toxicológicos en donde es necesaria la identificación de la toxina para concluir a ceca de los efectos adversos en la población.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo 4, en donde se observo un aumento considerable en la emisión de la fluorescencia de las AF en presencia de CD's, podemos predecir que se espera en futuros experimentos el poder mejorar la sensibilidad de la metodología propuesta en la NOM-188-SSA1-2002 al adicionar CD's a la fase móvil que forman complejos de inclusión que de alguna manera preservan la rigidez de la molécula, aumentando su emisión.



# ANEXOS



---

---

## Anexo A

### VALOR NUTRITIVO DE DIETAS PARA POLLO DE ENGORDA CONTAMINADAS CON AFLATOXINAS Y TRATADAS CON *Nocardia corynebacteroides*.

#### Procedimiento:

Se usaron 120 pollos Ross X Ross de un día de edad. Los que se dividieron en cuatro grupos de peso homogéneo. Con un diseño totalmente al azar y un arreglo factorial 2 x 2, en el que los factores serán con o sin aflatoxinas y con y sin Nc. Se estudiarán cuatro tratamientos con 3 repeticiones de 10 pollos cada uno. Se prepararán 4 dietas de maíz-soya en las cuales el maíz de la dieta va a estar sin contaminar y contaminado con AF y tratado y sin tratar con NC.

Para la preparación de las dietas se usó maíz libre de pesticidas, en el cual se determinaron humedad y nivel de proteínas. Se dividirá el lote en dos partes una de ellas se pondrá en frascos de 3 L y se inoculará con una cepa de *Aspergillus flavus*, ajustando la humedad a 18 % con agua estéril, se incubará a 30 ° C durante una semana por lo menos, hasta asegurar que los niveles de aflatoxinas sean lo suficientemente altos (> a 1000 µg Kg<sup>-1</sup> de maíz), analizado por el método de Aflatest. Se esterilizará en autoclave a 121° C por 30 min. Se dividían los lotes de maíz (sin contaminar y contaminado) en dos sublotos y se les incrementará la humedad a 18 % con agua estéril y se inocula con una suspensión de Nc y se incubará a 28 °C durante 72 horas. Se realizaron pruebas para estimar la colonización del maíz con NC tomando muestra de maíz, lavando con un buffer de fosfatos 0.1 M de pH 7.0, a una concentración de 1 g/mL. Se determinó el número total de microorganismos (NTM) a las 0, 24, 48 y 72 horas, de acuerdo con el método sugerido por AOAC (1995) poniéndole en placas de agar sangre e incubado a 28 ° C/ 7 días. Al cabo de las 72 h, se puso el maíz a secar a 60 °C en una estufa de aire



forzado / 24 h. se dejó a temperatura ambiente por 48 h para equilibrar la humedad al ambiente.

Se llevó un registro semanal de los pesos de los animales y del consumo de alimento. Al inicio y semanalmente se sacrificó a un pollo por repetición y por tratamiento para el análisis histopatológico de hígado, riñón, bolsa de Fabricio e intestino y por microscopia de barrido de intestino. Al final del trabajo (3 semanas), se sacrificaron 2 pollos de cada repetición y se determinaron las AF residuales en hígado.

### **Anexo B**

#### **DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS POR EL MÉTODO DE COLUMNAS DE AFINIDAD CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.**

Para el análisis de aflatoxinas totales tanto en las materias primas como de los dulces típicos, se utilizó el método por columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales (AFLATEST).

#### **Procedimiento:**

1.- Pesar 25 g en el caso de las siguientes materias primas y dulces típicos: Amaranto, coco, nuez, cacahuete, piloncillo, cacahuete, alegría de amaranto, cocadas, dulce de coco, palanqueta de cacahuete y; 50 g para pepita de calabaza y palanqueta de pepita (Fig.32).



**Figura 32. Pesado de muestras**



2.- Agregar a la muestra 100 ml de metanol al 60% en el caso de las primeras muestras y 200 ml al 80% en el caso de las segundas (Fig. 33).



