

720666



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMEN

LU 18.9.89

18.30 h.

**PROPUESTA DE PRACTICAS DE TOXICOLOGIA  
DE ALIMENTOS PARA UNA CARRERA  
ORIENTADA A LA INGENIERIA DE ALIMENTOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ALBERTO ROCA MAYORGA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*A mis padres por su gran apoyo  
A mis hermanos y abuelos porque me inyectaron confianza  
A mis familiares y amigos por lo que esperaron de mí  
a Graciela porque me dió la motivación.*

*Con agradecimiento a mis tíos Martha Roca y Mariano Fuster.*

*Las aves van a juntarse con sus semejantes; así la verdad-  
va encontrar a los que la ponen en práctica.*

*El Eclesiástico cap.28*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Pedro Valle Vega, Director de esta tesis, que con entusiasmo me dió todo el apoyo para realizarla.*

*A los profesores Bernardo Lucas y Adolfo de la Torre, por su cooperación a la presente.*

*A los maestros de la Facultad de Química, muy especialmente a los del área de alimentos.*



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

*JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:*

*PRESIDENTE:* PROF. PEDRO VALLE VEGA  
*VOCAL:* PROF. JOSEFINA VIJES TREJO  
*SECRETARIO:* PROF. SERGIO ANDRES HERNANDEZ SANDOVAL  
*1er. SUPLENTE:* PROF. ADOLFO GALNARES CAMPOS  
*2do. SUPLENTE:* PROF. HUGO RUBEN CARREÑO ORTIZ

*SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA -  
DE ALIMENTOS. DIVISION DE INGENIERIA. FACULTAD DE QUIMICA.  
U. N. A. M.*

*ASESOR:* DR. PEDRO VALLE VEGA

*SUSTENTANTE:* ALBERTO ROCA MAYORGA *Alberto Roca Mayorca*

## INDICE

PAG.

OBJETIVOS .....	4
CAPITULO I	
TOXICOLOGIA EN LA CERTIFICACION DEL APEGO A LA NORMALIZACION DE ALIMENTOS.	
1.- ADITIVOS.	
Práctica I.1.a. DETECCION DE COLORANTES ARTIFICIALES.....	5
Práctica I.1.b. DETECCION DE SACARINA.....	11
Práctica I.1.c. METODO PRESUNTIVO PARA DIETILESTIL-BESTROL	14
2.- CONTAMINANTES.	
Práctica I.2.a. DETECCION DE RESIDUOS DE INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.....	17
Práctica I.2.b. DETERMINACION DE PLOMO EN ALIMENTOS ENLATADOS.....	22
CAPITULO II	
TOXICOLOGIA EN EL CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA.	
Práctica II.a. DETECCION DEL CONTENIDO DE SULFATOS EN AGUA.	27
Práctica II.b. DETECCION DE ANTIBIOTICOS EN LECHE.....	30
Práctica II.c. DETECCION DE ADULTERANTES EN LECHE.....	34
CAPITULO III	
TOXICOS GENERADOS POR PROCESO.	
Práctica III.a. DETERMINACION DE METANOL EN SU VINO*.....	38
CAPITULO	
EVALUACION DE PROCESOS DE DETOXIFICACION.	
Práctica IV.a. DETECCION CUANTITATIVA DEL ACIDO CIANHIDRICO. CONTENIDO EN SEMILLAS.....	44

<i>Práctica IV.b. DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN SEMILLAS...</i>	48
-------------------------------------------------------------------	----

## *CAPITULO V*

### *TOXICOLOGIA EN LA INVESTIGACION.*

#### *1.- EXTRACCION DE TOXICOS PARA LOS ESTUDIOS DE EVALUACION TOXICOLOGICA.*

<i>Práctica V.1.a. EXTRACCION DE CAFEINA.....</i>	56
---------------------------------------------------	----

#### *2.- EVALUACION DE LOS NIVELES DE UN TOXICO EN ALIMENTOS - NATURALES.*

<i>Práctica V.2.a DETECCION DE OXALATO.....</i>	59
-------------------------------------------------	----

<i>Práctica V.2.b. DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE HEMAGLUTININAS*.....</i>	64
-------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Práctica V.2.c. DETERMINACION DE GLUCOSINOLATOS*.....</i>	69
--------------------------------------------------------------	----

#### *3.- TOXICOLOGIA EN LA INVESTIGACION Y DESARROLLO DE NUEVOS PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL.*

<i>Práctica V.3.a. DETECCION CUALITATIVA DE SAPONINAS.....</i>	74
----------------------------------------------------------------	----

<i>SEMINARIOS.....</i>	77
------------------------	----

<i>CONCLUSIONES.....</i>	79
--------------------------	----

<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	80
--------------------------	----

<i>NOTAS.....</i>	87
-------------------	----

## OBJETIVOS

La toxicología de los alimentos es una ciencia que capta el interés, tanto del estudioso de la materia, como de los lectores casuales, que frecuentemente se forman criterios erróneos acerca del riesgo que representa para la salud, la ingesta de alimentos procesados. Por tal razón, considero que el presente trabajo debe enfocarse al logro de dos grandes objetivos.

I) Que aporte el complemento práctico a la enseñanza teórica para reforzar el conocimiento sobre los agentes tóxicos - que pueden presentarse en los alimentos naturales, la frecuencia e importancia de su incidencia, el riesgo toxicológico de aditivos alimenticios, los tóxicos que pueden generarse por los procesos industriales y culinarios que se dan a los alimentos, los tóxicos presentes debido a contaminaciones químicas y microbiológicas, los procedimientos para eliminar o reducir el riesgo toxicológico, los mecanismos de intoxicación y desintoxicación; así como el aprendizaje de los métodos de análisis - para algunos tóxicos, los cuales han sido elegidos atendiendo razones de didáctica, y de los beneficios que su manejo práctico puede representar en el desempeño profesional.

II) Que el alumno se forme un criterio profesional sobre la materia, para que cuando se enfrente a un problema práctico, lo resuelva adecuadamente, combinando el conocimiento, el criterio y la ética profesional.

## CAPITULO I

## TOXICOLOGIA EN LA CERTIFICACION DEL APEGO A LA NORMALIZACION DE ALIMENTOS.

## 1.- ADITIVOS.

## Práctica 1. 1. a.

## DETECCION DE COLORANTES ARTIFICIALES.

## Introducción.

Los colorantes son los aditivos alimentarios más criticados en cuanto al factor riesgo-beneficio, pues son adicionados solo para mejorar la apariencia del producto, sin tener efecto sobre el sabor, calidad nutricional ni la conservación del mismo.

Gales reporta que el rojo #2 produce daño hepático, inhibición al crecimiento e incremento en la mortalidad de animales de laboratorio, el rojo #1 produce tumores malignos, el naranja # 1 tiene un significativo efecto catártico, el azul #1, verde #2 y verde #3 tienen efecto de inducción a tumores.

Es bien conocido que los colores sintéticos pueden provocar reacciones de hipersensitividad, como urticaria, asma y edema angioneurótico, sin embargo, incluso los colores naturales los causan, tal es el caso del extracto de anato, muy usado en mantequillas, que causa problemas, mayores aún, que muchos colorantes artificiales.

Los criterios para legislar su uso varían según las normas de cada país, sobre todo porque las dosis empleadas en las pruebas y la extrapolación de resultados en animales de laboratorio hacia el hombre son motivo de muchas discusiones. En México está permitido el uso de amarillos #5 y #6, azul #1, rojos #3, #5, -- #6 y #40.

### Método.

Se propone el de Stanley y Kirk, que emplea la cromatografía en papel posterior a una purificación del color extraído, y se auxilia en las propiedades colorimétricas al variar el pH. -- Permite también una detección cuantitativa.

### Reactivos.

- 1) Solvente 1.- Mezcle 4 ml. de piridina con 8 ml. de acetato de etilo y 8 ml. de agua destilada en un embudo de decantación, agítese y después de que se separen las fases, descarte la inferior. (MANEJE LA MEZCLA EN LA CAMPANA DE SEGURIDAD).
- 2) Solvente 2.- Mezcle 4 ml. de alcohol isoamílico con 4 ml. de alcohol etílico, 1 ml. de hidróxido de amonio y 2 ml. de agua destilada.
- 3) Amoniaco acuoso al 1% ( 100 ml. ).
- 4) Acido acético concentrado.
- 5) Acido clorhídrico concentrado.
- 6) Acido clorhídrico al 10% ( 50 ml. ).
- 7) Amoniaco concentrado.
- 8) Amoniaco acuoso al 10% ( 100 ml. ).
- 9) Alcohol etílico de 96°.
- 10) Alúmina activada ( 1 hora a 400°C. ).
- 11) Fibra de vidrio.
- 12) Papel filtro de poro grueso.
- 13) Papel Whatman No. 1.
- 14) Maskin tape.

### Material.

- 1 embudo de decantación de 100 ml.
- 1 matraz Kitasato.
- 1 Büchner con alargadera.
- 1 embudo de tallo largo.
- 1 matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- 1 vaso de precipitados de 100 ml.
- 1 columna de cromatografía de 20 X 300 mm. con llave de paso.
- 2 frascos de boca ancha con tapa de rosca.
- 1 microjeringa o tubo capilar.
- 1 regla graduada.
- 1 tijeras.

### Muestra.

25 g. de gelatina en polvo, caramelo, helado, "algodón" ó -  
25 ml. de refresco, que tenga color rojo, rosa, naranja o amarillo.

### Procedimiento.

#### a) Extracción.

1) Si se analiza gelatina en polvo.- se agitan 25 g. con 50 ml.- de alcohol y se filtran por succión a través de un Büchner, lave sobre el Büchner con 50 ml. de amoníaco acuoso al 1%. Los líquidos colectados se acidifican con ácido acético ( 2 ml. de ácido acético por cada 10 ml. de extracto ).

2) Alimentos hidrosolubles ( incluyendo caramelos, sodas y helados).- se disuelven en volúmenes mínimos de amoníaco acuoso al 1% ( las muestras líquidas se usan sin diluir), se filtran y aciu

difican con 2 ml. de ácido acético por cada 10 ml.

b) Preparación de la columna.

Se coloca un tapón de fibra de vidrio en el extremo inferior, se empaqueta con la alúmina activada hasta una altura de 10 cm., se cubre con una capa muy fina de fibra de vidrio. Se lava con 50 ml. de ácido clorhídrico al 10% para compactar y acidificar, empleando vacío.

c) Aislamiento del colorante.

Se introduce en la columna la disolución del extracto de la muestra y se aplica vacío. Se lava con 50 ml. de agua destilada y se eluye el colorante con amoníaco acuoso al 10%, procurando que el volumen de esta solución colorida sea lo más pequeño posible.

Nota.- De estar presente rodamina, ésta no será retenida por la columna.

d) Cromatografía en papel.

Corte 2 tiras de papel Whatman No. 1 de 2 X 12 cm. A cada una aplique el color necesario para dar una mancha intensa, de aproximadamente 2 mm. de diámetro, para lo cual se deja secar después de cada aplicación. Haga un corte pequeño con las tijeras a la altura de la aplicación (la cual debe estar a aproximadamente 1.2 cm. del borde inferior del papel). Pegue con masking tape el papel a la tapa del frasco de modo que al cerrarlo quede el papel vertical y tocando ligeramente el fondo del frasco. - - Agregue al frasco #1 el solvente #1 y al #2 el solvente #2 hasta una altura de 0.8 cm. aproximadamente. Tape el frasco y deje que desarrolle la cromatografía a una altura cercana al borde superior del papel. Despegue las tiras y haga un corte de tijera a la altura máxima recorrida por el disolvente. Deje secar en la -

campana de seguridad. Efectue la medición de las distancias re corridas por el disolvente y la (s) mancha (s) del colorante.

e) Rf.

Se determina dividiendo la distancia recorrida por cada -- color entre la recorrida por el disolvente.

f) Análisis visual.

Identifique y anote el color de cada mancha encontrada, ex ponga los papeles a vapores de ácido clorhídrico y amoniaco ano tando las variaciones de color.

g) Identificación de los colores

Con los Rf y los datos de coloración, determine en la ta-- bla #1 el o los colores que contiene el producto analizado.

TABLA #1

COLOR	Rf		Neutro	HC1	NH3
	S 1	S 2			
Rojo #1	0.45	0.55	Rosa	ROsa	Rosa
Rojo #2	0.06	0.24	Ciruela	ciruela	ciruela
Rojo #3	0.88	0.70	rosa	rosa	naranja
Rojo #4	0.50	0.36	rosa	naranja	rojo
Rojo #5	0.58	0.27	rosa	rojo	naranja
Rojo Ponceau #6	0.43	0.32	rojo	naranja	rojo
Rodamina	0.93	0.97	rosa mex.	rosa mex.	rosa mex.
Amarillo #1	0.59	0.59	amarillo	decolora	amarillo
Amarillo #5	0.08	0.17	amarillo	amarillo	amarillo
Amarillo #6	0.43	0.52	naranja	naranja	naranja
Naranja #1	0.71	0.60	rojo-nar.	naranja	rojo claro
Azul #1	0.34	0.59	azul	amarillo	azul
Azul #2	0.26	0.30	azul	azul	azul
Verde #1	0.59	0.75	verdeagua	nar o inc	decolora
Verde #2	0.40	0.68	verdeagua	nar o inc	decolora
Verde #3	0.42	0.46	verdeagua	nar o inc	azul oscuro
Violeta #1	0.54	0.76	violeta	ama o inc	azul

S 1 = Solvente #1

S 2 = Solvente #2

nar. = naranja

inc. = incoloro

ama. = amarillo

*Nota.- Algunos colores presentan pequeñas manchas secundarias. Los Rf pueden variar ligeramente dependiendo de la marca del colorante, e incluso de lote a lote, por ser los colorantes mezclas de componentes.*

*Nota.- Es recomendable que algunos equipos trabajen con colores puros o mezclas de éstos, proporcionadas por los profesores pero requieren ser sometidas a todo el proceso de purificación.*

#### *Cuestionario.*

- 1.- *Proponga la metodología que permita hacer cuantitativo el método de la práctica.*
- 2.- *¿Qué problemas puede causar la piridina?*
- 3.- *¿Se considera adulteración el hecho de encontrar un color de la tabla #1 en un producto que no reporta colorantes artificiales?*
- 4.- *¿Existen limitaciones en cuanto a la concentración de los colorantes permitidos?*
- 5.- *Mencione algunos colorantes naturales que se emplean en alimentos.*
- 6.- *Diferencie entre laca, pigmento, color no certificado y color análogo al natural.*

*Bibliografía: 17,22,30,43,51,60.*

*Práctica 1.1.b.*

*Detección de sacarina.*

*Introducción.*

*La sacarina ha sido el motivo de uno de los casos que más - polémica ha despertado con respecto a la validéz de los métodos - empleados para la evaluación toxicológica, su caso está aún en - estudio, pero es muy probable que su uso se limite a edulcorante de adición para diabéticos y por prescripción médica.*

*La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de - Norteamérica concluyó que es un cancerígeno de baja potencia en - ratas; Sweatman y Renwick indican que la sacarina no es metaboli - zada, y concluyen que no actúa como un cancerígeno electrofílico clásico; solo hay evidencia de tumores en ratas macho de segunda generación expuestas a dosis elevadas; por lo anterior, aunado - al estudio estadístico del Instituto Nacional de Cáncer de los - Estados Unidos, el cual no demuestra diferencia significativa en riesgo relativo por el consumo diario, habla en favor de la saca - rina; sin embargo, el alarmante incremento de casos de cáncer e - xige un control más estricto de cualquier aditivo riesgoso.*

*Método.*

*El método A.O.A.C. para bebidas no alcohólicas, cuantifica - la sacarina por la reacción de Nessler, que da un color amarillo verdoso que sigue la ley de Lambert y Beer.*

*Reactivos.*

- 1) Cloruro de amonio al 0.01% ( disuelva en agua libre de amonia - co). El pesado y aforado de esta solución debe realizarse con mu - cha exactitud.*
- 2) Reactivo de Nessler.- Disuelva 2.50 g. de yoduro mercurico y-*

1.75 g. de yoduro de potasio en 10 ml. de agua, agréguelos lentamente y con agitación sobre una solución fría de 4 g. de hidróxido de sodio en 12.5 ml. de agua, lleve a 25 ml. y guarde en frasco ambar.

