

1984 - 1989

081065136

---

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

## CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES



ANALISIS DE AFLATOXINAS EN EL MAIZ  
*Zea-mays* l, EN LA ZONA NORTE DE TAMAULIPAS  
EN EL PERIODO PRIMAVERA/VERANO 1995.  
EN EL CENTRO DE ACOPIO "LOS CASTRELLON"

---

**T E S I S   P R O F E S I O N A L**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A  
JUANA NORA MARGARITA BRAVO DE LA GARZA

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO

1999

---

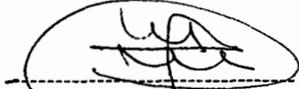
C.DR. ARTURO OROZCO BAROCIO  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizo la pasante: Juana Nora Margarita Bravo de la Garza con el título: Análisis de Aflatoxinas en el Maíz *Zea mays* en la Zona Norte de Tamaulipas (P - V 1995), en el Centro de Acopio Los Castrellón.; consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

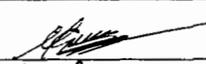
Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
Las Agujas, Zapopan, Jal. a 31 de mayo de 1999

EL DIRECTOR DE TESIS



M.C. Martín Pedro Tena Meza

Sinodales	Fecha	Firma
1. M.C. Ma.Cruz Arriaga Ruiz	1/ Junio / 1999	
2. Q.F.B. Margarita Bonilla Moreno	1 Junio 1999	
3. Ing. Gregorio Nieves Hernandez	4 Junio / 99	

## A G R A D E C I M I E N T O S

AL M.C. MARTIN PEDRO TENA MEZA

POR SU DIRECCION, APOYO, ASESORIA, COMPRENSION Y EL TIEMPO  
QUE DEDICO PARA HACER POSIBLE LA REALIZACION DE ESTA TESIS.

A MIS SINODALES

POR SU COMPRENSION Y APOYO PROPORCIONADOS

A DIOS

INFINITAMENTE POR SIEMPRE

## D E D I C A T O R I A

A MIS PADRES:

SR. JOAQUÍN BRAVO SEGURA.

SRA. MARGARITA DE LA GARZA DE BRAVO.

CON CARIÑO, AFECTO Y RESPETO AGRADESCO INFINITAMENTE SUS ESFUERZOS Y SACRIFICIOS, POR APOYARME EN MIS ESTUDIOS ASÍ COMO TAMBIÉN MANTUVIERON UNA ESPERANZA VIVA, PARA VERME REALIZADA COMO FUTURA PROFESIONISTA.

A MIS HIJOS

JAIME WALFREE Y ENGELBERT FERNANDO

CON INMENSO AMOR, POR SU CARIÑO Y PACIENCIA QUE HA MOSTRADO EN SU INFANCIA DURANTE EL TIEMPO NECESARIO EMPLEADO PARA LA ELABORACIÓN DE ÉSTA TESIS.

A MIS HERMANOS:

POR SU INCALCULABLE Y VALIOSO APOYO QUE ME HAN BRINDADO DURANTE AÑOS, PARA CULMINAR HASTA LA CÚSPIDE DE MI GRAN DESEO.

A MI ESPOSO:

CON MUCHO AMOR , POR SU COMPRESION AYUDA Y APOYO PARA CUMPLIR UNO DE MIS ANAHELADOS DESEOS. ASI TAMBIEN POR SU GRAN PACIENCIA CARIÑO Y SENSILLEZ.

## I N D I C E

	página
Indice de Figuras	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVO	3
III. ANTECEDENTES	4
3.1 El maíz	4
3.2 Micotoxinas	9
3.3 Aflatoxinas	12
3.4 Infección del maíz	19
IV. METODOLOGIA	24
4.1 Toma de muestras	24
4.2 Preparación de la muestra	28
4.3 Material, equipo y reactivos	29
4.4 Método "Aflatest"	29
V. RESULTADOS	33
VI. CONCLUSIONES	38
VII. BIBLIOGRAFIA	39

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## INDICE DE FIGURAS

Figura		página
1	Ubicación del poblado El Realito	25
2	Numero de camiones sin contaminación y contaminados con diferentes niveles de aflatoxinas. Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. de Valle Hermoso Tam. 1995.	34
3	Numero de toneladas de maíz recibidas sin contaminación y contaminadas con diferentes niveles de aflatoxinas. Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. de Valle Hermoso Tam. 1995.	34
4	Numero de camiones recibidos con diferente contenido de aflatoxinas. Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. de Valle Hermoso Tam. 1995.	36
5	Numero de toneladas de maíz recibidas con diferente contenido de aflatoxinas. Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. de Valle Hermoso Tam. 1995.	36
6	Numero de toneladas de maíz recibidas y su contenido de aflatoxinas por día en el Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. de Valle Hermoso Tam. 1995.	37

# CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## R E S U M E N

Durante el periodo comprendido del 22 de junio al 21 de julio de 1995 se recibieron en el Centro de Acopio de Maíz Los Castellon, ubicado en el poblado de El Realito Municipio de Valle Hermoso, 76,720.4 Toneladas de maíz producido en la zona, las cuales fueron muestreadas y analizadas mediante el método "Aflatest" para determinar su nivel de contaminación por aflatoxinas.

No fueron admitidos para su depósito en el centro de acopio cuatro embarques por presentar niveles de contaminación mas altos de los que pudiera manejar ANDSA, la compañía que operaba dicho centro de almacenamiento.

A la mayor parte del material recibido se le detecto contaminación por aflatoxinas, solo el trece por ciento estuvo libre de contaminación; del material recibido, el 56 % presento niveles de contaminación entre los 0 y 20 ppb, lo cual lo hace aceptable para el consumo humano, un 23 % presento niveles de contaminación entre los 21 y 100 ppb, lo cual permitía su uso para elaboración de alimento para animales; el restante 23% presento niveles de contaminación superiores al 100 % lo cual no permite su consumo como alimento humano o animal, debiendo de dirigirse a la comercialización controlada con fines industriales.

# CUCBA



## BIBLIOTECA CENTRAL

## I. INTRODUCCION

La palabra "Maíz" es de origen indio caribeño y significa literalmente "lo que sustenta la vida". El maíz, que junto con el trigo y el arroz son los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de la transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con gran éxito en las industrias lácteas y cárnicas y, tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, aún se utilizan hoy en día como forraje de calidad relativamente bueno para alimentar a los rumiantes de muchos pequeños agricultores de los países en desarrollo. Los tallos erectos, que en algunas variedades son resistentes, se utilizan para construir cercas y muros duraderos. (FAO 1993).

Botánicamente, el maíz *Zea mays* L., pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radical fibroso. Se reproduce por polinización cruzada y presenta sus flores femeninas (elote ó mazorca) y la femenina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. (Op. cit.).

El origen del maíz se pierde en la antigüedad, la planta esta sumamente especializada y no podría reproducirse por sí misma sin la ayuda del hombre. La mazorca está construida especialmente para producir elevados rendimientos de grano bajo la protección del hombre (Jugenheimer 1985).

Sin embargo estos rendimientos se ven mermados durante los procesos posteriores a la cosecha tal como es su almacenamiento, estas pérdidas no son siempre evidentes, y el deterioro de su calidad raramente se aprecia en toda su magnitud. En los países con climas tropicales y subtropicales es común que en los productos almacenados

haya pérdida de peso, transformaciones químicas (carbohidratos, aceite, etc.) y contaminación con fragmentos de insectos, excretas de roedores y con toxinas (González, 1995).

En Tamaulipas la contaminación del maíz ocasionada por aflatoxinas tiene una especial connotación, es en este estado donde se reportó por vez primera en México (ciclo agrícola primavera-verano 1989), este tipo de infestación, la cual se produce tanto en el campo como durante el proceso de almacenamiento; sin embargo, existen otras regiones en el país con características climáticas similares que pueden presentar este tipo de problemas.

Las aflatoxinas se consideran metabolitos secundarios con propiedades carcinógenas y hepatotóxicas que provocan inmunodeficiencias, pérdida de peso y finalmente la muerte. De ahí la importancia de conocer sobre la presencia de estas en el maíz almacenado, el cual es base de la alimentación de los mexicanos.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## II. OBJETIVO

Determinar el nivel de aflatoxinas presente en el maíz recibido durante el ciclo Primavera – Verano de 1995 en el Centro de Acopio “Los Castellón” en el poblado del Realito Municipio de Valle – Hermoso, Tamaulipas.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 El Maíz

Se da el nombre de cereales a las plantas de la familia de las gramíneas que se cultivan para aprovechar sus granos comestibles. Los más importantes son el trigo, centeno, cebada, avena, arroz y el maíz.

La planta del maíz *Zea mays* L. por su gran plasticidad se cultiva en casi todas las partes del mundo, motivo por el cual las plantas de este cereal pueden presentar algunas características diferentes.

