

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE AGRONOMIA



DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN 25  
COLECTAS DE MAIZ -Zea mays L.- EN  
MARIN, N. L. CICLO PRIMAVERA-VERANO  
1977

TESINA

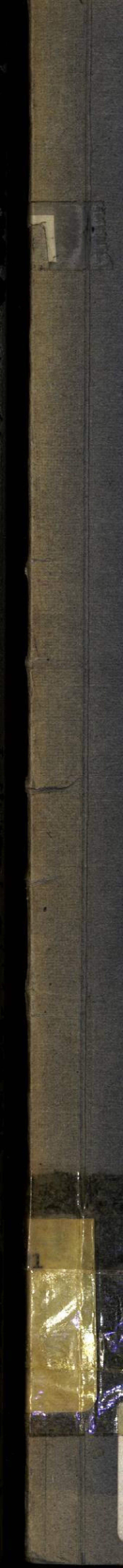
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA  
PRESENTA

*Gerardo J. Mora Cepeda*

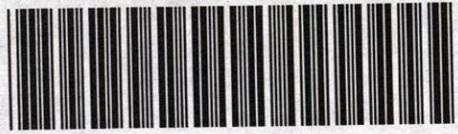
MONTERREY, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1978

040.633  
FA25  
9979

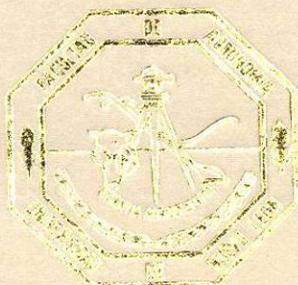


T  
SB19  
.M2  
M67  
C-1



1080063982

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA



DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN 25  
COLECTAS DE MAIZ *Zea mays* L. EN  
MARIN, N. L. CICLO PRIMAVERA-VERANO  
1977

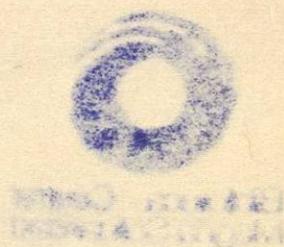
TESINA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA  
PRESENTA

Gerardo H. Mora Cepeda

MONTERRREY, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1978



T  
58191  
.M2  
M67

040-633  
FA25  
1078



Biblioteca Central  
Magna Salsburgh

Tesis



UANL  
FONDO  
TESIS LICENCIATURA

ESTE TRABAJO LO DEDICO CON TODO MI AFECTO A:

A LA MEMORIA DE MIS ABUELITOS

JOSE MORA AGUIRRE

BERTHA RODRIGUEZ DE MORA:

FELIPE ZEPEDA ELIZALDE

ELODIA PEREZ DE ZEPEDA

A MIS PADRES POR TODO EL APOYO  
Y CARIÑO QUE ME HAN DADO EN MI  
VIDA.

HERIBERTO MORA RODRIGUEZ

BEATRIZ E. ZEPEDA DE MORA

A MIS HERMANOS POR EL CARIÑO QUE  
ME TIENEN EL CUAL ES RECIPROCO.

HERIBERTO Y YOLANDA

JOSE LUIS Y EDNA JUDITH

BEATRIZ E. Y MAURO

A MIS QUERIDOS SOBRINOS  
MAURO, FERNANDO, ALEJANDRO  
EDNA JUDITH, JOSE LUIS  
YOLANDA ALICIA.

A TODOS MIS TIOS Y PRIMOS EN GENERAL.

A MI ASESOR POR EL APOYO DURANTE  
ESTE TRABAJO  
DR. JOSE LUIS DE LA GARZA G.

A MI ESCUELA Y MAESTROS

A MIS AMIGOS EN GENERAL.  
PERO MUY ESPECIALMENTE POR  
SU AYUDA EN ESTE TRABAJO.  
BEATRIZ OBREGON P.  
SIMON MORALES CH.  
SALVADOR TORRES V.  
JULIO RODRIGUEZ C.  
DAVID GARZA M.  
RICARDO FLORES  
SALVADOR MARMOLEJO M.

