

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



PRUEBA DE CUATRO TRATAMIENTOS EN LA
INACTIVACION DE AFLATOXINAS
EN MAIZ CONTAMINADO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

P R E S E N T A

VICENTE JAIME MARTINEZ RAMIREZ

MONTERREY, N. L.

ENERO DE 1980

T

SB608

.M2

M3

C.1



1080062160

T
SB608
.M2
M3

040.633

FA25

1980

c.5



Biblioteca Central
Magna Solidaridad



UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

Tesis

A mi abuelita

JOSEFINA DAVILA GOMEZ (Q.P.D.)

Por su amor y entrega
hasta antes de irse.

A mis padres

GUADALUPE RAMIREZ D.

Y

VICENTE MARTINEZ MEDINA

A quienes debo el
estar en esta nave.

Con cariño

A mis padres adoptivos

MAGDALENA VAZQUEZ G.

- Y

LUIS MARTINEZ MEDINA

Por haber vivido a su lado

casi todo el tiempo de mi vida.

A mis hermanos

Yolanda, Magdalena, José Luis,
Roberto, Reynaldo, Martha, Raúl,
Rosa María y Guadalupe

Con Respeto.

Agradezco en forma especial

A mi asesor: Dr. José Luis de la Garza
por su acertada dirección.

Al Centro de Investigaciones Agropecuari
as de la Universidad, por sus aportaci
ones económicas durante el transcur-
so del experimento.

Y de manera muy atenta a la Dra. Luci-
la Ramos por sus valiosos consejos.

Al Ing. Alfonso Tovar R., que también
nos ofreció su amistad, aún fuera del
aula.

A mis compañeros

RICARDO SOSA ESPINOSA

Y

JOSE LUIS COLUNGA GONZALEZ

Por el esfuerzo alcanzado juntos.

A NUESTRA ESCUELA

**Que este año renace y vuelve
al lugar que le corresponde.**

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	
Literatura Revisada	4
Materiales y Métodos	15
Resultados	24
Discusión	35
Conclusiones	37
Recomendaciones	38
Resumen	40
BIBLIOGRAFIA	42
APENDICE	45

INDICE DE CUADROS Y GRAFICAS

	Pág.
Cuadro #1.- Algunas micotoxinas además de aflatoxinas y sus fuentes fungales	4
Cuadro #2.- Concentración de aflatoxinas en la dieta que ocasiona toxicosis	8
Croquis: Acomodo de las cantidades de toxina, en cromatografía de capa fina, para su visualización en cromato vue	22
Cuadro #3.- Volumen de dilución utilizados para estimar el contenido de aflatoxina Bl.	23
Cuadro #4.- Resultados del estudio sobre inactivación de aflatoxinas en partes por millón	26
Cuadro #5.- Análisis de varianza del estudio sobre inactivación de aflatoxinas ...	27
Gráfica #1.- Resultado del tratamiento con diversas sustancias del grano de maíz infestado con aflatoxinas	28
Gráfica #2.- Comparación de medias	29
Gráfica #3.- Comparación de los niveles de tiempo en los tratamientos	30
Gráfica #4.- Reducción porcentual con un tratamiento de nixtamalización	31

	Pág.
Gráfica #5.- Reducción porcentual de aflatoxina B1 usando un tratamiento de agua - con cal a temperatura ambiental ..	32
Gráfica #6.- Reducción porcentual de aflatoxi-- nas B1 usando un tratamiento de zu mo de limón	33
Gráfica #7.- Reducción porcentual de aflatoxi-- nas usando como tratamiento cápsu- las de bilis.....	34

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

Consciente del problema que implica la contaminación - del ambiente y dentro de ésta, el de la contaminación de alimentos por micotoxinas (metabolitos tóxicos producidos -- por hongos) tratamos en este trabajo de aportar una pequeña parte de todo lo que se puede lograr por reducir estas defi ciencias.

El tema de las micotoxinas, y en especial el de las aflatoxinas (micotoxinas producidas por Aspergillus flavus - Link y A. parasiticus Speare) me ha inquietado desde que tu ve las primeras noticias de su realidad. Se ha demostrado que estos metabolitos tóxicos provocan daños muy serios e irreversibles de acuerdo con su concentración, dosis y tipo de organismo afectado. El hombre, sus animales domésticos y en general, cualquier animal de sangre caliente que ingie ra directa o indirectamente productos contaminados puede -- verse seriamente afectado.

La mayor incidencia de este tipo de contaminación se - observa en países con clima tropical y subtropical, aunque también se ha detectado en zonas templadas.

Algo que me ha hecho sentir aún más de cerca el proble ma, es su relativa solución. el hecho de que estos compues tos influyen en el hombre, y aún más las repercusiones -- de tipo económico y de salud en los países subdesarrollados.

México, por sus características económico-sociales y ambientales, es un medio propicio para la contaminación en el campo, aún antes del almacenamiento. En nuestro país no existen almacenes suficientes que reúnan las condiciones ambientales y sanitarias requeridas para prevenir el ataque de macro y microorganismos.

Estando dentro del problema, este inicio pudiera ser el principio de futuros estudios más completos y profundos sobre el tema.

En la lucha por la descontaminación de las aflatoxinas se han probado varias formas de inactivación. Solo algunas han resultado técnica y económicamente posibles para su realización a gran escala, tal es el caso de amoníaco y de la fotodegradación.

Realmente se deben de encontrar nuevas y mejores formas de inactivación, pues las medidas preventivas no son suficientes.

Los principales objetivos de este trabajo son los siguientes:

- a) Detectar un tratamiento químico o natural, que reduzca la concentración o inactive totalmente al tóxico. (Ya reportados con anterioridad).
- b) Probar tratamientos en la inactivación de aflatoxinas --

que no han sido reportados en la literatura.

- c) que el tratamiento a usarse sea económico y de uso fácil, para que en un futuro pueda usarse a escala comercial.
- d) Iniciar el principio de otros estudios más profundos sobre el tema.
- e) Dar a conocer los resultados de estas investigaciones a las personas interesadas.

LITERATURA REVISADA

En el pasado decenio se ha visto claramente que las aflatoxinas y otras toxinas fúngicas micotoxinas (cuadro #1) pueden contaminar segmentos de la cadena alimenticia humana y animal en medida desconocida (10,11).

El hongo responsable de la producción de aflatoxinas es Aspergillus flavus, taxonómicamente pertenece al grupo Aspergillus flavus oryzae, familia: Moniliaceae, orden: Moniliales y clase: Fungi imperfecti (18). No obstante se sabe que la capacidad de sintetizar estos compuestos están también presentes en Aspergillus parasiticus. (2, 3, 5, 7, 10, 12, 13, 20, 23)

Las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de Aspergillus flavus y la producción de aflatoxinas son temperatura de 10° a 45° C (óptima 30°C) y humedad relativa del 75% o más. (7, 9, 10, 12, 13, 18, 23)

Cuadro #1.- Algunas micotoxinas además de aflatoxinas (y sus fuentes fungales), presentes en el medio humano y que pueden amenazar la salud del hombre (10).

Toxina	Hongo
Citreoviridina.....	<u>Penicillium Citreoviridae</u>
Citrina.....	<u>Penicillium viridicatum</u> , <u>Penicillium citrinum</u> .

Cicloratina.....	<u>Penicillium islandicum.</u>
Luteosquirina.....	<u>Penicillium islandicum.</u>
Maltoricina.....	<u>Aspergillus oryzae.</u>
Patulina.....	<u>Penicillium expansum, Penicillium urticae, Penicillium claviforme.</u>
Toxina P R.....	<u>Penicillium roqueforti.</u>
Rubratoxina.....	<u>Penicillium rubrum.</u>
Rugoloxina.....	<u>Penicillium islandicum.</u>
Esterigmatosistina.....	<u>Aspergillus flavus, Aspergillus versicolor, Aspergillus nidulans y Aspergillus parasiticus.</u>
Tremorgens.....	Especies de <u>Penicillium</u> y <u>Aspergillus.</u>
Vomitoxina.....	<u>Fusarium graminearum.</u>

La presencia de hongos en algunos productos no indica necesariamente la existencia de toxinas, ya que no todas las cepas de Aspergillus flavus son tóxicas. Por otro lado, un aspecto aparentemente libre de microorganismos no significa que el material esté libre de toxinas. En algunos casos, cereales que parecen sanos y aptos para el consumo suelen tener niveles significativos de aflatoxinas (7, 10, 11, 18, 23, 24).