El maíz es una gramínea anual erecta, robusta de 0.6 a 3.0 m ó más de altura en su madurez. Sus tallos son ligeramente comprimidos, gruesos, ramificados a veces y con raíces que brotan de los nudos inferiores. Las envolturas de las hojas son fuertes, abiertas de un lado, duras, hirsutas verdes o de color paja, de ápice agudo y angosto. Tiene espigas unisexuales, monoicas; las masculinas se encuentran envueltas entre 8 o 13 bracteas largas duras. El eje carnoso de la espiga femenina (elote) es de 8 - 30 cm de largo y de 2.5 - 7.5 cm de diámetro (Ochse *et al.* 1986)

Los granos de maíz se desarrollan mediante la acumulación de los productos de la fotosíntesis, la absorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta en la inflorescencia femenina. La cual puede contener de 300 a 1000 granos según el número de hileras y el diámetro y longitud de la mazorca. El peso del grano puede variar mucho, de aproximadamente 19 a 30 g por cada 100 granos. Durante la recolección las panojas de maíz son arrancadas manual o mecánicamente de la planta. Se pelan las brácteas que envuelven la mazorca y luego se separan los granos manual o más a menudo, mecánicamente (FAO, 1993).

El grano de maíz se denomina botánicamente cariósido o cariopsis (cada grano contiene el revestimiento de la semilla, o cubierta seminal y la semilla). Sus cuatro estructuras físicas básicas son: el pericarpio, cáscara, o salvado; el endospermo; el germen o embrión; y la piloriza. (Op. cit.)

A continuación se presentan algunos aspectos de la planta de maíz tomados de la obra de Parsons (1990).

### Morfología

El cultivo del Maíz es de régimen anual. Su ciclo vegetativo oscila entre 80 y 200 días, desde la siembra hasta la cosecha. La estructura del maíz es la siguiente:

- Planta.- Existen variedades enanas de 40 a 60cm. de altura, hasta las gigantes de 200 a 300cm. El maíz común no produce macollos.
- Tallo.- Es leñoso y cilíndrico. El número de los nudos varia de 8 a 25, con un promedio de 16.
- Hoja.- la vaina de la hoja forma un cilindro alrededor del entrenudo, pero con los extremos desunidos. Su color usual es verde pero se pueden encontrar hojas rayadas de color blanco y verde o verde purpura. El número de hojas por planta varia entre 8 y 25.
- Sistema Radical.
  - Raíz Seminal o Principal.- Esta representada por un grupo de una a cuatro raíces, que pronto dejan de funcionar. Se originan en el embrión. Suministran nutrientes a las semillas en las primeras dos semanas.

- Raíces adventicias.- El sistema radical de una planta es casi totalmente de tipo adventicio. Puede alcanzar hasta dos metros de profundidad.
- Raíces de sostén o soporte.- Este tipo de raíces se originan en los nudos, cerca de la superficie del suelo. Favorecen una mayor estabilidad y disminuyen problemas de acame. Las raíces de sostén realizan la fotosíntesis.
- Raíces aéreas.- son raíces que no alcanzan el suelo.

El maíz es monoico, es decir tiene flores masculinas y femeninas en la misma planta. Las flores son estaminadas o pistilizadas. Las flores estaminadas o masculinas están representadas por la espiga. Las pistilizadas o femeninas son las mazorcas.

### Fisiología

La fisiología del maíz está determinada, en gran medida, por el factor genético. La forma de crecimiento y desarrollo de la planta depende de las condiciones ambientales, sólo hasta cierto punto.

Bajo condiciones apropiadas de temperatura, humedad y aireación, el maíz germina dentro de los seis días posteriores a la siembra. No requiere luz para germinar y, en general, no presenta problemas de latencia o dormacia.

En cambio de la fase vegetativa se produce más temprano, cuando el periodo de cultivo coincide con días cortos. Durante días largos, el maíz florece tardíamente.

La floración es afectada por la temperatura. Temperaturas superiores a 30° C tienden a provocar una inflorescencia masculina más temprana que la femenina. Bajo

condiciones en temperaturas menores de 20° C, la inflorescencia femenina aparece más temprano que la masculina.

La disposición floral favorece una polinización cruzada, bajo condiciones normales la autofecundación ocurre en alrededor de 5 días. La diseminación del polen se efectúa por medio del viento, la gravedad y los insectos.

La duración del ciclo de vida del maíz depende de las condiciones genéticas, aunque también del ambiente. Periodos de sequía y temperaturas altas provocan una maduración temprana.

### Clasificación

De acuerdo con la estructura de sus granos, en maíz puede dividirse en subespecies, como sigue:

*Zea mays indurata* o maíz cristalino.

Tiene un endospermo duro y granos de almidón completo. Este maíz se usa tanto en alimentación como materia prima para la obtención de alcohol y almidón.

*Zea mays amylacea* o maíz amiláceo.

Tiene endospermo blando sus granos de almidón no son compactos. Este maíz se cultiva en pequeña escala.

*Zea mays everta* o maíz reventador o palomero.

Tiene granos pequeños, endospermo es muy duro y revienta la tostarse, formando palomitas o rosetas.

*Zea mays saccharata* o maíz dulce.

Su endospermo tiene 11% de azúcar al secarse toma un aspecto arrugado. adecuado para el consumo humano.

*Zea mays tunicata* o maíz tunicado.

El grano puede tener diferentes tipos de endospermo. Se identifica por la presencia de glumelas bien desarrolladas que cubren al grano.

*Zea mays cerea* o maíz céreo.

Tiene endospermos céreos. Se utiliza en la elaboración de budines, gomas o adhesivos. El almidón está compuesto sólo por amilopectina, en vez de una mezcla con amilosa.

*Zea mays japonica*.

Se le clasifica como planta hortícola. Sus hojas son rayadas, las cuales tienen aplicaciones de tipo ornamental.

*Zea mays gracilla*

Es una planta hortícola enana.

Las variedades dependen según el uso, se clasifican de acuerdo con las siguientes características:

*Granos de color blanco.*

Para la elaboración de cereales.

*Granos con alta cantidad de carbohidratos.*

Son más aptos para la alimentación de animales.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

*Granos de estructura cerosa.*

Tiene un alto contenido de amilopectina, se utilizan como alimento para el ganado.

*Granos con alto contenido de azúcar.*

Son aptos para la alimentación humana. Se consumen en forma de elotes.

*Granos con alto contenido de aceite.*

Se utilizan principalmente en la industria aceitera.

*Granos con alto contenido de proteína y de lisina.*

Se usan tanto en la industria como en la alimentación humana.

*Granos con mayor proporción de almidón duro o cristalino.*

Se usan para elaborar rosetas o palomitas .

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Ahora bien, el hecho de que la población pueda contar con un adecuado suministro de este cereal no solo depende de su adecuada producción en campo, sino también de manejar de manera apropiada el producto en los procesos posteriores a la cosecha.

Para su almacenamiento Aguilar (1991) señala que el sitio debe de estar limpio, seco y libre de insectos y ratones; y que las tres principales reglas que conviene seguir para almacenar grano son: 1) *Limpiarlo* bien después de la cosecha, quitando los granos dañados y podridos. 2) *Secarlo* hasta que se ponga muy duro. 3) Mantenerlo en lugares *frescos, secos y muy limpios*. Estas reglas son el principio de un buen almacenamiento. Se trata de medidas preventivas que evitan en gran parte la infestación de los granos almacenados.

El grano tiene distintas cantidades de agua en diferentes épocas del año. Durante las lluvias los granos absorben agua del aire y aumentan su contenido de humedad; en cambio en el tiempo de secas pierden humedad debido a lo seco del ambiente. Si el grano tiene demasiada humedad, comienza a respirar más rápido y esto hace que se caliente. Además la humedad favorece el crecimiento de hongos, que pudren el grano, y el desarrollo de insectos que se alimentan de las semillas (Op. cit.).

### 3.2 Micotoxinas

Montes (citado por Díaz, 1993) señala que uno de los efectos más importantes de las pudriciones de postcosecha de frutos y hortalizas y especialmente de semillas y del deterioro de los alimentos por hongos, es la inducción de micotoxicosis, es decir, enfermedades de animales y del hombre ocasionadas por el consumo de forrajes y alimentos invadidos por hongos productores de toxinas.

Las micotoxinas son metabolitos producidos por diferentes hongos sobre los alimentos, que pueden causar una enfermedad e inclusive la muerte, al ingerirlos el hombre y los animales. Estas sustancias permanecen en los alimentos aun después de que el hongo muere, y son relativamente estables bajo las condiciones usuales de cocimiento y procesamiento de alimentos. Las micotoxinas originan dos problemas en el mercado de los granos, en el proceso y en su consumo; uno de ellos es regulatorio, para lo que muchos países incluyendo México y Estados Unidos, han establecido tolerancias para las aflotoxinas en los alimentos. El otro problema es de orden legal (González, 1995).

La producción de toxinas por hongos es gradualmente influenciada por el contenido de humedad del sustrato y por la temperatura, un contenido de humedad mínimo de 10 a 18% es adecuado para el desarrollo de hongos toxicogénicos,

*Aspergillus flavus* es algo xerofítico, y puede desarrollarse en materiales cuyo contenido de humedad esté en equilibrio con una humedad relativa de 85%. (Op. cit.).