## R E S U M E N

En el presente estudio se analizaron por su contenido de aflatoxinas 25 muestras de maíz. Las muestras corresponden al programa de mejoramiento de maíz de la Universidad Autónoma de Nuevo León, su lugar de colección fué en el Municipio de Marín, N. L. y su fecha Julio de 1977. Para el análisis y cuantificación de las aflatoxinas, se usó el método de Pons y colaboradores. Se encontró que un 25% de las muestras contenían aflatoxinas. En el presente estudio se encontró solamente la aflatoxina B1 en cantidades que variaron de 0 - 10 p.p.b.

En su mayoría las muestras que se analizaron estaban libres de aflatoxinas aún cuando algunas de ellas mostraban trazas.

Las muestras que presentaron una mayor fluorescencia, fueron de olote delgadito (2), estas muestras son del ciclo Primavera - Verano 1977.

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

Los hongos que atacan los granos almacenados producen grandes pérdidas en México. El presente estudio tiene como base investigar acerca de las pérdidas que se producen en granos de -- maíz debido al ataque de hongos que producen aflatoxinas y ob--servar si hay diferente producción de toxinas en las diferentes variedades.

El maíz es la base de la alimentación de nuestro pueblo, - por eso, aún cuando este estudio es pequeño y tiene algunas limitantes, esperamos que sirva para mejorar las condiciones de - almacenaje de los diferentes granos y obtener variedades resistentes o tolerantes al ataque de los hongos que producen las -- aflatoxinas.

## REVISION DE LITERATURA

Los hongos Aspergillus flavus Link y A. parasiticus Speare son de la clase Deuteromycetes, o sea, son hongos imperfectos, - esta clase incluye varios miles de especies saprófitas; otras -- son de gran importancia porque causan enfermedades en el hombre, los animales y las plantas, algunos hongos son de importancia industrial (5).

Los micro-organismos de esta clase no poseen o no se les conoce su estado sexual o perfecto, tienen micelio septado bien desarrollado y otras características semejantes a los hongos superiores (1).

La clase Deuteromycetes comprende cuatro órdenes, entre los que están los Moniliales, este es el grupo más numeroso de su -- clase, pues comprende más de 10,000 especies diferentes. En este orden se encuentra la mayoría de los hongos que atacan al hombre así como también los hay de importancia industrial como Penicillium spp y Aspergillus spp, también los hay fitoparásitos muy importantes como Verticillium, Fusarium, Alternaria (5). Algunas especies de Aspergillus y Penicillium atacan los granos almacenados, y especies del primero producen aflatoxinas. La contaminación de los alimentos por mohos es un fenómeno frecuente (6). -- Los primeros reportes de daños por aflatoxinas fueron hechos en 1960 en Inglaterra, cuando se presentó una gran mortandad de patos y otros animales, según Vaqueira y Morales (11). Estos autores mencionan que este tipo de toxinas son producidas por los -- hongos Aspergillus flavus y A. parasiticus.

Los primeros antecedentes de ingestión de alimentos contaminados con Aflatoxinas se remonta al año 1954. En el que Burnside comprobó que eran tóxicas para cerdos, que ingirieron alimento balanceado derivado de cacahuete contaminado con aflatoxina(9

Los materiales más expuestos al ataque por hongos productores de aflatoxinas son los granos como maíz, sorgo, trigo, arroz, oleaginosas, como semilla de algodón, cacahuate y soya (11).

Para que haya producción de la toxina, según Vaqueira y Morales (11) debe haber una humedad relativa de 85% o más, pero en un trabajo realizado por Boller y Schroeder (2) reportan una humedad relativa 70 - 75%, para que haya una infestación del 15 al 30% de los granos.

En cuanto a la temperatura, Vaqueira y Morales (11) consideraron que una temperatura de 13°C en adelante, favorece la producción de aflatoxinas por otra parte Boller y Schroeder (3) encontraron que la mayor producción de toxinas eran a 35° c.

Las primeras investigaciones acerca de contaminación debida a aflatoxinas en Monterrey, N. L. fueron realizadas en la Facultad de Agronomía (6, 7) y Ciencias Biológicas (8) de la U. A. N. L. Con alimentos balanceados para aves, conejos, puercos, se encontraron aflatoxinas en más de un 50% de las muestras analizadas. Los niveles encontrados fueron desde trazas hasta muy altos (1111 p.p.b.) la aflatoxina más frecuente fué la B1 (6).