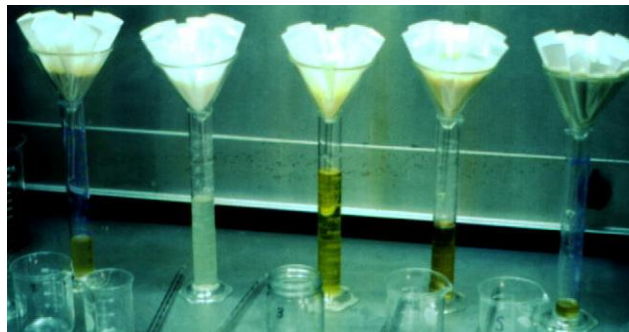
**Figura 33. Adicionando metanol al 60% a las muestras**

3.- Homogenizar la muestra por aproximadamente 1 minuto en la licuadora (Fig. 34).



**Figura 34. Moliendo muestras**

4.- Filtrar a través de papel filtro de 24 cm, la muestra homogenizada (Fig. 35).



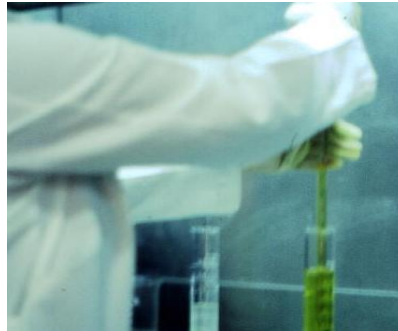
**Figura 35. Filtrado de muestras**

5.- Del filtrado que se obtuvo, tomar una alícuota de 20 ml en el caso de las primeras muestras y diluirlas en 20 ml de agua, en el caso de las segundas



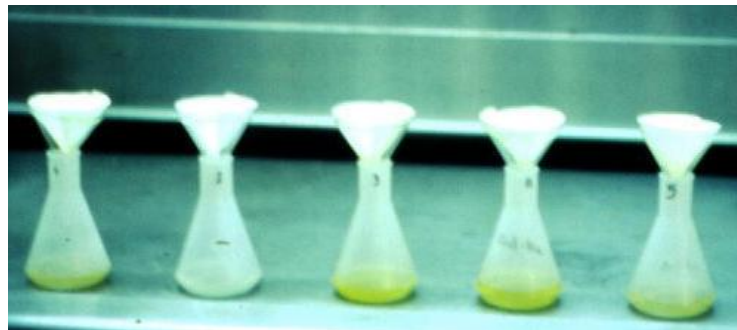


muestras, tomar alícuota de 10 ml y diluirla en 40 ml de agua a cada una (Fig. 36).



**Figura 36. Tomando alícuotas del filtrado**

6.- Realizar un segundo filtrado a través de fibra de vidrio (Fig. 37).



**Figura 37. Segundo filtrado**

7. Tomar 10 ml de filtrado y depositarlos en la columna de afinidad con anticuerpos monoclonales aflatest y filtrar al vacío. En el caso de las últimas dos muestras (pepita de calabaza así como palanqueta de pepita) se depositan 4 ml de filtrado (Fig. 38).



**Figura 38. Equipo de filtrado con columnas aflatest**



**Figura 39. Filtración al vacío**

8.- Realizar dos lavados haciendo pasar agua destilada por la columna de la misma manera que se pasó el filtrado (Fig. 40).



**Figura 40. Lavado de columnas**

9.- Colocar un tubo de ensayo en la parte inferior de cada columna y llevar a cabo la elución de la muestra haciendo pasar 1 ml de metanol grado HPLC (Fig. 41).



**Figura 41. Adición de metanol grado HPLC**

10.- Agregar 1 ml de solución reveladora marca Vicam (1:9) para facilitar la lectura de aflatoxinas (Fig. 42).

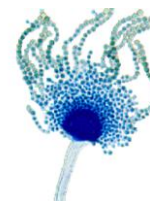


**Figura 42. Homogenización de adición de solución reveladora**

11. Colocar el tubo dentro del fluorómetro y leer a una longitud de onda de 425 nm (AOAC, 2000) ( Fig. 43).



**Figura 43. Lectura de aflatoxinas**



**Anexo C**

Áreas Cromatográficas y Curva de calibración para AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>

**400 ng/ml**

Aflatoxina	Tr	Area	Altura
B1r1	7.072	240064	10011
B1r2	7.06	250209	10042
B1r3	6.993	226774	9403
STD	0.042571508	11752.61921	360.3114394
prom	7.041666667	239015.6667	9818.666667
%C.V.	0.604565801	4.917091576	3.669657517
B2r1	14.603	1273628	69437
B2r2	14.437	1183053	64854
B2r3	14.344	1070346	60125
STD	0.131203404	101841.6009	4656.190754
prom	14.461333333	1175675.667	64805.33333
%C.V.	0.907270453	8.662389105	7.184888209