Las aflatoxinas pertenecen a un grupo de metabolitos

Bis furanocumarinos, cristalinos y fluorescentes, son estables hasta el punto en que no las destruye la cocción. - En la actualidad se conocen por lo menos ocho aflatoxinas diferentes; las cuatro más conocidas son: B1 y B2 (fluorescencia azul en luz ultravioleta) y G1 y G2 (fluorescencia verde). B1 generalmente está en mayor concentración. (7, 10, 12, 13, 18, 23).

Las aflatoxinas se han encontrado en:

- a) Semillas oleaginosas (cacahuate, semilla de algodón y - copra).
- b) Alimentos a base de semillas oleaginosas (cacahuate, se milla de algodón, copra, girasol y soya).
- c) Aceites vegetales brutos (cacahuate, oliva, coco).
- d) Cereales (maíz, sorgo, arroz, trigo, mijo, avena).
- e) Alimentos a base de cereales (maíz y sorgo).
- f) Nueces (piztaches, almendras, nuez de nogal pecanero).
- g) Frutas (higos).
- h) En leche se ha encontrado un subproducto de la aflatoxina B1 (aflatoxina M1) (11).

Efectos biológicos de las aflatoxinas.-

La aflatoxina B1 provoca aberraciones cromosómicas y rotura de las cadenas de ADN en las células vegetales y -- animales (23).

El hígado es la meta predominante de las aflatoxinas. Los animales jóvenes de laboratorio son más susceptibles -

que los adultos a los efectos agudos y crónicos, y los machos son mucho más susceptibles que las hembras (cuadro -- #2) (11).

Si bien el principal órgano de localización de las aflatoxinas es el hígado, se han encontrado del tipo B1 en el corazón, riñón, tejidos cerebrales y la orina o heces - de primates no humanos, así como en personas. (11).

Estas toxinas podrían estar relacionadas con una enfermedad que produjo encefalopatia y degradación adiposa - de la víscera que ocasionó la muerte a centenares de niños en Tailandia. También en Checoslovaquia se han dado - casos de defunciones de niños, encontrándose aflatoxinas - en los hígados al momento de hacer las autopsias. La fuente de la toxina en este caso fue un producto lácteo contaminado. (11).

Cuadro #2.- Concentración de aflatoxinas en la dieta que ocasiona toxicosis (11).

Especie	Edad	Aflatoxina (ppm)	Duración del suministro.	Efectos
Terneras	en destete	0.22-2.2	16 semanas	Crecimiento lento, muerte, lesiones hepáticas.
Toros	2 años	0.22-0.66	20 semanas	Lesiones hepáticas, enfermedades clínicas.
Vacas	2 años	2.4	7 meses	Lesiones hepáticas y enfermedades clínicas.
Cerdos	Recién nacidos	0.234	4 días	Crecimiento lento.
Cerdos	2 semanas	0.17	23 días	Anorexia, depresión, ictericia, ascitis, y crecimiento lento.
Cerdos	4 a 6 semanas	0.41-0.69	3 a 6 meses	Crecimiento lento y lesiones hepáticas.
Pollos	1 semana	0.84	10 semanas	Crecimiento lento y lesiones hepáticas.
Pollos New Hampshire	2 días	0.2	40 días	Crecimiento acelerado.

Inactivantes.-

Se han descrito diversos métodos de descontaminación y se han clasificado en tres categorías principales:

- a) Separación de las partes contaminadas del producto.
- b) Extracción de las micotoxinas (con disolventes polares).
- c) Inactivación de micotoxinas por métodos físicos (calor, ebullición, tostado, fotodegradación), químicos y biológicos.

Para que todo proceso de descontaminación se pueda aplicar a gran escala tiene que ser técnica y económicamente viable y debe de satisfacer los criterios siguientes:

- a) Que destruya o inactive la toxina (10, 11).
- b) Que no produzca o deje en el producto final residuos tóxicos o cancerígenos.
- c) Que destruya esporas o micelios del hongo que bajo condiciones favorables proliferen y formen nuevas toxinas.
- d) Que se preserve el valor nutritivo del producto (11).

Inactivación física.-

El contenido de aflatoxinas del aceite de cacahuete puede reducirse por filtrado con ayuda de un dispositivo auxiliar, que suprime la materia en partículas donde se encuentran aproximadamente el 65% de las aflatoxinas del aceite (10).

En la India el aceite es destoxificado, usando frascos de vidrio, para en ellos exponerlos a una insolación intensa

por lo menos durante una hora. Al parecer la luz degrada -- las aflatoxinas (debe de observarse también la calidad del -- aceite pues este sufre fotogradación oxidativa) (10).

Lee determinó el efecto del tostado en la destrucción -- de la toxina presente en cacahuete. La reducción de aflatoxina por este sistema fue de 45 a 83% (23).

Inactivación química.-

Las aflatoxinas son sensibles a los tratamientos oxidan-- tes y alcalinos. Ambos producen la ruptura del anillo lac-- tónico de la toxina. La reacción no es específica en los -- dos casos. (10, 11, 23).

Las aflatoxinas también se han reducido en presencia -- del insecticida Diclorves. Este insecticida aparentemente -- inhibió la biosíntesis de la estructura del ciclo del difu-- rano (muy común en las aflatoxinas y en las versicolorinas). (19).

A 2.5% de dimetil sulfóxido o más altas concentraciones previa inoculación de cacahuates con Aspergillus flavus, cau-- só una inhibición de la pigmentación conidial normal y apro-- ximadamente del 62 al 64% de la producción de toxinas (1, -- 17).

Alrededor de dos tercios de aflatoxinas totales han si-- do removidas de maíz contaminado comercial por el tratamien-- to de agua con cal a ebullición (nixtamalización). La afla--

11-

toxina G1 fue la que más se redujo, pero la B1 se encontró - en mayor cantidad en las aguas residuales (21).

Yang ha observado que tanto el hongo como la toxina --- fueron destruidos por blanqueadores comerciales y por el hipoclorito de sodio en un período de cinco días (23).

Davis y Diener reportaron que las substancias como el - ácido P. aminobenzoico, sulfato de potasio y fluoruro de potasio inhiben tanto el crecimiento microbiano como la producción de toxinas. (23).

El agua oxigenada es usada en la India a escala comercial en la destoxificación de aflatoxinas, en concentrados - proteínicos de cacahuates destinados a la alimentación humana. (10, 12, 15).

Resultados obtenidos por Gardney en 1971 indican que -- hay reducciones en el contenido de aflatoxinas en cacahuates de 121 ppb a niveles no determinables (trasas) y en algodón de 359 ppm a niveles de 4 ppb. El inactivante que usó fue - el amoníaco (4, 10, 12, 23).

También se ha comprobado destoxificación de aflatoxinas en tortas de prensado con metilamina (se ha detectado que - con este producto hay degradación de subproductos que pueden ser dañinos y además se disminuye el contenido nutritivo)(9) (10, 13, 23).

El ácido cítrico y varias concentraciones de metanol redujo la concentración de aflatoxinas (8).

El aldehído cinnámico, componente de la canela y el eugenol extraído del clavo de comer probaron ser inhibidores del crecimiento de Aspergillus parasiticus y de la producción de aflatoxinas (6).

Se ha demostrado que tratando los alimentos con 2000 ppm de SO₂ o más e incrementando la temperatura se reduce grandemente el nivel de toxinas (9).

Aún P. H. de 4.5 concentraciones de acetato de sodio mayores o iguales 1gr/100ml de agua destilada, inhibió completamente el crecimiento de Aspergillus flavus y previno la producción de aflatoxinas (5).

El ácido cafeínico parcialmente inhibió el crecimiento de Aspergillus parasiticus y la producción de aflatoxinas en un medio de levadura sacarosa (yes). (20).

Un compuesto con gran actividad inhibitoria sobre Aspergillus parasiticus fue aislado de papa (Solanum tuberosum). El compuesto se puede extraer con acetato etílico. Al parecer es un derivado del ácido cinnámico y estructuralmente es muy similar al ácido cafeínico. (20).

Los tratamientos de rocío de agua, H₂O₂ y ácido clorhídrico han demostrado bajar considerablemente los niveles -

de aflatoxinas en cacahuates españoles sin cáscara contaminados a propósito (15).

El ozono es otro producto con el cual se pueden inhibir las aflatoxinas en harina de semillas de algodón y harina de cacahuete (10, 12).

Finalmente se tiene noticia de que un tratamiento con cloro en harina de cacahuete reduce la toxicidad en anadejas pero no previene las lesiones del hígado (10, 11, 12, 23).