Una de las primeras investigaciones realizadas en México en cuanto al ataque de aflatoxinas en maíz fué realizado en el Instituto de Biología de U. N. A. M. éste trabajo lo realizó la Bióloga Martha Zenteno Zebada (12), ella utilizó el método de Pons y colaboradores para poder obtener la toxina y cuantificarla por medio de cromatografía de capa fina.

En un trabajo publicado en 1978 por Calvert y colaboradores (4) se encontró que las aflatoxinas son producidas por los hongos Aspergillus flavus y A. parasiticus. Las cepas de - - -

A. flavus exhibieron una amplia variación en la producción de aflatoxinas en el mismo sustrato. Estas producían sólo aflatoxinas B1 y B2. Sin embargo, las cepas de A. parasiticus producían consistentemente las 4 aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Se puede aclarar por estudios previos, que A. flavus era un contaminante más común en las muestras de maíz, comparado a A. parasiticus que se presentaba raramente

Rambo y col, mencionados por Mirocha y Christensen (9) corroboraron la observación de Taubenhaus en el sentido de que la infección de los granos era debida a A. flavus y A. parasiticus, y a su vez demostraron que la infección del maíz con A. flavus antes de cosechar estaba relacionado con el daño de los granos debido a insectos relacionados.

## MATERIALES Y METODOS

A) MATERIALES: En el presente estudio se utilizaron 25 colectas de maíz del Programa de Mejoramiento de F. A. U. A. N. L. - - el ciclo primavera - verano de 1977.

Para analizar estas muestras en el laboratorio se usaron materiales y reactivos químicos.

B) METODO: Se utilizó el método de Pons y colaboradores (10) en el análisis y cuantificación de las aflatoxinas.

El método tiene varias etapas.

a) Preparación de la muestra.

- 1.- Se procedió a hacer una aplicación de insecticida malathion contra gorgojo.
- 2.- Se molió la muestra primeramente con martillo.
- 3.- Se procedió a moler el grano nuevamente en un molino de - -- Wiley, este se utilizó en un 50% de las muestras.
- 4.- El otro 50% de muestras se molió en un molino de harina de - maíz.

b) Extracción de la muestra.

- 1.- Pesar 50 grs. de la muestra.
- 2.- Agregar 250 ml. de acetona al 70% en agua.
- 3.- Se agita por 30 min.
- 4.- Se filtra en forma normal y se colectan 150 ml. aprox.

c) Purificación del extracto.

Para esto se hizo lo siguiente: Al extracto obtenido en el paso anterior se le agregó.

- 1.- Agua destilada y acetato de plomo y se evaporó a 175 ml.
- 2.- Al extracto así obtenido se le agregó Celite analítico y se filtró al vacío.
- 3.- Se procede a hacer 2 separaciones con 50 ml. de cloroformo - cada una, en donde se pasa la parte inferior del líquido a - un vaso de precipitado.
- 4.- Se evapora hasta 3 ml.
- 5.- Se procede a colocar los componentes del aparato "K" (colum-

na cromatográfica) que son fibra de vidrio, sulfato de sodio anhidro, capa de 2 cms. de gel de sílice y otra delgada de sulfato de sodio anhidro.

6.- A la columna cromatográfica (tubo Butt) se vierte el extracto, se le agrega éter etílico que se elimina, se le agrega después 150 ml. de cloroformo metamol al 3% recogién dose en un vaso de precipitado y se procede a una nueva evaporación a 5 ml. . El extracto está listo para su análisis cualitativo.

d) Análisis cualitativo.

1.- Preparación de las placas para cromatografía.

2.- Se utilizan placas de 5mm. de grosor de 20 x 20 cms. el espesor de la capa fué de 500 micras, con aplicador (Desaga)

3.- Utilizamos sílica gel del No. 7.

4.- Se activan las placas a 110°C por una hora.

5.- Se deja enfriar a temperatura ambiente.