**350 ng/ml**

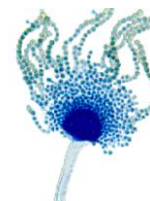
Aflatoxina	Tr	Area	Altura
B1r1	6.964	230811	10003
B1r2	6.978	222266	9573
B1r3	6.948	236164	9760
STD	0.015011107	7009.826888	215.6068954
prom	6.963333333	229747	9778.666667
%C.V.	0.215573581	3.051107039	2.204870078
B2r1	14.281	1139830	63266
B2r2	14.213	1146998	63961
B2r3	14.141	1170126	65171
STD	0.070009523	15833.15206	964.03233
prom	14.21166667	1152318	64132.66667
%C.V.	0.492620076	1.374026272	1.503184539

**300 ng/ml**

Aflatoxina	Tr	Area	Altura
B1r1	6.857	189209	7473
B1r2	6.869	176019	7589
B1r3	6.776	167716	7722
STD	0.050586559	10838.70347	124.5966827
prom	6.834	177648	7594.666667
%C.V.	0.740218898	6.101224598	1.64058132
B2r1	14.011	879706	49719
B2r2	13.902	915341	52355
B2r3	13.735	899480	52661
STD	0.13901199	17853.27058	1617.482406
prom	13.88266667	898175.6667	51578.33333
%C.V.	1.001334925	1.987725925	3.13597261

**250 ng/ml**

Aflatoxina	Tr	Area	Altura
B1r1	6.67	153187	6468
B1r2	6.661	170783	7283
B1r3	6.54	158811	7165
STD	0.072597061	8986.817902	440.4463645
prom	6.623666667	160927	6972
%C.V.	1.096025285	5.584406533	6.317360363
B2r1	13.457	746565	43806
B2r2	13.309	803235	46967
B2r3	13.185	762696	45927
STD	0.136176356	29197.91255	1611.012208
prom	13.317	770832	45566.66667
%C.V.	1.022575327	3.787843855	3.535505942



200 ng/ml

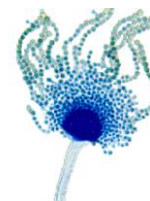
Aflatoxina	Tr	Area	Altura
B1r1	6.577	100058	5208
B1r2	6.473	110091	5118
B1r3	6.411	116927	5508
STD	0.083880868	8484.840855	204.2057786
prom	6.487	109025.3333	5278
%C.V.	1.293061013	7.7824489	3.868999215
B2r1	13.072	534253	32695
B2r2	12.912	514696	31229
B2r3	12.883	567353	34015
STD	0.101785723	26617.18085	1393.637447
prom	12.95566667	538767.3333	32646.33333
%C.V.	0.785646353	4.940385061	4.268894251

150 ng/ml

Aflatoxina	Tr	Area	Altura
B1r1	4.765	69397	4698
B1r2	4.782	69285	4690
B1r3	4.747	70155	4948
STD	0.017502381	473.2877912	146.701511
prom	4.764666667	69612.33333	4778.666667
%C.V.	0.367336941	0.679890716	3.069925593
B2r1	8.323	305978	28395
B2r2	8.384	326141	28835
B2r3	8.27	327977	28586
STD	0.057046764	12205.69175	220.6362013
prom	8.325666667	320032	28605.33333
%C.V.	0.68519155	3.813897281	0.771311415

100 ng/ml

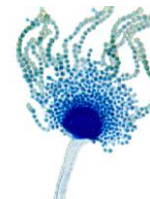
Aflatoxina	Tr	Area	Altura
B1r1	4.767	53599	4127
B1r2	4.768	59498	4349
B1r3	4.752	56157	3893
STD	0.008962886	2958.148238	228.0263143
prom	4.762333333	56418	4123
%C.V.	0.188203677	5.243270301	5.530592148
B2r1	8.292	282014	25189
B2r2	8.274	279195	25197
B2r3	8.179	272091	25197
STD	0.060715182	5113.373088	4.618802154
prom	8.248333333	277766.6667	25194.33333
%C.V.	0.736090306	1.840887947	0.018332702