Inactivación microbiológica.-

Otros procedimientos para destruir o inactivar las aflatoxinas son las basadas en la metabolización de las toxinas por otros microorganismos.

Tynisson y Robertson observaron que el protozoario del género Tetrahymena pyriformis es capaz de disminuir el contenido de aflatoxinas en un 58% en 24 horas y hasta 67% en 48 horas (23).

La bacteria Flavobacterium auranticum inactivó aflatoxinas en leche, aceite de maíz, soya y cacahuete ().

No fue detectada la toxina a 85% de humedad relativa, cuando en arroz fue inoculado al mismo tiempo con esporas de Aspergillus parasiticus y Aspergillus Chevalieri. La reducción fue del orden del 99% a 25°C, 100% a 30°C y 95% a 35°C a 100% de humedad relativa (2).

Las cantidades de aflatoxinas también fueron reducidas como resultado de la competencia entre Aspergillus Parasiticus y Aspergillus candidus. (3).

MATERIALES Y METODOS

Materiales.-

Cajas de Petri, microscopio, porta objetos, cubre objetos, incubadora, frascos Erlenmeyer, asa de transferencia, campana, mechero, perlas de vidrio, agitador, embudo Buchner, tubos Butt, vasos de precipitado, placas de vidrio de 5 mm. de espesor, y 20 por 20 cm por lado (400 cm² de área), cuba de separación, autoclave, papel filtro Whatman #4, cromatograma con luz ultravioleta, maíz contaminado, cepas de Aspergillus flavus.

Reactivos.-

Medio de cultivo Agar Czapek, acetona, agua destilada, acetato de plomo, celite analítico, cloroformo, sulfato de sodio anhidro, éter etílico, metanol, estándar de aflatoxinas, cal, limones, pastillas de bilis.

Métodos.-

Básicamente podemos dividir el trabajo en seis puntos.

- a) Aislamiento del hongo Aspergillus flavus.
- b) Inoculación del hongo en grano comercial.
- c) Utilización de los tratamientos en el grano comercial tóxico libre de microorganismos.
- d) Extracción de la toxina por el método de Pons.
- e) Cuantificación de las toxinas por comparación con el estándar en el cromatograma con luz ultravioleta.
- f) Análisis estadístico.

000628

Aislamiento.-

En 15 cajas de Petri con medio de cultivo Agar Czapek (24), fueron colocadas en cada una 10 semillas de maíz comercial contaminado. Se incubó el material. Las primeras colonias de microorganismos fueron identificadas con la ayuda de un microscopio, y las claves de Barnett. En algunas cajas se identificaron hongos que se relacionaban con Aspergillus. Nuevamente estos microorganismos se sembraron en 10 cajas de Petri en el mismo medio de cultivo. Ahora en 3 de las cajas se identificaron con la ayuda de las claves de Raper algunas cepas de Aspergillus flavus. Estas cepas fueron resemebradas en 10 cajas de Petri en medio de cultivo agar czapek con antibiótico. Una vez aislado el hongo se dejó que creciera en una incubadora, para después separar las cepas más tóxicas del hongo, con la ayuda de una lámpara de mano de luz ultravioleta.

Inoculación del grano.-

En 20 frascos Erlenmeyer, se colocaron en cada uno 130 gr de maíz comercial limpio, en una campana, cerca a un mechero y con una asa fueron trasladadas cepas tóxicas a cada uno de los frascos, se agregó agua destilada estéril para proporcionar suficiente humedad al crecimiento del hongo. Todos los frascos fueron puestos en la incubadora a 30°C y tapados con algodón.

Habiendo crecido el hongo en todos los frascos, se es-

terilizó a 15 libras de presión por espacio de una hora. Lo anterior se hizo para matar el hongo y tener una cantidad estable de toxina.

Los granos que estaban aglomerados por el mismo calor de la autoclave y el micelio producido fueron separados manualmente hasta dejarlo completamente limpio y seco. Este grano fue puesto en una caja, se revolvió y fue guardado en la incubadora a 28°C.

Se hicieron 3 muestreos (de 50 gr/muestra) para observar si la cantidad de toxina era igual en todo el grano --- (2600 gr). Los resultados de estos muestreos fueron los siguientes: 1a.= 10000 ppb, 2a.= 10000 ppb y 3a.= 11000 ppb. Se hizo un nuevo muestreo y resultó ser igual a las dos primeras.

Uso de los tratamientos.-

En frascos Gerber esterilizados se pusieron en cada uno 50 gr de maíz contaminado, a los cuales se les aplicaron los siguientes tratamientos:

A1 Agua con cal a ebullición (50 ml de agua y 20 gr de cal).

A2 Agua con cal (50 ml de agua y 20 gr de cal).

A3 Tabletas de Onotón (Ingredientes en cada tableta): 0.175 gr de pancreatina, extracto seco de bilis de buey: 0.25 gr, hemicelulosa obtenida de Aspergillus oryzae: 0.05 gr Simethicone: 0.025 gr y excipiente c. b. p. 10.8 gr.

Las tabletas fueron molidas hasta completar 20 gr y di---

luidas en 50 ml de agua destilada en cada tratamiento.

A4 50 ml de zumo de limón.

A5 Testigo.

Nota: Cada uno de los tratamientos tuvo 2 niveles de tiempo con 2 repeticiones (20 unidades experimentales).

Extracción de aflatoxinas por el Método de Pons (uso - de acetona acuosa) (16) en cada una de las unidades experimentales.

Extracción.-

- 1.- Se pesaron 50 gr de muestra (maíz seco molido y contaminado) en un Erlenmeyer de 500 ml.
- 2.- Se cubrió el fondo del frasco con perlas de cristal de 6 mm.
- 3.- Se agregaron 250 ml de acetona al 70%.
- 4.- Se taparon los frascos con tapones de polietileno.
- 5.- Se agitó la muestra en un agitador mecánico por 30 minutos.
- 6.- Se filtró a través de papel filtro Whatman #4 de 18.5 cm de diámetro en un embudo de 100 mm de diámetro. Se cubrió el embudo con un vidrio de reloj para minimizar la evaporación.
- 7.- Se colectó el filtrado claro en un frasco con tapón de 250 ml.

Purificación.-

- 8.- Se midieron 150 ml del extracto obtenido en un vaso de

precipitado de 400 ml.

- 9.- Se agregaron 60 ml de agua destilada y enseguida 20 ml de solución de acetato de plomo al 10%.
- 10.- Se hirvió la muestra en un baño a vapor hasta que el volumen se redujo a 175 ml.
- 11.- Al extracto crudo, hervido y enfriado se agregaron 3-4 gr de celite analítico como ayuda para filtrar.
- 12.- Se agitó bien y se filtró a presión reducida en un matraz Kitasato con un embudo Buchner al que se le puso un papel filtro Whatman #4 de 5.5 mm de diámetro.
- 13.- Se lavó la torta de filtrado con 60 ml de acetona al 20%.
- 14.- Se juntaron el filtrado y la solución de lavado y se virtieron sobre un embudo de separación de 250 ml.
- 15.- Al filtrado se le agregaron 50 ml de cloroformo agitando el embudo vigorosamente por un minuto para extraer la toxina.
- 16.- Se permitió que las fases se separasen y se transfirió la fase inferior (cloroformo) a un vaso de precipitado de 250 ml.
- 17.- Se repitieron los pasos 15 y 16.
- 18.- Las fases obtenidas se evaporaron en baño maría hasta 3 ml.
- 19.- Se transfirió el extracto con no más de 10 ml de cloroformo a una columna cromatográfica corta (tubos butt).
Preparación de los tubos butt.-

- a) En la parte donde se reduce el tubo se le puso fibra de vidrio como filtro y soporte.
- b) Se añadió una ligera capa de Na_2SO_4 (Sulfato de Sodio Anhidro Merck).
- c) También una capa de 4 cm de gel de sílice.
- d) Y finalmente otra capa de Na_2SO_4 (Sulfato de sodio anhidro).

20.- Se percolaron 100 ml de éter etílico a través de la columna y fueron eliminados.

21.- Se agregaron 150 ml de cloroformo metanol al 3%.

22.- Se recogió el filtrado (cloroformo-metanol y aflatoxinas) en un vaso de precipitado.

23.- Se evaporó a baño maría en el extractor hasta 3 ml.

24.- El extracto fue guardado en frascos especiales.