6.- Se aplican muestras de 30 microlts. a cada 1.5 cms. y 5 microlts. del standard (Al drich Chemical Company Inc) se aplican con micropipetas de 5 microlts.

Las concentraciones del standard son:

B1 = 10 mgr/ml. B2 = 4 mgr/ml G1 = 10 mgr/ml

G2 = 3 mgr/ml.

7.- Correr las placas hasta una altura de 2 cms. del tope utilizando como eluente cloroformo-acetona al 13%. Poner a temperatura ambiente.

8.- Observar la fluorescencia en el cromato-vue con luz ultravioleta de onda larga (366 nm.)

9.- Seleccionar las muestras positivas para análisis cuantitativo.

e) Análisis cuantitativo.

1.- Preparar las placas y efectuar el mismo procedimiento que en el método anterior hasta el paso No. 5.

2.- Colocar manchas sobre la placa de 30 microlts. del extracto de la muestra y 1, 2, 5 microlts. standard con micropipetas de 1, 2, 5 microlts.

3.- Efectuar el mismo procedimiento que se siguió en el análisis

cualitativo. Para correr las muestras y observar la fluorescencia (pasos 7 y 8).

4.- Cuantificar por la siguiente fórmula.

$$\text{p.p.b. Aflatoxina B} = \frac{V_s \cdot C_s \cdot S_d \cdot 1000}{W \cdot X \cdot 0.6}$$

En donde  $V_s$ = Microlts. de standard de aflatoxina en la cual la mancha B1, coincide con la mancha B1 de la muestra.

$C_s$ = Concentración de aflatoxina B1, en la solución standard (mgrs/ml)

$S_d$ = Volúmen al cual se diluye el extracto de la muestra para análisis de cromatografía en capa fina en microlts.

$W$ = Peso de la muestra en gramos.

$X$ = Microlts. del extracto de muestra usado en las manchas.

El mismo procedimiento se usa para calcular las Aflatoxinas B2, G1 y G2.

## R E S U L T A D O S

En el cuadro No. 1 se pueden ver los resultados obtenidos al analizar las muestras del presente estudio por su contenido de -- aflatoxinas. Se colocaron en cada placa cromatográfica hasta 9 -- muestras para detectar cualitativamente las toxinas. Se encontraron 7 muestras que tuvieron un alto índice de fluorescencia. Estas muestras se corrieron nuevamente en placas de cromatografía para sacar el Rf y la cantidad de toxina. Para el desarrollo de las -- placas se usó como eluente cloroformo metanol al 13%.

Todas las muestras con toxinas tenían aflatoxina B1, por -- lo tanto, como ya se investigó por parte de Calvert (4), el hongo que mas prosperó en las muestras fué Aspergillus flavus.

Cuadro No. 1

Contenido de aflatoxinas en variedades, líneas y selecciones de maíz (Zea mays L.) cultivadas en Marín, N. L., en 1977.

Muestra No.	Nombre	A F L A T O X I N A S			
		B1	B2	G1	G2
101	Guerito	--	--	--	--
102	"	8.3	--	--	--
103	"	--	--	--	--
104	Socorro 60	--	--	--	--
107	Ratón	--	--	--	--
108	Libre	--	--	--	--
110	Lig. tipo libre	--	--	--	--
111	Olote delgadito	--	--	--	--
112	" "	10	--	--	--
114	" "	10	--	--	--
116	Maíz viento	--	--	--	--
117	Maíz del aire	--	--	--	--
119	" " "	8.3	--	--	--
122	Venado	2.7	--	--	--
123	Pilínque	--	--	--	--
124	Mezcla geno	--	--	--	--
125	3 Colores	--	--	--	--
127	Var 55	--	--	--	--
128	Socorro	--	--	--	--
129	Ratón	--	--	--	--
130	Pilínque	--	--	--	--
131	"	--	--	--	--
132	Rápido	10	--	--	--
134	Libre	'	--	--	--
135	Chinaco	--	--	--	--