Christensen y Kauffmann (Citados por González 1995) señalaron que frecuentemente los hongos toxígenos desaparecen de los granos o productos en los que han crecido, al verse limitados por condiciones desfavorables para su crecimiento, quedando solamente las micotoxinas, lo que hace particularmente difícil verificar la calidad sanitaria de un determinado producto, sea este grano u otra materia prima; teniendo que recurrirse a técnicas químicas y biológicas para conocer su calidad sanitaria. Seguramente las micotoxinas siempre han estado con nosotros, pero hasta hace unas cuantas décadas se les ha reconocido como un problema de salud pública y animal.

Moreno (1990) señaló que las evidencias actuales que se tienen sobre la importancia de los diferentes hongos toxígenos que invaden a los granos indican que los géneros más importantes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En este sentido González (1995) señala que las aflatoxinas son una serie de metabolitos tóxicos producidos por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* dentro de los cuales la aflatoxina B-1 es el más potente.

Gutiérrez y Ríos (1991) señala que los venenos fúngicos pueden clasificarse más o menos en cuatro categorías, de acuerdo con el tipo de lesiones o daño patológico que producen, y de acuerdo con el órgano u órganos determinados afectados. Estos venenos son :

#### Hepatotoxinas o Venenos del Hígado

Estos producen grave cirrosis hepática o del hígado, hepatoma y necrosis de la células del hígado. Muchos de ellos son también poderosos carcinogénicos (por ejemplo las aflatoxinas o sea los principios tóxicos de *Aspergillus flavus*)

### Nefrotoxinas o Venenos del Riñón

Producen nefrosis crónica o aguda que finalmente, llevan a la falla total de los riñones (por ejemplo la citrina un metabolito del *Penicillium patulum*).

### Venenos Dermatológicos Fotodinámicos

Estas sustancias producen, en el hombre y en los animales lesiones en la piel parecidas a dermatitis, debidas al contacto con alimentos o cultivos infestados con el hongo toxígeno, por ejemplo, *Sclerotonia sclerotiorum* causante de la pudrición rosada del apio que producen dos poderosas sustancias generadoras de dermatitis.

Aunque los efectos del forraje con granos enmohecidos sobre los animales que los consumen se han conocido por muchos años, no fue sino hasta 1961 que la causa fue identificada propiamente. En 1960 más de cien mil pavipollos murieron en Inglaterra después de ingerir harina de cacahuete importada de Africa y Sudamérica. En los piensos venenosos se aisló *Aspergillus flavus* y la toxina producida por este organismo se denominó Aflatoxina (*Aspergillus flavus* toxina- Aflatoxina) (Op. cit.).

## 3.3 Aflatoxinas

### Definición y clasificación

De acuerdo con lo señalado por Rodríguez (1993), las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estos hongos son saprófitos y producen esporas amarillo verdosas. Las principales aflatoxinas son cuatro: B1, B2, G1, G2. La aflatoxina B1 generalmente se encuentra en mayores concentraciones que los otros y es más potente, siendo carcinogénico,

teratógeno y mutágeno. Las aflatoxinas son químicamente bis-hidrofuracumarinas inestable dada la doble ligadura de su estructura y a su anillo de lactona.

La identificación de las aflatoxinas por fluorescencia permitió caracterizar a compuestos químicos B1, B2 (Blue) y G1,G2 (Green). La diferencia principal entre la aflatoxina B1 y B2 es la carencia de su doble enlace en uno de los anillos por lo que se dice que la B2 es un dihidroderivado de la B1. Entre la G1 y G2 la diferencia está en el aumento de un átomo de carbono en uno de sus anillos (Op.cit.).

Las aflatoxinas fueron descubierta en 1961 en Inglaterra (Sargean, citado por González, 1995). Son más de una docena de sustancias químicas, relacionadas estrechamente y designadas por este término. Algunas son metabolitos de hongos, otras son metabolitos producidos por animales que han ingerido alimento contaminado por aflatoxinas o por bacterias al metabolizar un sustrato que contiene aflatoxinas. Aunque 15 especies de *Aspergillus* y varias de *Penicillium*, se sabe que producen aflatoxinas, solamente *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* han sido confirmados consistentemente como productores de aflatoxinas, que son los carcinógenos mas potentes que se conocen y pueden recuperarse de varios tipos de alimento(González, 1995).

La presencia de aflatoxinas en alimentos ingeridos por los animales, es muy dañino, no solamente al animal, también sus residuos pueden aparecer en la carne, en los huevos y pueden ser excretados en la leche. La Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, tiene establecido un límite de 20 ppb de aflotoxina, para todo producto destinado al consumo humano y animal. Sin embargo, este límite puede cambiar en el futuro, lo que dependerá de si el producto es para el consumo humano o animal, y probablemente categorizado de acuerdo con la edad y especie animal a alimentarse (Gonzalez, 1995).

Algunos alimentos son particularmente susceptibles a la contaminación con aflatoxinas, los cacahuates, la semilla de algodón y el arroz son ejemplos importantes de ello, sin embargo la peligrosidad radica principalmente en los métodos a menudo primitivos que se utilizan para cosechar y almacenarlos, que es cuando hay crecimiento de hongos filamentosos. Por lo tanto, resulta posible evitar la contaminación a medida que se perfeccionen las prácticas agrícolas, en particular en los países del tercer mundo (Deacon, 1998).

#### Humedad y temperatura

Como ya se menciona la humedad del ambiente y del grano o producto derivado de este es uno de los factores más importantes de la producción de las micotoxinas. La humedad relativa mínima que permite el desarrollo de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, y por lo tanto la producción de aflatoxinas, es de 85%. Esa humedad relativa representa contenidos de humedad en los cereales de 16.5-18.0% en soya de 15.5-17.0%, en girasol, cacahuete y copra de 8.5-10.0%. No hay límite superior en cuanto al nivel de humedad, ya que estos hongos pueden producir aflatoxinas en medio líquido, lo cual frecuentemente se hace en el laboratorio; sin embargo en la naturaleza, por la evidencia en cacahuete y maíz, su comportamiento tiende a ser xerofítico en la producción de aflatoxinas.

Estos hongos productores de aflatoxinas pueden crecer en temperaturas de 8 a 55° C siendo de 36 a 38° C las temperaturas óptimas para su desarrollo. Sin embargo, las temperaturas óptimas para la producción de aflatoxinas son de 25 a 35° C; aún cuando estas todavía pueden ser producidas cuando el hongo crece lentamente a temperaturas de 11 a 14° C. Aparentemente la producción de aflatoxinas no ocurre a temperaturas menores de 10° C, ni a mayores de 45° C. Mucha de la información sobre la producción de aflatoxinas se ha obtenido en el laboratorio; sin embargo, es necesario, como se ha venido realizando en maíz y cacahuete, obtener mayor información sobre las condiciones de humedad y temperatura en el microambiente alrededor de las vainas de

cacahuete y de los granos de maíz , así en los mismos granos, que favorecen el desarrollo de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas.

Se ha señalado que las cepas productoras de aflatoxinas son malas competidoras con otros hongos que crecen bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura y que esa competencia evita la producción de aflatoxinas, por lo que *Aspergillus flavus link* requiere estar prácticamente como cultivo puro. En estudios realizados sobre la producción de aflatoxinas se observó que *Aspergillus chevalleri*, *Aspergillus candidus* y *Aspergillus niger* interferían en la producción de aflatoxinas.

Aparentemente en los granos y productos en que estos hongos son un alto riesgo por su abundante y común producción de micotoxinas, su desarrollo se efectúa sin ser afectado por la micoflora asociada, si es que la hay en el momento de la producción de las toxinas, lo cual es materia para investigar.

Las especies *Aspergillus* son aeróbicas, por lo tanto requieren oxígeno para su desarrollo. A niveles de 1% de oxígeno en la atmósfera de almacenamiento se detiene el desarrollo de los hongos y por lo tanto también el riesgo de la producción de toxinas. Esa condición, de bajo contenido de oxígeno en el almacén, se logra mediante el uso de atmósferas controladas y almacenamiento hermético. En cuanto al tiempo que se requiere para la producción de aflatoxinas, esta puede ocurrir en el término de horas a unos cuantos días, siempre y cuando se conjunten los factores adecuados de humedad, de temperatura y ausencia de micoflora competitiva.

#### Propiedades físicas y químicas

De acuerdo con Rodríguez (1993) estas sustancias son termoresistentes hasta 250° C, emiten fluorescencia al ser excitadas por luz ultravioleta y presentan fotosensibilidad; además son solubles en cloroformo, acetona y metanol, poco solubles en éter etílico, insolubles en hexano, hidrocarburos saturados, éter de petróleo

### Aspergillus

Moreno (1990) señalo que las evidencias actuales que se tienen sobre la importancia de los diferentes hongos toxigenos que invaden a los granos indican que los géneros más importantes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

Se han señalado para *Aspergillus* la existencia de 18 grupos y se reconocen 132 especies (Frazier/Westhoff, 1978). *A. glaucus*, *A. restrictus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. fumigatus* y *A. clavatus*, son grupos importantes en el deterioro de los granos y semillas almacenados, afectando su calidad física, biológica, nutricional y sanitaria.