25.- La muestra se diluyó en 15 ml de cloroformo. (Cuadro #3).

Análisis cuantitativo en cromatografía de capa fina

Comparación visual contra el estándar.-

26.- Se prepararon las placas para cromatografía de capa fina de la siguiente forma:

- a) Se agitaron 50 gr de sílica gel en 100 ml de agua, por 30 segundos en un vaso.
- b) Se vertió la mezcla en un aplicador SJM para TLC para una capa de 0.5 mm de espesor.
- c) En 5 placas de vidrio de 20 por 20 cm se procedió a correr la mezcla.

- d) Se dejaron secar las placas al aire por 60 minutos.
- e) Posteriormente se secaron en una estufa de corriente de aire a 105°C por 2 horas.
- f) Se dejaron las placas en el desecador.
- g) Se marcó una línea a 2 cm del tope de la placa (A partir de aquí se procedió a aplicar las muestras y estándares en la placa).

- 27.- En la parte media de la placa fueron inyectadas con -- micropipetas las diferentes cantidades de standard -- (1, 2, 5 ml), aplicándose posteriormente a ambos lados de los patrones las muestras problema (unidades experimentales) a un volumen de 15 ~~ml~~ de los 15 ml de dilución. (Croquis: Fig. #*1).
- 28.- Se corrieron las placas en un tanque de desarrollo hasta una altura de 14 cm usando como eluyente cloroformo acetona al 13%.
- 29.- Finalizada la cromatografía, las fluorescencias fueron observadas bajo la luz ultravioleta de onda larga en Cromato Vue (336 nm).
- 30.- Se compararon las intensidades de las manchas de las muestras con las de las manchas del standard (patrón).
- 31.- Para calcular las ppb de aflatoxinas en las muestras se hizo lo siguiente:

$$\text{ppb de aflatoxinas Bl: } \frac{V_s \times C_s \times SD \times 1000}{W \times x \times 0.6}$$

Donde:

Vs: Son microlitros del standard de aflatoxina en la

cual la mancha B*1 coincide con la mancha B1 de la muestra.

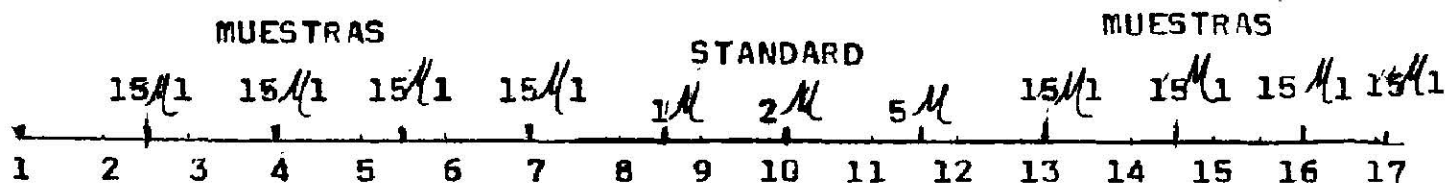
Cs: Concentración de aflatoxina B1 en la solución estandar de aflatoxinas (microgramos/microlitros).

SD: Volumen al cual se hizo la dilución de la muestra (extracto) en microlitros.

W : Peso de la muestra en gramos (50 gr).

X : Microlitros del extracto usado en las manchas.

El diseño estadístico que se usó fue el de completamente al azar con arreglo factorial (2 niveles de tiempo y 2 - repeticiones). En total fueron 20 unidades experimentales.



CROQUIS: Cantidades de toxina, en cromatografía de capa fina para su visualización en cromato vue.

Contenido aprox. de aflatoxina B1 en ppb.	Volumen de dilución en ml.
0 - 10	0.25
10 - 20	0.5 - 1.0
20 - 50	1.0 - 2.5
50 - 100	2.5 - 5.0
100 - 150	5.0 - 7.5
150 - 200	7.5 - 10.0
200 - 300	10.0 - 15.0

Cuadro #3.- Volumen de dilución utilizados para estimar el contenido de aflatoxina B1. (16)

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se observan en el cuadro #4, en el cual se muestran todos los tratamientos (unidades experimentales) con sus respectivas cantidades de aflatoxinas en ppm.

Según el análisis estadístico (cuadro #5), los productos usados fueron buenos inhibidores, pues hubo diferencia altamente significativa entre éstos.

El tiempo no influyó en el experimento, ni hubo interacción productos/tiempo.

El orden de los productos según su eficiencia es el siguiente:

- 1.- Agua con cal a ebullición (nixtamalización).
- 2.- Agua con cal a temperatura ambiental.
- 3.- Cápsula de bilis y zumo de limón.

El zumo de limón y la cápsula de bilis se comportaron estadísticamente igual, igualmente sucedió con los dos tratamientos de cal. (Comparaciones de medias, anexo).

En la gráfica #1 se muestra el comportamiento promedio de los productos, mostrándose la disminución de los niveles de aflatoxinas por los tratamientos y comparándose con el testigo.

En la gráfica #2 se observa lo que ya estadísticamente se había analizado. Los niveles de tiempo no influyeron significativamente en el comportamiento de los productos usados.

En las gráficas 3 a 6 se observan los porcentajes de reducción de aflatoxinas comparadas con el testigo promedio.

Los promedios de reducción son los siguientes:

Agua con cal a ebullición: 95.7% (Gráfica #3).

Agua con cal a temperatura ambiental: 94.1% (Gráfica #4).

Zumo de limón: 63.5% (Gráfica #5).

Cápsula de bilis: 63.5% (Gráfica #6).

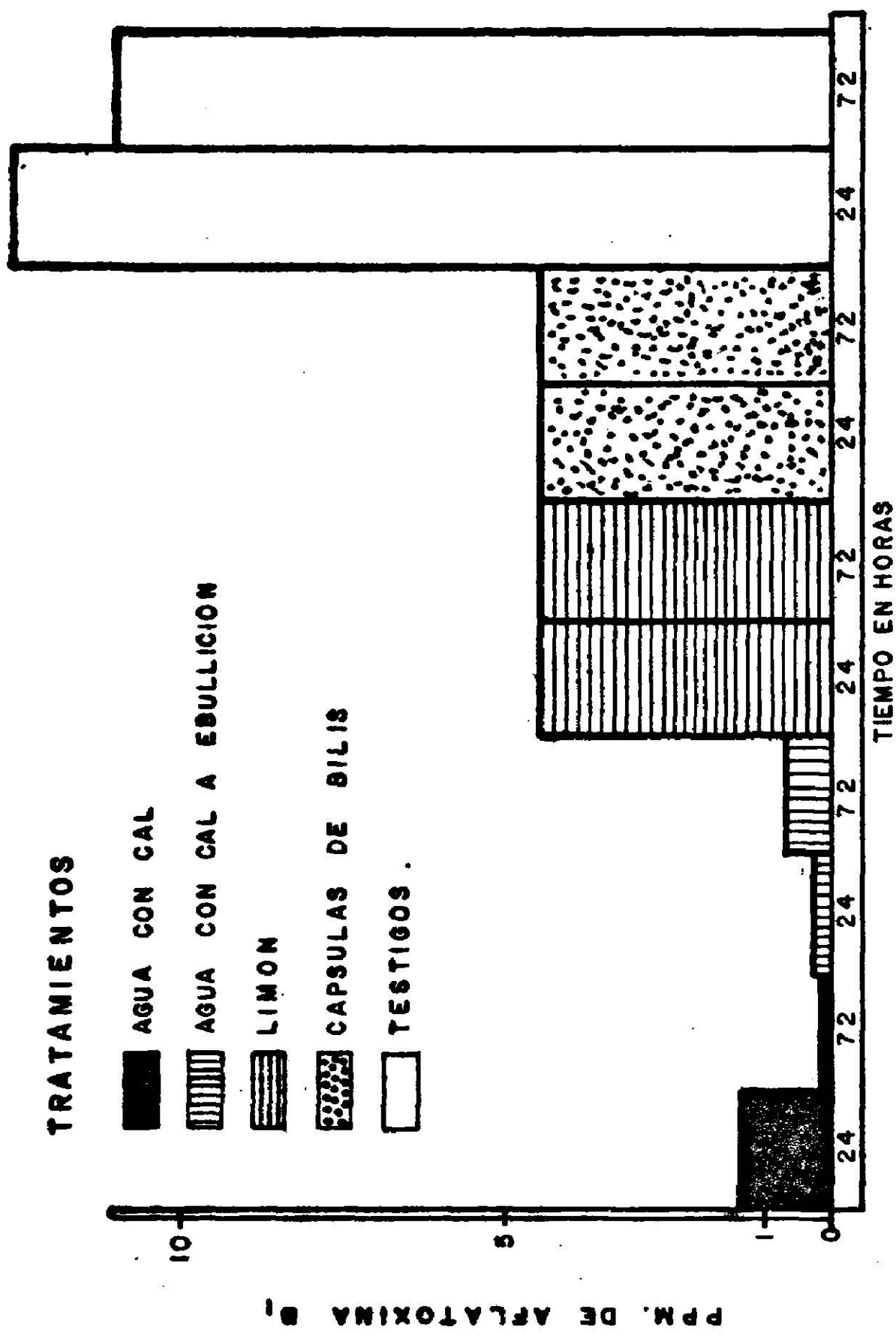
Cuadro #4.- Resultados del estudio sobre inactivación -
de aflatoxinas en partes por millón (1979).