\*Trazas.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El estudio es pequeño y el número de muestras y observaciones reducido, por lo que difícilmente se puede concluir algo; sin embargo, es significativo observar que algunas de las muestras -- contenían aflatoxinas. No se esperaba encontrar toxinas en el material examinado, puesto que había sido colectado directamente -- del campo. En la literatura se cita que el maíz puede tener toxinas, el caso de que haya sido previamente dañado por gusano elote ro (Heliothis zea Blode) (13). Otra posibilidad, quizás la mas viable, es que al cosecharse el grano contenía una cantidad apreciable de humedad que permitió el crecimiento de hongos en el almacenamiento y la subsecuente producción de toxinas. Como todo el material fué manejado siempre en la misma forma y almacenado en -- iguales condiciones, la presencia de aflatoxinas en solo algunas muestras nos indican una mayor susceptibilidad de esas muestras -- para favorecer el crecimiento de hongos toxicogénicos y la subsecuente producción de aflatoxinas. Esta observación; sin embargo, está sujeta a comprobación.

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

- 1.- Alexopoulos C. J. Introducción a la Micología. Editorial Universitaria de Buenos Aires pp 392 - 399 y 414. 1970.
- 2.- Boller, R. A. and Schroeder H. W. Influence of Relative - - - Humidity on Production of Aflatoxin In Rice by Aspergillus -- parasiticus. Phthopathology 64: 17 - 21. 1973.
- 3.- Boller, R. A. and Schroeder, H. W. Influence of Temperature - on Production of Aflatoxin in Rice by Aspergillus parasiticus Phytopathology 64: 283 - 286. 1973.
- 4.- Calvert, O. F. Lillehoj, E. B., Kwolek F., Zuber M. S. Aflatoxin B1 and G1 production in Developing Zea Mays Kernels - - from mixed Inocula of Aspergillus flavus and A. parasiticus. Phytopathology 68: 501 - 506. 1978.
- 5.- De la Garza Gzz., J. L. Curso de Fitopatología. Departamento de Difusión U. A. N. L. pp 127 - 129. 1974.
- 6.- De la Garza Gzz. J. L., Aguirre Rdz., J. I. y González L. R. Aflatoxinas en alimentos para puercos, conejos y aves en el - área de Monterrey, N. L., Boletín Interno de Parasitología -- F. A. U. A. N. L. 1978.
- 7.- Garza Reyes, J. S. Aflatoxinas en productos derivados de algodón y cacahuate en el área de Monterrey, N. L., Facultad de Agronomía U. A. N. L. Tesina. 1976.
- 8.- Macías Nevarez, J. G. Aflatoxinas en alimentos balanceados -- para conejos en el área de Coahuila y Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas U. A. N. L. Tesis. 1978.
- 9.- Mirocha, C. L. y Christensen C. M. Fungus Metabolites Toxic - to animals. Ann Rev. Phytopathology 12: 303 - 330.

- 10.- Pons, W. A. Jr., Cucullu, A. F., Lee, L. S., Robertson, J. -  
A., Franz, A. D., Goldblatt, L. A. Determination of Aflato--  
xin in Agricultural Products: Use of Aqueous Acetone for - -  
Extraction J. Assoc. Offic. Anal. Chemist 49: 554 - 562. - -  
1966.
- 11.- Vaqueira, C. y Morales, J. C. 1975. Aflatoxinas Rev. Tecnol  
Alimentos (Mex) 10: 50 - 58. 1975.
- 12.- Zenteno Zebada, M. Producción de Aflatoxinas Por Cepas de --  
Aspergillus flavus Aisladas de Maíz Rev. Lat. Am. Micro- --  
Biol. 263 - 266. 1971.
- 13.- Zuber, M. S. Calvert, O. H. Lillehoj, E.B.K. Wolox, W. F. --  
Preharvest Development of Aflatoxin B1 in corn in the United  
States 1972 - 1974. Phytopathology 66: 1120 - 1121. 1976.

NOTA: El presente trabajo fué financiado parcialmente por el - -  
Instituto de Investigaciones Científicas U. A. N. L. Cen--  
tro de Investigaciones Agropecuarias. Ing. Raúl B. Rodrí- -  
guez, Jefe.

1

T  
SB1  
. M  
N6  
C.