**Concentraciones reales para la Curva de estándares en ng/ mL**

Aflatoxinas	ng afla real	[afla] en 5 mL	150	200	250	300	350
<b>B<sub>1</sub></b>	1297.56398	259.512796	38.9269194	51.9025592	64.878199	77.8538388	90.8294786
<b>B<sub>2</sub></b>	1037.937104	207.587421	31.1381131	41.5174841	51.8968552	62.2762262	72.6555973
<b>G<sub>1</sub></b>	1586.107113	317.221423	47.5832134	63.4442845	79.3053556	95.1664268	111.027498
<b>G<sub>2</sub></b>	735.0443845	147.008877	22.0513315	29.4017754	36.7522192	44.1026631	51.4531069

Nombre Archivo	Nombre muestra	AREA AFLATOXINA		conc. En 450 microl		Cantidad AFLA muestra	
		B1	B2	ppb B1	ppb B2	microg B1	microg B2
supelco105	5T2	0	0	0	0	0	0
supelco106	3(4/2)	0	0	0	0	0	0
supelco107	2(PA)	0	20543	0	15.2055385	0	0.06842492
supelco108	1(4/2)	1087993	407735	378.04778	35.0615385	1.70121501	0.15777692
supelco109	10Nc T-1	17953	0	21.0226552	0	0.09460195	0
supelco110	10Nc 24(1)	14483	0	19.8648694	0	0.08939191	0
supelco111	7(PA) 10Nc	0	28599	0	15.6186667	0	0.070284
supelco112	10Nc T8(8PA)	0	24534	0	15.4102051	0	0.06934592
supelco113	10Nc 2(4/2)	1108	62194	15.4022221	17.3414872	0.06931	0.07803669
supelco114	T-3	0	0	0	0	0	0
supelco115	1(PA)	0	43935	0	16.4051282	0	0.07382308
supelco116	4(PA)	0	0	0	0	0	0
supelco117	5Nc 4(4/2)	0	26207	0	15.496	0	0.069732
supelco118	0Nc (6PA)	29865	0	24.9971639	0	0.11248724	0
Zona II	Pepitoria	124185	0	56.4675853	0	0.11248724	0
Zona II	Pepitoria	29236	66493	24.7872944	17.561949	0.11154282	0.07902877



## **Anexo D**

### **PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN**

#### **1. Descontaminación del material de laboratorio**

Todo el material de vidrio que fue utilizado durante el análisis, se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio, la cual se preparó diluyendo una parte de solución comercial de hipoclorito (con una concentración entre 5 y 6 %), con diez partes de agua. Después de tratamiento. El material se enjuaga con abundante agua directa del grifo, seguido de agua destilada y se seco por escurrimiento en una estufa de 90 100 °C

#### **2. Descontaminación de área de trabajo**

Después del análisis las superficies de las áreas de trabajo se limpiaron con una toalla desechable impregnada con solución de hipoclorito de sodio concentrado.

#### **3. Descontaminación del material desechable**

Todo el material desechable, se sumergió durante 5 min en la solución de hipoclorito de sodio. La solución descontaminante se eliminó por el drenaje y los materiales desechables tratados, se empacaron en una bolsa de plástico previamente sellada y se colocaron en el depósito de desechos.

#### **4. Tratamiento de derrames**

Los derrames de las soluciones de AF deben tratarse inmediatamente con hipoclorito de sodio, vertiéndolo directamente del envase, recoger los líquidos con un papel absorbente el cual también se colocara en una bolsa de plástico.

#### **5. Tratamiento de remanentes de extracto de muestras.**

Una vez que se ha separado una alícuota del extracto de la muestra es frecuente que permanezca un remanente del mismo. Estos restos de extracto deben tratarse con una cantidad de hipoclorito de sodio equivalente a la unidad de volumen del residuo a tratar.



---

Los líquidos resultantes se deben acumular en un recipiente para desechos líquidos y eliminarse en un lugar destinado especialmente para éstos.