El concepto de "grupo" fue establecido por Thom y Churh en su monografía del género *Aspergillus*, con el fin de reunir en cada "grupo" a especies, que si bien presentan diferencias para ser consideradas como tales, también presentaban similitudes morfológicas o fisiológicas.

A cada "grupo" le dieron el nombre de la especie más representativa o especie "tipo", por ejemplo, al grupo de las especies con cabezuelas negras se les dió el nombre de *Aspergillus niger*.

En el caso de *Aspergillus candidus* no hay problema, ya que en este grupo solo hay una especie.

Para la separación de grupos se utilizan principalmente características morfológicas y el color de la cabezuelas conidiales.

El género *Aspergillus* se caracteriza por no requerir agua libre para su desarrollo, ya que algunas especies pueden hacerlo en algunos productos con una actividad acuosa muy baja (0.07), por lo que se les considera como xerófitas.

El género *Aspergillus flavus* tiene once especies cuyas características morfológicas más sobresalientes son las siguientes: Cabezuelas globosas, radiadas o columnares, de color amarillo pálido: verde amarillo fuerte o azul.

Dentro del género *Aspergillus*, se encuentran *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* los cuales están presentes a lo largo del mundo, en el suelo y en el agua, y causan contaminación de aflatoxinas antes de la cosecha en maíz, cacahuate, semilla de algodón y almendras. Estos hongos que inhiben la semilla contaminan una gran variedad de cultivos después de la cosecha durante el manejo, almacenamiento y proceso. *A. flavus* y *A. parasiticus* son las únicas dos especies que producen aflatoxinas; sin embargo no todos sus aislamientos producen aflatoxinas en el campo o en cultivos de laboratorio Rodríguez (1993).

Las dos especies que producen aflatoxinas pueden ser distinguibles morfológicamente y por análisis químico de metabolitos (Op. cit.).

Características	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
Conoidióforo	Ramificaciones dobles.	Generalmente en ramificaciones simples.
Conidia	Generalmente rugosa o ligeramente rugosa.	Evidentemente verrucosa.
Color de la colonia	Amarillo verdosa.	Verde.
Superficie de la colonia	Irregular, algunas hifas aéreas.	Compacta, aterciopelada.
Análisis químico	Proteolítico.	Lipolítico.

#### La producción de aflatoxinas

Las aflatoxinas son producidas únicamente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*; ambas especies pertenecen al "grupo" *Aspergillus flavus*.

La producción de aflatoxinas depende de un buen número de factores, entre los principales se encuentran los siguientes:

- |                            |                             |                  |
|----------------------------|-----------------------------|------------------|
| 1) El hongo productor      | 5) La micoflora asociada    | 7) El período de |
| 2) El sustrato             | 6) El oxígeno en la         | almacenamiento   |
| 3) El contenido de humedad | atmósfera de almacenamiento |                  |
| 4) La temperatura          |                             |                  |

La sola presencia del hongo en un determinado producto, aún de una cepa productora de aflatoxinas, no significa que las aflatoxinas estén presentes, o que se vayan a producir, ya que para su producción se requiere que los diferentes factores antes mencionados, coincidan bajo determinadas circunstancias y condiciones.

#### Medios de cultivo

Rodríguez (1993) señaló que un medio diferencial de *Aspergillus* (ADM) fue elaborado para una rápida detección de las especies aflatoxigénicas; el medio contiene citrato férrico y produce una coloración amarillo naranja (*Fusarium* y *Penicillium* no producen la coloración) Revisando las limitantes del ADM se agregó sulfato de estreptomycin y Botran (2, 6 -dicloro-4-nitro-anilina) para detener el desarrollo de bacterias y otros hongos, después de agregar los inhibidores el medio fue nombrado *Agar Aspergillus flavus y Parasiticus* (AFPA). Este método ha sido usado con cacahuates y suelo.

Otro método para la detección del hongo que produce aflatoxinas es la fluorescencia UV, producida en agar Czapek modificado conteniendo licor de maíz,  $HgCl_2$   $H_2PO_4$ , los cultivos se incuban a 28°C por 7-10 días. La presencia de aflatoxinas es confirmada por cromatografía de capa fina del extracto de cloroformo del agar (Op. cit.).

El mismo autor señala que la producción de micotoxinas en medio líquido es usualmente más bajo que en los medios naturales. Una gran variedad de micotoxinas son necesarias para un estudio de alimentos en animales experimentales ó domésticos que

son solamente producidos en sustratos naturales, el uso del medio sintético permite al investigador tener un control mas preciso de algunas de las variables en la producción de metabolitos secundarios por el hongo específico. Las aflatoxinas se pueden producir en el medio Czapek con adición de sulfato de zinc o extracto de levadura en medio Raulin-Thom.

El primer medio líquido desarrollado por los investigadores de la Universidad Auburn fué nombrado SMKY y contiene sacarosa técnicamente en gramos (200 g), sulfato de magnesio (0.5 g), nitrato de potasio (3.0g) y extracto de levadura Difco (7.0g). El grado técnico de sacarosa fué superior a la sacarosa químicamente pura, probablemente porque éste contiene un fierro adicional y otros nutrientes para la formación máxima del desarrollo de aflatoxinas. La temperatura óptima para el crecimiento y producción de *Aspergillus flavus* en el desarrollo del medio SMKY es a 25°C, mientras que para el *Aspergillus parasiticus* es de 30-35°C. Otro es con extracto de levadura al 2% en 15-20% de medio de sacarosa (YES). El medio YES provee todos los nutrientes requeridos para la producción de aflatoxinas para algunos aislamientos de grupos de *Aspergillus flavus* (Op.cit.).

### 3.4 Infección del maíz

Rodriguez (1993) presenta amplia información sobre el proceso mediante el cual se produce la contaminación del maíz el cual señala en los siguientes apartados. El autor señala que el concepto sobre el proceso de contaminación del maíz fue transformado hace una década cuando se reconoció que puede ser contaminado por aflatoxinas en el campo, ya que antes se pensaba que *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* eran mohos de almacén.

De acuerdo con Rodriguez (1993), Taubenhaus fue el primero en reportar la infección por *Aspergillus flavus* en Texas en 1920, el, estudió 2 mohos *Aspergillus*

*flavus* y *Aspergillus niger* y encontró que *Aspergillus flavus* se encontraba más comúnmente en el tope del primer tercio de la mazorca, además el reportó que la infección estaba siempre asociada con insectos. El trató algunas técnicas de inoculación y concluyó que la infección de *Aspergillus flavus* requiere grano dañado. Los descubrimientos de Taubenhau no han sido correctamente valorados.

#### Colonización de estigmas y grano

*Aspergillus flavus* ha sido aislado de estigmas bajo condiciones de campo y se ha reportado que éste hongo coloniza estigmas pegados a la mazorca y sueltos. La condición del estigma tiene gran influencia sobre que tan bien el hongo se desarrolla en éste y se mueve hacia abajo para infectar los granos. En una comparación de los tres estados del estigma (el verde que no está polinizado, el amarillo-café son los más susceptibles. *Aspergillus flavus* penetra en éste estigma directa e indirectamente a través de las aberturas intercelulares.

Después de un periodo de 4-8 horas las conidias de *Aspergillus flavus* germinan sobre los estigmas lo más cercano a los granos del polen, éstos hongos se dispersan rápidamente a través del estigma produciendo un desarrollo rápido y ramificaciones laterales.

*Aspergillus flavus* crece hacia abajo del estigma muy rápidamente. El estigma es más susceptible a la colonización cuando éste toma una coloración amarilla-café y cuando el estigma se infecta en ésta etapa se infesta un mayor número de granos.

El hongo coloniza con facilidad los estigmas externos, después desciende por la mazorca invadiendo primero los estigmas interiores, luego las glumas y la superficie de los granos, pero rara vez penetra la médula del olote. *Aspergillus flavus* vive en los estigmas, glumas y superficie de los granos hasta la etapa tardía del desarrollo del grano de maíz, cuando el grano se aproxima a la madurez (su contenido de humedad es de 32%) el hongo penetra a través de la región del pedicelo.

### Factores que determinan el proceso

Algunos factores son importantes en la infección del estigma y del grano por *Aspergillus flavus*. Los niveles de inóculo, la sequía, la temperatura y la edad del estigma pueden afectar el proceso de infección.

#### *Niveles de inóculo.*

Una de las áreas no entendidas en la epidemiología de *Aspergillus flavus* es la fuente de inóculo. La conidia del hongo parece estar presente cada año pero su dispersión fluctúa.

#### *Estres por sequía.*

Las plantas expuestas a un estres por sequía en el campo tienen más granos infectados que muestras de parcelas irrigadas. Ellos atribuyen un incremento en los niveles de infección en parcelas no irrigadas a un alto nivel de inóculo y una reducida área haciendo más accesible a la conidia del hongo.

