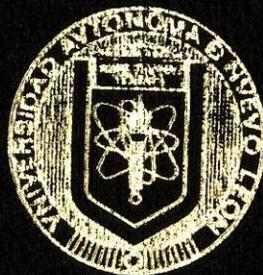


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**



**ENSAYOS Y/O PRUEBAS CON  
AGENTES DESTOXIFICANTES  
EN LA PRODUCCION DE AFLATOXINAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

P R E S E N T A

**RICARDO SOSA ESPINOSA**

CIUDAD UNIVERSITARIA

ENERO DE 1980

2994  
A3  
86  
E.1



1080063280

SECRET  
CONFIDENTIAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE AGRONOMIA



ENSAYOS Y/O PRUEBAS CON AGENTES -  
DESTOXIFICANTES EN LA PRODUCCION DE  
AFLATOXINAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE -  
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO  
PRESENTA EL PASANTE

RICARDO SOSA ESPINOSA

CD. UNIVERSITARIA.

ENERO DE 1980.

T  
2P941  
-A3  
S6



Facultad de Educación  
UANL



UANL  
FONDO  
TESIS LICENCIATURA

Central  
TESIS

A MIS PADRES:

SR. JESUS SOSA ZAVALÁ

Y

SRA. GUADALUPE ESPINOSA DE SOSA

Quienes a través de la libertad,  
comprensión y honestidad, me han  
dado las armas para volar por mí  
mismo el camino de la vida, - --  
animándome en la búsqueda de mi  
propia verdad.

gracias.

A MIS HERMANOS Y CUÑADOS:

Jesús e Irma

Guillermo y Lucila

Nora y Gonzalo

Guadalupe

Leticia

Minerva

A MIS ABUELOS:

Tomás Espinosa Jáuregui (Q.E.P.D.)

Y

Josefina Alcaraz Vda. de Espinosa

A MIS TIOS:

Tomás y Cheryl

Ma. Elba y David

Irma y Hugo

Héctor

A MIS PRIMOS.

A MIS MAESTROS Y ASESORES:

DR. JOSE LUIS DE LA GARZA GZZ.

ING. ALFONSO TOVAR RODRIGUEZ

Q.B.P. SALVADOR MARMOLEJO M.

Que gracias a sus enseñanzas y orientación, fué posible la realización de éste trabajo.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS.

AL CLUB SOCIAL Y  
DEPORTIVO TOROS A.C.

Que de alguna u otra manera  
contribuyeron en la forma--  
ción de mi persona.

gracias.

# I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION . . . . .	1
LITERATURA CONSULTADA . . . . .	4
MATERIALES Y METODOS . . . . .	13
EXTRACCION Y PURIFICACION DE LAS AFLATOXINAS . . . . .	17
ANALISIS PRELIMINARES . . . . .	19
RESULTADOS . . . . .	22
DISCUSION . . . . .	31
CONCLUSIONES . . . . .	33
RECOMENDACIONES . . . . .	34
RESUMEN . . . . .	36
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA . . . . .	38

## INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Toxinas producidas por diferentes especies de - - <u>Aspergillus spp.</u> y sus efectos en la salud del -- hombre.....	6
2	Estructura química de la aflatoxina B <sub>1</sub> y sus - - derivados.....	7
3	Propiedades químicas de las aflatoxinas.....	8
4	Resultados del estudio sobre inactivación de - - aflatoxinas. 1979.....	24
5	Análisis de varianza del estudio sobre inactiva-- ción de aflatoxinas. 1979.....	25

## INDICE DE GRAFICAS

Gráfica No.		Página
1	Tratamiento del grano de maíz infestado con aflatoxinas expuesto en diversas sustancias.....	26
2	Comparación de eficiencia entre el tratamiento de jugo gástrico y los testigos.....	27
3	Comparación de eficiencia entre el tratamiento de agua mineral y los testigos.....	28
4	Comparación de eficiencia entre el tratamiento de NaOCl 1% (Hipoclorito de sodio), y los testigos..	29
5	Resultados del grano de maíz infestado con aflatoxinas tratado en diversas sustancias.....	30

## INTRODUCCION

El maíz es el principal producto de la dieta del mexicano, por lo tanto, la contaminación de este grano por aflatoxinas es considerada fuertemente como un peligro potencial para la salud pública y su cadena alimenticia.

En nuestro país, país subdesarrollado, en donde aún existen regiones indígenas y ciudades o regiones rurales que se encuentran aisladas de las grandes ciudades; es donde la población está más expuesta a la contaminación por aflatoxinas, debido a que en su mayor parte se encuentra subalimentada.

Algunos de los más importantes alimentos vegetales de consumo humano (por ejemplo; las semilla oleaginosas y los cereales, que aportan cantidades considerables de proteínas y calorías a la ración alimenticia) son susceptibles a la contaminación por aflatoxinas, registrándose la mayor incidencia por contaminación en las regiones tropicales y semitropicales. Sin embargo; se han encontrado o detectado aflatoxinas en frutas como el higo, en la leche, nueces y pescado.

Uno de los problemas de la contaminación por aflatoxinas, estriba en los almacenes, debido a que si no se lleva un buen control de las con

diciones de humedad, temperatura, aereación, etc. proliferarían los -- hongos, entre los cuales están Aspergillus flavus y Aspergillus parasí-- ticus que son los que producen aflatoxinas.

Los conocimientos sobre las micotoxinas y sus repercusiones para - la salud son vagos. Las "aflatoxinas" son probablemente las micotoxi-- nas mejor conocidas y se han realizado esfuerzos considerables para ela-- borar métodos de prevención y lucha contra ellas.

Aunque la presencia de moho en los alimentos se ha considerado -- siempre inconveniente, sólo en los últimos años, se han reconocido los grandes efectos que produce en el hombre y los animales.

La falta de su estudio e investigación a nivel nacional nos hace - ver la poca importancia que los programas de gobierno dá a estos estu-- dios y/o investigaciones.

Debido a la extrema toxicidad de las aflatoxinas, es necesario en-- contrar métodos de "destoxificación" ya que las medidas preventivas no bastarán para evitar enteramente la contaminación por aflatoxinas.

En nuevo León, la presencia o detección de aflatoxinas en los pro-- ductos agrícolas nos ha motivado a efectuar investigaciones en su deter-- minación, su cantidad, tipo, distribución y su posible destoxificación.

Los objetivos de este trabajo son :

- 1.- Realizar pruebas inhibitorias a partir de la producción de aflatoxinas con agentes oxidantes ya probados.
- 2.- Probar agentes destoxificantes, o sustancias tales como jugo gástrico y agua mineral, ambas sustancias no han sido reportadas en la literatura consultada, pero existe la posibilidad de que sean buenos inactivantes.
- 3.- Encontrar un inhibidor económico y accesible de modo a que en un futuro próximo, previos estudios o exámenes y/o análisis se puedan utilizar y/o recomendar a nivel de campo.
- 4.- Abrir o ampliar este tipo de investigaciones a nivel local, nacional y escolar.

## LITERATURA CONSULTADA

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos bis furanoisocoumarin--nos tóxicos, cristalinos y muy fluorescentes, biosintetizados por aspergí--llus flavus Link, Aspergillus parasiticus Square y 11 especies más de As--pergillus, que pueden presentarse como contaminantes en cualquier tipo de grano o semilla antes y después de almacenado. (14, 20, 3)

Aspergillus flavus, es un hongo cosmopolita y de potencial peligro, considerado como un importante contaminantes de almacén debido a la segrega--ción de su metabolito secundario llamado aflatoxina B<sub>1</sub>, producto éste, - de sus cuerpos miceliales y solo es encontrado en las esporas en cantida--des infinitesimales (11, 20, 8, 15).