## **Anexo E**

### **Medidas preventivas para evitar la presencia de aflatoxinas**

*Evitar los factores que influyen en el desarrollo de hongos y en la producción de micotoxinas:*

- ✚ Selección adecuada de las semillas de cacahuate, maíz, sorgo y otros granos.
- ✚ Evitar la humedad del producto, las temperaturas (producción máxima de hongos entre 25 y 32 ° C) y humedad relativa elevada en el almacenamiento y la conservación de semillas.
- ✚ Eliminar malezas
- ✚ Practicar rutinariamente la rotación de los cultivos.
- ✚ Desactivar o quemar toda la materia orgánica muerta antes de la preparación del terreno.
- ✚ Evitar daños mecánicos a los productos.
- ✚ Recolectar los cultivos en plena madurez.
- ✚ Los almacenes deben ser secos y que no permitan la entrada de agua.
- ✚ Cumplir las normas sanitarias de almacenamiento (estibas, niveles de humedad adecuados, ventilación e iluminación adecuada, etc.)
- ✚ Controlar la infestación de insectos.
- ✚ Almacenar a baja temperatura.
- ✚ No utilizar los granos verdes, quebrados o aventados.
- ✚ Inspección periódica del producto almacenado.





---

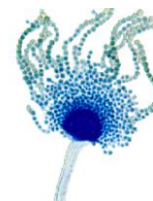
---

Referencias

1. **Previdi y P. Casolari, A.** (1986). Le aflatossine. *Industria Conserve*, **61**. 243-245 pp.
2. **Jaimez, J.** (2002). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in Food analysis. *J. of Food Microbiology*, **882**: 1-10 pp.
3. **AOAC**, ( 1990). *Official methods of analysis of the Associations of official analytical chemists*. 15 th. Cereal Food. 234-247
4. **Bata, A.,** and Lasztity, R (1999). Detoxification of mycotoxins-contaminated food and feed by microorganism, trends in food Science & Technology, 10: 223-228.
5. **ACGHI**, Committee Activities and reports, Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment. ACGHI, Cincinnati, Oh. USA, 1987.
6. **ACGHI**, TLVs valores límite para sustancias Químicas y Agetes Físicos en el ambiente de trabajo, e índices Biologicos Exposición, 1993-1994.
7. **Van Walbeek, W.** (1993). Fungal toxins in foods. *Can. Inst. Food Sci. Techonol. J.* **6** (2): 96.104 pp.
8. **Blesa, J., et al**, (2004), Limited survery for the presence of aflatoxins in foods from local market and supermarkets in Valencia, Spain. *Food Additives and Contaminants*, 21 (2): 165-171.
9. **Lesson, S., et al**, (1995). *Poutly Metabolic Disorders and Mycotoxins* University Books, Ontario, Canada, 249-297.
10. **Linder, E.** (1995). *Toxicologia de Alometos*, 2ª edición. Acribia, S.A. Zaragiza, España.
11. **Akiyama, H., et al**, (2001). Determination of aflatoxins B1, B2, G1 amd G2 in apices using a multifunctional column clenad-up. *J. of Chromatography A*. 932: 153-157



12. **Araujo, A.** (1994). Determinación de aflatoxinas en cacahuates comercializados en Recife-PE, Brasil. *Alimentaria*. **249**: 35-37
13. **D'Mello, J.P.F.**(1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*. 69: 155-166
14. **Holcomd, M., et al.** (1992). Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *J. of Chromatography*. 659: 127-137
15. **Otta, K. H., et al.** (2000). Determinaton of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography. *J. of Chromatography A*. 882: 11 – 16.
16. **Gimeno, A. y Martínez, F. R.** (2004). Riesgos de micotoxinas de algunas micotoxinas (como contaminantes de los alimentos) pueden provocar en humanos. Artículo técnico publicado en Ergomix. En internet: <http://www.Ergomix.com/nuevo/prueba/micotoxinas1>.
17. **Gimeno, A.** (1978). Validation of an Analytical Method to Determine the Content of Aflatoxin in Animal Feeding Stuff. *Jornadas Científicas de la Asociación Española de Especialistas en Micología*, Reus 23 al 25 de Mayo, Vol.1, pp.51-73 (libro del Symposium).
18. **Gimeno, A.** (1981). Hazelnuts as possible substratum for aflatoxin production. CT-17 LNETI (Laboratorio Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial - Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares) Junho, Lisboa, 129-154 pp.
19. **Gimeno, A.** (1980). Incidence and mycotoxin production by *Aspergillus flavus*. *Symposium Científico de la Sociedad Ibérica de Nutrición Animal*, Enero 8-10, Lisboa, Portugal, 207-233 pp.
20. **Peraica M., et al.** (1999) Efectos toxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bull World Health Organ*, 77 (9): 754-766.
21. **Guzmán, D.P.** (2001) Mitos y realidades de las aflatoxinas. *Avance y perspectivas*, 20: 415-420.



22. **Williams, J., et al.** (1999) Informe sobre el problema de aflatoxinas de ña castaña (*Bertholletia excelsa*) en Bolivia: Documentó Técnico 71/199. Universidad de Georgia. USAID/Bolivia. 4-7.
23. **FAO (1991).** Alimentación y Nutrición. *Utilización de alimentos tropicales: semillas oleaginosas tropicales.* Estudio FAO alimentación y nutrición. Roma, Italia. 92 pp. Disponible en: [www.fao.org](http://www.fao.org)
24. **FAO (2005).** *Historia de los dulces típicos mexicanos.* Disponible en: [www.fao.org](http://www.fao.org)
25. **García, G. A., et al.** (2001). Inspección para aflatoxinas en el maíz almacenado o transportado a Sonora, 1998. Informe técnico. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie Botánica, m72 (2): 187-193.
26. **Nelson, D.B., et al.** (1980). Aflatoxins and reye's syndrome: A case control study. *Pediatrics*, 66 (6): 865-869.
27. **Lippmann, M.** (2000). *Environmental Toxicants.* Wiley – Intersciences. New York, EEUU, 401-402.
28. **Oyelami, OA.** (1997) Aflatoxins in the lungs of children with Kwashiorkor and children with miscellaneous diseases in Nigeria. *J. Toxycol Environm Health.*
29. **Steciow, M.**(2003). Aflatoxins. En internet:<http://www.cricyt.edu.ar/encyclopedia/termibos/aflattox.htm>.
30. Bogantes, Ledezma., et al. (2004). Aflatoxinas. *Acta med. Costarric.* 4(46)174-178.
31. **Papp, E., et al.** (2004). Liquid Chromatography determination of aflatoxins. *Microchemical J.* 73:39-46.
32. **Chiavaro, E. at al.** (2001) New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography a.* 973: 31-40.



33. **Kok, W. Th.** (1994). Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. of Chromatography B.* 659: 127-137.
34. DOF. (2002) Diario Oficial de la Federación. NOM-188-SSA1-2002. Norma Oficial. Productos y Servicios. Control de Aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. México, D.F. 21-41
35. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html>
36. Bolet, Astoviza, et al. (2005) Micotoxinas y Cancer. *Rev. Cubana Invest Biomed*, 1 (24): 54 – 59
37. Galván, M. (1992). Nosologías del síndrome hepático. *Mem. ANECA* 29: 89-95. México.
38. Osuna O. (1991). Micotoxinas: problema de salud publica. Efectos en aves, métodos de análisis y nuevos tratamientos. *MV Rev. Cienc, Vet.* 7(2): 2-8.
39. Osuna O. (1994) Toxicos en los alimentos para aves. *Mem. ANEZA* 221-223, México.
40. Rouessac, F Y Rouessac, A. (2003). “Análisis químico: Metodos y tecnicas instrumentales modernas”. Ed. Mc Graw Hill.
41. Bermejo, M.F. (1991). “Química analítica general, cuantitativa e instrumental” Vol. 2 Ed. Paraninfo, S.A. Madrid, España.
42. Harris, D.C. (2001) “Análisis químico cuantitativo”. Ed. Reverte, S.A. Barcelona, España.
43. Skoog, D.A., et al. (2001). “Química Analítica”. 7ª edición. Editorial, Mc Graw Hill. 837-850.
44. Galen, W E. (1985) *Instrumental Methods of chemical analysis*. Mc Graw Hill International Edition, New York, EEUU.
45. Willard, H.H. (1988). *Instrumental Methods of Analysis*. 7a edición, Ed. Wodsworth Publishing Company. San Diego, EEUU. 197-222; 465-512.
46. Wehry, R.R. (1981). *Moder, Fluorescence spectroscopy*. Pleum Press. New York, EEUU. 325-357.