#### *Temperatura .*

La temperatura es una de las más obvias influencias en la infección del estigma. (Jones et al s/a) demuestran que la infección del grano es mucho más grande de 32°C a 38°C que de 21°C a 26°C. (Payne et al s/a) reportan baja infección del grano en un régimen de temperatura de día /noche de 26°C/22°C, pero una alta infección a un régimen de día/noche de 34°C/30°C.

La temperatura puede influenciar la infección a través de sus efectos sobre la planta, el hongo ó en ambos. La temperatura arriba de 30°C no es favorable para el maíz y puede servir para predisponer la planta a la infección. Por otro lado una alta temperatura podría ser favorable para el desarrollo de *Aspergillus flavus* ya que el hongo tiene una temperatura óptima de 36°C-38°C para desarrollarse.

### Insectos y aflatoxinas

Tomado de Rodríguez (1993) se señala la relación que guardan estos problemas crónicos en el maíz.

Los insectos hacen que aumenten en forma significativa los niveles de aflatoxinas en las mazorcas antes de la cosecha, los insectos transportan las esporas *Aspergillus flavus* y también dañan los granos lo cual da por resultado un incremento en la infección por hongos. Al parecer, la infección con *Aspergillus flavus* tiene relación con varios tipos de insectos.

El daño por insectos en el campo de maíz ha demostrado que aumenta la incidencia de las mazorcas infectadas con el hongo productor de aflatoxina. Las investigaciones en el sureste de Missouri con humedades altas del maíz encontró una significativa asociación entre la contaminación con aflatoxinas y las mazorcas del maíz con daños por gusanos. Cuando se evaluaron 9,900 mazorcas de maíz el 6.3% de el grano dañado por insectos mostraron asociación con las aflatoxinas comparado con un 2.5% en grano no dañado. Los hongos fueron aislados de el 37% de la mazorcas que mostraban daños por gusanos como por el contrario para el 14% en mazorcas no dañadas. Se ha encontrado que otros insectos transportan esporas de hongos productores de micotoxinas. Los daños que ellos hacen al grano y otros artículos de consumo incrementan la posibilidad del desarrollo de micotoxinas.

La sequía o sequedad es ahora considerada uno de los mayores factores en los cuales se predisponen ciertas cosechas para la infección con hongos productores de micotoxinas. En 1977 debido a las sequías el maíz en el sureste del estado de Texas se vió afectado con el problema de aflatoxinas. El maíz y los cacahuates especialmente están expuestos al problema de aflatoxinas cuando ocurre la sequía.

#### Daños por aflatoxinas

Las micotoxinas causan la muerte en un amplio rango de especies de animales, provocaron inflamación severa del hígado o riñones, hemorragias masivas y algunas ulceraciones de la boca y el tracto digestivo. En otros tiempos los efectos no se reconocían fácilmente. Estos efectos dependen de la especie del animal, cantidad

consumida y el tiempo de exposición. La dosificación moderada o alta para un animal sensible o un ave puede producir la muerte dentro de un corto tiempo. La cría de un ave de corral, cerdos jóvenes, cerdas preñadas, vacas paridas y perros son altamente susceptibles cuando ingieren dietas tóxicas bajo largos periodos de tiempo.

De acuerdo con las normas establecidas (comunicación interna) por Almacenes Nacionales de Deposito (ANDSA), el nivel máximo de contaminación por aflatoxinas para el maíz para consumo humano no debe de ser mayor a 20 ppb, mientras que el maíz con valores de contaminación entre 21 y 100 ppb deberá de ser destinado a la alimentación animal; maíz con valores de contaminación superiores a 100 ppb deberá de ser comercializado de manera restringida para la elaboración de aceite, celuloide, explosivos plásticos, jabón, glicerina entre otros.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## IV. METODOLOGIA

La determinación del contenido de aflatoxinas se realizó en el periodo de cosecha del maíz sembrado en el ciclo primavera-verano de 1995, en el centro de acopio "Los Castrellón" ubicado en el poblado El Realito, Municipio de Valle Hermoso, en la región norte del Estado de Tamaulipas (Figura 1).

El granero cuenta con una capacidad de almacenamiento de 15,000 toneladas; con pisos y paredes de concreto y techo (de 7 a 10 metros de altura) de lámina galvanizada que protege al producto de las inclemencias del tiempo además de plagas ocasionales.

Para asegurar la calidad del producto almacenado, es indispensable la determinación constante de humedad, temperatura, y de los insectos y patógenos que pudieran presentarse durante el proceso de almacenamiento; sin embargo, mas importante lo es aún, la determinación de estos parámetros antes de la recepción del producto con la intención de que este reúna las mejores características, para ser almacenado. Para ello se cuenta con un laboratorio fisico y otro químico, donde se llevan a cabo los diferentes análisis a la muestra del maíz que son llevadas por camiones al centro de recepción, para que con base a su resultado de los mismos se determine si este se recibe y se almacena o por el contrario se descarta.

### 4.1 Toma de muestras

Las muestras fueron tomadas en el periodo comprendido entre los días 22 de junio y 21 de julio de 1995. Al momento de llegada de un camión al centro de acopio de manera inmediata se procedió a la toma de muestras (1 Kg por camión), para lo cual se dividía el camión en cuadrángulos (su número dependía de la capacidad del camión) de cuyo centro se tomaba una porción para completar la muestra de 1 Kg, utilizando para ello la sonda de alvéolos de 11 orificios. El siguiente esquema ilustra lo anterior:

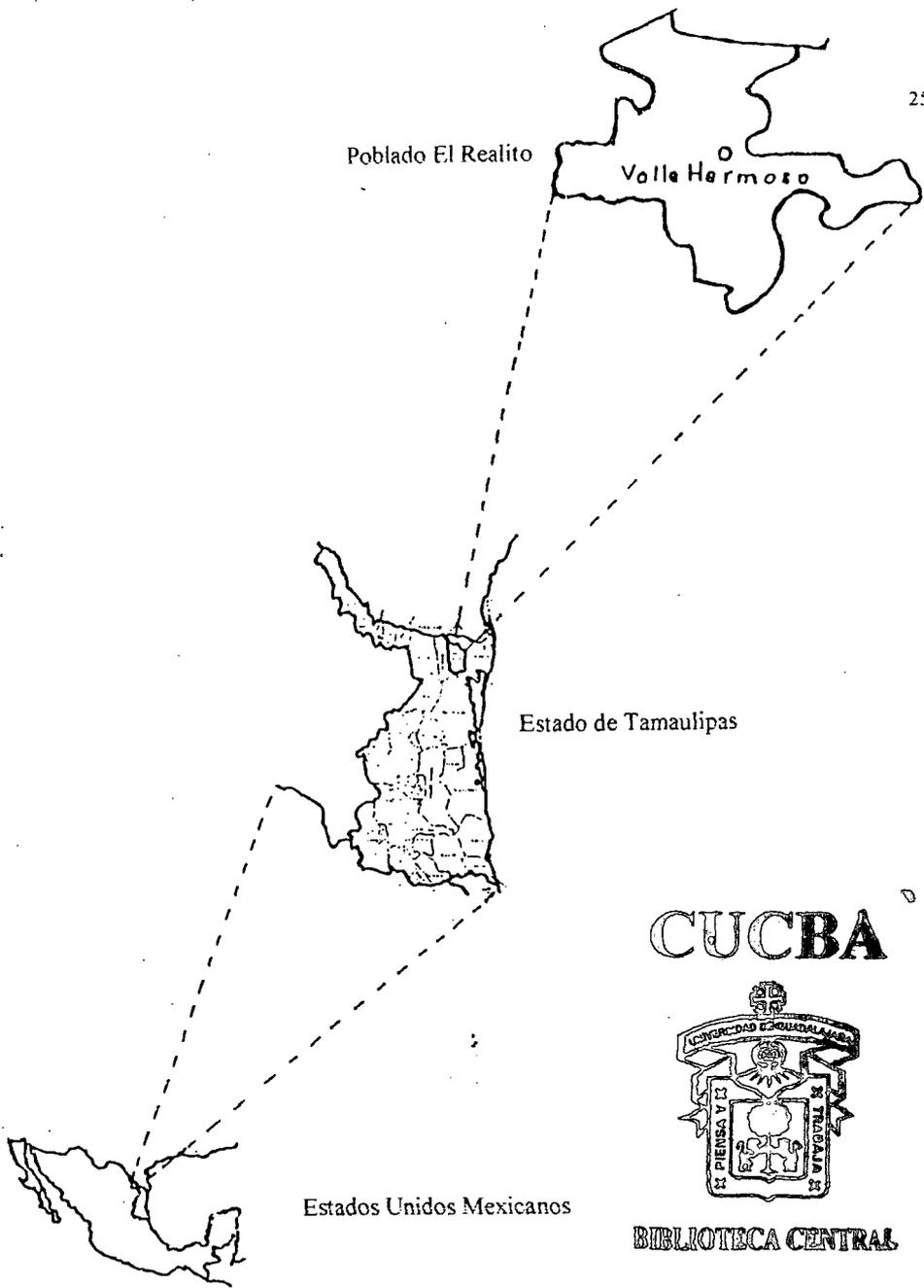


Figura 1. Ubicación del poblado El Realito, Mpio de Valle Hermoso, Tamaulipas.