3) Eter (100 ml.). Nota.- es extremadamente flammable, manéjelo - en la campana de seguridad.

4) Agua acidificada.- 5 ml. de agua con una gota de ácido clorhídrico concentrado.

5) Acido clorhídrico concentrado.

6) Agua libre de amoníaco.

7) Algodón.

#### Material y Equipo.

1 matraz aforado de 100, 50 y 25 ml.

1 frasco ambar.

1 embudo de decantación de 250 ml.

1 embudo de tallo largo.

1 vaso de precipitado de 250 ml.

1 sistema de rotoevaporador o parrilla para baño maría.

1 pipeta de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 ml.

1 probeta graduada de 50 ml.

8 vasos de precipitados de 50 ml.

espectrofotómetro.

#### Muestra.

50 ml. de una bebida dietética no alcohólica.

#### Procedimiento.

Agregue 2 ml. de ácido clorhídrico a 50 ml. de muestra y --

extraiga en embudo de decantación con 2 porciones de 50 ml. de éter. Filtre los extractos a través de algodón. Lave los filtrados con 5 ml. de agua acidificada, separe la fase etérea y evapore a sequedad, agregue 5 ml. de agua libre de amoníaco y 6 ml. de ácido clorhídrico y evapore a 1 ml. aproximadamente. Agregue 5 ml. de agua y otros 6 ml. de ácido clorhídrico evaporado hasta 1 ml. Diluya a 50 ml. con agua libre de amoníaco en matraz aforado, tome 2 ml. de ésta solución y añórelas a 25 ml. con agua libre de amoníaco. Agregue 1 ml. de reactivo de Nessler y compare con una serie de soluciones de cloruro de amonio que contengan 0.1, 0.4, 0.7, 1.0, 1.3, 2.0 y 3.0 ml. de la solución 1 disueltos en agua libre de amoníaco a un aforo de 25 ml., haciendo la lectura en un espectrofotómetro a 525 nm.

Interpole la lectura en la gráfica de la curva patrón y determine la sacarina que contiene la bebida, sabiendo que 0.2921 g. de cloruro de amoníaco corresponde a 1 g. de sacarina insoluble y 1.317 de la sal sódica.

#### Cuestionario.

- 1.- ¿Porqué se usa agua libre de amoníaco?
- 2.- Sugiera un método cualitativo para detectar sacarina sabiendo que ésta es soluble en éter y en medio ácido.
- 3.- Escriba la fórmula estructural de la sacarina y proponga un mecanismo por el cual sea posible detectarla con el reactivo de Nessler.
- 4.- Mencione otros edulcorantes usados como sustitutos no calóricos y las ventajas y desventajas que conllevan.

Bibliografía: 11, 46, 52 y 60

## Práctica I .1.c.

### Método Presuntivo para Dietilestil-bestrol (DES).

#### Introducción.

El dietilestil-bestrol está dentro del grupo de hormonas - anabolizantes, y junto con las sustancias residuales cancerígenas, residuos potencialmente alergénicos, residuos promotores - de resistencia bacteriana, antiparasitarios, antisépticos y plaguidas representan los objetivos de los análisis toxicológicos en carnes y derivados.

El DES fué usado en medicina humana, veterinaria y como -- promotor del crecimiento en ganado para carne y aves de engorda. En Estados Unidos se le permitió bajo las siguientes condiciones: como aditivo no debía exceder 20 mg./día en novillos y 2 - mg./día en ovejas sin administrarse los últimos 14 días previos al sacrificio.

No deben detectarse residuos de él en la carne para consumo humano, dado que puede causar hiperestrogenismo en mujeres y afeminamiento en hombres, cambios en la función hepática y las pruebas hipoplásticas revelan condiciones que predisponen a tumores malignos, por lo que se ha prohibido su uso. En México, a pesar que lo prohíbe la SARH, se sabe que se sigue empleando, - sobre todo en pollo, como aditivo promotor del crecimiento.

#### Método.

El DES se extrae con etanol, se purifica y se visualiza por inspección fluorescente, con una sensibilidad de 0.1 mg/Kg.

#### Reactivos.

- 1) Etanol al 7% en cloroformo (60 ml.).

- 2) Xileno- Alcohol isomílico- metanol 90:20:2 ( 100 ml.).
- 3) Estandar de DES a partir de una solución de concentración - de 1 mg/ml., se diluye 1 a 10 y de ésta nuevamente 1 a 10 de modo que se tienen estandares de 1, 0.1 y 0.01 mg./ml.
- 4 Silica gel.

#### *Material y Equipo.*

- 1 Placa para cromatografía en capa fina.
- 1 licuadora.
- 1 embudo de tallo largo.
- 1 cámara de cromatografía.
- 1 rotoevaporador o parrilla de baño maría.
- 1 lámpara de luz ultravioleta.

#### *Muestra.*

20 g. de pienso o alimento balanceado sospechoso, también puede buscarse en carne, de preferencia en hígado.

#### *Procedimiento.*

Se licúa 20 g. de muestra con 50 ml. de etanol al 7% en - cloroformo por 5 minutos, se filtra y se concentra el solvente - con la muestra aproximadamente hasta 0.5 ml.. Se aplican 0.1 ml. de solvente con muestra y de cada una de las concentraciones de estandar a la placa con silica gel. Se desarrolla el cromatograma con xileno-alcohol isoamílico-metanol (90:20:2) en la cámara de cromatografía. Finalmente se visualisan las manchas de DES - exponiendo la placa a luz ultravioleta; una exposición larga - produce un desarrollo de color amarillo a rojo y finalmente a -

café por ser la secuencia de productos de oxidación del DES.

*Nota.- Dado que es un producto prohibido, su presencia implica una violación a las disposiciones gubernamentales. El método no es práctico para analizar carnes pues de encontrarse positivo en éstas implicaría una exagerada administración del DES, dado el nivel de detección del método.*

#### *Cuestionario.*

- 1.- *¿Qué información proporciona el uso de estándares en la presente práctica?*
- 2.- *¿Que método recomendaría para confirmar ésta detección?*
- 3.- *¿Cómo actúa una hormona anabólica para aumentar el volumen muscular?*

*Bibliografía: 28, 34 y 68.*

## 2.- CONTAMINANTES.

### Práctica 1.2.a.

#### DetECCIÓN DE RESIDUOS DE INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

#### Introducción.

La elevada tasa de crecimiento poblacional exige una producción creciente de alimentos, pero si se considera que alrededor de una tercera parte de ésta producción no es aprovechada, la disminución de pérdidas es una alternativa muy importante.

La ONU reporta pérdidas anuales de 33 millones de toneladas de cereales debidas a daños causados por insectos en Estados Unidos. En países menos industrializados, las pérdidas porcentuales son mayores, lo que origina una tendencia a incrementar el uso de plaguicidas, con sus consecuentes problemas ecológicos. Los insecticidas organofosforados, por ser biodegradables deben ser los más empleados, pero si no se suspende su aplicación 15 días antes de la cosecha, son de alto riesgo toxicológico para el consumidor.

Estos compuestos inhiben la acción de la acetilcolinesterasa que interviene en la fisiología de los nervios colinérgicos, algunos de ellos son muy tóxicos aún por vía cutánea, y su ingesta diaria aceptable (IDA) es mínima, siendo la mayor para el malatión de 0.02 mg./kg. de alimento y la menor de 0.0006 mg./kg. en el caso del azodrin.

#### Método.

La muestra se extrae, purifica y finalmente se le efectúa una cromatografía, para detectarse por  $R_f$  y formación de color con tetrabromofenolftaleín-etilester.

*Reactivos.*

- 1) Acetona ( 240 ml. ).
- 2) Diclorometano ( 200 ml. )
- 3) Eter de petróleo ( 200 ml. )
- 4) Eter etílico libre de peróxidos al 15% en éter de petróleo - (200 ml.)
- 5) Eter etílico libre de peróxidos al 55% en éter de petróleo- (200 ml.)
- 6) Sulfato de sodio anhidro.
- 7) Fibra de vidrio.
- 8) Florisil de 60 a 100 mallas activado a 130°C, por 4 horas - (21 g.)
- 9) Cloruro de sodio (6 g.)
- 10) Heptano al 25% en acetato de etilo (50 ml.)
- 11) Tetrabromo fenilftalein etiléster al 0.1% en acetona (10ml.)
- 12) Solución de nitrato de plata.- 0.05 g. en 2.5 ml. de agua y diluida a 10 ml. con acetona.
- 13) Solución de ácido cítrico.- Disuelva 0.5 g. en 5 ml. de agua y diluya a 10 ml. con acetona.
- 14) Bromo (0.1 ml.)

*Material y Equipo.*

- 1 licuadora
- 1 embudo de tallo largo
- 1 matraz erlenmeyer de 500 ml.
- 1 matraz redondo de fondo plano.
- 3 embudos de decantación.
- 1 vaso de precipitado de 500 ml.

- 1 retroevaporador.
- 1 columna de 20 x 300 mm.
- 1 matraz aforado de 10 ml.
- 1 placa de vidrio para cromatografía.
- 1 cámara para cromatografía.
- 1 microjeringa o tubo capilar.
- 1 atomizador.
- a regla de medición.

#### Muestra.

100 g. de zanahoria, lechuga, jitomate, melón, naranja, pa  
pa, o chile.

#### Procedimiento.

Se pesan 100 g. de muestra, se cortan y licúan a alta velo  
cidad con 200 ml. de acetona, se pasa a través de papel filtro-  
a un matraz. De este extracto se colocan 80 ml. en un embudo de  
separación y se añaden 100 ml. de éter de petróleo y 100 ml. de  
diclorometano, se agita un minuto y se transfiere la fase acu-  
sa a un segundo embudo de separación.

La fase orgánica del primer embudo se pasa a través de un-  
embudo al que previamente se le colocó una capa de fibra de vi-  
drio y otra capa de 3 cm. de sulfato de sodio anhidro, se reci-  
be en un matraz redondo de fondo plano, al segundo embudo de se  
paración que contiene la fase acuosa, se le añaden 7 g. de sal,  
agitando 30 segundo para que se disuelva la mayor parte de sal.  
Se añaden 100 ml. de diclorometano, se agita 1 minuto y se pasa  
la fase orgánica a través del embudo empacado anteriormente em  
plead. Se extrae la fase acuosa con 100 ml. adicionales de di-  
clorometano. Se juntan los extractos orgánicos y se evaporan --  
hasta un volumen aproximado de 2 ml., se añaden 10 ml. de aceto

na y se concentran a 2 ml. Después de repetir la concentración anterior con dos porciones de 10 ml. de acetona, se afora el residuo a 10 ml. con acetona nuevamente.

Se empaca la columna con una capa inferior de fibra de vidrio, se le agregan 21 g. de florasil todavía caliente y una capa superior de 1 cm. de sulfato de sodio anhidro. Se deja eluir éter de petróleo.

El extracto acetónico se evapora, se recupera con éter de petróleo enjuagando el recipiente perfectamente y se añade a la columna; se eluye con 200 ml. de éter utilico al 15% en éter de petróleo y posteriormente con 200 ml. de éter etílico al 55%. El aluato se evapora a 4 ml. y se afora a 10 ml. con éter de petróleo.

Se aplican 10  $\mu$ l. del extracto a la placa con silica gel y se expone a vapores de bromo para la oxidación de plaguicidas tiofosforados, dentro de una cámara que contenga 0.1 ml. de bromo, durante 1 minuto para después evaporar el bromo al aire por 5 minutos. Use la campana de seguridad.

Se desarrolla el cromatofolio aproximadamente 15 cm. con 50 ml. de heptano al 25% en acetato de etilo. Se deja secar la placa 3 minutos.

Se aplica con atomizador una capa de solución de tetrabromofenolftalein etil éster, después y también atomizando, una capa más ligera de solución de nitrato de plata. Después de 2 minutos, atomizando también, aplique solución de ácido cítrico.

Determine el Rf.

La sensibilidad del método es de 5-10 kg. para el nivel mínimo de detección.

Nota.- Se recomienda aplicar las muestras de varios equipos en una placa, y de ser posible algunos estándares.

Rf de los principales organofosforados empleando heptano al 25% en acetato de etilo:

<i>Azodrin</i>	0.418
<i>Demeton</i>	0.782
<i>Diazinon</i>	0.435
<i>Etilparati6n</i>	0.663
<i>Eti6n</i>	0.845
<i>Fonato</i>	0.748
<i>Fosdrin</i>	0.641
<i>Guti6n</i>	0.373
<i>Malati6n</i>	0.853
<i>Metilparati6n</i>	0.464
<i>Ronnel</i>	0.718

### *Cuestionario.*

- 1.- *Suponga que detecta una mancha azul de Rf 0.855, si aplic6-20 ml. de extracto al cromatofolio y el nivel m6nimo de detecci6n para este insecticida por 6ste m6todo, es de 10 mg., ¿puede estar dentro de los niveles de JDA?*
- 2.- *Si detecta azodrin en su muestra. ¿considera necesaria una evaluaci6n cuantitativa para aceptar o rechazar un lote muestreado?*
- 3.- *Escriba las estructuras qu6micas de dos compuestos organofosforados, con su DL50 para insectos y mam6feros.*

*Bibliograf6a: 6, 7, 11, 40, 50 y 60.*

## Práctica I.2.b.

### Determinación de plomo en alimentos enlatados.

#### Introducción.

La ingestión diaria promedio de plomo para un adulto es de 0.3 mg. del cual 90% pasa a través del tracto intestinal sin ser absorbido, el 10% restante es excretado bajo condiciones normales; se tiene también un nivel de seguridad que consiste en un almacenamiento en huesos, pero cuando se excede este límite aumenta sus niveles en tejidos blandos con sus consecuentes alteraciones metabólicas, funcionales y clínicas, como la inhibición de la actividad de enzimas que dependen de la presencia de grupos sulfhidrilo libres.

Si bien la intoxicación por plomo es un problema actual de gran magnitud, su problemática es debida más que nada a la contaminación ambiental puesto que el tamaño de partícula del plomo ambiental, exageradamente concentrado en las grandes urbes, es propicio para su fácil absorción pulmonar.

Entre los alimentos, los más susceptibles de contaminarse con plomo son las latas de alimentos ácidos. Para ellas se tienen normalizado que no deben rebasar los 5 mg Pb/Kg.

#### Método.

Se realiza una digestión de la muestra, se extrae el plomo de la misma con cloroformo y se forma un complejo rojo con la ditizona, el cual se cuantifica espectrofotométricamente.

#### Reactivos.

- 1) ácido nítrico concentrado (20 ml.)

- 2) *Acido perclórico (5ml.)*
- 3) *Solución de citrato de amonio.- Disuelva 40 g. de ácido cítrico en 90 ml. de agua adicione 3 gotas de indicador rojo de fenol e hidróxido de amonio hasta producir un color rojizo - (6 ml.)*
- 4) *Solución de clorhidrato de hidroxilamina.- Disuelva en agua 20g. de clorhidrato de hidroxilamina y lleve a 65 ml. agregue 5 gotas de - indicador azul de timol e hidróxido de amonio hasta lograr un - color amarillo, adicione 10 ml. de dietil ditiocarbamato de sodio 1:25, mezcle perfectamente y deje reposar por 5 minutos, extraiga con porciones sucesivas de 15 ml. de cloroformo, hasta - que una porción de 5 ml. del extracto no se colorea de amarillo al ser agitada la misma con solución de sulfato cúprico al 12.5 %. Añada 2 gotas de indicador azul de timol y ácido clorhídrico 3N hasta color rosa. Afore a 100 ml. con agua destilada ( 2 ml).*
- 5) *Indicador rojo de fenol.*
- 6) *Hidróxido de amonio (20 ml.).*
- 7) *Solución de cianuro de potasio al 10% (2 ml.).*
- 8) *Solución extractora de ditizona.- Disuelva 30 mg. de ditizona en 1000 ml. de cloroformo y adicione 5 ml. de alcohol. Guarde la solución de frasco ambar a 4°C. Antes de usar extraiga -- con aproximadamente la mitad de su volumen de ácido nítrico -- 1:100, desechando la fase acuosa. (50 ml.)*
- 9) *Cloroformo (3 ml.)*
- 10) *Solución de ácido nítrico 1:100 (20 ml.)*
- 11) *Solución patrón de ditizona (10 mg. de ditizona disueltos - en 1000 ml. de cloroformo). Guarde en frasco ambar y refrigerada (25 ml.).*
- 12) *Solución de cianuro amoniacal.- Disuelva 2 g. de cianuro de potasio en 15 ml. de amoniaco y afore a 100 ml. con agua (20 ml)*
- 13) *Solución patrón de plomo.- Disuelva 159.8 mg. de nitrato de*

plomo en una mezcla de 100 ml. de agua y 1 ml. de ácido nítrico afora a 1000 ml. con agua, cuando se vaya a emplear, diluya 10-ml. de ésta solución con agua a un aforo de 100 ml. (35 ml.).

#### *Material y Equipo.*

1 matraz aforado de 25 ml.  
 1 matraz aforado de 100 ml.  
 2 pipetas graduadas de 1 ml.  
 2 pipetas graduadas de 5 ml.  
 1 pipeta graduada de 10 ml.  
 1 probeta graduada de 100 ml.  
 3 perlas de vidrio.  
 1 parrilla o mechero, pinzas y soporte universal.  
 1 matraz microkjeldahl o un matraz erlenmeyer de 250 ml.  
 1 embudo de filtración.  
 2 embudos de separación de 125 ml.  
 1 vaso de precipitados de 250 ml.  
 1 vaso de precipitados de 100 ml.  
 6 tubos de ensayo.  
 espectrofotómetro.

#### *Muestra.*

5 g. de un alimento de tipo ácido enlatado o 10 ml. de jugo cítrico también de lata.

#### *Procedimiento.*

Pese 5 g. de muestra o 10 ml. si se trata de un jugo en un matraz microkjeldahl. agregue 20 ml. de ácido nítrico y 5 ml. -

de ácido perclórico y digiera en la campana de seguridad hasta que la solución se aclare. Deje enfriar, filtre y afora a 25 ml. con agua destilada.

Tome una alícuota de 10.0 ml. de la muestra digerida y añáda 20 ml. de agua. Agregue 6 ml. de solución de citrato de amonio, 2 ml. de clorhidrato de hidroxilamina y 3 gotas de rojo de fenol. Ajuste el pH con hidróxido de amonio a 9.0-9.5 (color rojo).

Enfríe y añada 2.0 ml. de solución de cianuro de potasio.- Extraiga con porciones sucesivas de ditizona que tomará un color violeta, cuando esta retenga su color (verde azul), indique que el plomo ha sido extraído. Los extractos de ditizona coléctelos en un segundo embudo de separación. Lave la capa acuosa remanente del primer embudo con 3 ml. de cloroformo y transfiera este cloroformo al segundo embudo. Adicione 20 ml. de ácido nítrico 1:100 al segundo embudo y agite por 30 segundos, descarte la capa de cloroformo (inferior). Extraiga la porción ácida remanente con 5.0 ml. de solución patrón de ditizona y 4 ml. de solución de cianuro amoniacal agitando por 30 segundos.

Desarrolle una curva patrón de la siguiente manera: lleve 10.8, 6, 4, 2, y 1 ml. de solución patrón a 10 ml. de ácido nítrico 1.100. extraiga cada uno de ellos con 2.5 ml. de solución patrón de ditizona y 2 ml. de solución de cianuro amoniacal.

Lea la absorbancia a 510 nm. del problema, la curva patrón y un blanco que contenga 5 ml. de solución patrón de ditizona y 4 ml. de cianuro amoniacal. Interpole en una curva patrón la concentración de plomo para su muestra.

Nota.- (Maneje con extremada precaución el cianuro)

Cálculos.

$$\text{ppm de Pb} = \frac{C \times 25 \times 5}{W \times 10}$$

donde:

$C$  = Concentración de plomo en la muestra en Mg./ml.

$W$  = Peso de la muestra en gramos.

#### Cuestionario.

- 1.- ¿Cuál es el objeto de agregar radicales citrato y cianuro a pH de 9.0 - 9.5?
- 2.- ¿Qué clase de reacción se lleva a cabo entre el plomo y la ditizona?
- 3.- ¿Cuál es el motivo de que los enlatados de productos ácidos sean los alimentos que comunmente están mas contaminados -- por plomo?
- 4.- Diga algunas características de la enfermedad denominada s a t u r n i s m o.
- 5.- Mencione otras fuentes de contaminación por plomo.

Bibliografía: 3, 35, 41, 46 y 60.

## CAPITULO 11

## TOXICOLOGIA EN EL CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA

## Práctica 11.a.

## DETECCION DEL CONTENIDO DE SULFATOS EN AGUA.

## Introducción.

La calidad microbiológica y química del agua es de suma importancia en la industria de los alimentos. El agua potable no debe contener más de 1 mg./ L. de ningún metal tóxico (plomo, cromo, arsénico, selenio, mercurio, fluor), tampoco debe exceder de 500 mg/L de sólidos totales ni más de 250 mg./L de un sólo tipo de ión, en lo que a éste último respecta uno de los iones que llegan a causar problemas es el ión sulfato, que a niveles altos tiene un efecto laxante. El método propuesto (gravimétrico) es adecuado, dado que el nivel de sulfatos debe ser alto para tener una significancia toxicológica.

## Método.

Los sulfatos son precipitados como sulfato de Bario y pesados después de un secado.

## Reactivos.

- 1) Acido clorhídrico concentrado. (1 ml.)
- 2) Cloruro de bario 0.1M (5 ml.)

## Material.

- 1 probeta graduada de 50 ml.
- 1 gotero.
- 1 embudo de decantación de 125 ml.
- 2 tubos de vidrio para centrífuga.
- 1 parrilla.
- 1 desecador.
- horno

#### Muestra.

50 ml. de agua sospechosa ó intencionalmente alterada con fines didácticos.

#### Procedimiento.

Mida exactamente 50 ml. de muestra y acidifíquela ligeramente con 3 gotas de ácido clorhídrico (un exceso de ácido incrementa la solubilidad del sulfato de bario), el medio ácido previene la coprecipitación de carbonatos.

Caliente la solución y colóquela en un embudo de separación. Agreguela lentamente a 5 ml. de cloruro de bario 0.1M contenido en una probeta, deje enfriar la muestra y centrifúguela, decantando el sobrenadante al final.

Seque el tubo de centrífuga que contiene todo el precipitado, a 100°C., enfríe en un desecador y pese en balanza analítica. Lave perfectamente el tubo, séquelo en el horno, enfríe y péselo.

#### Cálculos.

$$\text{mg/l de Sulfato} = \frac{D \times 0.411}{0.05 \text{ l.}}$$

donde:

$D$  = diferencia de peso en mg. entre el tubo vacío y seco y el tubo con precipitado, seco.

#### Cuestionario.

- 1.- Investigue el nivel de sulfatos necesario para representar un peligro toxicológico, e informe si el agua que analizó es potable, no lo es, o es tóxica, con respecto a sulfato.
- 2.- ¿Qué diferencia hay entre purgante y catártico?
- 3.- Si el producto de solubilidad del sulfato de bario a pH 6 y 25°C, es de  $1.2 \times 10^{-10}$ , ¿Qué porcentaje de error por éste factor lleva una determinación de  $a \times 100$  ppm. de sulfatos?.  $a$  = número del equipo al cual pertenece.
- 4.- Que efecto tiene el uso de sulfitos en verdura.

Bibliografía: 24, 46 y 65.

## Práctica 11.b.

## DETECCION DE ANTIBIOTICOS EN LECHE.

## Introducción.

En la leche, la razón más frecuente de que contenga antibióticos es la mastitis, tratada con penicilina principalmente, aunque también es tratada con bacitracina, tetraciclinas y estreptomicinas. Sus efectos indeseables no se limitan a las reacciones adversas que puedan ocurrir en los consumidores (resistencia bacteriana por su uso subterapéutico y alergias, principalmente) sino que también pueden alcanzar una concentración suficiente para impedir su utilización en la elaboración de quesos, mantequilla y yogurth (las bacterias lácticas son muy sensibles a los antibióticos, en tanto que las Gram (-) son más resistentes por lo que pueden desarrollarse más fácilmente y alterar el alimento al disminuir la competencia).

Una vaca tratada contra mastitis afecta un lote de leche correspondiente a la producción de otras 50 vacas sanas. La penicilina es el antibiótico más activo como inhibidor de bacterias lácticas. En quesería encontramos que para pastas cocidas que se fermentan con Streptococcus thermophilus y Propioni bacterium son suficientes 10 U.I. para afectarle la calidad, en tanto que para el Cheddar se requieren 100 U.I. y para el Camembert 400 U.I. por litro. Dado que es difícil detectar dosis inferiores a 50 U.I./l. la solución del problema queda en manos del productor, el cual debe descartar la leche producida aún al tercer día posterior al uso de antibióticos; otras soluciones no resultan muy efectivas, por ejemplo, se cuenta con la enzima penicilinasasa que ataca a la penicilina, pero requiere de la previa información de que el antibiótico presente es penicilina y en que concentración está: se cuenta también con cepas de fer-

mentos lácticos que resisten dosis relativamente altas de penicilina.

#### Método.

Se detectan hasta 50 U.I./ml de penicilina o sus equivalentes de otros antibióticos por la inhibición al crecimiento de un inóculo, lo cual se detecta porque el cloruro de tetrafenil-tetrazolio permanece en su forma incolora, en tanto que la proliferación de microorganismos lo reducen a su forma roja (forma zan).

#### Reactivos.

1) Leche descremada reforzada (RSM).- Libre de antibióticos y con un contenido de 0.05% de peptona, esterilizada a 115°C, por 15 minutos, (5 ml).

2) Leche descremada reconstituida libre de antibióticos.- Agregue 10 g de la leche es polvo a 25 ml de agua, mezcle gradualmente la pasta en otros 75 ml. de agua y transfiera a un frasco esteril de 150 ml. prepárese fresca.

3) Solución de cloruro de TTC.- solución acuosa al 1% de 2,3,5-cloruro de trifenil tetrazolio ( 5 ml).

4) Solución de penicilina.- disuelva tabletas de bencil penicilina en agua y diluya a 1 U.I./ml, prepárese cuando se vaya a usar (0.8ml).

5) Cultivo.- un día antes de la práctica inocule 5 ml de RSM -- con una gota de un cultivo grumoso de Streptococcus thermophilus e incube toda la noche a 37.5°C.

#### Material.

5 tubos de ensaye estériles con marca a los 2.5 y 10 ml.  
5 tapones de caucho para tubo de ensayo, estériles.  
2 tubos de ensaye.  
1 pipeta de 10 ml. estéril.  
1 pipeta de 5 ml. estéril.  
1 pipeta de 1 ml. estéril.  
1 termómetro de -10 a 110°C.  
1 frasco estéril.  
1 baño de agua para temperatura constante.  
1 mechero, 1 tripié, 1 tela de asbesto.  
1 comparador LoviBond y un disco 4/22.

#### *Muestra.*

10 ml. de leche fresca.

*Nota.*- De preferencia muestreada de queserías.

#### *Procedimiento.*

Coloque 2.5 ml. de muestra en un tubo marcado a 2.5 y 10 ml y tapelo con un tapón de caucho y colóquelo en agua hirviendo hasta que la temperatura aumente 83-87°C (lo cual se lo indicará un termómetro en otro tubo similar con 2.5 ml de agua) e inmediatamente enfríe el tubo con agua corriente. Almacene a 5° C hasta que le realice la prueba (a).

Agite los 5 ml. de cultivo en un frasco que contenga la leche reconstituida, tápelo y mezclelo por rotación. A los 2.5 ml de leche tratada con calor agregue la leche reconstituida hasta la marca de 10 ml. (a), tape e invierta 2 veces; incube en baño de agua a 27.5°C por 2 horas. Incube al mismo tiempo 10 ml de leche reconstituida inoculada, como cultivo control. Entonces agregue a los tubos 1 ml. de solución de TTC, invierta incube una hora más.

Invierta y coloque los tubos en el compartimiento derecho de comparador LoviBond. En el compartimiento izquierdo coloque un blanco que contenga 2.5 ml. de muestra y 7.5 ml de leche inoculada. Cuantifique el color de la muestra contra un disco LoviBond 4/22.

Las muestras coloreadas desde rosa claro hasta rojo (lectura de uno o más) son negativas, el cultivo de control es claramente rojo (lectura de 2.5 a 3) en el caso de una muestra positiva (lectura menor de uno), confirmela adicionando 1 ml de la solución del tubo que no dió color a 2.5 ml de solución de hidróxido de sodio 0.1N, colocandose en baño a 37.5°C, se desarrollará un color rojo en pocos minutos.

Paralelamente se confirman las lecturas de la siguiente manera: pipetee 0.3 y 0.5 ml de solución de penicilina en 3 tubos y llevelos a 10 ml con leche reconstituida inoculada, tápelos, mezcle por rotación y use 2.5 ml. de cada uno en forma similar a la prueba de detección. Los tubos deben ser rojo (2.5 a 3) rosa (1 a 2.5) y blanco o rosa muy ligero (manos de uno), correspondientes a 0, 0.03 y 0.06 U.I./ml respectivamente.

#### Cuestionario.

- 1.- Si usted elabora un queso que se afecta sustancialmente con 20 U.I. de penicilina/l, y el método más sensible solo detecta más de 50 U.I. ¿Cómo se aseguraría de no tener problemas por éste factor?
- 2.- ¿Considera éste método como propio para la investigación científica ó para la industria? ¿Porqué?
- 3.- Proponga otra forma de detectar la inhibición al crecimiento de microorganismos.

Bibliografía: 4, 18, 46, 49, 60, 62.

*Práctica 11.c.**DETECCION DE ADULTERANTES EN LECHE**Introducción.*

*El incremento en el uso de compuestos químicos para el control de insectos, de enfermedades y en la limpieza y sanidad de utensilios ha causado un serio problema a la industria lechera. Residuos de éstos compuestos han sido encontrados en leche y están considerados como causantes de adulteración. Dado que la calidad de la leche está indicada por su cuenta microbiana, y la presencia de ellos puede ser factor de inhibición a la proliferación de microorganismos, se considera que estos productos pueden ser usados para cubrir malas prácticas de producción de leche.*

*Hay también temor de que los residuos de compuestos cuaternarios de amonio puedan impedir la multiplicación deseable de bacterias usadas en la manufactura del queso. En tanto que hay una considerable controversia en cuanto al rol de éstos compuestos en la calidad de la leche y producción de queso, está fuera de cuestión que no deben estar presentes.*

*Muestra.*

*20 ml. de leche adulterada intencionalmente con algún (os) adulterante (s) por los profesores.*

*1) Peróxido de hidrógeno.*

*Reactivos.*

- 1) Pentóxido de vanadio al 1% en ácido sulfúrico al 6% en agua- ( 10 ml.).

*Material.*

- 1 gotero
- 1 vaso de precipitado de 50 ml.
- 1 agitador de vidrio.

*Procedimiento.*

Agregue de 10 a 20 gotas de reactivo a 10 ml. de muestra y agite. Un color rojo o rosa indica la presencia de peróxido de hidrógeno.

*ii) Hipocloritos y cloraminas.*

*Reactivos.*

- 1) Yoduro de potasio al 7% en agua (1.5 ml.)
- 2) Acido clorhídrico 1 + 2 (4 ml.)
- 3) Almidón soluble.- Caliente 1 g. de almidón en 100 ml. de agua y enfríe (1 ml.).

*Material.*

- 1 tubo de ensaye
- 1 agitador
- 1 patrilla para baño María.

*Procedimiento.*

En 5 ml de leche se se realizarán las pruebas de la A a la D en forma sucesiva. Agregue la leche en un tubo de ensaye. adicione 1.5 ml. de solución de yoduro de potasio. mezcle lentamente por agitación y anote el color (prueba A).

Agregue 4 ml. de ácido clorhídrico diluido, mezcle con agitador y anote el color (prueba B).

Coloque el tubo en un baño de agua previamente calentado a 85°C y deje reposar 10 minutos, enfríe y anote el color (prueba C).

Agregue de 0.5 a 1.0 ml. de solución de almidón al líquido bajo el cuajado y anote el color (prueba D).

Prueba	Concentración de cloro disponible					
	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:25000	1:50000
A	Café- Amarillo to.	Amarillo intenso	Amarillo pálido			
B	Café Amarillo to.	Amarillo intenso	Amarillo brillante			
C	Café Amarillo to.	Amarillo intenso	Amarillo	Amarillo	Amarillo pálido	Amarillo
D	Azul púrpura	Azul púrpura	Azul púrpura	rojo púrpura oscuro	rojo púrpura	rojo púrpura pálido

iii) Compuestos cuaternarios de amonio.

Reactivos.

- 1) *Solución indicadora.*- Disuelva 0.05 g. de eosina en 100 ml. de acetona, poco antes de realizar la práctica agite 10 ml. de ésta solución con 90 ml. de tetracloetano y 1 g. de ácido cítrico, filtre la ( a ml ).
- 2) *Buffer.*- 25 g. de ácido cítrico se disuelven en 100 ml. de agua y se ajusta el pH a 3.5 con solución de hidróxido de amonio al 50% (aproximadamente 50 ml. se requieren ) ( 0.2 ml.).

#### *Material.*

- 2 tubos de centrifuga  
1 centrifuga

#### *Procedimiento.*

A un tubo de centrifuga agregue 1 ml. de leche, 5 ml. de agua 1 ml. de solución indicadora y 0.2 ml. de buffer, agite - - fuerte 10 segundos y centrifugue por 5 minutos a 3200 rpm.

Si hay presentes compuestos de amonio cuaternario, la capa del fondo tiene un color rojo.

#### *Cuestionario.*

- 1.- Diga el fundamento químico de los 3 métodos.
- 2.- ¿Qué problemas toxicológicos puede ocasionar la ingesta de hipocloritos y cloraminas?
- 3.- ¿Existe alguna sustancia química que se permita adicionar - a la leche de consumo humano?

*Bibliografía:* 4, 6 y 49.

## CAPITULO III

## TOXICOS GENERADOS POR PROCESO

## Práctica III.a.

## DETERMINACION DE METANOL EN SU VINO\*.

## Introducción.

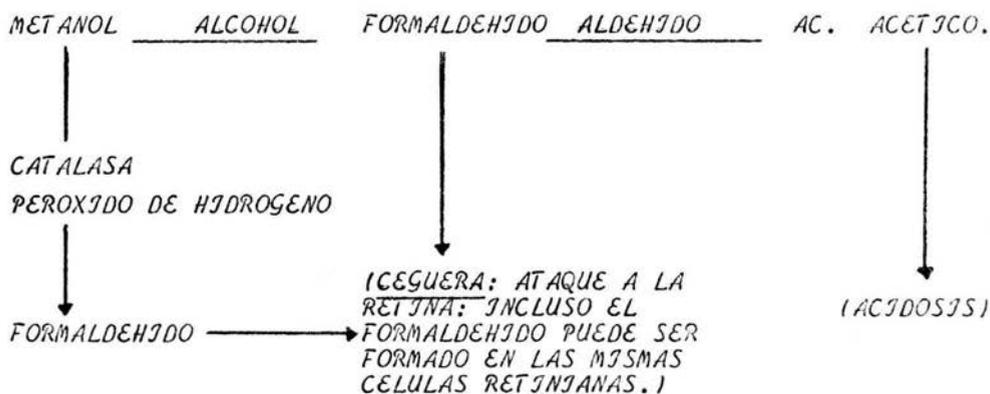
La fermentación alcohólica efectuadas por levaduras no produce metanol; sin embargo, si una fuente es muy rica en pectinas, la adición de enzimas pécticas eleva el contenido de metanol, -- porque la pectinesterasa hidroliza los grupos metoxilos de la molécula de pectina: por lo cual si los jugos fermentados se utilizan para elaborar brandies, no es conveniente usar enzimas pécticas para su aclaramiento.

El metanol tiene fundamentalmente acción narcótica parecida al etanol. Pero por el contrario, el catabolismo intermedio del metanol produce la formación de formaldehído hasta ácido fórmico. Las acciones tóxicas son debidas predominantemente al ácido fórmico y aparecen aproximadamente a las 24 horas. Sólo en el hombre y los monos aparece la ceguera por degeneración de la retina. El metanol se elimina en menor proporción que el etanol, -- de ahí su acumulación progresiva, y debido a su afinidad por las enzimas peroxigenasas, inhibirá la respiración celular particularmente la de los tejidos más sensibles como son el tejido nervioso y el retiniano.

El alcohol metílico es un líquido incoloro volátil (p.eb. - 66°C) de baja densidad ( $C = 0.797$ ), que presenta un olor semejante al etanol y con características físicas análogas. Para su determinación en presencia de etanol existen dos métodos generales de uso común: por oxidación química a formaldehído y forma--

ción de un derivado coloreado y por cromatografía de gases.

La oxidación drástica del metanol pasa por formaldehído, - después a ácido fórmico y, por última a anhídrido carbónico y - agua. Sin embargo, los agentes menos drásticos, como permanganato de potasio en medio ácido nos liberan exclusivamente formaldehído y éste compuesto presenta una serie de reacciones sensibles, por ejemplo con el reactivo de Schiff. Además puede reaccionar el formaldehído con dimetilanilina (técnica de Trillat), también produce una coloración rojo grosella con el reactivo de Schryver: y se ha visto que por calentamiento en medio sulfúrico con ácido cromotrópico de una coloración rojo violeta extremadamente sensible y de una adecuada especificidad.



Método.

Consiste en separar el metanol de los constituyentes no volátiles por destilación simple, para después oxidar el metanol a aldehído fórmico, el cual se hace reaccionar con ácido cromotrópico, para desarrollar una coloración la cual se lee espectrofotométricamente y se determine en forma indirecta el contenido de

este alcohol.

#### Reactivos.

- 1) Solución patrón de metanol.- 1.3 ml. de metanol (bien medido) se coloca en un matraz aforado de 1 litro, aforandose con agua destilada (1.8 ml.)
- 2) solución de permanganato de potasio/ácido fosfórico.- Disolver 3 g. de permanganato de potasio en una mezcla de 15 ml. de ácido fosfórico y 70 ml. de agua y llevar a 100 ml. con agua -- destilada. (12 ml.).
- 3) Solución de ácido oxálico al 5% en una mezcla de ácido sulfúrico agua en una relación 1:1. Nota.- ésta mezcla se debe preparar con mucho cuidado y trabajarse en frío (baño de hielo), - adicionando el ácido al agua lentamente y con mucha precaución. ( 12 ml. ).
- 4) Acido cromatográfico al 5% ( 5ml.).
- 5) Etanol al 5% en volumen (v/v) (18.2 ml.).
- 6) Acido sulfurico concentrado. (30 ml.)

#### Material y Equipo.

- 1 equipo de destilación simple con capacidad de 500 ml.
- 1 probeta de 50 ml.
- 1 juego de mechero Bunsen con manguera y tela de asbesto.
- 1 soporte universal.
- 3 pinsas para refrigerante.
- 1 termómetro de 0 - 100°C.
- 1 recipiente para baño de hielo.
- 2 matraces aforados de 100 ml.
- 2 matraces aforados de 25 ml.
- 2 pipetas graduadas de 1 ml.
- 2 pipetas graduadas de 5 ml.

2 pipetas graduadas de 10 ml.

1 bureta de 50 ml.

1 recipiente de baño maria.

espectrofotómetro con juego de celdas de vidrio de 1 cm. de paso de luz.

#### Procedimiento.

De acuerdo al contenido alcohólico reportado por la bebida se realizará la dilución correspondiente para que la bebida que de a un 5% de etanol (v/v). De ésta manera de la muestra ajustada, se colocan 100 ml. en el equipo de destilación simple y se procede a destilar. Se colectan los primeros 15 - 20 ml. y éste destilado se afora a 100 ml. con agua destilada.

Del destilado se toma una alícuota de 5 ml. y se deposita en el fondo de un matraz aforado de 25 ml.; a continuación se le adiciona con bureta 2 ml. de la solución de permanganato se le coloca el tapón y se agita, se deja que permanezca por 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se le adiciona 2.0 ml. de mezcla ácido oxálico-ácido sulfúrico, tapando y agitando, y con mucho cuidado se afloja el tapón para permitir la salida del dióxido de carbono liberado: se deja otros 15 minutos, después del cual se procede a adicionar 1 ml. de ácido cromotrópico y con ayuda de una bureta se le adicionan 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado (PRECAUCION: El ácido debe estar lo más frío posible y debe resbalarse por la pared del matraz); a continuación se sumerge en un baño maria que esté entre 65- - 68°C. y se deja en él por 20 minutos.

Una vez pasado el tiempo estipulado, se enfría el matraz al chorro de agua y se afora al volumen con agua destilada. Se toma una fracción homogenizada que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Una alícuota de 5 ml. del destilado se trabajará en la misma forma que la muestra, con la diferencia de que en lugar de -adicionarle 1 ml. de ácido cromotrópico, se sustituirá por agua destilada (BLANCO DE MUESTRA).

A su vez se tiene que correr una curva estándar, para lo cual se preparan los siguientes matraces de acuerdo a la tabla anotada a continuación:

MATRAZ		B	1	2	3
Solución	patrón	0.0	0.3	0.5	1.0
Solución	( 5 )	5.0	4.7	4.5	4.0
Solución	( 2 )	2.0	2.0	2.0	2.0
15 minutos temperatura ambiente					
Solución	(3)	2.0	2.0	2.0	2.0
15 minutos temperatura ambiente					
Solución	(4)	1.0	1.0	1.0	1.0
Reactivo	(6)	5.0	5.0	5.0	5.0
20 minutos sobre 65-68°C					

Enfriar al chorro de agua y aforar a 25 ml. con agua destilada, leer absorbancia a 570 nm.

#### Cálculos.

Considerando que la solución patrón tiene una concentración de metanol de 1 mg/ml, interpolar la lectura de su muestra en la curva estándar y reportar el contenido en su bebida en ppm (mg/l)

#### Cuestionario.

- 1.- ¿La capacidad para metabolizar etanol y metanol en el hombre es igual?
- 2.- ¿Cómo se trata una intoxicación con metanol?
- 3.- Aparte de bebidas alcohólicas: ¿En qué alimentos podemos encontrar la presencia de metanol?
- 4.- ¿Qué función tiene la adición de la mezcla de ácido oxálico ácido sulfúrico en la determinación?
- 5.- ¿Con qué reactivo (s) se puede sustituir el ácido cromotrópico?

*Bibliografía: 1, 13, 19, 21, 42 y 49.*

## CAPITULO IV

## EVALUACION DE PROCESOS DE DETOXIFICACION

## Práctica IV .a.

## DETECCION CUANTITATIVA DEL ACIDO CIANHIDRICO CONTENIDO EN SEMILLAS.

## Introducción.

El ácido cianhídrico es un tóxico de fácil absorción por el tracto digestivo. Se combina con hemoproteínas, particularmente con la citocromo oxidasa inhibiendo la respiración celular. Su DL50 es de 0.5-3.5 mg/kg de peso corporal. Existe una exposición baja de HCN con el humo de tabaco, la dieta y atmósfera contaminadas, pero éstas pequeñas cantidades son excretadas como tiocianato gracias a la rhodanasa.

Se le encuentra en muchos vegetales como glucósido en proporciones de 0.005-0.2% de cianuro. Intervienen en el control de acciones enzimáticas toman parte en la fotosíntesis de compuestos nitrogenados y realizar la función de protección contra depredadores. Los glucósidos por si solos no son tóxicos, sino cuando por la cianogénesis efectuada por B- glucosidasas e hidroxinitriliasas se rompe el enlace glucosídico, liberando ácido cianhídrico junto con cetonas alifáticas o aldehídos aromáticos pudiendo estos últimos, también tener efectos nocivos.

Los glucósidos, con excepción de la toxifilina no son termolábiles, pero si las enzimas que liberan el HCN; la preparación tradicional de leguminosas (remojo, macerado y cocción) eliminar el HCN, que es muy volátil, y dado que el hombre no contiene B-glucosidasas y la acidez de los jugos gástricos no es suficiente para liberarlo, el problema se reduce a:

- a) Ingeniería el producto crudo (ejemplo almendras amargas).
- b) Ingeniería el producto cocido junto con vegetales crudos que contengan las enzimas, aunque poco se conoce al respecto.
- c) La presencia de ciertas bacterias del tracto intestinal bajo que aparentemente pueden hidrolizar amigdalina.

#### Método.

Se induce la cianogénesis y el HCN es destilado para que al contacto con el nitrato de plata, precipite como cianuro de plata y sea titulado el exceso de nitrato de plata.

#### Reactivos.

- 1) Nitrato de plata 0.02N (30 ml.)
- 2) Sulfocianuro de potasio 0.02N (30 ml.)
- 3) Acido nítrico concentrado (1 ml.)
- 4) Indicador de alumbre férrico.

#### Material.

- 1 molino manual o licuadora.
- 1 tamiz del #20
- 1 matraz kjeldahl
- 1 matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- sistema kjeldahl para destilación
- 1 Gooch preparado con asbesto y alargadera
- 1 matraz kitasato
- 1 bureta de 25 ml. con piezas y soporte.

#### Muestra.

El 50% de los equipos trabajará con frijol Lima de un mismo lote, la mitad de ellos prepararán con anticipación los frijoles así: remojado, cocido, molido y calentado a casi sequedad: la otra mitad los trabajará crudos ( pesarán 15 g de muestra).- El restante 50% analizará almendras amargas de un mismo lote, - la mitad las analizará crudas y la otra mitad tostadas (pesarán 10 g de muestra)

#### Procedimiento.

Muela la muestra hasta que pase por el tamiz, pésela con - 1mg de exactitud y agréguela a un matraz kjeldahl, agregue 100-ml de agua y mantengalo a 10°C por 2 horas, entonces agregue otros 100 ml de agua. Prepare el aparato de destilación de modo que el extremo del condensador esté sumergido en la superficie del líquido receptor (30 ml de nitrato de plata 0.02 N acidificado con 1 ml de ácido nítrico) e inicie la destilación. Cuando se han destilado 150 ml. filtre el destilado a través de un Gooch, y lave éste y el receptor con poca agua, combine el filtrado y el agua de lavado y titule el exceso de nitrato de plata - con sulfocianuro de potasio 0.02 N usando como indicador alumbrá férrico. El fin de la titulación se determina por el color rojo que se forma cuando una gota adicional de tiocianato reacciona con el indicador dando una serie de complejos de tiocianato férrico.

Determine los mg de HCN destilados y el porciento de este en la muestra. Recuerde que se trata de una determinación indirecta.

1 ml de nitrato de plata 0.02 N = 0.54 mg de HCN

#### Cuestionario.

- 1.- *¿Porqué se debe mantener el macerado en frío por 2 horas?*
- 2.- *¿Podría funcionar éste método para la evaluación de HCN en hojas verdes de sorgo? ¿Porqué?*
- 3.- *De acuerdo a lo que detectó en su muestra. ¿Cuántos gramos de ella necesitaría ingerir un hombre de 70 Kg para sufrir una intoxicación fatal?*
- 4.- *Escriba la reacción enzimática de cianogénesis para un glucósido.*

*Bibliografía: 26, 35, 37, 39, 46, 60 y 67.*

## Práctica IV .b.

## DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN SEMILLAS.

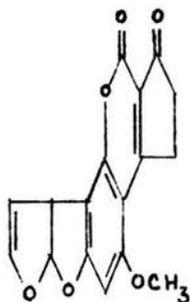
## Introducción.

El término aflatoxina engloba alrededor de 14 compuestos - heterocíclicos considerados cumarinas modificadas, y son las mi cotoxinas más importantes en cuanto a su insidencia y toxicidad. Son productos principalmente por Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. orizae y A. Wentii que son soprófitos y productores de esporas resistentes: sus metabolitos (aflatoxinas) son generados en la fase estacionaria del desarrollo del hongo y tienen un notable efecto antimicrobiano, aunque no todas las cepas son capaces de producirlos. Su producción se favorece con la abundancia de carbohidratos, humedad del sustrato de 10-18%, humedad relativa mayor de 70%, temperatura de 12 a 47°C (óptima de 30°C) La incidencia mayor se presenta en productos mal almacenados ó sobremadurados. Los granos mas susceptibles son trigo, -- arroz, maíz y cacahuate. El daño físico de la semilla la predis pone para el ataque fúngico. Las zonas tropicales son las más - afectadas.

Su acción tóxica se da en la supresión de la síntesis del-RNA mensajero, afectando principalmente tejido hepático, llegan do a causar cáncer en humanos por intoxicación crónica de 15 mg kg día. El caso más importante de aflatoxicosis ocurrió en la - India en 1974 afectando alrededor de 400 personas de las cuales murieron 100, el agente contaminante, maíz, presentaba niveles- de 0.25 a 15.6 mg/kg.

Una ingesta de 0.33 mg/kg de alimento en vacas resulta en- 1  $\mu$ g/l de aflatoxina M2 en leche (M1 es un derivado hidroxilado de la B1), lo que ya representa un riesgo para la salud sobre - todo en infantes. La principal aflatoxina es la B1, que está --

presenta en la gran mayoría de las muestras afectadas.



B1 LD50 oral sobre patos de 1 día de 18.2  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal.

P. fusión 265°C.

Emite fluorescencia azul, con máxima emisión a 425 nm.

#### MÉTODOS DE DETOXIFICACION

1) Térmico.- Inoperante pues las temperaturas requeridas afectan la semilla.

2) Extracción con disolventes.- Resulta caro pero da resultados satisfactorios.

a) acetona - agua (90:10) en semillas de algodón se logra extraer el 97%, eliminando a la vez los ácidos libres, gossipol y la mitad de la rafinosa, pero requiere del disolvente muy puro y una baja temperatura (para evitar sabores extraños).

b) Metaximetano resulta muy efectivo en harina de cacahuete.

c) Solución de cloruro de calcio en caliente sobre semilla de cacahuete.

3) Químico.

a) Amoniaco o metil amina llegan a eliminar un 98%, pero presentan problemas de olor y reducción del valor nutricional.

b) Peróxido de hidrógeno es efectivo, sobre todo con la B1.

c) El tratamiento alcalino a 100°C da buenos resultados, como ejemplo la nixtamalización en México

4) Radiaciones.- La luz U.V. potente no es efectiva en semillas pero si en aceites, incluso en el aceite de coco se reduce la toxicidad con exposición a la luz solar.

5) Microbiológico.- El Flavobacterium aurantiacum, que es un microorganismo no patógeno da reducción del 85% en soya y casi -- 100% en maíz y cacahuate.

#### MÉTODOS ALTERNOS DE DETECCIÓN

1) Métodos "Filtro".- Se utilizan por ser rápidos y sencillos, - las muestras sospechosas deben ser confirmadas por análisis más precisos.

a) Método de campo.- se basan en la fluorescencia amarillo verdosa brillante que dan las muestras contaminadas al aplicarles la luz U.V. de 365 nm. Dando aproximadamente el 50% de falsos - positivos y algunos falsos negativos.

Referencias: 5 y 54

b) Método de papel filtro.- extracción con metanol, deshidratación, suspensión en benceno y aplicación al papel filtro para - observar fluorescencia con luz U.V.

Referencia: 31

2) Métodos biológicos.- incluyen los que emplean microorganismos, animales, órganos y tejidos animales, y plantas: detectando las toxinas por inhibición al crecimiento, cambio de pigmentación, mutaciones, muerte, cáncer hepático, cambios citomorfológicos, decremento en la viabilidad del embrión, hiperplasia - inducida en conductos biliares, inhibición ó estimulación del - metabolismo del DNA y agotamiento de clorofila.

Referencia: 64

3) Método CD (Contaminación Branch).- Combina técnicas de extracción líquido-líquido con cromatografía de partición.

Referencia: 12

4) Método de cromatografía en capa fina.- permite purificar no-

sólo aflatoxinas, sino también otras micotoxinas que pueden contaminar la muestra.

Referencia: 55

5) Espectrofotométrico.- se basa en la absorción a 363 nm posterior a una purificación por cromatografía en capa fina.

Referencia: 45

6) HPLC.- El método por cromatografía líquida de alta presión es el método más sensible y permite el aislamiento de las aflatoxinas principales como la B1, B2, G1, G2 y otras de menor frecuencia o importancia.

Referencia: 48

#### Método.

Se propone un método de minicolumna, que es barato y accesible a las condiciones del laboratorio, el método está modificado para que a partir del extracto purificado sea aplicable la detección por cromatografía en capa fina y HPLC, y da la posibilidad de hacerse semicuantitativo mediante el empleo de estándares de aflatoxina por comparación de la emisión fluorescente. - Tal cual, se puede considerar como un método "filtro" de una eficiencia superior a los mencionados en el inciso 1 (detecta -- hasta 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de aflatoxinas totales).

#### Reactivos.

- 1) acetónitrilo-cloruro de potasio acuoso al 4% (90+10) (200 - ml).
- 2) Eter de petróleo (100 ml.)
- 3) cloruro férrico al 10% (10 ml.)

- 4) hidróxido de sodio al 4% (10 ml.)
- 5) cloroformo (100 ml.)
- 6) cloroformo - acetona (90+ 10) (5 ml.)
- 7) Acido sulfúrico al 25% (5 ml.)
- 8) Agua oxigenada.
- 9) Sulfato de sodio anhidro.
- 10) fibra de vidrio.
- 11) Alúmina neutra.
- 12) silica gel.
- 13) florasil.

#### *Material.*

- 1 licuadora.
- 1 potenciómetro
- 1 embudo de separación de 500 ml.
- 1 matraz kitasato con conecciones para vacío.
- 1 equipo de destilación simple.
- 1 embudo de filtración rápida.
- 1 tubo de vidrio de 6 x 200 mm.
- 1 varilla de vidrio de 6 x 200 mm
- 1 probeta graduada de 250 ml.
- 2 probetas graduadas de 100 ml.
- 1 bureta.
- 1 propipeta.
- 2 vasos de precipitados de 250 ml.
- 1 vaso de precipitado de 600 ml.
- papel filtro cualitativo.
- lámpara de luz U.V.
- 1 caja de madera o cartón.

*Nota.- todo el material deberá estar limpio y seco.*

### Muestra.

El 50% del grupo trabajará con maíz en sus distintas variedades y formas procesadas, el 50% restante lo hará con cacahuate. Ambos deberán ser clasificados previamente en su aspecto, - presencia visible de hongos, porcentaje de grano dañado y destino de la semilla (alimentación humana, animal o siembra). Se usarán 50g de muestra.

### Procedimiento.

a) Preparación del gel.- se mezclan 100 ml de agua destilada -- con 10 ml. de cloruro férrico al 10% y se titula con agitación-continua hasta pH de 4.6 empleando hidróxido de sodio al 4%.

b) Preparación de la columna.- Se empacan en el orden mencionado, comprimiendo con la varilla y cuidando en cada paso de dejar una superficie plana y compacta de los siguientes materiales: fibra de vidrio (6 mm), sulfato de sodio anhidro (10 mm), florasil (10 mm), silica gel (18 mm), alúmina neutra (10 mm), sulfato de sodio anhidro (10 mm) y fibra de vidrio (6 mm).

1.- Preparación del extracto.- Se pesan 50 g de muestra y se licúan con 200 ml de acetonitrilo - KCl al 4% (9+1), a alta velocidad por 2 minutos, se filtran 100 ml del sobrenadante.

2.- Desgrasado.- Se colocan los 100 ml filtrados en el embudo de separación y se le efectúan 2 extracciones de 50 ml. de éter de petróleo.

3.- Decoloración del extracto.- Se agrega el gel al embudo y se agita por 2 minutos, se deja reposar 2 minutos y se drenan los - 100 ml de muestra decolorada.

4.- Extracción de las micotoxinas.- Se mezclan en el embudo los- 100 ml de extracto con 50 ml de cloroformo, se agita y se drena-

el cloroformo sobre el matraz de destilación. Se repite la operación con otros 50 ml. de cloroformo.

5.- Concentración del extracto.- Se evapora por destilación aproximadamente el 95% de cloroformo.

Nota.- Después de la evaporación total del solvente es posible seguir la detección por el método de cromatografía líquido-gas o de capa fina, detectando aflatoxinas, escripenos, ocratoxina, zeralenona y rubratoxina.

6.- Determinación.- Se conecta la minicolumna al vacío y se añade con propipeta el concentrado cloroformico, se añaden 5 ml de cloroformo-acetona (9:1) como eluyente. Se cierra el vacío antes de que la columna se seque, se coloca ésta en una cámara oscura y se observa aplicandole luz U.V. a 366 y 254 nm. De observarse fluorescencia, se conecta nuevamente al vacío y se le aplican 5 ml de ácido sulfúrico al 25%, observandola nuevamente a 366 nm.

7.- Interpretación.- Las aflatoxinas B dan fluorescencia azul y las G la dan verde; con máximos de emisión a 425 y 450 nm -- respectivamente; además esta fluorescencia se vuelve amarillenta después de la acción del ácido sulfúrico. Por lo tanto, una muestra que las contenga, dará fluorescencia azul, verde o azul verdosa a 366 nm, no fluorescerá a 254 nm y a 366 la dará amarillenta después de la acción del ácido. Dado que es posible la presencia de interferencias no se puede afirmar que una muestra que presente esas características tenga aflatoxinas, pero existe una alta probabilidad.

Nota.- Se agrega agua oxigenada al material y sustancias que puedan contener aflatoxinas, después de la detección.

#### Cuestionario.

1.- Compare las fórmulas estructurales de las aflatoxinas B<sub>1</sub>,-

B2, G1, G2 y M1.

2.- Diga cual es la razón por la cual el método de detoxificación por extracción con solventes no permite la eliminación total de las aflatoxinas en un lote.

3.- ¿Qué desventaja práctica presente el uso de Flavobacterium aurantiacum en la detoxificación de un lote de harina contaminada?

4.- Si tiene el método a, que da 25% de falsos positivos y 0% de falsos negativos, y el método b, que da 5% de falsos positivos y 2.5% de falsos negativos. ¿cuál emplearía? ¿Porqué?

5.- Suponga que en el paso (5) del método empleado, lleva a sequedad, redisuelve en 0.1 ml. de cloroformo, inyecta al cromatógrafo líquido-gas, y obtiene un cromatograma cuya interpretación indica 0.020 mg de B1. 0.02 mg de B2 y 0.03 mg de G1 -- ¿qué concentración de aflatoxinas en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tiene la muestra?

6.- Mencione 2 compuestos que causen interferencia en el método empleado.

Bibliografía: 2, 5, 12, 23, 31, 45, 48, 53, 54, 55, 56, 64 y 66.

## CAPITULO V.

## TOXICOLOGIA EN LA INVESTIGACION

## 1.- EXTRACCION DE TOXICOS PARA LOS ESTUDIOS DE EVALUACION TOXICOLOGICA.

Practica V.1.a.

## EXTRACCION DE CAFEINA.

## Introducción.

La cafeína junto con otras 600 sustancias, recibieron la -- clasificación de GRAS en 1958. En 1978 el comité seleccionado sobre sustancias GRAS sujetas a revisión concluyó "En tanto no haya evidencia en la información que demuestre que la cafeína es peligrosa para el público, cuando es usada en bebidas tipo - cola, a los niveles manejados actualmente y en la manera ahora - practicada, la duda existente requiere que sean efectuados estudios adicionales". por consecuencia se han efectuado una gran - cantidad de pruebas estadísticas y de laboratorio para la evalua ción de su toxicidad. A la fecha no hay pruebas concluyentes: - dentro de los efectos de que se ha sospechado, figuran úlcera, - daños cardiovasculares, cáncer, tumores en pecho, alteraciones - en el nacimiento y desarrollo de infantes, y daños al sistema - nervioso central. Las pruebas hasta ahora realizadas solo han - podido demostrar algunos de estos efectos en animales de labora - torio, pero a dosis exageradamente elevadas.

## Método.

Se trata de una extracción con cloroformo y un secado.

## Reactivos

- 1) Ferrocianuro de zinc al 10.6% acuoso ( 5 ml ).
- 2) Solución de acetato de zinc.- 21.9 g de acetato de zinc cristalizado y 3 ml de ácido glacial aforados a 100 ml con agua -- ( 5 ml ).
- 3) Amoniaco al 0.88% ( 10 ml ).
- 4) Hidróxido de sodio 1N ( 10 ml ).
- 5) Cloroformo ( 150 ml ).
- 6) Alcohol etílico ( 10 ml ).

#### Material.

- 1 sistema para reflujo.
- 1 matraz aforado de 100 ml.
- 1 embudo de filtración rápida.
- 1 embudo de decantación de 250 ml.
- 1 vaso de precipitados de 250 ml.
- 1 rotovaporador o parrilla para baño maría.
- 1 estufa
- 1 papel filtro.

#### Muestra.

25 g. de café soluble.

Nota.- Se recomienda que se trabaje con todas las marcas existentes en el mercado.

#### Procedimiento.

Refluje 25 g. de muestra en 200 ml de agua por 30 minutos,

evapore hasta un volumen aproximado de 80 ml. agregue 5 ml. de ferrocianuro de zinc y 5 ml de solución de acetato de zinc, añore a 100 ml. agite y filtre; transfiera a un embudo de separación después de haber medido el volumen de filtrado, agregue 10 ml. de solución de amoníaco y extraiga 5 veces con porciones de 25 ml de cloroformo.

Lave los extractos con 10 ml de solución 1 N de NaOH y luego con 10 ml de agua. Agite los líquidos de lavado con un poco de cloroformo y agregue este a los extractos. Evapore con el rotoevaporador, seque a 100°C en la estufa y pese la cafeína.

Desarrolle un proyecto mediante el cual se tome a la cafeína, como base para realizar una prueba toxicológica (ej. DL50, toxicidad crónica, respuesta nerviosa, etc.) especificando tipo y edad de los animales a utilizar, dosis, vía de administración parámetros a evaluar, duración de las pruebas, e interpretación estadística de resultados.

Bibliografía: 6, 25, 33, 49 y 60.

## 2.- EVALUACION DE LOS NIVELES DE UN TOXICO EN ALIMENTOS NATURALES.

Práctica V.2.a.

### DETECCION DE OXALATO.

#### Introducción.

Se encuentran oxalatos a niveles elevados en muchos alimentos comunes, por ejemplo, la espinaca tiene de 0.3 a 1.2 l en base húmeda), el rubarbo 0.2 a 1.3% y el té de 0.3 a 2.0%, acumulado principalmente en las hojas.

Efectos agudos.- Gleason encontró que pueden darse intoxicaciones agudas por la ingesta exagerada de éste tipo de plantas presentándose cuadros de gastroenteritis corrosiva, shock, síntomas convulsivos, daño renal y muerte.

Efectos crónicos.- Aproximadamente la tercera parte del oxalato urinario es derivado del ácido ascórbico, cantidades similares provienen de la glicina, en tanto que solo unos pocos mg vienen del oxalato de la dieta, del cual solo se absorbe del 1 al 6% de lo ingerido durante una comida normal o de 30 a 50% si solo se ingiere la planta contenedora, por lo que su rol en la formación de cálculos renales es de dudosa importancia. Un problema más serio puede presentarse en dietas deficientes en calcio y vitamina D, pues disminuye el calcio disponible, deteriorando el crecimiento.

En la alimentación animal puede ocasionar problemas serios, con excepción de si se administran éstas plantas a rumiantes, -- pues es degradado por las bacterias del rumen.

#### Método.

El oxalato se precipita, purifica y titula oxidimétricamente

por la acción del permanganato que lo oxida a dióxido de carbono.

#### Reactivos.

- 1) Papel indicador de intervalo corto, pH 3.5 - 5.5.
  - 2) Permanganato de potasio 0.01N preparado antes de usar (25 ml)
- Nota.- Revise su preparación y estandarización en la bibliografía.
- 3) Solución buffer de acetatos pH 4.5.- disuelva 0.25 g. de cloruro de calcio anhidro, en 5 ml de ácido acético diluido 1+1 y agreguelo a una solución de 3.3 g. de acetato de sodio diluido a 5 ml. (10 ml.)
  - 4) Líquido de lavado.- diluya 2.5 ml de ácido acético a 50 ml. - con agua, agregue oxalato de calcio en polvo, agite y deje reposar, repita la operación hasta que sature la solución, enfríe a 4°C y justo antes de usarlo, fíltrelo, manteniéndolo frío.
  - 5) Reactivo de ácido tungsto-fosfórico.- disuelva 0.25 g. de tungstato de sodio dihidratado en una mezcla de 0.4 ml de ácido fosfórico y 5 ml de agua, entonces diluya a 10 ml con agua ( 5 ml.).
  - 6) Alcohol caprílico.
  - 7) Acido clorhídrico 6N (55 ml.)
  - 8) Acido clorhídrico 6N (55 ml).
  - 9) Acido sulfúrico 1 + 9 ( 10 ml ).
  - 10) Papel filtro de poro grueso y Whatman #30.

#### Material.

- 1 licuadora.
- 1 bureta de 25 ml. con pinzas y soporte.

1 vaso de precipitado de 800 ml.  
 1 matraz aforado de 500 ml.  
 1 matraz aforado de 100 ml.  
 1 embudo de filtración rápida.  
 2 matraces Erlenmeyer de 50 ml.  
 2 tubos de centrifuga.  
 1 pipeta de 10 ml.  
 1 varilla de vidrio.  
 1 parrilla para baño maría.  
 centrifuga.

#### Muestra.

40 - 50 g. de espinaca, acelga, rubarbo o betabel.

#### Procedimiento.

Preparación de la muestra.- Pese exactamente de 40 a 50 g. de muestra y homogenícela en una licuadora con 100 ml. de agua - medida volumetricamente. pese con exactitud alrededor de 35 g. de ésta suspensión dentro de un vaso de 800 ml. previamente tarado, agregue agua hasta un peso de 300 g. y 55 ml de ácido clorhídrico 6N. Agregue 2 gotas de alcohol caprilico y hierva 15 minutos, enfríe y transfiera cuantitativamente a un matraz aforado de 500 ml. afores con agua, agite y deje reposar al menos 12 horas, agite y filtre a través de un papel cuantitativo de poro grueso; de seche los primeros 100 ml.

Precipitación de ácido oxálico.- pipetee 25 ml. de filtrado en un matraz Erlenmeyer de 50 ml. agregue 5.0 ml. del reactivo - de ácido tungsto fosfórico, agite y deje reposar al menos 5 horas. Filtre a través de un papel Whatman #30, pipetee 20 ml del filtrado en un tubo de centrifuga y agregue gota a gota hidróxi-

do de amonio hasta alcanzar un pH de 4-4.5 usando papel indicador. Agregue 5 ml. de buffer y agite con varilla de vidrio. Lave las paredes del tubo con una pequeña cantidad de agua y deje reposar al menos 12 horas. Centrifugue 15 minutos a 1700 rpm para compactar el precipitado, decante el sobrenadante con una inversión suave y constante del tubo dejando que al final éste gotee sobre un papel filtro limpio. Lave el precipitado con un chorro de líquido de lavado frío, hasta que se suspenda perfectamente, centrifugue nuevamente desechando el sobrenadante. Agregue al precipitado 5 ml. de ácido sulfúrico 1 + 9.

*Titulación.*— Transfiera la muestra a un matraz Erlenmeyer de 50 ml. calientela en baño de agua y titule en caliente con permanganato de potasio 0.01N hasta que el primer rosa persista al menos 30 segundos. Titule también un blanco de 5 ml. de ácido sulfúrico 1 + 9 bajo las mismas condiciones y haga la corrección al título.

$$\frac{\text{mg } \text{ác. oxálico}}{100 \text{ g. prod.}} = \frac{(T) (1350) (\text{peso de muestra} + 100 \text{ g.})}{(\text{peso de suspensión}) (\text{peso de muestra})}$$

donde:

$T = \text{ml de permanganato } 0.01 \text{ N.}$

$1350 = (0.45 \text{ mg. de } \text{ác oxálico equiv. a } 1 \text{ ml. de permanganato})$   
 $(30/20) (\text{factor de dilución}) (100 \text{ g. de producto})$

*Cuestionario.*

- 1.- ¿Cuál es el fundamento químico de la aparición del color rosa como punto final de la titulación?
- 2.- ¿Qué factor de dilución se considera en la fórmula de la que se obtiene 1350 ?

- 3.- ¿Cuál es la razón del factor 30/20 en la misma fórmula?
- 4.- Mencione algunas propiedades químicas del ácido oxálico.

*Bibliografía:* 15, 37, 38 y 46.

Práctica V.2.b.

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE HEMAGLUTININAS\*

*Introducción.*

*Aunque estas proteínas tóxicas, han sido encontradas en muchas familias de plantas, hongos, líquenes e incluso en algunos animales, se le ha dado mayor importancia a su presencia en las leguminosas.*

*Algunas hemaglutininas, además de presentar la propiedad de aglutinar los globulos rojos, además presentaron actividad tóxica en pruebas de laboratorio.*

*Debido a su especificidad hacia ciertos azúcares, también se les conoce con el nombre de lectinas. No obstante algunos autores las clasifican como específicas e inespecíficas, de acuerdo a su poder de aglutinación hacia los grupos sanguíneos humanos: sin embargo un grupo de investigadores definen esta especificidad, en términos de que aglutinen eritrocitos de una especie de animal o de varias.*

*Estos componentes antinutricionales termolábiles de diferente origen, producen los mismos trastornos que se presentan con mayor o menor gravedad, entre estos resalta la intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio y edema; no obstante hay que hacer notar que no todas -- las lectinas tienen propiedades tóxicas graves.*

*Método.*

*La técnica utilizada en esta práctica, se basa en la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos por efecto de la cantidad de hemaglutininas presente: así al incrementarse la canti*

dad de lectinas en la suspensión de prueba, se produce una disminución en el porcentaje de glóbulos rojos suspendidos y por consiguiente se puede apreciar la sedimentación de los eritrocitos-aglutinados.

#### Reactivos.

- 1) Sangre de conejo con anticuagulante ( 0.5 ml.)
- 2) Solución salina isotónica.- disolver 8.5 g. de cloruro de sodio en 1 l. de agua destilada (110 ml).
- 3) Solución de cloruro de sodio al 1% ( 50 ml.)
- 4) Solución de tripsina.- disolver 100 mg de tripsina en 100 ml. de solución salina isotónica ( 1 ml.).

#### Material.

- 1 mortero y pistilo
- 1 tubo para centrífuga graduado
- 1 probeta de 10 ml.
- 1 probeta de 5 ml.
- 1 vaso de precipitados de 100 ml.
- 2 matraces Erlenmeyer de 125 ml.
- 11 tubos de hemólisis
- 1 gradilla pequeña
- 2 pipetas graduadas de 1 ml.
- 1 pipeta graduada de 5 ml.
- 1 trozo de gasa de 10 x 10 cm.
- 1 embudo de filtración rápida
- 1 matraz aforado de 25 ml.
- papel filtro cualitativo de 10 x 10 cm.

### Muestra.

1 g. de frijoles negros, bayos o lima, soya, germen de trigo o papa.

### Procedimiento.

La sangre con anticuagulante se trasvasa a un tubo de centrífuga para lavarla ( 2 veces) con la solución salina isotónica, en una proporción de sangre: solución de 1:5. Se centrífuga a 2000-2500 rpm durante 10 minutos, después por decantación se elimina el líquido sobrenadante y una vez terminado el segundo lavado, - se diluya el paquete de glóbulos rojos al 4%, para lo cual por cada 1 ml. de eritrocitos ( paquete) se añaden 24 ml. de solución (1).

Para la sensibilización por cada 10 ml. de glóbulos rojos - al 4% se agrega 1 ml. de solución de tripsina , se colocan en la incubadora por espacio de 1 hora a 37°C; después de lo cual se - vuelve a centrífugar para eliminar la enzima, y a continuación se le dan 3 lavados con solución isotónica, como en el inicio; y -- después del último lavado se resuspende el paquete de eritrocitos al volumen original.

Paralelamente se puede ir preparando el extracto de la muestra a ensayar, para lo cual se coloca 1 g. de material en un vaso de precipitados de 100 ml y se le adiciona 25 ml de solución de cloruro de sodio al 1%, se efectúa la extracción por agitación frecuente durante 1 hora; después de este tiempo se deja sedimentar, para que por decantación se filtra a través del papel-filtro plegado ó si hay problemas se usa la gasa, y el filtrado se lleva a 25 ml. con la misma solución.

Una vez que se tiene el extracto y los eritrocitos sensibilizados, se colocan 11 tubos de hemólisis en una gradilla, conteniendo cada uno 0.5 ml. de solución salina isotónica, numerados-

del 1 al 10 consecuentemente el onceavo corresponde al control.- En los tubos numerados se realiza una dilución seriada con ayuda de una pipeta graduada de 1 ml. de modo que al tubo 1 se le agregan 0.5 ml. de extracto, se homogeniza, se toman 0.5 ml. de esta mezcla y se pasan al tubo 2, repitiéndose la operación hasta el tubo 10, del cual se desecha el medio ml. correspondiente.

Por último se agrega 0.5 ml. de suspensión de glóbulos rojos a cada tubo y se homogeniza invirtiendo en 3 ocasiones el tubo suavemente, se deja en la incubadora 1 hora a 37°C; después de lo cual se observa hasta que tubo se produce sedimentación (prueba +), el tubo control nos ayudará a visualizar las pruebas negativas.

#### Cálculos.

Reportar hasta que tubo se produjo reacción positiva de aglutinación, la cual directamente nos da el título; pero además reportar en términos de microgramo de muestra que produce prueba positiva de aglutinación, de acuerdo a la máxima dilución en la mezcla de reacción (considere que su extracto tiene 40 mg/ml). Recuerde que ya desde el primer tubo se tiene una dilución.

#### Cuestionario.

- 1.- ¿Porqué es importante trabajar en esta práctica con solución salina isotónica?
- 2.- Si su muestra no aglutinara los eritrocitos de la especie de animal estudiado. ¿Consideraría que está ausente de hemaglutininas?
- 3.- ¿Cómo cree que pudiera hacer cuantitativo el método de la -- práctica?.

4.- Explique como interaccionan las lectinas con los glóbulos rojos.

5.- ¿Cómo podría disminuir el efecto tóxico de las lectinas, sin dañar la calidad nutricional?

*Bibliografía:* 26, 27, 36, 37, 38 y 58.

Práctica V. 2.c.

### DETERMINACION DE GLUCOSINOLATOS\*

#### Introducción.

Diversos trabajos experimentales parecen concordar en que el consumo de grandes cantidades de col. o vegetales relacionados, puede causar hipertrofia de la glándula tiroidea (bocio). Se ha encontrado una estrecha correlación, entre la incidencia de bocio con el exagerado consumo de ciertos vegetales (Familia de las crucíferas), en regiones del mundo en donde el consumo de yodo en la dieta es bajo.

Los factores productores de bocio de algunas crucíferas y especialmente del género Brassica, como rábano, col, brócoli, etc. derivan de compuestos que hasta 1970 se llamaban tioglucósidos y que en la actualidad son conocidos como glucosinolatos.

La naturaleza picante de algunas crucíferas usadas como alimento, tales como el rábano y la mostaza, es conocida desde hace mucho tiempo y se le ha asociado a un precursor del alil-isotiocianato. De las 1500 especies conocidas, se ha visto que 300 contienen de 1 a 7 glucosinolatos, de los cuales 1 a 2 se encuentran en mayor proporción. La mayoría de los glucosinolatos tienen la B-D-tioglucosa como azúcar, y casi todos tienen la misma configuración; además este tipo de compuesto tóxico se encuentra en la planta como unión formando sales de potasio, principalmente.

Los glucosinolatos se pueden presentar a lo largo de toda la planta que los contiene: así los podemos encontrar en raíz, tallo, hojas y semillas. Sin embargo, en la semilla es donde se encuentran en más altas concentraciones: además en la misma planta, pero en diferente compartimiento se encuentra el sistema enzimático capaz de hidrolizar a estos heterósidos.

Los glucosinolatos son hidrolizados por una tioglucosidasa-para darnos glucosa, el ión sulfato ácido y al aglucón, el cual puede ser tiocianato, isotiocianato o nitrilo más azufre.

El aglucón pasa por un intermediario que sufre un reanreglo molecular, que depende de su estructura y de las condiciones de hidrólisis.

#### *Método.*

Ya que la propia planta que contiene glucosinolatos tiene a su vez el sistema enzimático para su hidrólisis; se utilizará esta característica para liberar el ión sulfato ácido. Con el fin de cercionarse que se lleve a cabo la hidrólisis, se adicionará a su vez un extracto enzimatico de alta actividad y posteriormente se realizará una titulación ácido-base, para que en forma indirecta podamos conocer el contenido de este tipo de tóxico en la planta en estudio.

#### *Reactivos.*

- 1) Acido caprílico
- 2) Acido clorhídrico 0.1N (10 ml)
- 3) Hidróxido de sodio 0.1N (10 ml)
- 4) Hidróxido de sodio 0.025 N. valorado (20 ml.)

#### *Material.*

- 1 juego de pinzas de disección y navaja.
- 1 mortero con pistilo.
- 1 licuadora.
- 1 colador fino.

2 probetas de 200 ml.  
 1 agitador de vidrio.  
 1 matraz Erlenmeyer de 250 ml.  
 2 matraces aforados de 200 ml.  
 2 vasos de precipitados de 250 ml.  
 3 vasos de precipitados de 100 ml .  
 2 probetas de 50 ml.  
 parrilla de agitador magnético y magneto.  
 potenciómetro.  
 incubadora a 35°C  
 congelador.

#### Muestra.

25 g. de semilla de mostaza blanca y de 10 a 100 g de un vegetal del género *Brassica*, dependiendo del contenido de humedad.

#### Procedimiento.

Preparación del extracto enzimático.- se pesan 25 g. de semilla de mostaza blanca, que se trituran en un mortero y se vacían a la licuadora añadiendo 100 ml de agua destilada. Se mueven durante 1 a 2 minutos a baja velocidad, a continuación se produce a filtrar a través de un colador y se colecta el filtrado en una probeta. Llevando el volumen a 150 ml. (adicionar una gota de ácido caprílico si hay problema con la espuma). Se vacía el filtrado a un matraz de 250 ml. y se incuba por 90 minutos a 35°C (ver preparación de la muestra). Transcurrido el tiempo, se vacía el extracto enzimático activo a un vaso de precipitados y se neutraliza la acidez formada con la solución de hidróxido de sodio 0.1 N, hasta llevarlo a pH 6.0 con ayuda de un potenciómetro y una parrilla de agitación magnética, llevar con agua desti

lada (pH 6.0) a un volumen de 250 ml. Guardar el extracto en un congelador.

*Preparación de la muestra.*— Pesar de 10 a 100 g. de muestra y cortarla en trozos pequeños o triturarla en un mortero y pasar la cuantitativamente a la licuadora, adicionando 100 ml. de agua destilada. Moler la muestra por espacio de 1 a 2 minutos baja -- velocidad y a continuación filtrar como en el caso de la preparación del extracto enzimático. Neutralizar el extracto a pH 6.0 -- con ácido o base según sea el caso y aforar el volumen inmediato superior con agua destilada (pH 6.0). Por último pasar el extracto a un vaso de precipitados y guardarlo en el congelador, para usarlo la siguiente sesión.

*Determinación.*— Tanto el extracto enzimático como la muestra deben estar descongeladas. Tomar 2 alícuotas de la muestra de 50 ml. cada una y adicionarles 20 ml. de extracto enzimático activo y someterlas a incubación por 90 minutos a 35°C. Es conveniente -- correr en blanco del extracto enzimático, para lo cual a una porción de 20 ml. de dicho extracto se le adicionan 50 ml. de agua -- destilada (pH 6.0) y se somete a las mismas condiciones. Transcu -- rrido el tiempo de incubación sacar la muestra. colocarla en un -- vaso de precipitados de 100 ml. y titular la acidez producida -- con NaOH 0.025N, utilizando un potenciómetro y parrilla de agita -- ción magnética, interrumpiendo la adición cuando se llega a pH -- 6.0. Titular también el blanco.

#### Cálculos.

Asumiendo que el peso molecular promedio de los glucosinola -- tos es de 400 g/mol y que cada mol del compuesto tóxico libera -- un equivalente de sulfato ácido; reportar el contenido de éste -- tóxico en términos de mg/100g de muestra.

#### Cuestionario.

- 1.- mencione tres plantas de uso en la alimentación humana que contienen glucosinolatos y diga cual es el principal glucosinolato que contiene.
- 2.- ¿Todos los glucosinolatos pueden dar origen a factores productores de bocio como la goitrina?
- 3.- ¿Con qué fin se realiza la titulación del blanco del extracto enzimático activo?
- 4.- ¿Creé que el cocimiento de un vegetal con un alto contenido de glucosinolatos, sea suficiente para hacerlo inocuo y no tener riesgo en su consumo?.
- 5.- Describa brevemente alguna técnica diferente de la realizada en la práctica, para la cuantificación de éste tipo de tóxico.

Bibliografía: 14, 16, 47, 59 y 61.

Práctica V.3.a.

### DETECCION CUALITATIVA DE SAPONINAS.

#### Introducción.

Son glucósidos que se presentan en una gran variedad de plantas. Su toxicidad se debe a que son tensoactivos; hemolisan eritrocitos, inhiben el crecimiento de aves, deprimen la producción de huevo, causan flatulencia en rumiantes y son extremadamente tóxicos para animales de sangre fría. La DL50 en mamíferos, de algunos de ellos, es menor de 100 mg/kg, pero la muerte, más que por la absorción y acción sistemática, es debida a la inflamación del aparato digestivo.

Existen 2 grupos principales de saponinas, las solubles en alcohol, que son esteroidales y las solubles en agua, triterpenoidales.

Están contenidas en espinacas, betabel, espárragos, soya, alfalfa, tréboles: en el veneno de algunas serpientes y en estrellas de mar.

Intervienen como factores de inhibición en la germinación, algunas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y protozoarios patógenos como mecanismo de defensa de las plantas.

Por sus propiedades tensoactivas son utilizadas en la elaboración de bebidas de soda, cerveza, shampoos, jabones, extinguidores de fuego y para bajar la tensión superficial de emulsiones fotográficas.

Las que se encuentran en tubérculos de dioscorea son fuentes importantes para síntesis de hormonas y productos esteroidales como progesterona y cortizona.

Reactivos.

1) Etanol ( 20 ml)

*Material.*

1 mortero con pistilo.  
1 sistema de reflujo.  
1 embudo de tallo largo.  
1 frasco cilindrico alto.  
1 regla de medición.  
papel filtro.

*Muestra.*

5 g. de alfalfa, espinacas, betabel o espárragos.

*Procedimiento.*

Se muelen 3 g. de muestra, se pasan con 20 ml. de etanol al sistema de reflujo y se refluja por 25 minutos; se enfría, se filtra y se adicionan 10 ml. del filtrado a 100 ml. de agua en un frasco, se tapa y se agita durante 3 minutos, se deja en reposo 10 minutos y se mide la altura de la espuma.

*Cuestionario.*

- 1.- ¿Sería conveniente usar muestras de soya para ésta práctica?
- 2.- ¿Qué propiedad de las saponinas sirve para hacerles una determinación cuantitativa y como se hace ésta en términos generales?

- 3.- *Escriba la estructura química de algún tipo de saponina.*
- 4.- *Investigue en que parte del proceso de la elaboración de cerveza se utilizan las saponinas.*

*Bibliografía: 15, 20, 29, 37, 44, y 63.*

## SEMINARIOS

## ADITIVOS.

Se analizará si los alimentos sujetos a inspección contienen algún aditivo prohibido ó fuera de norma de estar presente, -cual es la razón para que el fabricante lo haya incluido, y el grado de riesgo que representa para la salud, considerando la cantidad que normalmente se ingiere y el tipo de consumidor (niños, adultos, o alimentación animal).

## CONTAMINANTES.

1) Si se encuentran insecticidas buscar si hay alguna tendencia a presentarse más en algún tipo de vegetal que en otros, -y si la hay cual puede ser la razón. Si un solo producto llega a presentar dos o más insecticidas, aún sin rebasar la IDA de cada uno de ellos, que tan riesgoso puede ser (posibilidad de sinergismo).

2) Hacer la consideración de cual problema es más grave, la contaminación de plomo en los alimentos o en el medio ambiente. Analizar la importancia del plomo como contaminante con respecto a otros metales tóxicos.

## PRUEBAS TOXICOLÓGICAS DE CONTROL DE CALIDAD.

1) Una vez proporcionado el dato exacto de concentración de sulfatos, evalúese el porcentaje de exactitud y la precisión del método, considerándose el total de experimentos efectuados por el grupo.

2) Hacer la consideración de cuales productos lácteos se ven más afectados por la presencia de antibióticos y adulterantes.

### TOXICOS GENERADOS POR LA TRANSFORMACION DE UN ALIMENTO.

Considerar el papel que juegan impurezas o productos de --- transformación en aditivos alimentarios, componentes y productos propiamente dichos.

### PROCESOS DE DETOXIFICACION.

1) Que importancia tienen las leguminosas en la nutrición y que factores impidieron en algún momento su utilización.

2) Correlacionar el estado de las semillas (aspecto, presencia de hongos, porciento de grano dañado) con el resultado de la detección de aflatoxinas. Correlacionar el destino de la semilla (alimentación humana, animal o siembra) con el resultado del análisis. Buscar la influencia de los tratamientos sobre las detecciones de muestras simples y procesadas.

### EXTRACCION DE TOXICOS.

Exponer las características de los estudios de evaluación - toxicológica, sus costos y la información que pueden proporcionar. La confiabilidad en la extrapolación de resultados en modelos químicos o biológicos hacia el hombre.

### TOXICOS NATURALES

Hacer una discusión Tóxicos naturales vs. Tóxicos artificiales.

### DESARROLLO DE ALIMENTOS.

Discutir el efecto de la concentración en el daño o beneficio que proporciona un compuesto.

### CONCLUSIONES

*Las prácticas propuestas fueron diseñadas considerando algunas limitaciones, tales como la disponibilidad de material y equipo de laboratorio, el costo de los reactivos y el horario para realizar las mismas, pero espero -- que todas las facilidades que me proporcionó el material humano de la facultad de Química, me hayan permitido superar esos pequeños detalles, para lograr un trabajo que aporte un grano de arena a la superación integral de quienes cursen la materia.*

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Amerine, M.A. y Ough, C.S. 1976. *Análisis de vinos y mostos*. Ed. Acribia, España.
- 2) Anévalo, G. 1983. *Desarrollo de aflatoxinas en productos alimenticios y materias primas para la obtención de los mismos*. *Grasas y aceites* 34 (2): 115-124; 35 (4): 251-257 y 35 (6): 387-392. 1983 y 1984.
- 3) Ariens, E.J., Lehman, P.A. y Simonis, A.M. 1978. *Introducción a la toxicología general*. Ed. Diana, México
- 4) Atherton, H.V. y Newlander, J.A. 1981, *Chemistry and testing of dairy products*. Avi publishing Co. inc. 4ta. edición USA.
- 5) Barabolack, R.; Colburn, C.H., Just D.E. Kurtz, F.A y So bleichert E.A 1979. *Apparatus for rapid inspection of corn for aflatoxin contamination*. *Cereal Chem.* 55: 1065.
- 6) Casarett and Doull's 1986. *Toxicology*, 3a. edición, MacMillan publishing Co. USA.
- 7) Castellanos. E. 1975. *Efectos crónicos de insecticidas organoclorados y organofosforados en el hombre*. Facultad de Química. UNAM, México.
- 8) Chinchester, C.O. y Lee, T.C. 1981. *Effect of food processing in the formation and destruction of toxic constituents of food*: 35-56 en Ayres, J.C. Avi publishing Co. USA.- 1981.
- 9) Committe of food protection. *Toxicants occurring naturally in foods*. *Nac. Ac. of Sciences*. USA. 1973.
- 10) Conn, E.E. 1981. *Unwanted biological substances in foods*: 105-120 en *impact of toxicology on food processing*. Ed. - Ayres. J.C. Avil publishing Co. USA. 1981.

- 11) Devore, G y Muñoz, E. 1976. *Química orgánica. Publicación-cultural. México.*
- 12) Eppley R.M. 1966. *A versatile procedure for assay and preparatory separation of aflatoxins from peanut products. -- J.A.O.A.C. 49: 1218 - 1223.*
- 13) Fabre. R y Truhaut, R. 1976, *tratado de toxicología. Ed. - Paraninfo. España.*
- 14) Farnsworth, N.R. *Biological and phytochemical screening of plants. J. Pharm. Sci. 55 (3): 225-276 (1966)*
- 15) Fassett. D.W. 1973. *Oxalates.: 346-359 en toxicants occurring naturally in foods. National Aca. of Sciences. USA - 1973.*
- 16) Ferrando, R. *Alimentos tradicionales y no tradicionales: - FAO, Alimentación y nutrición. 2: 9-12 (1980).*
- 17) *Food and agriculture organization of the united nations, - toxicological evaluation of some food colors, emulsifiers, stabilizers, anti-caking agents and certain other substances; Who Tech. Rep. Ser., 46A: 30 (1969).*
- 18) Friend, B.A., Shahani, K.M. 1981. *Antibiotics: 206-223 en- impact of toxicology on food processing. Ed. Ayres, J.C. - Avi Publishing Co. USA 1981.*
- 19) Frimmer, M. 1976. *Farmacología y toxicología veterinaria.- Ed. Acribia. España.*
- 20) George, A.J. *Legal status and toxicity of saponins; Food - cosmet. Toxicol 3:85-95 (1965).*
- 21) Goldstein, A., Aronow, L. y Kalman, S. 1969. *Principles of drug action. Harper and Row Publishers USA.*
- 22) Hart. F.L. y Johnstone, H. 1971. *Análisis moderno de los - alimentos. Ed. Acribia España.*
- 23) Harvis, Chapman, Williams, Norton y Toule. 1982. *Methods -*

- for the detection and identification of selected mycotoxins p. 372-375 en isolation and identification methods for food poisoning organisms. Ed. Academic Press. USA 1982.
- 24) Hyde, E. Kiesey, J. Ross, P.F. y Schar, H.M. 1977 Manual-- methods of analytical toxicology. Iowa State University Press. USA.
  - 25) Institute of food technologists expert panel on food safety and nutrition. Evaluation of caffeine safety. Scientific -- Status summary Food Tech. : 105-111 (1987).
  - 26) Jaffé, W.G. Factores tóxicos en leguminosas. Arch. Latinoamer. Nutr. 18 :205-218 (1986).
  - 27) Jaffé, W.G. 1980. Hemagglutinins (lectines): 73-102 in Toxic constituents of plants foodstuffs. Ed. Liener J.E. Academic Press USA 1980.
  - 28) J.A.O.A.C.; 56 (4): 785 (1973).
  - 29) Jones, M. y Elliot, F.C. Two rapid assays for saponin in individual alfalfa plants: Crop; Sc. 9: 688-691 (1969).
  - 30) Kirshman, J.C. 1981 Toxicity and safety requirements of colors: 261-272 en impact of toxicology on food processing. Ed Ayres J.C. Avi publishing Co. USA 1981.
  - 31) Knake R.P. Rao C.S., y Deyoe C.W. 1972 A rapid qualitative - Test for aflatoxin. Feedstuffs nov. 1972. 27:32.
  - 32) Kovacs. M.F. J. Assoc. offic. Agr. Chem. :49-368. (1966).
  - 33) Lacroix, A.Z., Mead, L.A. Liang, K.Y., Bedell, C. y Pearson T.A., 1986. Coffee consumption and the incidence on coronary-heart disease. The New England journal of Medicine 315 (16) 977-982 (1986).
  - 34) Laguna D.S. Residuos de medicamentos en carnes. III Jornadas técnicas. ACTA - 6A. 9: 63-68.
  - 35) Liener, J.E. Effects of antinutritional and toxic factors on

- the quality and utilization of legumes proteins.: 523-550 - en *Protein nutritional quality of foods and feeds*. Ed. Friedman, M. Marcel Dekker Vol. 2 USA (1975).
- 36) Liener, I.E. Seed hemagglutinins. *Econ. Bot.*, 18:27-33. -- (1964).
- 37) Liener, I.E. 1969, *Toxic constituents of plant food stuffs*. - Academic Press Inc. USA.
- 38) Linder, E. 1978. *Toxicología de los alimentos*. Ed. Acribia. España.
- 39) Lucas, B. y Sotelo A. 1984 A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated -- seeds. *Nutrition reports international*° 29 (3): 711-714. -- (1984).
- 40) Luke, M., Froberg, J. y Masumoto, H. 1975. Extraction and clean up of organochlorine organophosphate, organonitrogen- and hydrocarbon pesticides in products for determination by gas-liquid chromatography: *J.A.O.A.C.* 58 (5) USA (1975)
- 41) *Methodology for Analytical toxicology*. C.R.C. Press USA -- (1978).
- 42) Meyer, L. H. 1969. *Food Chemistry*. Van Nostrand Reinhold - Co. USA.
- 43) Mikkelsen, H., Larsen, J.D. y Tardind, F. Hypersensitivity-reactions to food colors, with special reference to the natural color Annato :141-144 en *Toxicological aspects of food safety*. Ed. Leonard, B.J. Springer-Verlag. USA (1978).
- 44) Monroe, E. Wall, C., Roland, E., McClennan, M.L. y Klump, - M.E. Detection and estimation of steroidal saponins in-plant tissue: *Anal. Chem.*, 24 (8): 1337-1341. (1952).
- 45) Nabney J. y Nesbitt, B.F. 1965. A spectrophotometric method for determining the aflatoxins. *Analyst* 90: 155-160.

- 46) *Official Methods of Analysis of the association of official analytical Chemists*. Ed. Williams. S. 14va. Edición. USA - (1984).
- 47) Olsen. O. y Sorensen, H. Sinalbin and other glucosinolates in seeds of souble low rape species and Brassica napus cv. - bronowski; *J. Agric. Food Chem.* 28 (1): 43-45 (1980).
- 48) Panalaks. T. y Scott. P.M. 1977 Sensitive silica gel packed flowcell for fluorometric detection of aflatoxins by high - pressure liquid chromatography *J.A.O.A.C.* 60: 583 - 589.
- 49) Pearson, D. 1970 *The chemical analysis of foods*. 6ta. edición. MacMillan publishing Co. USA (1986).
- 50) *Pesticide Analytical Manual*. 1982. FDA. USA.
- 51) Radowski. J.L. The absorption, fate and excretion of citrus red No. 2 and D & C red No. 14 *J. Pharmacol Exp. Ther.* 134-100. (1961).
- 52) Roberts. H.R. 1981. *Food Aditives.*: 265-267. *Food Safety*. - Ed. Roberts. H.R. A Wiley interscience publication. USA. ( 1981 ).
- 53) Rodricks, J.V. y Pohland. A.E. 1981 *Food Hazards of natural origin*, cap. 5: 197 - 201. en *Food safety*. Ed. Roberts. H.R. a Wiley interscience publication. USA 1981.
- 54) Shotwell. L. y Hesseltine, C.W. 1981. Use of bright greenish yellow fluorescence as a presumptive test for aflatoxin in-corn. *Cereal chemistry* 58 (2): 124-127. 1981.
- 55) Stoloff. L. et al. 1971 A multimycotoxin detection method - for aflatoxins, ochratoxin, zearalenone, sterigmatocystin - and patulin. *J.A.O.A.C.* 54: 91-97. 1971.
- 56) Stoloff. L. 1972 *Analytical methods for mycotoxins*, *clin. - Toxicol.* 5(4). 465- 494. 1972.
- Valle, P. 1986. *Toxicología de alimentos*. :24-29. CPEHS, --

- OPS, OMS, México, 1986.
- 57) Tallavist. E. y Vaananen J., Death of a child from oxalic acid poisoning due to eating rhubarb leaves. *Ann. Paediat., Feenn.* 6: 144 (1960).
  - 58) Toms. G.S., Phytohaemagglutinins. : 367-462 en *Chematoxonomy of the leguminosae.* Eds, Harborne, B. Bouter, D. y Turner B.1. Academic Press. Inglaterra (1971).
  - 59) Tookey. H. L., Van Etten. C.H. y Daxenbichler, M.E. 1980. - *Glucosinolates: 103-142 en Toxic constituents of plant food stuffs.* Ed. Liener. J.E. Academic Press. USA. (1980).
  - 60) Valle. P. *Toxicología de alimentos.* Centro panamericano de ecología humana y salud. O.P.S. O.M.S. México (1986).
  - 61) Van Etten, C.H. y Wolff. J.a. 1973 *Natural Sulphur compounds 210-223 en toxicants occurring naturally in foods; Committee on food protection.* National Academy of Sciences. USA (1973)
  - 62) Velázquez, F.Q., Pérez, M.D. y González, R.S. *Investigación de Residuos de Antibióticos en leche Pasteurizada y envasada que se consume en el área metropolitana.* *Salud Pública en México.* 23 (1): 99-99 (1980)
  - 63) Walter. E.D. isolation of a saponin hederin and its sapogenin, hederagin from Burclover (*Medicago hispida*) *J. Am. -- Pharm. Assoc.* 46: 466-467 (1957).
  - 64) Watson, D.H. y Lindsay. D.G. 1982. *A critical review of biological methods for the detection of fungal toxins in foods and foodstuffs.* *J. Sel Food agric.* 33: 5967 1982.
  - 65) Willrich. T.L. y Buck. W.B. 1967. *Effects of water quality on animal health and performance.*
  - 66) Wilson y Hayes 1973, *Microbial toxins.* Cap. 18:385-393 en - *Toxicans occurring naturally in foods.* 2a. ed. National Academy of Sciences. USA 1973.

- 67) Wokes, F. y Willimott, S.G. 1951 The determination of cyanide in seeds. *J. of Pharmacy and Pharmacology* 3: 905-916 -- (1951).
- 68) Young 1978 Diethylstilbestrol y Diethylstilbestrol -- dipropionate. *JARC* 21 :173-210 (1979).

## NOTAS

Las prácticas de determinación de metanol en un vino\*, - Determinación semicuantitativa de hemaglutininas\* y Determinación de glucosinolatos\*, fueron elaboradas por el profesor Bernardo Lucas y el profesor Adolfo de la Torre, y ya se imparten en el laboratorio de Toxicología de alimentos, de la facultad de Química de la UNAM.

El volumen de reactivo marcado entre parentesis corresponde al mínimo que necesita para una práctica individual. Se recomienda calcular el volumen necesario para todo el grupo de trabajo y prepararlo con anticipación, asignándolo equitativamente a los equipos que deben prepararlo.

Es recomendable, cuando el costo de los reactivos a utilizar sea muy elevado, realizar solo una curva patron-por mesa.