- 
47. IARC(1987) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human *International Agency for Research of Cancer (IARC): 7* World Health Organization. 53-57 pp
48. Jaimez, J. (2002). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in Food analysis. *J. of Food Microbiology*, **882**: 1-10 pp.
49. Murrillo Hectot. (1966). Tratado elemental de la química organica. 7<sup>a</sup> ed. Editorial E.C.L:A:L:S:A. 116-117
50. R. M. Beebe. (1978). *J. Assoc. Anal. Chem.* 61:1347
51. Tarín. A., et al. (2004) Use of high-performace liquid chromatography to assess airborne mycotoxins. Aflatoxins and Ochratoxin *J. of Chromatography A.* 1047: 235-240.
52. Blesa, J., et al. (2005). Analysis of aflatoxin in peeled peanuts by liquid chromatography and fluorescence detection. *Bull. Environ. Contam, Toxicol.* 75: 115-120.
53. Desroiser, Norman W. (1998). *Elementos de Tecnología de alimentos.* CECSA. México. 331 pp.
54. Federal Drug Administration (2000). Division of Emergency Medicine: Definition of Aflatoxin. Febrero. San Francisco, CA.
55. Jaimez, J. (2002). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in Food analysis. *J. of Food Microbiology*, **882**: 1-10 pp.
56. Jiménez, M. ; Matero, R.; Huerta J. y Hernández E. (1991). Micotoxin and micotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumptions. *Mycopathologia.* **115**: 121-127 pp.
57. Koneman, H. (1997). Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies. *Toxicology*, **19**: 209-221.



- 
58. Miller, J.D. (1995). Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research *J. Stored Prod. Res.*, 1-16 pp.
59. Muller, E. L. (1976). *Nicología*. Ed. Omega, S.A. Barcelona, España. 677-693.
60. Pasteiner, S. *Micotoxins in Animal Husbandry*. Pub. Cient Biomin. 1994, Austria.
61. Rafai, R., et al. (1995). Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs. *Vet Rec*, 136: 511-514.
62. SAGARPA (2005). Fuente de Información Estadística Agroalimentaria con información de las delegaciones de la SAGARPA en: [www.sagar.gob.mx/users/pidtca](http://www.sagar.gob.mx/users/pidtca) >
63. Sala, M y Crrillo P. (1994) *Micotoxinas*. *Rev. Nutric Anim. Apl.* 2(32): 22-34.
64. Wyatt RD. Manejo de las toxicosis con tricotecenos. II parte. *Avic. PRef*, 11(2): 132-135;
65. Zintzen H. El problema de las aflatoxinas. *Pub. Cient, Roche Int.* Mayo 1975, Montevideo.
66. <http://www.uam.es/departamentos/ciencias/qorg/docencia:red/qo/115/agua.html>.
67. Castillo Urueta, O. (2005). *Estudios de la Calidad de Dulces Tradicionales Mexicanos Comercializados en la Ciudad de Mexico*. FES-Cuautitlán. Tesis de Licenciatura.
68. [http://www.engormix.com/s\\_searchermiles.asp?txtq=ergomix](http://www.engormix.com/s_searchermiles.asp?txtq=ergomix)
69. Sergio Quispe y Susana Revollo. (2001). *Estudios de contaminación con aflatoxinas producidas por Aspergillus flavus en la castaña y el maní*. Unidad Biología Molecular - Inst. SELADIS - Univ. Mayor de San Andrés, Bolivia
70. [Residuos de Aflatoxinas y Ocratoxina A en Alimentos de Origen Animal \(Leche, Huevos, y Tejidos Comestibles\)](#)
71. <http://www.veterinaria.org/asociaciones/aevedi/00132CV.htm>
72. <http://www.monografias.com/trabajos14/sustancias-toxicas/sustancias-toxicas.shtml>

## Referencias

---



73. <http://www.analizacalidad.com/micotoxinas.htm>
74. <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y1390S/y1390s02.htm>
75. <http://www.midiotecavipec.com/blogmidia/?p=29>
76. [http://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/ToxAlim/ToxAlim\\_L20.pdf](http://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/ToxAlim/ToxAlim_L20.pdf)
77. [www.engormix.com/tricotecenos\\_nuevas\\_consideraciones\\_cereales\\_s\\_articulos\\_1433\\_MYC.htm](http://www.engormix.com/tricotecenos_nuevas_consideraciones_cereales_s_articulos_1433_MYC.htm) - 112k
78. <http://www.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000519>
79. <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgClig012.pdf>
80. [www.reviberoammicol.com/2001-18/141144.pdf](http://www.reviberoammicol.com/2001-18/141144.pdf)
81. [www.conasamexico.org/mesa13Investigación%20sobre%20aflatoxinas.pdf](http://www.conasamexico.org/mesa13Investigación%20sobre%20aflatoxinas.pdf)