X		X		X		X
	X			X		
X		X		X		X

Camión de 15-25 Ton.

X		X		X
	X		X	
X		X		X

Camión de 30-40 Ton.

Esta muestra de manera inmediata fue sujeta a los análisis físicos en el laboratorio respectivo, con lo cual se confirmaba la observación visual realizada al camión, estas pruebas fueron:

### Temperatura

Se mide la temperatura del maíz con ayuda de un termómetro de cubeta de escala de 100°C, se introduce éste en la parte media de la bolsa muestra por 3 minutos y se toma la lectura. De tener una temperatura alta, como resultado del contenido de humedad en la semilla y su consecuente actividad metabólica, se procedía a aplicar las medidas correctivas necesarias como el secado del grano.

La temperatura en la bodega se mide de manera constante con un termómetro de cubeta, ya que si la temperatura es muy alta afecta al grano por sobre calentamiento, lo que favorece el desarrollo de hongos y plagas. Si la temperatura es elevada se remueve el maíz con pala o bazooka portátil con el objeto de disminuir la temperatura.

### Humedad

Para determinar el porcentaje de agua que contenía el grano se utilizaron determinadores de humedad de la marca MOTOMCO y LABTRONICS por su facilidad de su manejo y precisión. Todo el maíz que presento más de 14.0% de humedad se paso por el secador (el cual aplica a la vez un fungicida) de manera previa antes de ser almacenado en la bodega.

### Olor

Debe presentar un olor característico a grano sano, si por el contrario se perciben olores de fermentación, moho, agrio o putrefacción. la partida será rechazada.

### Presencia de insectos

Se observa cuidadosamente a simple vista para detectar la presencia de insectos (individuos, excretas, partes de organismos muertos, etc.) en el grano o grano dañado por plagas, así como el tipo de grano que integra la muestra.

### Impurezas

Con esta prueba se trata de detectar el grano quebrado, gluma o pajilla, tierra o semillas extrañas al producto que se pretende almacenar.

### Daños en la semilla

Es objetable cualquier grano que a simple vista presente coloraciones extrañas al color normal, exceso de granos germinados, con hongos, daño por calor, picado, o inmaduro. Para lo cual se aplicaron los siguientes criterios:

- |                  |  |
|------------------|--|
| <u>Germinado</u> | Presenta desde un ligero desarrollo en el embrión hasta el desarrollo total de germen.   |
| <u>Hongos</u>    | Presenta diversas coloraciones en el embrión, tales como verde, azul, café o pudrición de olote.   |
| <u>Calor</u>     | Un daño ligero por calor ocasiona una coloración café oscuro en el embrión. Un daño severo por calor ocasiona una coloración café oscuro o negro en todo el grano. |
| <u>Picado</u>    | Este grano presenta perforaciones, producto del ataque de la plaga, en el caso de ataque por palomilla, presenta en el embrión totalmente comido.                  |
| <u>Inmaduro</u>  | Este grano no alcanza su madurez a tiempo y se encuentra enjuto o chupado.   |

Se realiza después de la observación de los anteriores parámetros la separación de los granos dañados que una vez pesados en la balanza granataria determinar el porcentaje de granos dañados.

Ejemplo:

1 gramo corresponde	10 gramos corresponde	20 gramos corresponde
1.0%	10.0%	20.0%

#### 4.2 Preparación de la muestra

Al aprobar las pruebas físicas, la muestra individual de un kilo se traslado al laboratorio de análisis químico donde se tomaba una porción de la misma para integrar con otras muestras individuales de 4 ó 5 vehículos (dependiendo de su tonelaje individual), una muestra compuesta de un kilogramo que representaba aproximadamente 100 toneladas de producto a recibir.

Esta muestra compuesta se paso por un homogenizador "Boerner", donde se dividió en 2 partes iguales por tres ocasiones hasta obtener una muestra de 125 g., almacenando el resto en bolsa de papel como material de reserva (875g) conservando su numero de registro.

Los 125g. de la muestra compuesta final fueron molidos en el molino Romer-Mill, el cual homogeneiza y subdivide la muestra a la vez. La muestra molida se coloca en un tamiz malla No. 20 (0.0331 pulgadas), para ser cernida, el material que paso la malla se homogeneizo para tomar 20g. y realizar el análisis de aflatoxinas. El tamizado de la muestra se realizó a distancia razonable de la mesa de desarrollo del método de análisis para evitar posibles contaminaciones.

### 4.3 Material, equipo y reactivos

#### Material

- |  |   |
|--|---|
| -Adaptadores de jeringas de 10 mililitros  | -Matraces F.M. de 250 mililitros        |
| -Tubo de desecación                        | -Papel filtro de fibra de vidrio        |
| -Charola                                   | -Papel filtro Whatman # 1               |
| -Columnas de inmunoafinidad y limpieza     | -Pipetas de 10 mililitros               |
| -Embudo de filtración rápida               | -Pizetas                                |
| -Espátulas                                 | -Probetas de 100 mililitros             |
| -Estándares de calibración del fluorómetro | -Sondas                                 |
| -Gradillas                                 | -Soporte                                |
| -Guantes desechables                       | -Tamices 2.5/64"                        |
| -Jeringas                                  | -Vasos de precipitado de 100 mililitros |

#### Reactivos

- Agua destilada
- Buffer de fosfatos
- Cal
- Cloruro de sodio
- Columnas Aflatest P. de VICAM
- Metanol
- Metanol HPLC
- Solución reveladora de bromo

#### Equipo

- Balanza digital
- Divisor de Bomer
- Fluorómetro VICAM
- Homogenizador
- Licuadora
- Molino de Romer
- Regulador de voltaje

### 4.4 Metodo Aflatest

Para la determinación de aflatoxinas se utilizó el método biológico de análisis reportado por Navarrete (1993) el cual se basa en el principio de anticuerpos monoclonales específicos para aflatoxinas (antígeno). Mismo que cuenta con las siguientes fases.

#### Licuefacción

A los 20g. de muestra molida y tamizada se le adicionó 2g. de Cloruro de Sodio más 40 ml de Metanol al 80%, los cuales se licuaron a alta velocidad en el vaso de la licuadora durante dos minutos.

#### Filtración

Se filtra la muestra con papel filtro de poro fino o Whatman No.1, se deja filtrar en su totalidad la mezcla.

### Dilución

Se diluyen 5 ml. del filtrado en 35 ml. de solución buffer de fosfatos (PBS) de pH 7.4; una tableta de PBS sirve para 100 ml, hay que hacer suficiente buffer de fosfato para el número de muestras que se requiera. Para preparar un litro de PBS se requieren 10 pastillas y tardan en disolverse alrededor de 15 minutos.

### Segundo filtrado de la muestra

Se hace un segundo filtrado con papel filtro de microfibra de vidrio 11.0 cm de diámetro circular su característica principal es la dimensión del poro.

### Preparación de la columna de inmunoafinidad

Con ayuda de una jeringa se aplican 20 ml de PBS en la columna de inmunoafinidad a una velocidad de 5 ml por minuto. Cuidar de no dejar secar el gel y mantener la columna en medio húmedo.

### Aplicación de la muestra

Se agregan 16 ml de la muestra obtenida del segundo filtrado; a la columna de inmunoafinidad BIO-CODE previamente lavada con 20 ml PBS a una velocidad lenta de 5ml. por minuto cuidando que no se seque la columna.

### Lavado de la columna monoclonal

Se lava la columna monoclonal con 20 ml. de agua destilada a una velocidad de 5ml/min. cuidando el goteo. Una vez que pasó la muestra por la columna, se lava ésta con 20 ml de agua destilada e inyecta aire hasta la sequedad.

### Obtención de aflatoxinas

Se recuperan las aflatoxinas del gel de la columna de inmunoafinidad, agregándoseles 1.5 ml de metanol puro HPLC (con una jeringa conectada a un adaptador) y dejándolo caer por gravedad, recogiendo la muestra en una celda de borosilicato, (con la misma jeringa se pasa aire por el gel) para

recuperar todo el eluido de metanol. (1.5 de MeOH del eluido mas 1.5 ml de MeOH del lavado de la columna de limpieza es igual a 3 ml en la celdilla.

#### Incremento de la fluorescencia

Por fuera de la celdilla, se añaden 2 ml de una solución de bromuro de piridinio perbrómico (PBPB) a una concentración de 50 mg / litro de agua destilada. Antes de realizar la lectura, la celda de borocilicato deberá limpiarse en su exterior y agitar suavemente para homogeneizar la solución.

#### Contenido de la celdilla

La celdilla tendrá 1.5 ml de muestra eluida más 1.5 de metanol para lavar o de arrastre más 2 ml de PBPB que serán 5ml.

Esta mezcla se agita y se deja que reaccione en la obscuridad alrededor de un minuto.