Aspergillus flavus, requiere para su crecimiento y desarrollo, una humedad en maíz o trigo de 18-18.5% ó más, o que el substrato esté en equi--librio con una humedad relativa de 85%, además una temperatura mínima de - 6-8°C, un óptimo de 36-38°C, y un máximo de 44-46°C. La mínima y la máxi--ma temperatura para su crecimiento están afectadas por la humedad, concen--tración de oxígeno, calidad y cantidad del nutriente y otros factores.

A. flavus produce aflatoxina en un intervalo de temperaturas de - 12-42°C, y un máximo de producción de toxina entre 25-32°C, dependiendo de su potencial genético, humedad del substrato, composición y duración del -

substrato asociado al hongo, condiciones ambientales y/o condiciones experimentales de laboratorio específicas (11, 2, 3, 24, 14).

La presencia de Aspergillus flavus, no indica necesariamente una contaminación por aflatoxinas, debido a que no todas las cepas producidas por este hongo tienen la capacidad de producir aflatoxinas; ya que se han comprobado que de 1400 cepas aisladas de fuentes diversas solo el 53% tienen la capacidad suficiente para sintetizar aflatoxinas (12, 2, 16). Por otra parte la ausencia de moho visible no es garantía de que no exista peligro de contaminación por aflatoxina (11).

Diferentes especies del género Aspergillus produce una variedad de toxinas que dañan la salud, como se observa en el Cuadro # 1.

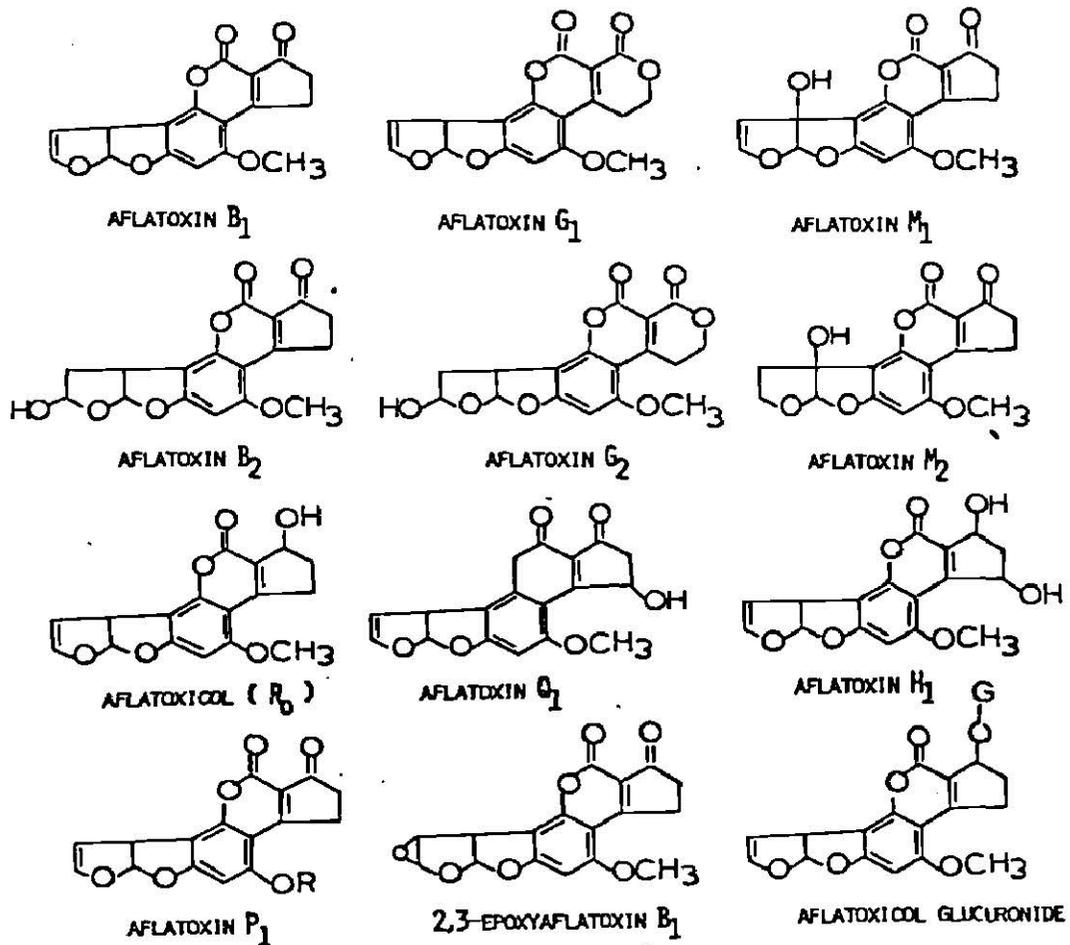
Las aflatoxinas (micotoxinas) no provocan reacciones de inmunidad, son resistentes al calor y no se destruyen con el procesado normal de los alimentos.

CUADRO No. 1. Toxinas producidas por diferentes especies de Aspergillus y sus efectos en la salud del hombre (19).

Toxina	Gen. y sp. involucrado	Descubrimientos	Toxicosis
Acido Kojic	<u>Aspergillus glaucus</u> <u>Aspergillus oryzae</u> <u>Aspergillus tamaril</u>	Aislado en 1907 Estructura de-- terminada en - 1924.	Convulsiones y Perturbaciones gastrointesti- nales.
Ocratoxinas A,B	<u>Aspergillus ocraceus</u> <u>Aspergillus melleus</u> <u>Aspergillus alliaceus</u>	Toxicidad y es- tructura deter- minada en 1965 1967.	Necrosis del - hígado y daño al riñón.
Esterigmatosisti- na.	<u>Aspergillus versicolor</u> <u>Aspergillus nidulans</u> <u>Aspergillus flavus</u> <u>Aspergillus rugulosus</u>	Aislado en 1962	Hiperplasia en hígado y duc-- tos biliares.
Aflatoxina B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , B <sub>2a</sub> G <sub>2a</sub> , R <sub>0</sub> , B <sub>3</sub> , G <sub>1</sub> , etc.	<u>Aspergillus flavus</u>	Toxicidad y Es- tructura deter- minada en 1961- 1967.	Daño de cáncer al riñón, e hi- perplasia en - ductos bilia-- res y parati-- roides.

Buchi et al (19) reportaron el total de las estructuras de aflatoxinas derivadas de B<sub>1</sub>, a continuación se presenta el Cuadro No. 2 con las estructuras químicas de B<sub>1</sub>, y los derivados metabólicos sintetizados -- por hongos o por producto del metabolismo animal.

CUADRO No. 2. Estructura química de la aflatoxina B<sub>1</sub> y derivados (19).



En el Cuadro No. 3 aparecen las propiedades químicas de las aflatoxinas.

CUADRO No. 3. Propiedades químicas de las Aflatoxinas. (19)

Aflatoxina	Fórmula molecular.	Peso molecular.	Punto de fusión.	Absorción	Fluorescencia
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268 - 269	21,800	425
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286 - 289	23,400	425
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244 - 246	16,000	450
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237 - 240	21,000	450
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299	19,000	425

Las aflatoxinas pueden ser inactivas por medios físicos, químicos y biológicos.

#### Inactivación química.

Existen varios métodos de destoxificación; a escala industrial solo aquellos en los que se usa amoníaco se emplean con frecuencia.

Se ha desarrollado un proceso de destoxificación de maíz, basándose en el uso del amoníaco acuoso a presión atmosférica. Este método no -

no plantea problemas tecnológicos, pero el maíz obtenido se decolora, quedando su uso limitado para alimentos animales; y su mecanismo de inactivación demostró que la aflatoxina B<sub>1</sub> se combina con macromoléculas proteínicas y con ello queda inactivada, sin embargo, aún está en estudio la evaluación toxicológica del producto final. (11)

Algunos investigadores han dirigido sus esfuerzos a prevenir la contaminación por aflatoxinas, Rao y Harein (21), demostraron que Diclorvos a 20 ppm. aplicado antes de la inoculación con Aspergillus flavus sobre maíz y cacahuete inhibió la producción de aflatoxina y previno esta producción en trigo.

En otro experimento, Rao y Harein (23), demostraron que Diclorvos a 5 mg./ml. y 10 mg./ml. redujo la producción de aflatoxina en un 62 y 59% en maíz, trigo y cacahuete.

Schroeder et al (23) confirmaron que diclorvos aparentemente inhibe la formación de la estructura del anillo difurano en las aflatoxinas.

Sreenivasamurthy et al. (8), observaron la eficiencia de varias soluciones salinas en harina de cacahuete contaminada con aflatoxinas y comprobaron que una solución de bicarbonato de sodio al 1% remueve completamente la toxina, pero el 33% de la proteína también es extraída, sin embargo una concentración de cloruro de calcio redujo la concentración de afla-

toxina en un 80% con solo 6% de proteína extraída. Se sugiere, que aunque ambas sustancias son usadas como solventes de extracción, pueden ser un instrumento para la práctica en la destoxificación.

Yang (24) llevó a cabo experimentos comparativos entre los efectos del NaOCl (hipoclorito de sodio) y los blanqueadores comerciales sobre la destoxificación de aflatoxinas, y observó que tanto el hongo como la toxina fueron destruídos por los blanqueadores comerciales y el NaOCl a concentraciones de 7.0 por  $10^{-3}$  M en un período de 5 días. Davis y Diener (8) reportaron que sustancias como ácido p-aminobenzoico, sulfato de potasio y fluoruro de potasio inhibieron tanto el crecimiento microbiano como la producción de toxina.

Trager y Stoloff (8) recomendaron, después de un estudio extensivo sustancias como sulfato de amonio, hipoclorito de sodio, permanganato de potasio, borato de sodio y peróxido de hidrógeno; en la posible destoxificación de aflatoxinas, debido a que todos estos reactivos reaccionaron con las cuatro principales aflatoxinas y obviamente pueden ser más apropiados para la inactivación para proteger el personal que trabaje en la destoxificación de alimentos y productos alimenticios. (8)

Bean et al. (1) observaron que sustancias como dimetil sulfóxido requieren de altas concentraciones que van desde un rango de 5,000 a 50,000 ppm. para lograr la inhibición de aflatoxinas y el micelio del hongo.

Dwarakana et al. (8) reportaron que los niveles de aflatoxina B<sub>1</sub> fueron grandemente reducidos por medio de la ozonización, aplicando 25 mg. de ozono a una temperatura de 100°C

Bullerman et al. (5) observaron que en pan fresco y con pasas y a base de canelo no permite el crecimiento y/o desarrollo del hongo, y por lo tanto, no se genera aflatoxina. Se ha reportado que aceites esenciales de ciertas especies, producen efectos microbiales.

Bullerman et al. (6) concluyeron de sus investigaciones que el canelo inhibe el crecimiento del hongo y la producción de aflatoxina, ellos comprobaron que el aceite de clavo y de canelo a 200 y 250 ppm., aldehido de canelo y eugenol a 150 y 125 ppm. inhibieron totalmente el crecimiento del hongo y la producción de la toxinas.

Doyle y Marth (9), sugirieron que el bisulfito (SO<sub>2</sub>) a razón de 2,000 ppm. ó más con un incremento de la temperatura puede reducir la cantidad de aflatoxina a un nivel aceptable, en base a la alta reactividad química del bisulfito, y a que es un aceptable aditivo en los alimentos. Estos mismos investigadores (10) realizaron un experimento para demostrar el efecto del ácido cítrico y metanol, en la inactivación de aflatoxinas por bisulfito, y concluyeron que el metanol y el ácido cítrico probablemente tienen efecto en la oxidación del bisulfito y sugirieron que la degradación de aflatoxina está dependiente de la oxidación del bisulfito.

Paulsen et al. (17) realizaron un experimento en cacahuate sin cáscara probando aire caliente a presión, nitrógeno líquido,  $H_2O_2$ , HCL, oleato de sodio y spray de agua (agua rociada); y concluyeron que los tratamientos más efectivos que produjeron bajos niveles de aflatoxina fueron  $H_2O_2$ , spray de agua y HCL.

#### Inactivación Física.

Las aflatoxinas son termoestables y sólo se degradan por una exposición muy prolongada a altas temperaturas.

Coomes et al. (8) observaron que en muestras de harina humedecida de cacahuate con un contenido de 7,000 mgrs./Kg. de aflatoxinas fueron reducidas a un nivel de 350 mgrs./Kg. tratándola en el autoclave a 15 lb./pulg.<sup>2</sup> a 120°C. durante 4 horas.

Lee y colaboradores (8) reportaron un promedio de reducción de 80% y 60% de aflatoxina  $B_1$  y  $G_1$  después del tostado del cacahuate a una temperatura de 150°C durante 0.5 horas.

#### Inactivación Biológica.

Se ha reportado que Flavobacterium sp. NRRL B-184 incubado en alimentos contaminados con aflatoxinas, como leche, aceite, cacahuate, mantquilla de cacahuate y maíz son destoxificados rápida y completamente, no produciendo otros elementos o productos tóxicos. Teunisson y Robertson ( ) observaron que el protozoario Tetrahymena pyriformis es capaz de disminuir el contenido de aflatoxina  $B_1$  en un 58% en 24 horas y hasta un 67% en 48 horas. (8)

## MATERIALES Y METODOS

El presente experimento se realizó, en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., en Ciudad Universitaria.

### MATERIALES.

Se utilizó grano de maíz completamente limpio proveniente de una tienda comercial, 15 matraces Erlenmeyer, 15 cajas petri, 16 frascos de vidrio con capacidad de 150 grs., 50 cc. de jugo gástrico, hipoclorito de sodio, agua mineral, asas, etiquetas. Se utilizaron los materiales y -- equipo necesarios para la extracción, purificación y cuantificación de -- aflatoxina, como son : Acetona, cloroformo, acetato de plomo, eter etilico, celite analítico, gel de sílice, sulfato de sodio anhidro, micropipetas del', 2 y 5 microlitros, cámara de incubación, baño maría, aparato de luz ultravioleta para cromatografías (Cromato-Vue), estufa.

### METODOS.

Básicamente este trabajo se dividió en 5 etapas y son :

- I.- Aislamiento y cultivo del hongo Aspergillus flavus.
- II.- Inoculación del grano con Aspergillus flavus.
- III.- Establecimiento del diseño experimental adecuado.
- IV.- Aplicación de Inhibidores.
- V.- Resultados.

### I. Aislamiento y cultivo de Aspergillus flavus :

A fin de obtener las cantidades necesarias de aflatoxina para realizar las pruebas inhibitorias se procedió a aislar y cultivar el hongo Aspergillus flavus en grano de maíz comercial, se procedió a una desinfección superficial del grano con hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto y posteriormente lavado con agua esterilizada dos veces consecutivas. En seguida los granos fueron colocados en cajas petri con agar-antibiótico; utilizando 10 granos por caja petri. La incubación fué hecha a 30°C. por 5 ó 6 días, al fin de los cuales se procedió a separar las colonias de Aspergillus flavus transplantándolas a tubos inclinados con un medio de agar Czapek, medio en el que fueron conservados para resiembras sucesivas de otros experimentos (25).

### II. Inoculación del grano con Aspergillus flavus :

Se obtuvo primeramente grano limpio esterilizado superficialmente en 15 matraces Erlenmeyer llenados con grano a 3/4 partes de su capacidad. En seguida se procedió a inocular o sembrar con las cepas de Aspergillus flavus bajo una rigurosa asepsia colocando después los matraces en una cámara de incubación a 30°C.; a los 5 días se procedió a agregarles agua estéril para obtener así un rápido crecimiento del hongo.

A los 30 días el grano estaba completamente cubierto por micelio y esporas del hongo, dando una apariencia verdosa y un olor poco común.

Después se procedió a separar el crecimiento vegetativo del hongo del grano invadido con la finalidad de obtener el grano lo más limpio posible. Para llevar a cabo lo anterior, se debió llevar los matraces al autoclave con la finalidad de aniquilar el hongo y parar así la producción de aflatoxina.

Una vez eliminado el patógeno se llevó a cabo el secado del grano en una estufa fuera de uso, tomándose una temperatura interior de 32°C. Seco el grano, se procedió a tomar dos muestras de 50 grs. al azar y se llevaron al laboratorio para un análisis cuali-cuantitativo de aflatoxina resultando ambas muestras con 10,000 ppb. procediéndose después a resolver todo el grano con el fin de hacer homogéneo el material experimental (grano).

### III. Establecimiento del diseño experimental :

En este experimento se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, para evaluar el mejor tratamiento y mejor nivel respectivamente.

Los tratamientos a probar fueron; jugo gástrico, agua mineral, hipoclorito de sodio al 1% y testigo; todos a 2 niveles de tiempo de 24 y 72 horas con 2 repeticiones. El experimento consistió en aplicar el inhibidor a determinada hora y a las 24 y 72 horas se retiraban los inhibidores para su posterior cuantificación.

#### IV. Aplicación de los inhibidores :

Se procedió a colocar 50 grs. del grano contaminado en cada uno - de 16 frascos previamente esterilizados, para después continuar con la - aplicación de 50 ml. de inhibidor por tratamiento.

##### Aplicación del tratamiento 1 (Jugo Gástrico)

Se diluyeron 50 ml. de jugo gástrico en 150 ml. de agua destilada con la finalidad de extraer un total de 200 ml. de jugo gástrico para su posterior aplicación en las 4 muestras (2 muestras a 24 hrs. y 2 muestras a 72 hrs.)

##### Aplicación del tratamiento 2 (Agua Mineral).

Se aplicaron 50 ml. de agua mineral por muestra, 2 muestras a 24 hrs. y 2 muestras a 72 hrs. para su posterior cuantificación.

##### Aplicación del tratamiento 3 (Hipoclorito de Sodio al 1%)

Se procedió a la aplicación de 50 ml. de hipoclorito de sodio al 1% por muestra, 2 muestras de 24 hrs. y 2 muestras de 72 hrs., para su posterior cuantificación.

##### Aplicación del tratamiento 4 (Testigo)

Este tratamiento consistió en dejar el grano sin agente inhibidor, con el fin de comparar los resultados. Para la extracción y purificación

de las muestras se utilizó el método de Pons et al. (18) como se detallá a continuación :

#### Extracción.

De cada una de las muestras se pesaron 50 grs. de grano de maíz y se molieron o quebraron en un molino Wiley, colocándose el grano molido en matraces de 500 ml. para posteriormente agregar 250 ml. de acetona al 70% y llevarse al agitador mecánico por 30 min., filtrándose posteriormente a través de papel filtro Wathman # 4 en un embudo de filtración rápida (al vacío). Después se colecta el filtrado, no menos de 150 ml. en un vaso de precipitado de 400 ml.

#### Purificación del extracto.

Al filtrado colectado (150 ml.) se le agregan 60 ml. de agua destilada y 20 ml. de acetato de plomo al 10%.

Se hierve la muestra hasta reducir el volúmen a 175 ml.; luego el extracto crudo, hervido y frío, se le agrega de 3 a 4 grs. de celite analítico como ayuda para filtrar, se agita y se filtra a presión reducida en embudo Buchner al cual se le había puesto papel wathman # 4 de 5.5 cm. de diámetro. La torta de filtrado se lava con 60 ml. de acetona al 20%, combinándose posteriormente el filtrado y la solución del lavado. La mezcla se coloca en un embudo de separación y se le añade 50 ml. de cloroformo. Se agita vigorosamente por espacio de 1 min. aproximadamente, permi-

tiendo luego que las fases se separen. La fase inferior (clorofórmica) se transfiere a un vaso de precipitado de 250 ml.

Con la fase que queda en el embudo se repite la extracción añadiéndole otros 50 ml. de cloroformo; ya separadas las fases clorofórmicas se mezclan y se ponen a evaporar hasta un volumen de 2 a 3 ml. Estos a la vez se transfieren cuantitativamente a una columna de cromatografía preparada en un tubo Butt, agregando no más de 10 ml. de cloroformo. Después de esto se percolan 100 ml. de éter etílico a través de la columna.

Se desecha el éter percolado y luego se le agrega 150 ml. de cloroformo metanol al 3%, colectando el diluido en un vaso de precipitado de 250 ml. y se evapora hasta tener 2 ml. aproximadamente. (Nota; para preparar la columna cromatográfica se hace lo siguiente: En el tubo Butt se coloca primeramente fibra de vidrio que sirve como soporte, posteriormente se le añade una capa de 1 a 2 mm. de sulfato de sodio anhidro, luego se coloca una capa de gel de sílice y al final se pone otra capa de sulfato de sodio anhidro de aproximadamente 2 mm. de espesor).

Los 2 ml. del colectado se transfieren al baño maría hasta llegar a sequedad. Finalmente ya seco, se tapa perfectamente bien el frasco y se guarda en el refrigerador para posteriormente realizar los análisis cualitativo y cuantitativo de las aflatoxinas.

ANALISIS PRELIMINARES DE LAS MUESTRAS  
EN CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (C.C.F.)

Para el examen preliminar se utilizan placas de vidrio de 20x20 cm. y una capa de sílica gel de 250 micras de espesor. Se lavaron bien 5 - placas de vidrio de 20 cm. x 20 cm. y se secaron. Ya secas se prepara - la sílica gel en una proporción de 50:90 de sílica y agua respectivamen - te, se vierte en el aplicador, con el cual se corren las placas para ob - tener un grosor de 250 micras, se dejan secar al aire y se ponen en la - estufa para secarlas completamente por 1 hora a 110°C.

A los extractos secos y purificados se les agregó 10 ml. de cloro-- formo en el caso del jugo gástrico, en el caso del agua mineral se le -- agregaron 15 ml. de cloroformo, en las muestras de hipoclorito de sodio se le agregaron 15 ml. y por último en el caso de los testigos también - se le agregó 15 ml.

Las diluciones que fueron aplicadas a los diferentes tratamientos - se basaron en el conocimiento de que había cantidades de aflatoxinas su - periores a 300 ppb. en algunos casos.

Se colocaron muestras de extractos de 1 microlitro y muestras del - estandard cuantitativo de 1, 2 y 5 microlitros ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ) sobre --

las placas preparadas anteriormente colocando las manchas a una distancia entre ellas de aproximadamente 1 cm. sobre la línea de 4 cm. de la base de la placa.

Se usaron micropipetas de 1, 2 y 5 microlitros; estas deben mantenerse en posición vertical para obtener manchas circulares en el desarrollo de la cromatografía en capa fina.

Se procesaron 4 placas, en donde cada placa tenía 8 muestras; éstas se dividieron en muestras de 24 horas y muestras de 72 horas; por lo tanto, 2 de las placas sobrantes se utilizaron para verificar los resultados.

En un tanque de desarrollo se colocaron 150 ml. de solvente cloroformo-acetona al 13% recién preparado, no dejando saturar el tanque, se colocaron las placas dejando correr el solvente, hasta que el solvente alcance la línea superior de la placa (aproximadamente un desplazamiento de 12 cm.), ya recorrido el solvente la distancia señalada se sacan las placas y se dejan secar al aire por 5 ó 10 min.

Una vez secas, las placas se observaron bajo luz ultravioleta de onda larga en un aparato especial (Cromato-vue).

Posteriormente las manchas de las muestras eran comparadas en intensidad de fluorescencia como lo indica el método utilizado y en seguida se

procedía a hacer los cálculos según la fórmula siguiente, para determinar la cantidad de aflatoxinas contenida en cada una de las muestras :

$$\text{ppb de aflatoxina B}_1 = \frac{(V_s) (C_s) (S_d) (1000)}{(W) (X) (0.6)}$$

En donde :

$V_s$  : Microlitros del estándar de aflatoxinas en el cual la mancha  $B_1$  de la muestra coincide con la mancha  $B_1$  del estándar.

$C_s$  : Concentración de aflatoxina  $B_1$  en la solución estándar de aflatoxina (mg./ml.)

$S_d$  : Volúmen a la cual se diluye el extracto de la muestra para el análisis de CCF en microlitros.

$W$  : Peso de la muestra en gramos.

$X$  : Microlitros del extracto usado en las manchas.

El mismo procedimiento se utiliza para calcular las aflatoxinas  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$ .

## RESULTADOS

Se procesaron 16 muestras de grano de maíz inoculado previamente con *Aspergillus flavus*, para determinar la cantidad de aflatoxina presente en cada una de las muestras, después de haber sido sometidos cada una a los tratamientos de inactivación.

Estadísticamente el experimento no aportó diferencia significativa, entre los tratamientos y el tiempo no influyó en el grado de inactivación.

En el Cuadro No. 4, se enuevan las cantidades de aflatoxinas  $B_1$  en ppm., mencionando sus respectivos tratamientos, repeticiones y niveles.

En el Cuadro No. 5, se representa la tabla de análisis de varianza del experimento.

En la gráfica No. 1, se representan los diferentes tratamientos a que fueron sometidas las 16 muestras, comparándose el grado de eficiencia de inhibición de aflatoxina  $B_1$ .

En la gráfica No. 2, se observa una comparación de eficiencia entre el tratamiento de jugo gástrico y los testigos con sus respectivos niveles.

En la gráfica No. 3. Se observa una comparación de eficiencia - entre agua mineral y los testigos con sus respectivos niveles.

En la gráfica No. 4. Se observa una comparación de eficiencia - entre el hipoclorito de sodio 1% y los testigos con sus respectivos niveles.

En la gráfica No. 5. Se observan los resultados promedio de -- aflatoxina B<sub>1</sub> para cada uno de los tratamientos con sus respectivos niveles.

CUADRO No. 4. Resultados del estudio sobre inactivación de aflatoxina.

TRATAMIENTO	REPETICION	TIEMPO (EXPUESTO AL INACTIVANTE) EN HORAS.	CANTIDAD DE AFLATOXINA EN PPM.
Jugo Gástrico	1	24	10.000
" "	1	72	.666
" "	2	24	.666
" "	2	72	10.000
Agua Mineral	1	24	.500
" "	1	72	4.000
" "	2	24	.500
" "	2	72	2.500
Hipoclorito de Sodio al 1%	1	24	7.500
" "	1	72	10.000
" "	2	24	4.500
" "	2	72	5.000
Testigo			
"	1	24	10.000
"	1	72	10.000
"	2	24	10.000
"	2	72	9.000

CUADRO No. 5. Análisis de Varianza del estudio sobre inactivación de aflatoxinas --  
 (datos del Cuadro No. 4), 1979.

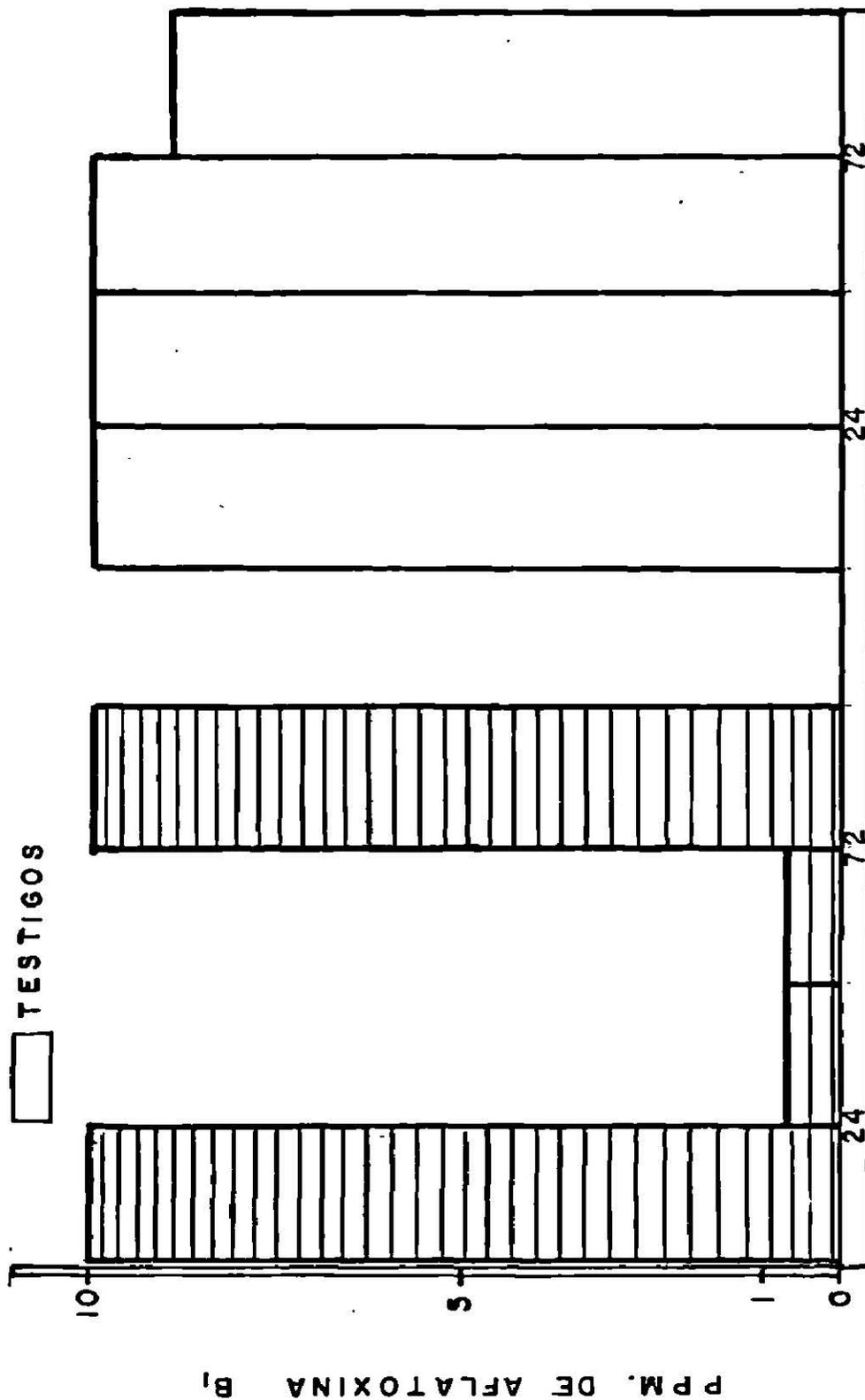
F. V.	G.L.	S. CUADRADOS	C. MEDIOS	F. CALC.	F. TEORICA
Media	1	574.0015764			
Inhibidores	3	136.0885592	45.36285	3.6848	3.69
Tiempo	1	8.3246514	8.3246514	.6762	246
Interacción	3	8.2378485	2.7459495	.2230	8.69
Error	8	98.4862356	12.3107794		26.83
TOTAL	16				



TRATAMIENTOS

JUGO GASTRICO

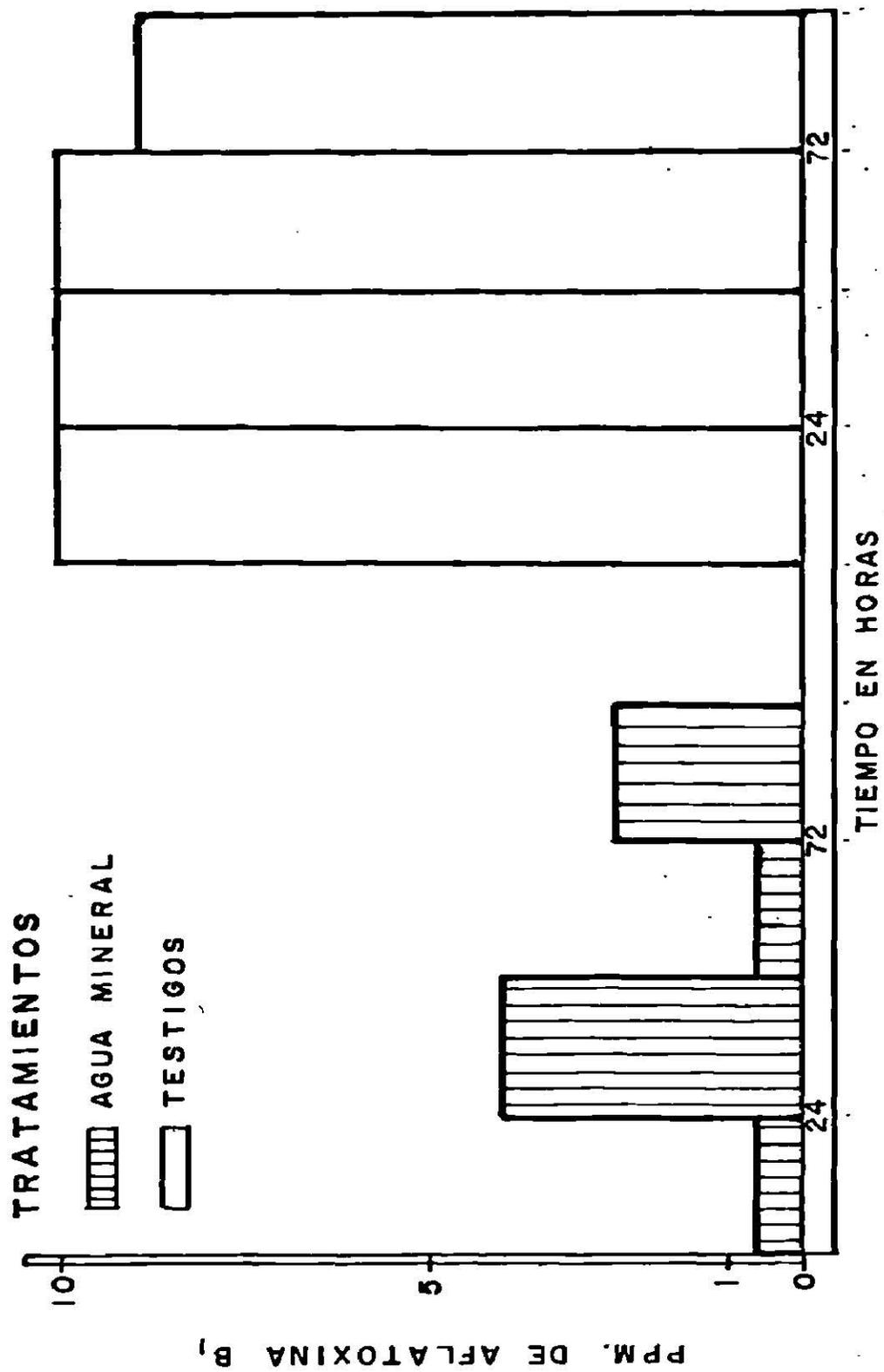
TESTIGOS



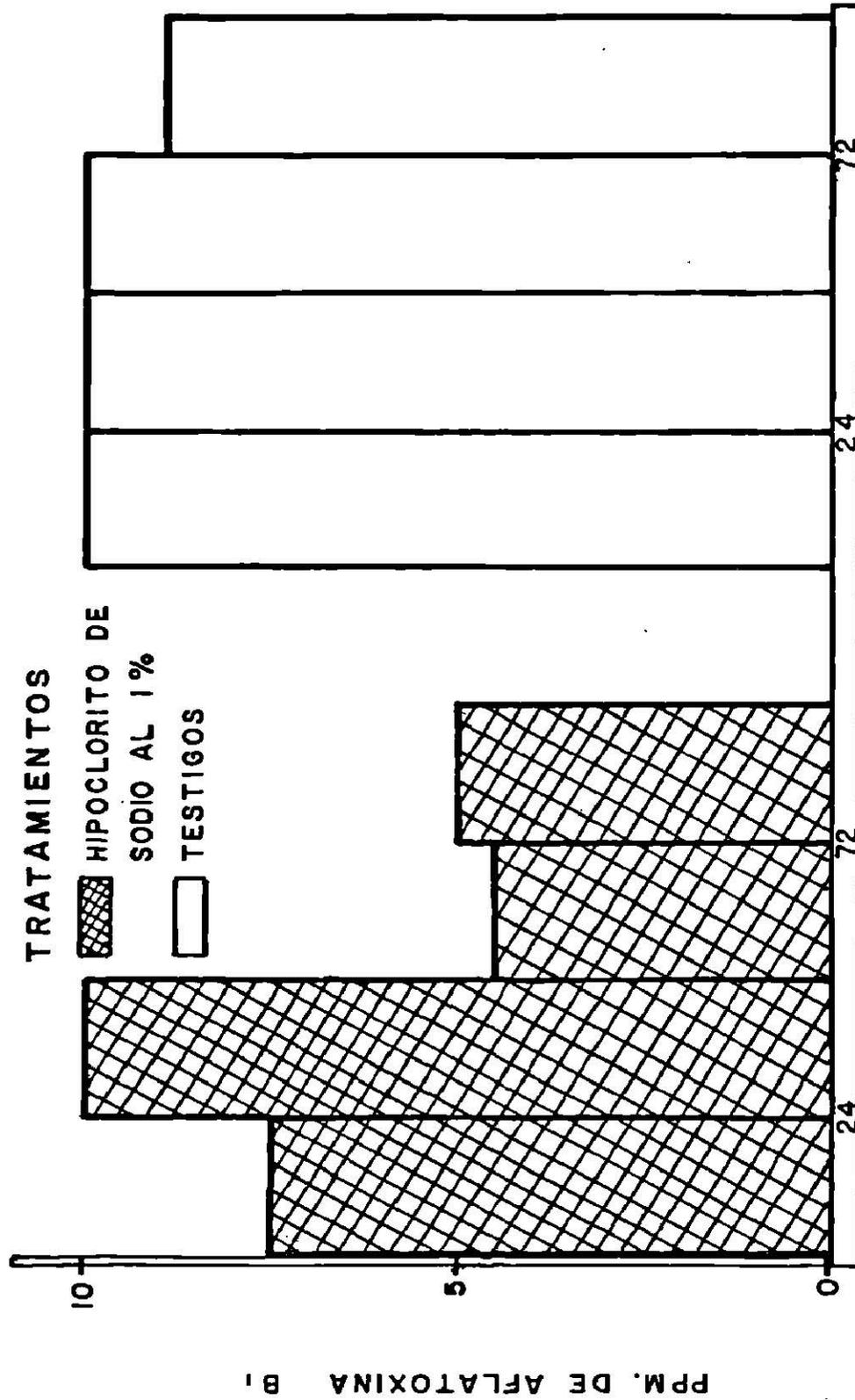
TIEMPO EN HORAS

GRAFICA 2.- COMPARACION DE EFICIENCIA ENTRE EL TRATAMIENTO DEL JUGO GASTRICO Y LOS TESTIGOS

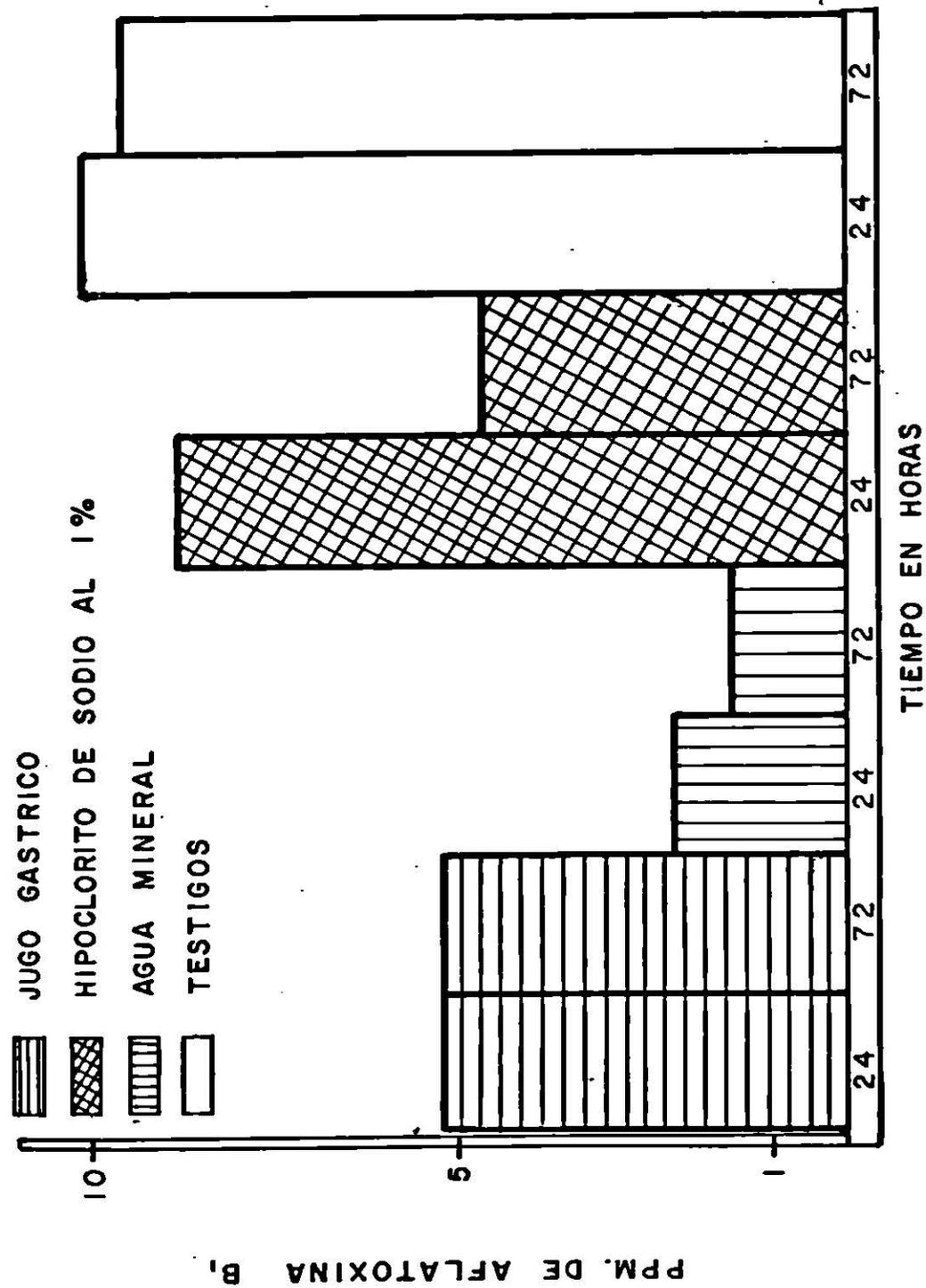
P.M. DE AFLATOXINA B1



GRAFICA 3.- COMPARACION DE EFICIENCIA ENTRE EL TRATAMIENTO DE AGUA MINERAL Y LOS TESTIGOS



GRAFICA 4.- COMPARACION DE EFICIENCIA ENTRE EL TRATAMIENTO DE NaOCL 1% Y LOS TESTIGOS



GRAFICA 5.- RESULTADOS DEL GRANO DEL MAIZ INFESTADO CON AFLATOXINAS TRATADO CON DIVERSAS SUSTANCIAS

## DISCUSION

Objetivamente, este trabajo consistió en destoxificar 16 muestras de maíz contaminado con 10,000 ppb. de aflatoxina B<sub>1</sub>/muestra.

Al resolver estadísticamente los resultados proveniente de los cálculos cuantitativos, se reportó que no hubo diferencia significativa entre tratamientos y que el tiempo al cual estuvieron expuestos los tratamientos tampoco influyó en el experimento.

Sin embargo, al comparar individualmente los tratamientos con los testigos, se observó que en realidad si hubo una baja en la destoxificación, pero la alta variabilidad entre los tratamientos del mismo nivel no aportó estadísticamente la diferencia deseada.

Esta alta variabilidad entre los tratamientos del mismo nivel se pudo deber a factores como; mala homogeneidad de las unidades experimentales (o sea, que no todas las muestras tuvieran contaminadas con 10,000 ppb. ), método más adecuado al secar el grano antes de moler, mal manejo al etiquetar las muestras en el laboratorio, un otros factores.

La mayoría de los investigadores al realizar trabajos de inactivación química, por lo general buscan que el inactivador acabe con el hongo, y que a la vez provoque baja producción de toxinas.

Sin embargo, el tratamiento # 2 basado en el agua mineral inhibió la toxina un 81.25%; en comparación con un experimento realizado por -- Sreenivasamurthy (8) en el cual reportó que una solución concentrada de - - cloruro de calcio inhibió un 80% de la producción de toxina.

El tratamiento # 3 basado en el hipoclorito de sodio al 1% inhi-- bió en un promedio de 4 muestras, la producción de aflatoxinas B<sub>1</sub> a un 38% en comparación con el experimento realizado por Yang (24) en el cual cant<sup>u</sup>dades de  $7.0 \times 10^{-3}$  M. en un período de 5 días inhibió totalmente la pro-- ducción de toxina.

El tratamiento # 1 basado en la aplicación de jugo gástrico destoxificó en un promedio de 4 muestras 46.67% de la producción de aflatoxina; es de observar, que el jugo gástrico está compuesto principalmente de HCL y de un cierto número de enzimas; se ha reportado que el HCL puede llegar a destoxificar a un nivel muy bajo, la producción de toxina. (17)

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados experimentales y los análisis estadísticos se concluye lo siguiente :

- 1.- Que no hubo diferencia significativa entre tratamientos y que el tiempo no influyó en los tratamientos.
- 2.- Se deduce que, a mayor concentración y a mayor tiempo de exposición del grano con el destoxificante deseado, existe mayor probabilidad de inhibir totalmente la toxina.
- 3.- Que la falta de otra repetición era necesaria para obtener mayor confiabilidad del experimento.
- 4.- En todos los tratamientos, a excepción del # 4, hubo una baja en la producción de aflatoxina B<sub>1</sub>.
- 5.- Aparentemente, a pesar de la variabilidad que hubo dentro de cada uno de sus niveles, agua mineral fué el mejor inactivante.
- 6.- Al parecer a cada uno de los tratamientos a probar, les faltó más concentración de sus soluciones base.

## RECOMENDACIONES

- 1.- Se recomienda que para conocer la eficacia del procedimiento de destoxificación, se lleven a cabo las siguientes medidas:
  - A). Analizar física y químicamente las aflatoxinas por un método oficial, ejecutándose estos análisis por lo menos en dos laboratorios simultáneamente.
  - B). Si este análisis demuestra que la destoxificación tuvo éxito, se realizarán pruebas con patitos de 1 día de edad; una vez sacrificados se examinarán histológicamente hígado y riñones.
  - C). Conocer la reacción de las aflatoxinas al estar en contacto con el agente destoxicante, así como los riesgos y condiciones de reversibilidad que darían de nuevo las toxinas.
  - D). Determinar el valor nutritivo general y la composición de aminoácidos después del tratamiento.
- 2.- Se recomienda tener especial cuidado al trabajar con este tipo de toxinas.
- 3.- Se recomienda efectuar el mismo experimento, o al menos repetir los tratamientos de jugo gástrico y agua mineral, apegándose más a la lectura oficial.

- 4.- Se recomienda realizar pruebas de inactivación, con agentes que puedan ser adheridos a los alimentos sin peligro de residualidad.
- 5.- Se recomienda que cualquier tipo de información de aflatoxinas, sea -  
dado a conocer de una forma más amplia a la opinión pública, para que exista conocimiento de estos contaminantes.

## RESUMEN

Este trabajo se realizó en 5 etapas en 7 meses, dando comienzo el 11 de Septiembre de 1978 y terminando el 22 de Abril del 79.

Las etapas son :

- 1.- Aislamiento del hongo Aspergillus flavus Link.
- 2.- Inoculación al grano con el hongo Aspergillus flavus Link.
- 3.- Establecimiento del diseño experimental adecuado.
- 4.- Aplicación de los agentes inactivantes.
- 5.- Resultados.

Los tratamientos experimentales fueron: Jugo gástrico, agua mineral, hipoclorito de sodio al 1% y los testigos con 2 niveles de tiempo 24 y 72 horas. En las 16 muestras de grano de maíz, analizados cuali--cuantitativamente se observó, que en todos los tratamientos hubo una baja, si no considerable, al menos aceptable en la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Promediando las 4 muestras por tratamiento, se observó, que el --tratamiento # 1 con base en el jugo gástrico disminuyó en un 46.67% la --cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub>; el tratamiento # 2 en base a agua mineral, --

disminuyó un 81.25% la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub>; el tratamiento # 3 -- con base al hipoclorito de sodio al 1%, disminuyó en un 38% la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub>.

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

- 1.- BEAN A.G. et al. Dimethyl sulfoxide inhibition of aflatoxin synthesis by Aspegillus flavus. *Phytopathology* 61:380-382. 1970
- 2.- BOLLER R.A. Y H.W. SCHROEDER. Influence of relative humidity on production of alfatoxin in rice by Aspegillus parasiticus. *Phytopathology* 64:17-21. 1973
- 3.- BOLLER R.A. Y H.W. SCHROEDER. Production of aflatoxin by cultures - derived from conidia Stored in the laboratory. *Mycology* 66: - 61-66. 1974
- 4.- BUCHANAN J.R., N.F. SOMER Y R.J. FORTLAGE. Aspergillus flavus infección y producción de aflatoxinas en fruto de la higuera. *App1. Microbial.* 30 (2): 238-241. 1975
- 5.- BULLERMAN L.B. Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. -- *Journal of food Science.* 39 (1): 1162-1165. 1974.
- 6.- BULLERMAN L.B. F., F.Y. LIEW Y S.A. SEIER. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of food Science.* 42(4): 1107-1109. 1977.

- 7.- CALVERT H.O. et al. Aflatoxin B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> production in developing zeamays kernels from mixed inocula of Aspergillus flavus y A. parasiticus. Phytopatology. 68: 501-506. 1977.
- 8.- DETROY W.R., E.B. LILLEHOJ Y CIEGLER A. Aflatoxin and related compounds, Microbial toxins. 6: 3-178. 1971.
- 9.- DOYLE M.P. Y E.H. MARTH. Bisulfite degrades aflatoxin: Effect of citric acid and methanol and possible mechanism of degradation. Journal of food Protection. 41 (11): 891-896. 1978.
- 10.- DOYLE M.P. Y E.H. MARTH. Bisulfite degrades aflatoxin: Effect of temperature and concentration of bisulfite. Journal of food protection. 41 (10): 774-780. 1978.
- 11.- F.A.O., O.M.S. Y P.Y.U.M.A. Conferencia mixta sobre microtoxinas - tema 7, 8 del programa. Nairobi Kenya. 1977.
- 12.- FRANK H.K. El problema de las microtoxinas en alimentos y bebidas. Zentral Bl. Bakteriologie parasitenkunde infektionskrankheiten KRHYG ERSTE ABT OSIG SEIHE B. HYG PRAEV MED. 159 (4): 424-434. 1974.
- 13.- GARZA CH. J. Determinación de aflatoxinas en alimentos balanceados para aves en la zona avícola del estado de Nuevo León, México. Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis. 1978.

- 14.- GOLDBLATT, L.A. 1969. Aflatoxin a Scientific Background control and Implications. ( Food Science Techonology ). Academic Press - - New York. pp. 36-46.
- 15.- JAMIESON, M. 1974. Manejo de alimentos, Ecología del almacenamiento editorial Pax, México D.F. 1:84-85.
- 16.- KOEHLER, P.E., R.T. HAMLIN Y L. BERAHA. Producción de aflatoxinas B y G, por Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus aislados - del mercado de pecanas Appl. Microbial 30 (4): 581-583. 1975.
- 17.- PAULSEN M.R. et al. Aflatoxin content and skin of spanish peanuts as affected by treatments with Chemicals, water spray heated air, and liquid nitrogen. Journal of food Science. 41: 667-671. - - 1976.
- 18.- PONS, W.A. JR. et al. Determination of aflatoxins in agricultural - products: Use of aqueous acetone for extraction. J. Assoc. -- Offic. Anal. Chemist. 49: 554-562. 1966.
- 19.- PETTIT, E.R. Y R.A. TABER. Symposium on Mycotoxicology food and feed contamination. Proceedings of the american Phytopathological - Society. 3: 99-125. 1976.
- 20.- STOLOFF L. Incidence, Distribution and disposition of products - -- containing aflatoxins. Proceedings of the american Phytopatho-- logical Society. 3: 166. 1976.

- 21.- RAO, H.R. Y P.K. HAREIN. Dichlorvos as an inhibition of aflatoxin production on wheat, corn, rice and peanuts. *Journal of Economic Entomology*. 65(4): 988-989. 1972.
- 22.- REISS, J. Micotoxinas en alimentos. La influencia de varios papeles metálicos en el crecimiento de Aspergillus flavus y la formación de aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> en algunos tipos de pan rebanado. *Food Cosmet Toxicol*. 13 (3): 325-330.
- 23.- SCHROEDER, H.W., R. COLE, R.D. GRIGSBY AND H. HEIN SR. Inhibition of aflatoxins production and tentative identification of an aflatoxin, intermediate "versiconal acetate" from treatment with dichlorvos. *Appl. Microbiology*. 27 (2): 394-399. - 1974.
- 24.- VAQUEIRO, C. Y J.C. MORALES. Aflatoxinas Rev. Tecnología de alimentos, México. 10:50-58. 1975.
- 25.- ZENTENO ZEBADA M. Producción de aflatoxinas por cepas de Aspergillus flavus aislados de maíz. *Rev. Lat. Amer. Microbiol* 13:263-266. 1971

## C U E N T O S

Yo no sé muchas cosas, es verdad:

Digo tan sólo lo que he visto.

Y he visto:

que la cuna del hombre la mecen con cuentos...

que los gritos de angustia del hombre los ahogan  
con cuentos....

que el llanto del hombre lo taponan con cuentos...

que los huesos del hombre los entierran con cuentos...

y que el miedo del hombre...

ha inventado todos los cuentos...

Yo no sé muchas cosas, es verdad,

pero me han dormido con todos los cuentos...

y sé todos los cuentos.

Leon Felipe.