Inactivantes	Tiempo (días)	Repetición	P.P.M. de aflatoxinas.	
a) Agua con cal	1	1	1.25	
		2	1.25	
	3	1	0.025	
		2	0.225	
	b) Agua con cal a ebullición	1	1	0.500
			2	0.025
3		1	1.250	
		2	0.225	
c) Limón	1	1	5.000	
		2	3.750	
	3	1	5.0000	
		2	3.750	
d) Cápsulas de bilis	1	1	5.000	
		2	3.750	
	3	1	5.000	
		2	3.750	
e) Testigo	1	1	12.500	
		2	12.500	
	3	1	11.666	
		2	10.000	

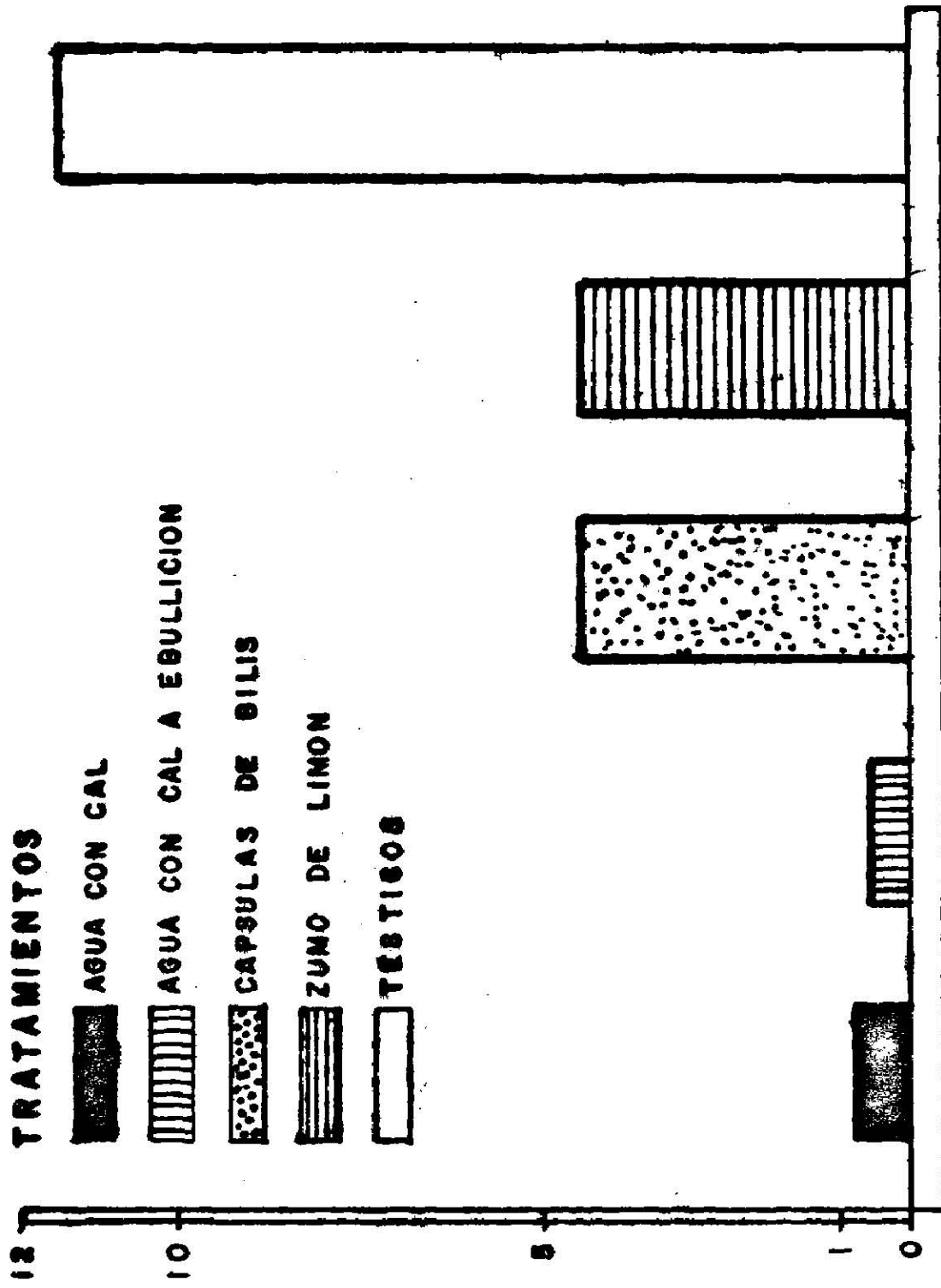
Cuadro #5.- Análisis de varianza del estudio sobre i--
nactivación de aflatoxinas. (Datos del cua
dro #4).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F calculada	F. Teórica	
					0.05	0.01
Media	1	373.3862528	373.3862528	722.0910019	242	6056
Inactivantes	4	327.0582612	81.7645653	158.1243456	5.96**	14.54**
Tiempo	1	1.0736926	1.0736926	2.0764121	242	6956
Interacción	4	3.1964464	0.7991116	1.5454004	5.96	14.54
Error	10	5.170903	0.5170903			
Total	20	336.4993032				

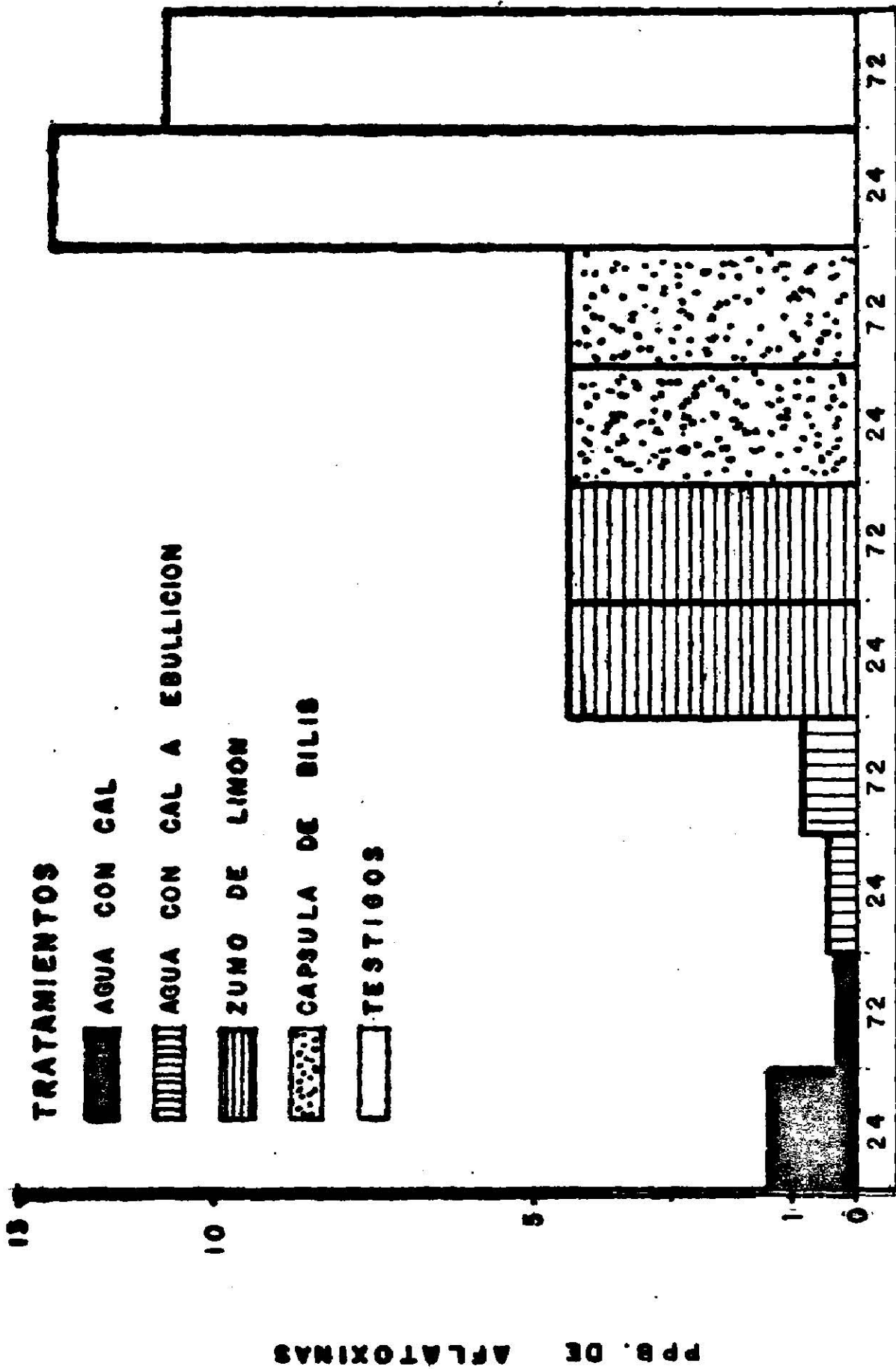
** Diferencia altamente significativa.



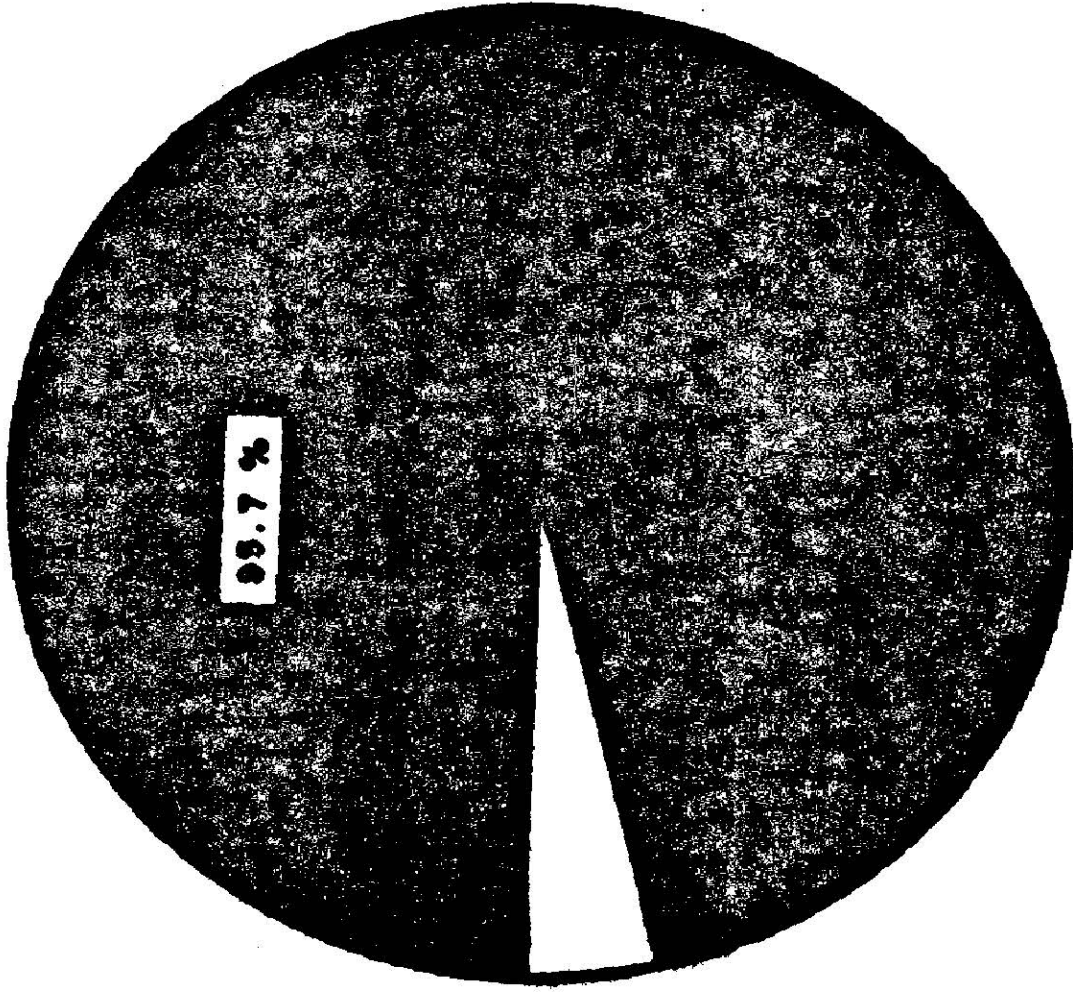
GRAFICA 1.- RESULTADO DEL TRATAMIENTO CON DIVERSAS SUSTANCIAS DEL GRANO DE MAIZ INFESTADO CON AFLATOXINAS



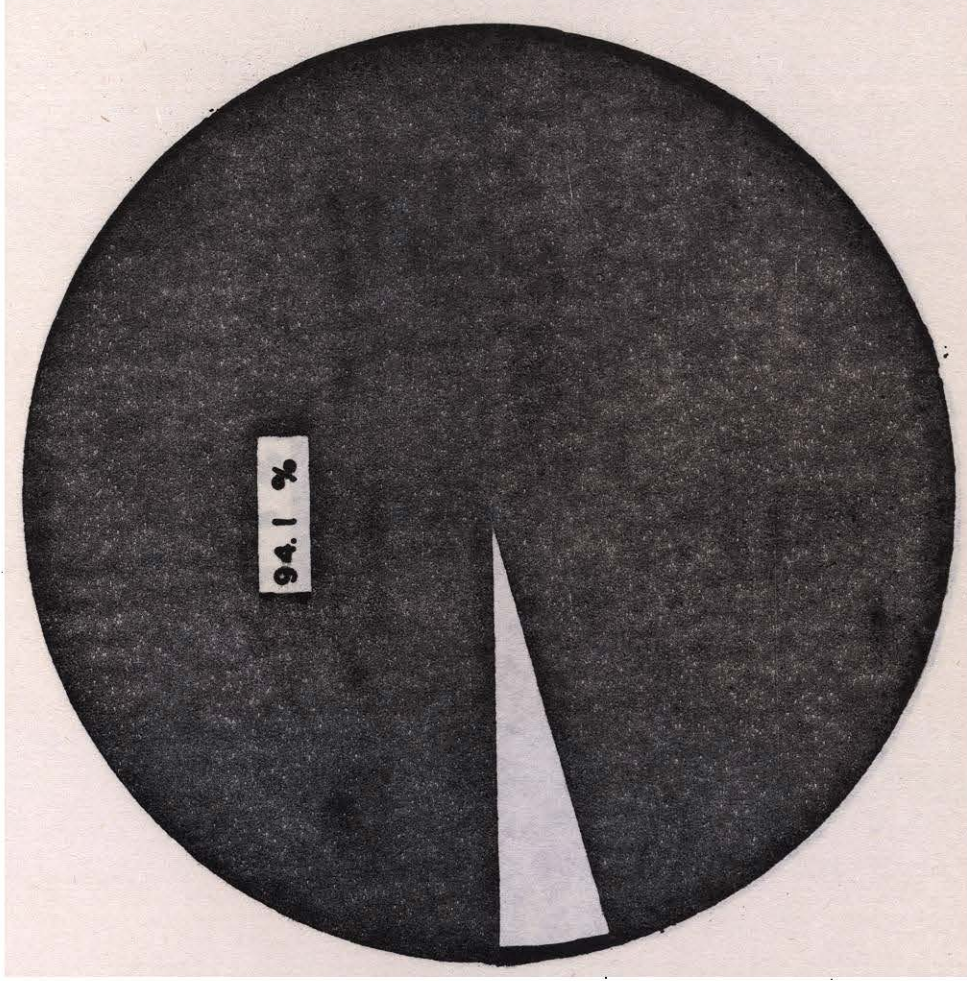
GRAFICA 2.- COMPARACION DE MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS




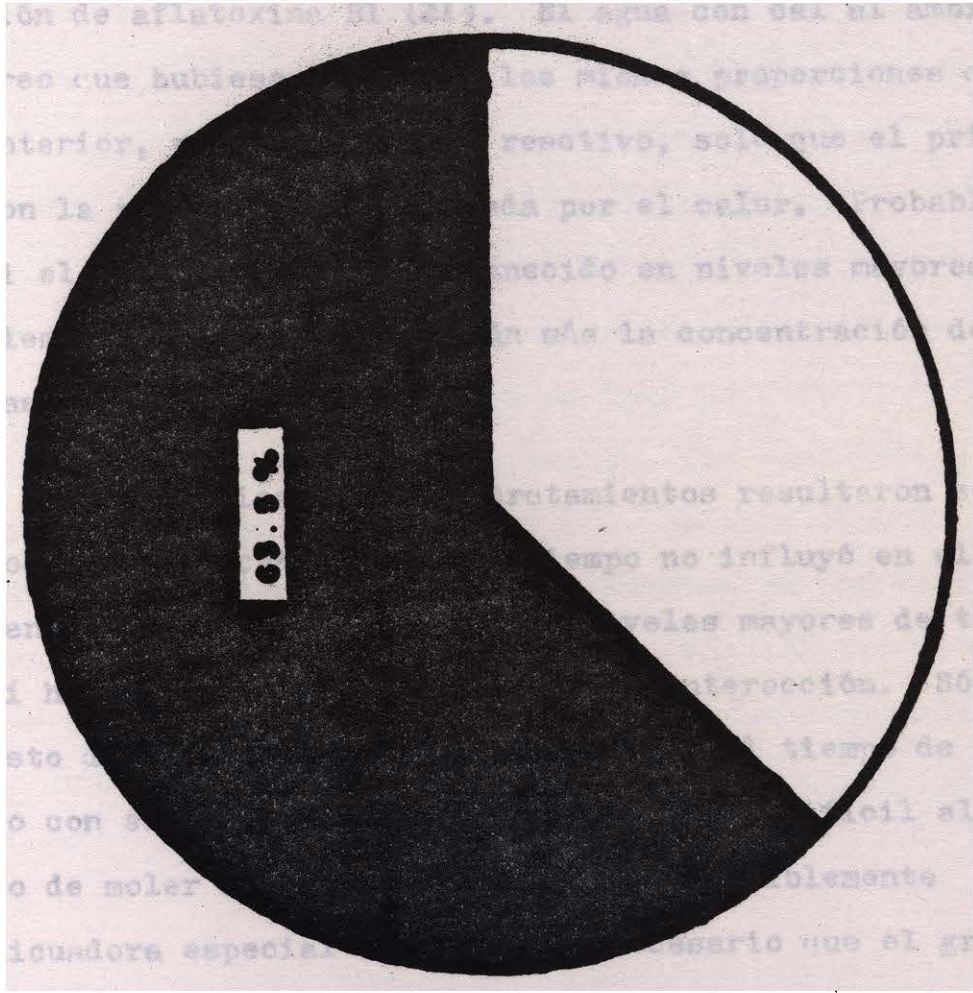
GRAFICA 3.- COMPARACION DE LOS NIVELES DE TIEMPO EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS



GRAFICA 4.- ■ REDUCCION PROCENTUAL DE AFLATOXINA B₁ (95.7%) USANDO UN TRATAMIENTO DE AGUA CON CAL A EBULLICION (NIXTAMALIZACION)



GRAFICA 5.-  **REDUCCION PROCENTUAL DE AFLATOXINA B₁ (94.1 %) USANDO COMO TRATAMIENTO AGUA CON CAL A TEMPERATURA AMBIENTAL**



**GRÁFICA 7.- ■■■■ REDUCCION PORCENTUAL DE AFLA -
TOXINAS (63.5 %), USANDO COMO TRATAMIENTO
CAPSULAS DE BILIS**

DISCUSION

El tratamiento de nixtamalización que ya se ha reportado con anterioridad fue el que más redujo la concentración de aflatoxina B₁ (21). El agua con cal al ambiente creo que hubiese bajado en las mismas proporciones que el anterior, pues es el mismo reactivo, solo que el primero con la reacción más acelerada por el calor. Probablemente si el segundo hubiera permanecido en niveles mayores de tiempo se habría abatido aún más la concentración de toxinas.

Estadísticamente los tratamientos resultaron ser buenos destoxificantes pero el tiempo no influyó en el experimento. Pudiera ser que usando niveles mayores de tiempo si hubiera algo de interferencia e interacción. Sólo que esto dejaría el grano muy húmedo (por el tiempo de contacto con el tratamiento), y sería un tanto difícil al momento de moler antes de la extracción. Posiblemente con una licuadora especial donde no sea necesario que el grano esté seco se pudiera llegar a realizar la extracción.

El ácido cítrico ha sido ya reportado en la literatura como buen inactivante (8). Basándonos en esto, el limón, uno de los tratamientos que por supuesto contiene ácido cítrico, pudiera ser un buen prospecto en la destoxicación de aflatoxinas, pero con mayor tiempo de contacto -

en el producto contaminado. No sólo se podría usar en ---
maíz, sino también en cacahuates y otras bayas comestibles,
nueces, etc.

Por otra parte creemos que el tratamiento con cápsu--
las de bilis pudiera ser otro buen destoxificante, ya no -
sobre un producto contaminado, sino probablemente dentro -
del propio sistema digestivo. Una de las principales fun-
ciones del hígado es la de excretar la bilis (la cual ayu-
da en la digestión). Claro que en el sistema digestivo ocu-
rren muchas reacciones interactuantes, pero creemos que a
pesar de esto, debe de haber un buen porcentaje de destoxi-
ficación, dentro de nuestro cuerpo. La pancreatina, otro
de los componentes de esta cápsula pudiera también de al--
gún modo reducir la toxina. No sabemos en qué medida ni -
cuál de los ingredientes fue el que más inhibió, pero lo -
que sí sabemos es que ahí se encuentra un destoxificante.

CONCLUSIONES

- 1.- Los productos usados redujeron considerablemente la ---
concentración de aflatoxinas.
- 2.- El tiempo no influyó en el experimento.
- 3.- No hubo interacción productos/tiempo.
- 4.- El mejor tratamiento como se esperaba fue el de nixtama
lización, reduciendo la concentración de aflatoxinas en
un 96%.
- 5.- El segundo mejor tratamiento fue el de agua con cal, a
temperatura ambiental, reduciendo la concentración de a
flatoxinas en un 94%.
- 6.- Los tratamientos de jugo de limón y la cápsula de bilis
redujeron cada uno en un 63.5% la concentración de afla
toxinas.
- 7.- Los dos tratamientos de cal (a ebullición y al ambien--
te) se comportaron estadísticamente igual.
- 8.- Los tratamientos de jugo de limón y cápsula de bilis se
comportaron estadísticamente igual.

RECOMENDACIONES

Algunas partes de este estudio, tal como los tratamientos de bilis y limón podrían repetirse, con más tiempo de contacto con el producto contaminado.

Respecto a la hipótesis planteada en la discusión sobre la destoxificación a nivel de los propios órganos del cuerpo, podrían ser meras conjeturas, pero se pudieran realizar bioensayos con animales, dándoles en la ración o inyectándose una cantidad estimada (calculada) de aflatoxina; posteriormente habría que operar y extraer del hígado las aflatoxinas acumuladas. Sabiendo esta cantidad sabríamos el porcentaje de inactivación en la digestión.

Para futuros trabajos sobre inactivantes creo que se deben hacer por lo menos tres repeticiones por producto, - para disminuir el error experimental y aumentar los grados de libertad.

Es recomendable que el personal que se dedique a realizar este tipo de trabajos, tome las precauciones debidas. Sería bueno usar bata desechable, guantes quirúrgicos, mascarilla, mantener esterilizado el lugar de trabajo lavar y esterilizar los materiales usados; también es preferible no comer ni beber en estos lugares.

Para una mejor integración en el estudio de este problema, sería bueno también que se prosiguiera en:

- a) Confirmación de resultados, por medio de pruebas biológicas con patos de un día de nacidos.
- b) Asegurarse de qué es lo que sucede con las aflatoxinas (por lo menos para B1) cuando es usado un inactivante.
- c) Determinar el valor nutritivo de los productos tratados con destoxificantes.

Finalmente para abatir aún más toda contaminación por hongos y otros micro y macroorganismos es necesario intervenir en los diferentes puntos de la producción, comercialización, elaboración y distribución de los productos que pueden contaminarse, y sobre todo mantener en óptimas condiciones de limpieza, humedad y temperatura los almacenes.

RESUMEN

Aspergillus flavus se aisló para contaminar maíz limpio, de esta forma fue como se obtuvieron cantidades relativamente constantes de aflatoxinas dentro del producto -- inoculado.

Se hicieron cuatro muestras para observar si las cantidades de toxina estaban en la misma proporción en todo -- el grano (2600 gr). Tres de las muestras fueron iguales y la otra sólo interfirió en un 10% más.

De los 2400 gr restantes se tomó un kilogramo para poner los tratamientos. Fueron 20 unidades experimentales -- que se usaron a manera de muestras (de 50 gr cada una). Se probaron 5 tratamientos con 2 niveles de tiempo (24 y 72 -- horas) con dos repeticiones cada uno. Los tratamientos fueron: agua con cal a ebullición, agua con cal al ambiente, cápsula de bilis, limón y un testigo para comparar.

Tanto para el muestreo como para el experimento se utilizó el Método de Pons para la extracción de la toxina -- ("acetona acuosa"), y para la cuantificación se hizo en -- cromatografía de capa fina, comparando la fluorescencia -- del estándar con la de las muestras en un cromato Vue de luz ultravioleta.

El diseño estadístico que se usó fue el de completa--

mente al azar con arreglo factorial.

Todos los tratamientos (productos utilizados) resultaron ser buenos inhibidores. El tiempo no influyó en el experimento, ni hubo interacción productos/tiempo. El mejor tratamiento fue el de nixtamalización.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bean G. A., W. L. Klarman, G. W. Rambo y J. B. Sanford. DIMETHYL SULFOXIDE INHIBITION OF AFLATOXIN SYNTHESIS BY *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, - 61:38-381: 1971.
- 2) Boller R. A. and H. W. Schroeder. INFLUENCE OF *Aspergillus chevalieri* ON PRODUCTION OF AFLATOXIN IN RICE BY *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology*. 63:12: 1507-1510: 1973.
- 3) Boller R. A., H. W. Schroeder. INFLUENCE OF *Aspergillus candidus* ON PRODUCTION OF AFLATOXIN IN RICE BY *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology*. 64:1:-121-123: 1974.
- 4) Brekke O. L et al. AFLATOXIN IN CORN: AMONIA INACTIVATION AND BIOASSAY IN RAINBOW TROUT APPLIED AND ENVIROMENTAL. *Microbiology*. 34:1:34-37: 1977.
- 5) Buchanan Jr., R. L. and J. C. Ayres. EFFECT OF SODIUM ACETATE AND GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION BY *Aspergillus parasiticus*. N R R L 299 Journal of Food Science. 41:1:128-132: 1976.
- 6) Bullerman L. B. and Liew and Sally A. Seier. INHIBITION OF GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION BY CINNAMON AND CLOVE OILS, CINNAMIC ALDEHYDE AND EUGENOL. *Journal Food Science*. 42:4:1107-1109: 1977.
- 7) Detroy R. W., E. B. Lillehoj and A. Ciegler. AFLATOXIN - AND RELATED COMPOUNDS. *Microbial toxins*. 6:3 - 178: 1971.
- 8) Doyle M. P. and E. H. Morth. BISULFITE DEGRADES AFLATO--

- XIN: EFFECT OF CITRIC ACID AND METHANOL POSSI--
BLE MECHANISM OF DEGRADATION. Journal of Food -
Protection. 41:11: 891-898: 1978.
- 9) Doyle M. P. and E. H. Morth. BISULFITE DEGRADES AFLATO--
XIN: EFFECT OF TEMPERATURE AND CONCENTRATION OF
BISULFITE. Journal Food Protection. 41:10: 774-
780: 1978.
- 10) F.A.O./ O.M.S./ P.N.U.M.A. Conferencia Mixta sobre Mico-
toxinas. Nairobi, Kenya. 4:2,3,4; 5:1,2,3,4; 6:
2-8; 7:1,2,9; 8:1 : 1977.
- 11) F.A.O./ O.M.S./ P.N.U.M.A. Conferencia Mixta sobre Mico-
toxinas (Perspectiva global sobre Micotoxinas).
Nairobi, Kenya. 6:1,2,3,5,8: 1977.
- 12) Goldblatt L. A. AFLATOXIN SCIENTIFIC BACKGROUNDS CONTROL
AND IMPLICATIONS. Academic Press. pp. 13-287. -
1975.
- 13) Mirocha Ch. J. and C. M. Christensen. MYCOTOXINS AND THE
FUNGI THAT PRODUCE THEM. Proceedings of the A--
mer. Phytopath. Soc. 3: 110-115: 1976.
- 14) Mirocha C. J. and M. Christensen. FUNGUS METABOLITES TO-
XIC TO ANIMALS. Minnesota. p. 303. 1974.
- 15) Paulsen M., G. H. Brusewitz and B. L. Clary. AFLATOXIN -
CONTENT AND SKIN REMOVAL OF SPANISH PEANUTS AS
AFFECTED BY TREATMENTS WITH CHEMICALS: WATER --
SPRAY, HEATED AIR, H2O2, NITROGEN LIQUID. Jour-
nal of Food Science. 41: 667-671: 1976.
- 16) Pons W. A. Jr., et-al. DETERMINATION OF AFLATOXIN IN A--
GRICULTURAL PRODUCTS: USE OF AQUEOUS ACETONE --

FOR EXTRACTION. Assoc. Offic. Anal. Chemist. 7
49: 554-562: 1966.

- 17) Rambo G. W. and G. A. Bean. TREATMENT OF PEANUTS WITH DIMETHYL SULFOXIDE AND ITS EFFECTS ON AFLATOXIN - PRODUCTION BY *Aspergillus flavus*. Phytopathology. 61: 380-382: 1973.
- 18) Raper K. B. and D. I. Fennel. THE GENUS OF *Aspergillus* - spp. pp. 360-404: 1965.
- 19) Schroeder H. W., R. J. Cole, R. D. Brigsby and H. Hein - Jr. INHIBITION OF AFLATOXIN PRODUCTION AND TENTATIVE IDENTIFICATION OF AN AFLATOXIN INTERMEDIATE "VERSICONAL ACETATE" FROM TREATMENT WITH DICHLORVOS. Applied Microbiology. 27:2: 394-399. 1974.
- 20) Swaminathan B. and P. E. Kochler. INSOLATION OF ON INHIBITION OF *Aspergillus parasiticus* FROM WHITE POTATOES (*Solanum tuberosum*). Journal of Food --- Science. 41: 313: 1976.
- 21) Ulloa-Sosa. M. y H. W. Schroeder. NOTE ON AFLATOXIN DECOMPOSITION IN THE PROCESS OF MAKING TORTILLAS. Cereal Chemistry. 46: 4: 397-400: 1969.
- 22) Ulloa-Sosa M., y T. Herrera. Persistencia de las aflatoxinas durante la fermentación del pozol. Rev. Lat. amer. Microbiol. 12: 19-25: 1970.
- 23) Vaqueiro C., y J. C. Morales. Aflatoxinas. Rev. Tecnol. de alimentos. México. 10: 50-58: 1975.
- 24) Zenteno Zebada Martha. Producción de aflatoxinas por cepas de *Aspergillus flavus* aisladas de maíz. Rev. Lat. amer. Microbial. 13: 263-266: 1971.

APENDICE

Comparaciones de medias por el Método de Tukey.

1.- Se ordenan las medias de mayor a menor.

A5: 11.665

A3: 4.375

A4: 4.375

A1: 0.6875

A2: 0.5000

2.- Se calcula $S\bar{y} = \frac{CME}{4} = \frac{0.5170903}{4} = 0.129272575 = 0.3595449$

3.- Se saca de las tablas $q; (, p, n_2) = : 0.05, 5(\text{trat}), 10(\text{g.l.e})$
 $= 4.65$

4.- Calcular $RM = (S\bar{y}) (q) = 0.3595449 \times 4.65 = 1.671883585.$

11.665 - 4.375	: 7.29	1.671883585	≠
4.375 - 4.375	: 0	1.671883585	=
4.375 - 0.6875	: 3.687	1.671883585	≠
4.375 - 0.5000	: 4.875	1.671883585	≠
4.375 - 0.6875	: 3.687	1.671883585	≠
4.375 - 0.5000	: 4.875	1.671883585	≠
0.6875 - 0.5000	: 0.1875	1.671883585	=