#### Lectura de la fluorescencia para cuantificar aflatoxinas totales

Se calibra el fluorómetro y se coloca la celdilla de limpieza y sin burbujas, en el fluorómetro para tomar la lectura en ppb. Se estará leyendo el contenido de 50 gramos de muestra por camión.

La calibración del fluorómetro se realiza con estándares VICAM, y se toma la lectura de la pantalla, cuyo resultado corresponde en ppb.

#### Calibración del fluorómetro

El aparato ajusta automáticamente: lámpara, p.p.b., tiempo de hacer la lectura e impresora. Se coloca el primer estándar ampollita de color amarillo de 12 p.p.b., en el aparato para que lo registre. La segunda ampollita en el blanco de 1 p.p.b. Al final se coloca la ampollita roja para que el fluorómetro lea automáticamente 24 p.p.b.

En el fluorómetro calibrado, se leen los problemas en el tiempo previamente seleccionado.

Si el resultado del análisis de la muestra compuesta reportaba aflatoxinas en menos de 20 ppb, los camiones que integraron la muestra compuesta pasaban a la secadora (si era necesario) y después a bodega por considerarse apto para el consumo humano; sin embargo también se aceptaron los camiones que contenían producto contaminado fuera de norma tal como se señala en el siguiente capítulo.

El proceso continuaba llevando el camión a pesar a la báscula anotando legiblemente los datos del camión y del conductor, para después almacenar el producto en la bodega, la cual se mantenía bajo constante muestro con la finalidad de controlar la calidad del producto

# CUCBA



## BIBLIOTECA CENTRAL

## V. RESULTADOS

Durante el periodo del 22 de junio al 21 de julio de 1995, en la época de cosecha de maíz, se realizó en el Centro de Acopio de "Los Castellón" Mpio. De Valle Hermoso, Tamaulipas, la prueba de aflatoxinas mediante el método aflatest (Navarrete, 1993) al maíz llevado a este centro de recepción.

Mediante la aplicación de dicho análisis, pudo determinarse que de los 377 camiones que llevaron maíz al centro de acopio, 330 de ellos (87.54%) presentaban diferentes grados de contaminación con aflatoxinas; dependiendo su nivel de contaminación del sitio del cual provenían.

Del total de los envíos, cuatro de ellos (1.06%) fueron rechazados por presentar valores de aflatoxinas mucho más allá de los permisibles para su manejo; los valores que presentaron sus muestras fueron los más altos de toda la temporada de acopio, estos fueron dos envíos de 1,100 ppb; uno de 1,240 y otro de 2100 ppb. Debido a que este material no se incorporó al depósito, la cantidad de toneladas no fue estimada.

Como puede observarse en la Figuras 2 y 3, del total del producto recibido para su almacenamiento (373 camiones equivalentes a 76,720.4 Ton); solo 47 muestras (12.5%) estuvieron libres de contaminación por aflatoxinas, estas representaron solo 1,007.5 Ton (13.2%) de maíz. Sin embargo el resto, 330 muestras (87.5%) que representaban 6,612.9 ton (86.8 %) presentaron contaminación de aflatoxinas mediante la prueba aplicada, cuyo rango varió de 1 a 800 ppb.

De manera particular, los niveles de contaminación que se manejan a continuación, corresponden a los patrones establecidos para el análisis de aflatoxinas en muestras de maíz establecidos por ANDSA; la cual considera, como ya se menciona en el capítulo cinco, tres niveles de contaminación con aflatoxinas.

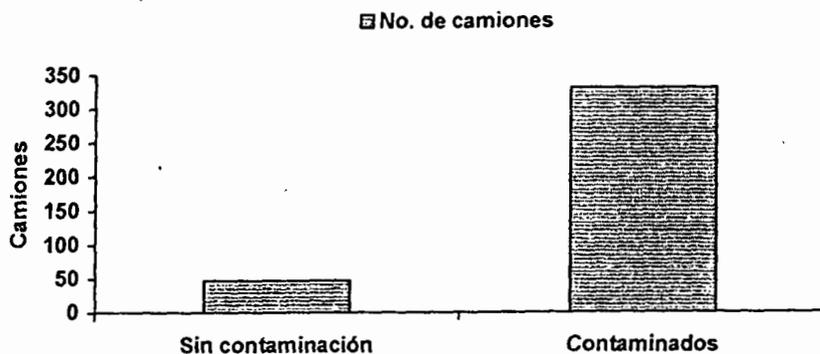


Figura 2. Numero de camiones sin contaminación y contaminados con diferentes niveles de aflatoxinas. Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. De Valle Hermoso Tam. 1995.



Figura 3. Numero de toneladas de maíz recibidas sin contaminación y contaminadas con diferente nivel de aflatoxinas en el Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. De Valle Hermoso Tam. 1995.

La distribución de los niveles de contaminación en el total del producto recibido (numero de camiones y tonelaje) se muestra en las figuras 4 y 5. De las muestras evaluadas, 210 muestras (55.7%) que correspondieron a 4,303.6 Ton. (56.5% del tonelaje total), se ubicaron en el rango de 0 a 20 ppb; mientras que 89 muestras (23.6%) presentaron niveles entre 21 y 100 ppb, representando 1,768.5 Ton. (23.2%); las muestras con los valores más altos de contaminación superior a las 100 ppb. , fueron 74 (19.6%) equivalentes a 1548 ton (20.3%).

Ahora bien, la relación que se dio entre contenido de aflatoxinas (promedio por día) y la cantidad de producto recibido (toneladas), se presenta en la Figura 6 para cada uno de los niveles de contaminación manejados sobre la base de la norma de ANDSA; el análisis individual de los valores muestra que los mayores niveles de contaminación (mas de 100 ppb) se presentaron en los envíos de maíz recibidos los días 5 y del 7 al 11 de julio, siendo estas superiores a las 150 ton por día. Mientras que los menores valores de contaminación se recibieron del 24 de junio al 8 de julio, en envíos de maíz superiores a las 200 ton por día. Así mismo, se observa que durante varias fechas sobre todo, en la segunda mitad de la época de recepción se observa muchos envíos, con contenido de aflatoxinas superiores a 50 ppb con relación a las pocas toneladas de maíz recibidas en el día (menos de 100 toneladas por día).

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

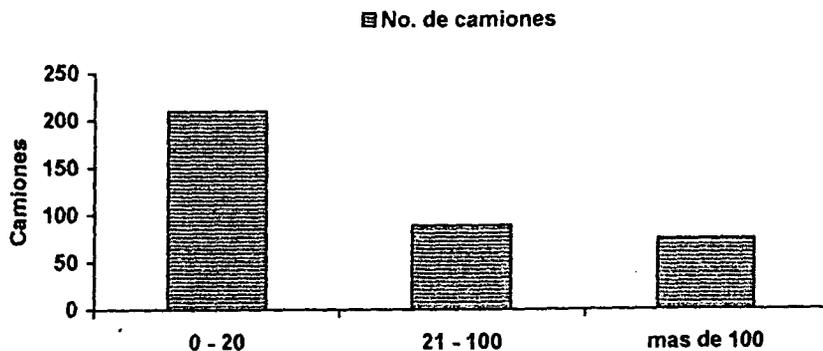


Figura 4. Numero de camiones con maiz recibidos con diferente contenido de aflatoxinas. Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. De Valle Hermoso Tam. 1995.

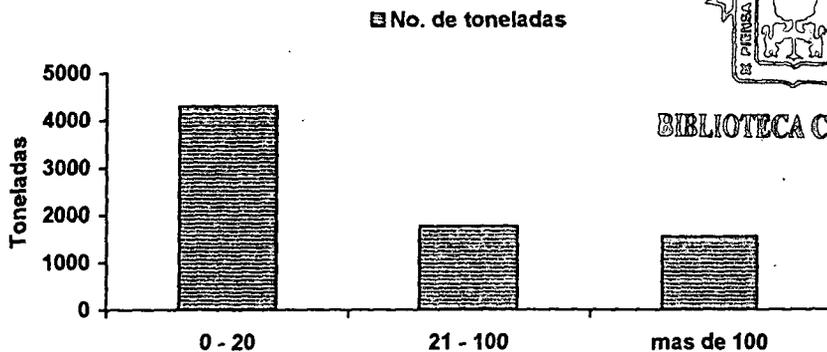


Figura 5. Numero de toneladas de maiz recibidas con diferente contenido de aflatoxinas en el Centro de Acopio Los Castellon. Mpio. De Valle Hermoso Tam. 1995.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

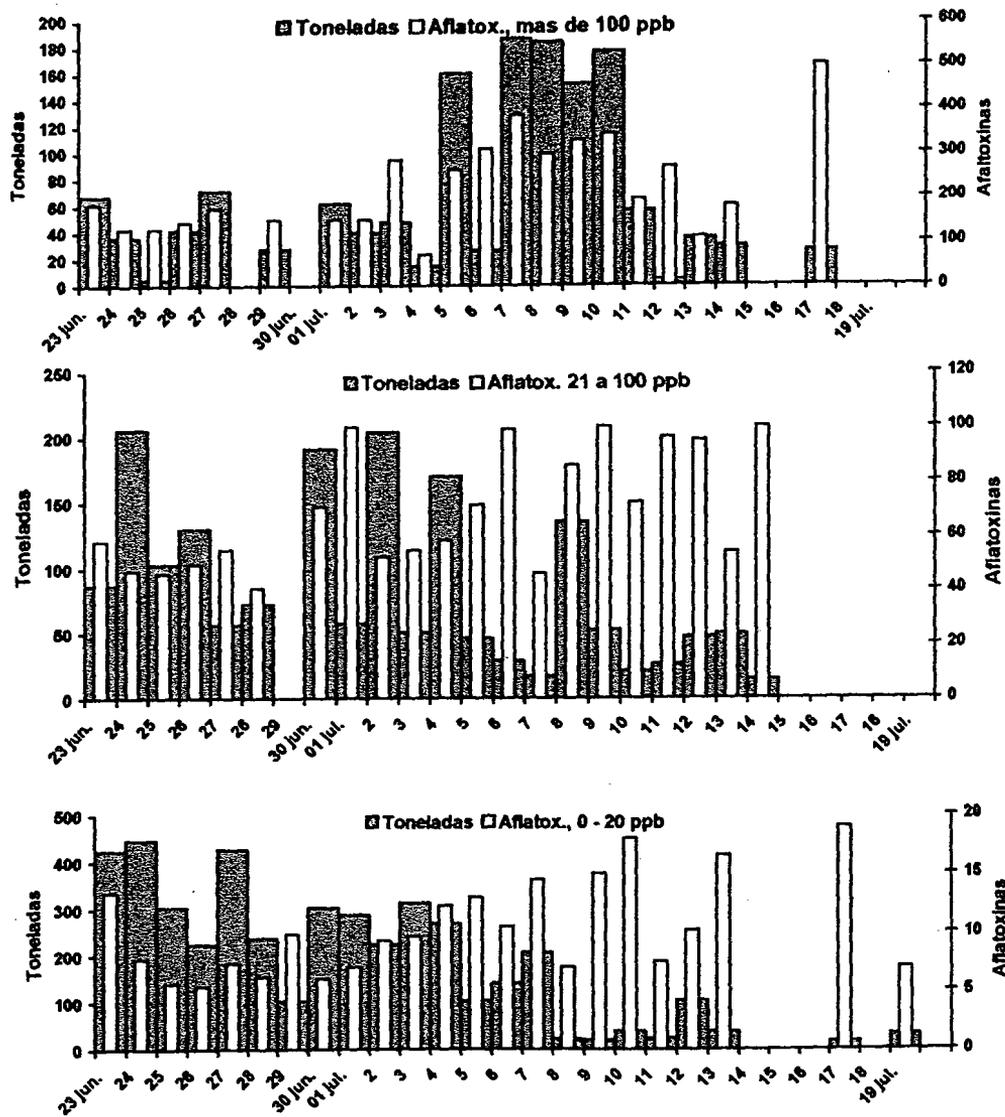


Figura 6.

Numero de toneladas de maiz y su contenido de aflatoxinas recibidas por dia en el Centro de Acopio Los Castellón. Mpio de Valle Hermoso Tam. 1995.

## VI. CONCLUSIONES

1. El resultado de las pruebas sobre el contenido de aflatoxinas aplicadas durante el periodo del 23 de junio al 19 de julio de 1995, a los envíos de maíz al Centro de Acopio de los Castellón, confirma los altos niveles de contaminación presentes en la región norte del Estado de Tamaulipas.
2. Solo cuatro envíos fueron descartados por presentar niveles de contaminación mas allá de los que pudiera manejar ANDSA, estos fueron del orden de las mil y dos mil ppb.
3. Solo una mínima parte de los envíos (menos del 13%) y de manera correspondiente del numero de toneladas (13%) estuvieron libres de la presencia de aflatoxinas.
4. Del producto recibido aproximadamente el 56% (4,303.6 Ton), presentaron niveles de contaminación que permitían su uso para el consumo humano; el 23% (1,768.5Ton.) presentaron niveles de contaminación que solo posibilitaban su uso como forraje y el otro 23% (1,548.3 Ton) presento niveles de contaminación que lo hacían solo permisibles para comercialización controlada para la industrialización.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar J. 1991. Consejos para almacenar maíz en casa. Secretaria de Educación Pública, G.E.A..
- Aldrich S.R. y E. Leng. 1974. Producción moderna de maíz. Hemisferio Sur. Buenos Aires Argentina
- Badoui D.S. Química de los alimentos. "Proteínas". Editorial Alhambra Mexicana, S.A. de C.V. 1989.p.p.145
- Compañía Nacional de Subsistencias Populares CONASUPO 1990. Instructivo de Actividades del Analista-Almacenista. Gerencia Nacional Noreste.
- Córdoba A. H. 1990 Instructivo de actividades del analista. Gerencia Regional Noreste. Bodegas rurales CONASUPO S.A. de C.V.
- Deacon J.W. 1998. Introducción a la micología moderna. Depto. De Microbiología. Univ. De Edimburgo.
- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) 1980. Compendio de enfermedades del maíz. Universidad de Illinois. Ed, Hemisferio Sur. España.
- Díaz de la C. B. 1993 Identificación de hongos contaminantes de maíz *Zea mays* L., almacenado en Autlan, Colotlan, Tala, Zapopan y Tlajomulco. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad de Guadalajara, México.
- Diener U. L. y N. D. Davis. Aflatoxin in maize. " Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Aproceedings of workshop. Zuber M. S., E. B. Lillehoj y B. L. Renfro. CIMMYT. p.p. 33-40

- Garza C. y Morales H. 1992 Revista de la Sociedad Química. "Determinación del contenido de aflatoxinas en maíz bajo diferentes tiempos de cocimiento y con concentraciones de cal", Vol. 36. Núm. 6. México, D.F., p.p.17
- González A.U. 1995. El maíz y su conservación. Primera Ed. Trillas.
- Gutiérrez S. M. y H. Rios. "Determinación de Aflatoxinas en Tortillas de Maíz Nixtamalizado y Demostración de su Reactivación en el Sistema Digestivo por la Acción de pH Ácido". Tesis, Químico Farmacobiólogo. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Ciencias Químicas Cd. Reynosa, Tam.
- Günter R.A. 1986. Lista de hongos fitopatógenos de Cuba. Científica Técnica. Cd. De la Habana, Cuba.
- Guzmán de Peña G. 1992. Efecto de la nixtamalización en maíz contaminado con aflatoxinas. Suplemento de El Nacional. Pág. 8. Enero 28.
- Jugenheimer R. 1985. Maíz - Variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. 1973. Memorias del Simposio sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo. Centro Médico Nacional. México D.F.- Colegio de Postgraduados - ENA. Chapingo Edo., de Mex.
- Moreno, E.M. y M Gil. 1990. "Aspergillus Flavus y la Producción de Aflatoxinas". Manual Técnico. Almacenes Nacionales de Depósito, S.A. Dirección de Operación. Centro Nacional de Investigación.

- Navarrete H. 1993. "Análisis de Aflatoxinas en la Recepción de Maíz". Manual técnico. Almacenes Nacionales de Depósito S.A. Dirección de Operaciones, Centro Nacional de Investigación, Certificación y Capacitación.
- Ochse J.J. y M.J. Soule Jr. 1986. Cultivo y Mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Limusa, Mex.
- Olmos J. 1993. Insectos que dañan granos y semillas post-cosecha y semillas de almacenamiento en el Mpio. San Juan de los Lagos, Jal. Tesis Ing. Agónomo. Universidad de Guadalajara.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 1993. El maíz en la nutrición humana. Roma.
- Ortiz A. Cornejo 1992. Manual de Procedimientos para el Análisis de Aflatoxinas. ANDSA. Dirección de Operación. Centro Nacional de Investigación, Certificación y Capacitación.
- Parsons D. B. 1987. Maíz, manuales para la educación agropecuaria. Sexta Ed. Trillas. México. pp. 9-16
- Reyes P. 1990 El maíz y su cultivo. México.
- Reyes C. 1992. Seminarios Técnicos. "Aflatoxinas en maíz". Campo Experimental Sur de Tamaulipas. INIFAP. México ,
- Rodríguez A. 1993. Efecto de la limpieza en nixtamalización y acidificación de maíz contaminado con aflatoxinas. Tesis Químico Farmacobiologo, Universidad Autónoma de Tamaulipas.

Universidad Autónoma de Tamaulipas 1992. Manual del curso de capacitación para el análisis de aflatoxinas en la recepción del maíz perteneciente al ciclo de cosecha primavera - verano 1992. en el Estado de Tamaulipas.

Valle P.V. 1991. Toxicología de Alimentos. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Programa de Salud Ambiental. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Metepec. Estado de México, México 1991.

Wong E. S. y Hsieh D.P. Proc. National Academy Science. "Mutagenicity of aflatoxinas related to their metabolism and carcinogenic potential". Vol. 73. Núm. 7. 1976. pp. 2241-2244.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL