

T
15.952492
1460
979
3 CC. QQ.

094600
E. 2.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

INVESTIGACION Y CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN MAIZ DE CONSUMO

TESIS PRESENTADA POR

MERCEDES ELIZABETH GALAN ACEITUNO

PREVIA OPCION AL TITULO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL 1979

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA





UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR : DR. EDUARDO BADIA SERRA
SECRETARIO GENERAL : DR. JORGE FERRER DENIS

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO EN FUNCIONES : DR. EDUARDO BADIA SERRA
SECRETARIO EN FUNCIONES : DR. JORGE FERRER DENIS

A S E S O R

DRA. LETICIA CALDERON DE MACHADO

JURADO DE TESIS

DRA. ALBA GLORIA CAÑAS

DRA. GLORIA RUTH CALDERON

DR. OSCAR ORLANDO CUELLAR

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

A las doctoras Letty Calderón de Machado, Gloria Ruth Calderón, Alba Gloria Cañas, María del Carmen de Arriola y Fabiola de Micheo, por su valiosa orientación durante el desarrollo de la investigación.

Al personal del Departamento de Análisis Bromatológico de la Facultad de Química y Farmacia y a todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo.

D E D I C A T O R I A

A MIS PADRES Y ABUELITAS

A MI ESPOSO

A MIS HIJOS

A MIS HERMANOS, AMIGOS Y COMPAÑEROS

I N D I C E

	<u>Página</u>	
I	OBJETIVOS	1
	- Introducción	2
	- Bioquímica de aflatoxinas y mecanismo de acción	6
II	PARTE EXPERIMENTAL	
	- Obtención y reparación de las muestras	12
	- Fundamentos de los métodos y cálculos	16
III	RESULTADOS	19
IV	DISCUSION	21
V	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	24
VI	BIBLIOGRAFIA	27
VII	APENDICE	
	- Fórmulas de las principales aflatoxinas y algunas constantes físicas y químicas.	1
	- Descripción de las técnicas utilizadas	5
	- Cuadros demostrativos de intoxicaciones, condiciones adecuadas de almacenamiento y diluciones máximas permitidas de piensos contaminados	22
	- Procedimientos recomendados para la descontaminación de material infestado por aflatoxinas.	30

O B J E T I V O S

- I. Investigación y cuantificación de aflatoxinas en maíz de consumo nacional correspondiente a las cosechas que comprenden los años de 1975 a 1977, incluyendo también muestras de maíz de importación.

- II Comparación de métodos químicos para el análisis del contenido de aflatoxinas, los cuales están -- indicados para el uso en nuestros Laboratorios.

- III Hacer conciencia del peligro potencial que representan las aflatoxinas, tanto en la salud humana como animal, y sugerir medidas que puedan adoptarse para evitar su formación en granos almacenados y en campos de cultivo.

INTRODUCCION

Las Aflatoxinas son toxinas producidas por una serie de hongos del tipo *Aspergillus* (*flavus*, *fumigatus*, etc.) y fueron detectadas por primera vez en el año de 1960 en un brote de peste en pavos de una localidad de Inglaterra, dada la naturaleza desconocida de dicha enfermedad se le llamó "Enfermedad pavo X". El origen del problema fué seguido hacia el alimento de maní ingerido por los pavos procedente del Brasil, el cual resultó contaminado por el hongo *Aspergillus Flavus* (1).

Gracias a estudios realizados en Estados Unidos, Inglaterra, y Africa, se encontró que varios derivados químicos producidos por este hongo eran los responsables de los síntomas de la nueva enfermedad (1).

El termino de Aflatoxinas se deriva de la primera letra de *Aspergillus*, las tres primeras de *flavus* y la palabra toxina se usa como término general para denominar estas toxinas, aunque se ha comprobado que no todas las cepas de *A. Flavus* son capaces de producirla. (2)

Las cuatro aflatoxinas más conocidas se denominan B_1 , B_2 , G_1 y G_2 y esta nomenclatura obedece al color de su fluorescencia azul (Blue) y verde (Green) que presenta bajo luz ultra-

(1) Aflatoxinas, Algunos Problemas y Progresos BIM, Boletín Informativo Manisero. Córdoba. Julio/Octubre 1971

(2) Mycopathología et Mycologia Aplicata, Vol. 44 1971
Ocurrence of Aflatoxin Producing Strains of
Aspergillus Flavus Link in Stored Corn.

violeta en cromatografía en capa fina.

Normalmente la aflatoxina B₁ está presente en más altas concentraciones, pero su proporción relativa varía de acuerdo a las condiciones de crecimiento y potencia del organismo (3).

Originalmente las Aflatoxinas fueron encontradas como contaminantes del maní, pero han sido descubiertas en distintas partes del mundo en avena, trigo, soja, sorgo granífero, heno, alimentos de semilla de algodón, arverjas, arroz y otros (1) y en vista de que el hongo puede crecer en tal diversidad de cosechas, puede encontrarse presente en los campos de cultivo, granos almacenados y productos envasados.

Existe información respecto a que las Aflatoxinas producen cáncer en varios animales, y se ha comprobado que se efectúan cambios en los cromosomas de algunas plantas y animales que pueden ser transmitidos a generaciones futuras.

Hasta la fecha no se ha comprobado el efecto de estas micotoxinas sobre nuestra salud, y solamente se han formulado hipótesis acerca del posible papel de estas sustancias en la incidencia de hepatomas en ciertos grupos de población del mun

(3) Jones, B.D. Tropical Products Institute
G 70 Methods of Aflatoxin Analysis, April 72

do, donde se encuentran más expuestos al consumo de alimentos contaminados con hongos y sus metabolitos.

El envenenamiento por Aflatoxinas ha sido observado en vacunos, ovinos, cerdos, aves y animales de vida salvaje, y los efectos pueden variar entre animales de parentezco cercano, particularmente se presenta mayor susceptibilidad en animales jóvenes. (Apéndice cuadros Nos. 1 y 2).

Pueden observarse lesiones hepáticas, cojeras, convulsiones, hemorragias, falta de apetito y muerte. En especies muy sensibles, dosis tan pequeñas como 0.4 ppm pueden causar la muerte (Apéndice cuadro No. 3)

En vista de la extrema toxicidad y carcinogenicidad, y de la amplia distribución de las aflatoxinas, se ha invertido mucho esfuerzo para un control efectivo de la distribución de alimentos y forrajes que parecen contenerlas (2).

Esto ha creado la necesidad de desarrollar métodos sensibles para la determinación de Aflatoxinas en productos agrícolas y se han desarrollado dos tipos básicos de ensayos para la detección del material tóxico; pruebas biológicas y pruebas químicas (3), siendo la cromatografía la técnica más utilizada, ya que posibilita su separación de los otros constituyentes presentes en las muestras alimenticias. Los procedi-

mientos biológicos no han tomado suficiente desarrollo para el uso rutinario.

Ya que las aflatoxinas son muy estables al calor, no son normalmente destruidas por este proceso, pero se están realizando estudios que involucran el uso de otros microorganismos, métodos de extracción y métodos químicos para destruirlas o retirarlas de los elementos alimenticios; de todos modos, ninguno de estos métodos son factibles como un control de procedimiento práctico rutinario, y el mejor control que se puede tener es evitar su formación más bien que tratar su remoción después de su ocurrencia. Esto puede efectuarse mejor por: la regulación de cultivo, prácticas de riego y condiciones de almacenaje para reducir al mínimo el desarrollo del hongo *Aspergillus flavus*.

Los fungicidas para el control de *Aspergillus flavus* no parecen ser prácticos para la destrucción de Aflatoxinas (1).
(Apéndice Cuadro No. 5)

Las Aflatoxinas son producidas en pequeñas cantidades únicamente con propósitos experimentales. La producción es por fermentación en gran escala de sustratos sólidos o medios líquidos, de los cuales son extraídas y purificadas por cromatografía. Una producción anual total probablemente no excede a los 100 gm.

Bioquímica de las Aflatoxinas y Mecanismo de Acción

En relación a los alimentos visiblemente mohosos, las probabilidades de encontrar aflatoxinas son mayores, pero la segregación de estos lotes no es garantía de la ausencia de contaminación por micotoxinas en lotes aparentemente de buena calidad, y la única demostración cierta de su presencia en un alimento es el análisis de las toxinas. La ocurrencia de *A. flavus* ó *A. parasiticus*, ó los recuentos elevados de mohos, no pueden dar seguridad de la presencia de las toxinas.

Se han destacado varios casos en los cuales las autoridades Gubernamentales, han destruido cantidades importantes de granos (maíz y sorgo) por haber encontrado aflatoxinas en niveles mayores que los recomendados por el grupo consultor de proteínas (P.A.G. de U.N.) y la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA).

Varios de los cargamentos destruídos provenían del extranjero y por condición de importados fueron sometidos a análisis. Existen evidencias de que los granos nacionales pueden contener cantidades aún mayores de aflatoxinas.

El problema obviamente no puede resolverse mediante la destrucción del grano en una región que padece ya de desnutrición en un fuerte sector de la población; es necesario aplicar medidas de detoxificación o medios más simples como la mezcla de lotes fuertemente contaminados con lotes sanos para diluir las toxinas. (Apéndice Cuadro No. 7)

Cierto sector privado empresarial está interesado en el control de las micotoxinas por las pérdidas potenciales en aves de corral y ganado porcino (9).

Mecánismo de acción de Aflatoxinas (10)

Clifford y Rees (1966-1967) sugirieron que el mecanismo de acción de las aflatoxinas en el organismo es el siguiente:

- Penetra en las células y núcleos de células y luego se combina con el ácido desoxiribonucleico (DNA)
- El índice de síntesis de ácido ribonucleico (RNA) está consecuentemente reducido e inhibido el ácido ribonucleico mensajero (m-RNA)
- En unos quince minutos la síntesis de proteínas es bloqueada a causa de esta inhibición del m-RNA y la mitosis es seguida de muerte celular.

(9) Resúmenes Técnicos. Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial ICAITI, División de Investigación Aplicada. Estado Actual de la Investigación de Micotoxinas en Centro América. Año 4 No. 1, Guatemala Abril 1978.

Las aflatoxinas son probablemente excretadas con rapidez; - dentro de las 24 horas de ingestión el nivel de las toxinas en el organismo desciende por debajo del límite de detección (0.04 ppm en el patito). Los animales excepcionalmente - susceptibles a las aflatoxinas metabolizan las mismas en el hígado, formando otros metabolitos que pueden resultar todavía más tóxicos que las mismas aflatoxinas; mientras que los animales menos susceptibles probablemente metabolizan aflatoxinas en menor grado.

Signos de envenenamiento por Aflatoxinas. (Apéndice cuadros- Nos. 3 y 4)

Los animales jóvenes y hembras grávidas son particularmente susceptibles a las aflatoxinas. Las señales características de intoxicación por aflatoxinas son:

- El "síndrome hemorrágico", observado principalmente en aves, terneros y cerdos' y
- Trastornos hepáticos graves, observados casi en todo tipo de ganado.

Los niveles de las enzimas en el plasma (como la fosfatasa alcalina y la transaminasa glutamato-oxalato), tienden a aumentar, pero la actividad de las enzimas hepáticas (como el succinato-dehidrogenasa; adenosíntrifosfatasa, fosfatasas - ácidas y alcalinas y difosfatasa inosina) están reducidas. Las aflatoxinas interfieren también el metabolismo de los - minerales y vitaminas esenciales. Se han encontrado las

siguientes condiciones adversas a consecuencia de una intoxicación por aflatoxinas en el ganado.

- Niveles menores de calcio, magnesio y fósforo en la sangre del ganado vacuno;
- Casi ninguna vitamina A en el hígado, en donde normalmente se almacena la vitamina A en cerdos y vacuno.
- Y disminución de la coagulación sanguínea, que sugiere algún antagonismo con la vitamina K.

Se sabe también que las aflatoxinas son fuertemente carcinogénicas. Las truchas son particularmente susceptibles; desarrollando hepatomas en menos de diez meses al alimentarlas con piensos que contienen de 0.5 a 2 mg. de aflatoxinas por kilo.

Los efectos carcinogénicos de las aflatoxinas en los animales de laboratorio se investigaron extensamente.

La dosis carcinogénica de aflatoxinas para la rata es de unos 10 Ugm al día - en comparación con 9000 Ugm. al día de amarillo mantequilla o del amarillo metilo (dimetilaminoazobenceno) que es otra sustancia altamente carcinogénica.

La intoxicación por mohos y micotoxinas se trata en principio

sintomáticamente; los posibles métodos de tratamiento son:

- Empleo de carbón animal para absorber las toxinas;
- Empleo de estimulantes en casos de parálisis;
- Empleo de purgantes y diuréticos para acelerar la excreción;
- Empleo de sedantes en casos de agitación y
- Empleo de emolientes, agentes antiinflamatorios y antifermentativos en casos de inflamación gastrointestinal.

La primera medida mas obvia, es desde luego, la suspensión del pienso contaminado.

En cuanto a la relación que puede existir entre las Aflatoxinas y la salud del hombre, se han publicado muchos estudios que dejan ver la relación que existe entre la ingestión de Aflatoxinas y la incidencia o prevalencia de cáncer primario en el hígado.

El nivel de Aflatoxinas y los rangos de incidencia de cáncer en el hígado, fueron positivamente correlacionados en Uganda, Tailandia, Muranga, distrito de Kenya y Mosambique, en donde se encontró una alta frecuencia de contaminación de Aflatoxinas en muestras de alimentos del mercado (Apéndice Cuadro No. 6)

Se publicaron los resultados de un estudio seguido durante -

11 años en 67 hombres que habían inhalado partículas contaminadas con aflatoxinas mientras trabajaban en un molino triturador de maní y otras semillas oleaginosas. Dos de 65 hombres mayores de 39 años revelaron la enfermedad fatal del hígado durante su primera exposición con Aflatoxinas y 11 revelaron cáncer en varios órganos. Al principio se pensó que el cáncer podía haberse originado en el hígado (posiblemente un carcinoma Cholangiocellular). Estos 13 hombres habían inhalado dosis de aflatoxinas estimadas entre 160 y 395 $\mu\text{g}/\text{M}^3/\text{hombre/semana}$. En 65 hombres para control, se revelaron cuatro cánceres, y ninguno murió de enfermedad del hígado. El exceso de cáncer observado en este estudio no fué estadísticamente significativo, pero el número de sujetos fué insuficiente para excluir una significativa y positiva correlación.

I I

P A R T E

E X P E R I M E N T A L

Precaución: En la pulverización de muestras secas pueden resultar partículas que queden suspendidas en el aire y aun que no haya presencia de toxinas, existe un peligro potencial de inhalación de esporas de mohos o respuestas alérgicas al polvo inhalado; deberán usarse entonces mascarillas protectoras o recolectoras de polvo (4).

Hay que tomar en cuenta que la contaminación por Aflatoxinas en productos particulares como granos y nueces puede variar desde concentraciones grandes hasta concentraciones pequeñas y generalmente no están distribuidas de manera uniforme, por lo que la preparación de la muestra y el muestreo, deberán hacerse con este factor en mente, y considerando la posibilidad de pequeñas contaminaciones, deberá usarse toda la muestra de laboratorio en la preparación de la muestra que se va a analizar.

Debe tratarse hasta donde sea posible, la reducción del tamaño de partícula y uniformidad en el mezclado para lograr una distribución efectiva de la porción contaminada. Un maíz contaminado (aproximadamente 0.5G), puede contener suficiente cantidad de Aflatoxinas para resultar en un nivel

significativo cuando se mezcle con 10.000 maíces (aproximadamente 5k o 10 lbs.)

Para obtener \geq 1 pieza de maíz contaminado en cada 50 G. de porción tomada, este único grano debe ser reducido a 100 partes, y estas 100 partes deberán ser uniformemente distribuidas a través de la masa entera. Para alcanzar este grado de reducción del grano, el maíz deberá ser pulverizado para que pase a través de un tamíz No. 20 (4).

OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras que incluyen maíz nacional y de importación, fueron tomadas en la Planta Almacenadora de Granos del Instituto Regulador de Abastecimientos (IRA), situada en San Martín, Km. 18 de la Carretera Panamericana que conduce a San Miguel.

Treinta silos de 9 metros de altura con una capacidad de - 14.000 quintales cada uno fueron muestreados con sonda de profundidad a 3, 6, 9, 12, 15 y 18 piés de altura, tomando cada muestra de diferentes puntos del mismo.

Estas muestras parciales fueron mezcladas y homogeneizadas para obtener una muestra total representativa del silo y - de cada una de estas muestras se pesó una libra de maíz - que constituía la muestra que sería analizada.

Las muestras fueron pulverizadas utilizando para ello un - molino Thomas-Willer, Modelo 4 (Arthur H. Thomas Company), hasta que atravesaron un tamiz No. 20 y luego homogeneizadas durante 15 minutos para lograr una mejor distribución de partículas contaminadas. De esta muestra pulverizada y homogeneizada se pesó la cantidad indicada en cada uno de los análisis.

Después de pulverizar cada muestra el molino se limpiaba -

con corriente de aire a presión para evitar contaminación de una muestra con la siguiente.

MATERIALES Y METODOS

A. Técnica a la minicolumna

En este método la toxina es extraída de la muestra usando acetona: agua (85:15) como solvente de extracción, y las impurezas son precipitadas con sulfato de amonio al 40%.

La toxina es luego extraída de la capa acetónica por medio de benceno, el cual es colectado y evaporado en un vial y el extracto seco disuelto nuevamente en una mezcla de cloroformo: acetona (9:1). Este extracto se hace pasar a través de la minicolumna, la cual se compara con un blanco y un standard.

(Apéndice página No.5)

B. Técnica por cromatografía en capa fina previa depuración por cromatografía en columna.

La toxina es extraída de la muestra usando una mezcla de metanol: agua (55:45) como solvente de extracción y simultáneamente algunas impurezas y grasas son extraídas de la muestra por medio de n-hexano. La toxina extraída en la capa metanólica es colocada en una columna cromatográfica usando celite como soporte, y los componentes grasos de la muestra eluidos con n=hexano.

Finalmente la toxina es eluida de la columna usando cloroformo: n-hexano (1:1) hasta colectar 600 ml, los cua--

les son evaporados y el extracto seco disuelto en benceno. El extracto así obtenido es aplicado en cromatografía en capa fina y su Rf comparado con el de los standares de Aflatoxinas.

(Apéndice página No, 10)

c. Técnica por cromatografía directa en capa fina

La toxina es extraída de la muestra usando como solvente de extracción una mezcla de acetona: agua (85:15) - y las impurezas precipitadas con acetato de plomo al - 20%. Luego la toxina es extraída del extracto acetónico usando cloroformo como solvente de extracción, el cual es colectado y evaporado en un vial de 4 dracmas. El extracto seco es disuelto en una mezcla de benceno: acetonitrilo (98:2) y aplicado en cromatografía de capa fina, siendo comparado su Rf con el de los Standares utilizados.

(Apéndice página No. 16)

Los cálculos se hicieron usando la formula:

$$\text{ugm/k} = 1.67 (SxYxV) / (XxW)$$

en donde:

S = ul de aflatoxina standar igual al desconocido

Y = concentración de aflatoxina standard en Ugm/ml

V = ul de la dilución final del extracto de la muestra

X = ul del extracto de la muestra aplicada que dió la fluorescencia igual al standard.

W = Gramos de muestras extraída por 20 ml. de cloroformo (17.14 G. para 50 ml. y 6.86 G. para 20 ml. del extracto acetónico).

$$1.67 = \frac{20}{12} \quad (\text{de los extractos cloroformicos})$$

$$S = 2 \text{ ul}$$

$$Y = 1 \text{ ugm/ml.}$$

$$V = 100 \text{ ul.}$$

$$X = 6 \text{ ul}$$

$$W = 17.14 \text{ gm.}$$

$$1.67 \times (2 \text{ ul.} \times 1 \text{ mgm/ml} \times 100 \text{ ul}) / (6 \text{ ul} \times 17.14 \text{ gm})$$

$$1.67 \times (200/102.84)$$

$$1.67 \times 1.944$$

$$= 3.247 \text{ ugm/kilo en las muestras contaminadas.}$$

I I I

R E S U L T A D O S

R E S U L T A D O S

En la tabla de resultados podrá observarse que:

1. Solamente 4 muestras presentaron fluorescencia cuando fueron analizadas por la técnica de la minicolumna, lo cual no dá la certeza de la presencia de toxinas, pero sí la posibilidad de que esten presentes. Por el contrario, de las muestras que no presentaron ninguna fluorescencia puede asegurarse que no contienen aflatoxinas.
2. Usando la técnica por cromatografía en capa fina previa depuración por cromatografía en columna no pudo llegarse a ninguna conclusión, ya que la interferencia de impurezas fluorescentes impidió su cuantificación. De este punto se habla más ampliamente en la discusión de los resultados.
3. Se pudo comprobar que la fluorescencia que presentaban 2 de las 4 muestras era debida a la presencia de aflatoxina B₁, ya que al aplicar el método directo por cromatografía en capa fina pudo compararse el R_f de los standares con el de las muestras. Las otras 2 muestras presentaban impurezas fluorescentes que corrían hasta el frente del solvente.

I V

D I S C U S I O N

DISCUSION

La primera técnica que se aplicó, o sea la de la minicolumna no se hizo con el objeto de determinar la cantidad de toxinas presentes en las muestras, sino para poder seleccionar las - muestras contaminadas que darían fluorescencias, de las no - contaminadas. O sea que esta técnica fue preliminar a la cuantificación, ya que por ser bastante corta, sencilla y - sensible, a cantidades pequeñas de aflatoxinas, nos permitiría elegir las muestras a las cuales se les aplicaría cromatografía en capa fina para cuantificarlas comparando su fluorescencia con la de los diferentes patrones de aflatoxinas.

Cuatro muestras resultaron positivas, como puede observarse en la tabla de resultados y a estas muestras se aplicaron - las técnicas por cromatografía en capa fina.

Se usaron 2 técnicas distintas para poder cuantificar estas muestras positivas, la primera técnica era una adaptación - de una técnica para maní, y la segunda una específica para maíz.

La técnica de cromatografía en capa fina previa depuración - por cromatografía en columna es una técnica cara considerando el gran consumo de reactivos que involucra, además de eso

resulta demasiado larga para adoptarla como técnica de rutina.

No fue posible durante el desarrollo de esta técnica hacer correr en 1 hora, el solvente de elución, que es el tiempo estipulado por la técnica sino, que esto tomó alrededor de 2 días completos, en los cuales se corre el riesgo de evaporación de los eluatos recolectados, debiendo dejar el recipiente marcado con una línea para ver el nivel al que habían quedado las porciones recogidas, incurriendo a un error en la cuantificación.

Otro de los inconvenientes que se encontraron en esta técnica, fué en cuanto al volumen de eluatos que hay que evaporar y llevar a sequedad (600 ml.) que debe hacerse en un recipiente grande, al cual hay que lavar las paredes con una cantidad pequeña de cloroformo para recolectar en un vial de 4 dracmas.

Al correr la cromatografía de capa fina se observó que las 4 muestras que resultaron positivas en la minicolumna presentaban fluorescencias celeste en la placa, pero los R_f de esas manchas fluorescentes no coincidían con el R_f de los estándares de aflatoxinas. Todas las manchas fluorescentes corrían hasta el frente del solvente y no era una mancha deli-

mitada, sino que se extendía a lo ancho de la placa de forma irregular.

Estas manchas fueron raspadas y redisueltas en el mismo solvente, aplicadas nuevamente en capa fina con los mismos resultados, siempre corrían hasta el frente del solvente en forma de una mancha irregular.

También fueron analizadas al espectro comparando su absorbancia contra la de un patrón de aflatoxina B₁, y resultaron con diferentes absorbancias, lo que indicaba que no eran aflatoxinas. Se trataba de impurezas fluorescentes que son extraídas por los mismos solventes específicos de aflatoxinas (Apéndice Cuadro No. 8)

No pudo observarse por esta técnica ninguna fluorescencia que tuviera el mismo Rf que los standares, por lo que no pudieron cuantificarse.

Al aplicar el método directo por cromatografía en capa fina los resultados fueron satisfactorios, y 2 de las 4 muestras originalmente con fluorescencia pudieron cuantificarse, ya que aunque siempre aparecieron las impurezas fluorescentes al frente del solvente, también podían distinguirse las manchas fluorescentes con el mismo Rf de los standares. Las otras dos muestras solamente presentaron la fluorescencia de la impureza.

V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

10. De acuerdo a los resultados puede decirse que la calidad del maíz analizado, en lo que respecta a contaminación con aflatoxinas, es satisfactoria, ya que de los 30 silos analizados se encontró, en 2 de ellos, - niveles inferiores a los 5 ugm/kilo, lo cual no representa mayor riesgo para el consumidor.

2. Ya que los límites de contaminación por aflatoxinas - en diferentes productos alimenticios varía según el - país, y los niveles fluctúan entre 0.005 y 0.2 mg/kilo y 0.03 ppm para alimentos humanos, podemos asegurar que los niveles encontrados están dentro de los límites - establec-idos.

3. El método de la minicolumna nos servirá para orien-tarnos, en caso de dar fluorescencia positiva, de - la presencia de aflatoxinas, pero deberá correrse - cromatografía en capa fina para asegurarse de la - presencia de las toxinas.

4. Las condiciones de almacenamiento de estos granos - analizados han sido adecuados para no permitir desau

rrollo de hongos.

5. Por la información recopilada en este trabajo puede tomarse conciencia del problema que representan las aflatoxinas en la salud, tanto humana como animal, y aunque no pueda asegurarse que son carcinogénicas en el hombre así como en los animales, existe una estrecha relación entre la incidencia de cáncer y la ingestión de aflatoxinas según lo demuestran muchos estudios al respecto.

RECOMENDACIONES

1. Para análisis rutinarios se recomienda el uso de la técnica directa por cromatografía en capa fina, ya que los resultados se obtienen directamente y en un tiempo relativamente corto.
2. Ya que los resultados de las aflatoxinas son estimados, no deben pipetarse nunca los extractos sospechosos de toxinas a menos que se haga con la ayuda de una bomba de succión.
3. Deberá tenerse siempre a la mano solución blanquea

dora de hipoclorito de sodio, con la cual deberá la
vase el área de trabajo, cristalerías, ropa e incluu
so manos después de terminar la jornada de trabajo.

4. Ya que la tendencia de los ingredientes a contaminaru
se con hongos es directamente proporcional al conte-
nido de humedad y condiciones de almacenamiento (du-
ración, temperatura y humedad) resulta de relevante
interés controlar estos factores, ya que es el méto-
do mas económico de evitar la formación de hongos.
O sea que como medida preventiva se sugiere almacenar
los granos a una humedad baja (11 a 13%).

VI

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

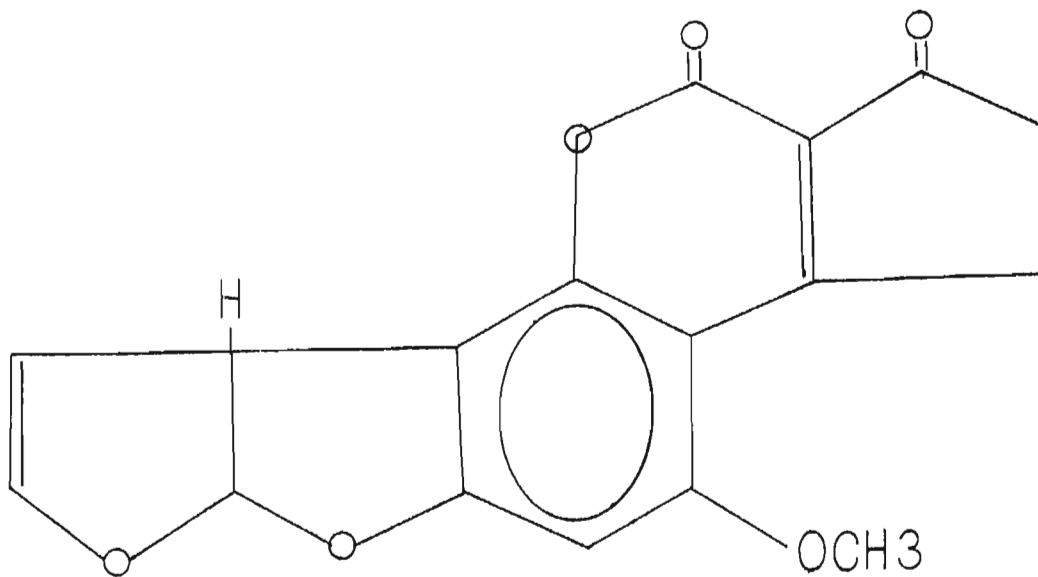
BIBLIOGRAFIA

1. AFLATOXINAS, Algunos Problemas y Progresos, BIM Boletín Informativo Manisero, Córdoba - Julio - Octubre 1971.
2. Mycopathologia et Mycologia Aplicata, Vol. 44 1971 Ocurrance of Aflatoxin Producing Strains of Aspergillus Flavus Link in Stored Corn
3. Jones B.D. Tropical Products Institute G. 70 Methods of Aflatoxin Analysis, April 72
4. Methods of Analysis AOAC 12 th. Edition 1975
5. Journal of the AOAC Vol. 57 No. 3 1974 Rapid Screening Methods for Examining Corn and Corn Derived Products for Possible Aflatoxin Contamination
6. Official and Tentative Methods of American Oil Chemists' Society Third Edition 1971 W.E. Link Tentative Method AB 6-68, Aflatoxins
7. Acuña, D. Benavides, J. Vega, N. Analytical G.T. Methods for Aflatoxins in Corn Samples and Other Agricultural Comodities, 5 th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins San José, Costa Rica 8-13 Agosto 1976.
8. Aflatoxins. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Man Vol. 10 1976
9. Resúmenes Técnicos. Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial ICAITI, División de Investigación Aplicada. Estado Actual de la Investigación de Micotoxinas en Centro América. Año 4 No. 1, Guatemala, Abril 1978.
- 10' Zintzen, H. El problema de las Aflatoxinas, Servicio Técnico Roche, Roche International Ltda. Casilla 149 Montevideo, Uruguay 1975.
11. Stollof, L. y Trager, W. Recomend Descontamination Procedures for Aflatoxin. J. Assoc. Off Chemist 48 (3)

VII

A P E N D I C E

FORMULAS DE LAS PRINCIPALES AFLATOXINAS

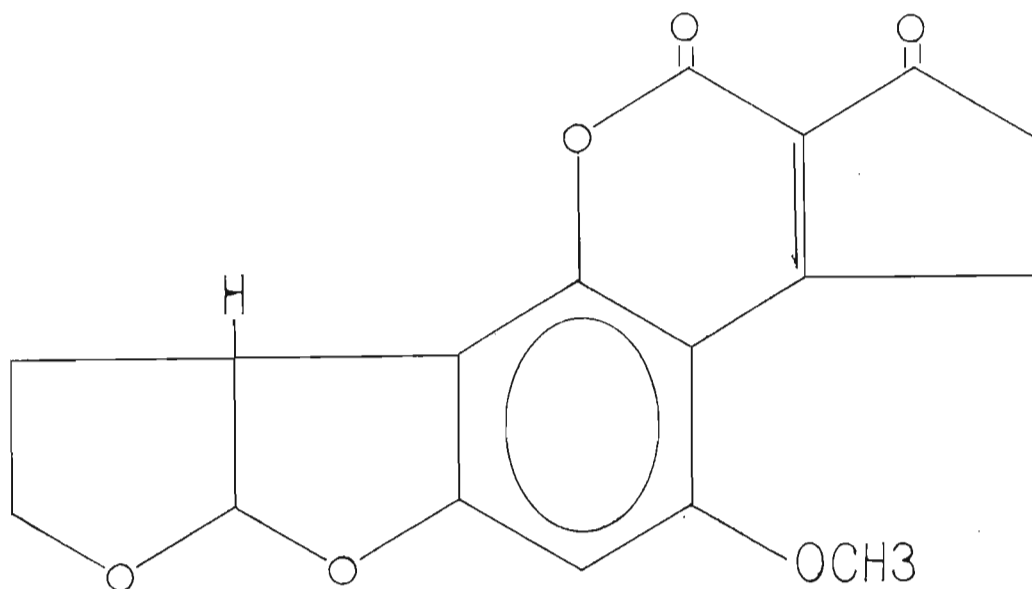


NOMBRE : AFLATOXINA B₁

FORMULA QUIMICA : C₁₇ H₁₂ O₆

PESO MOLECULAR : 312.3 Gm.

NOMBRE QUIMICO : (6aR-Cis) (2, 3, 6a, 9a.) Tetra. hidro
 -4-metoxi-ciclopenta (C) furo (3', 2':
 4,5) furo (2,3-h) (2) benzopiran-1-11-diona.



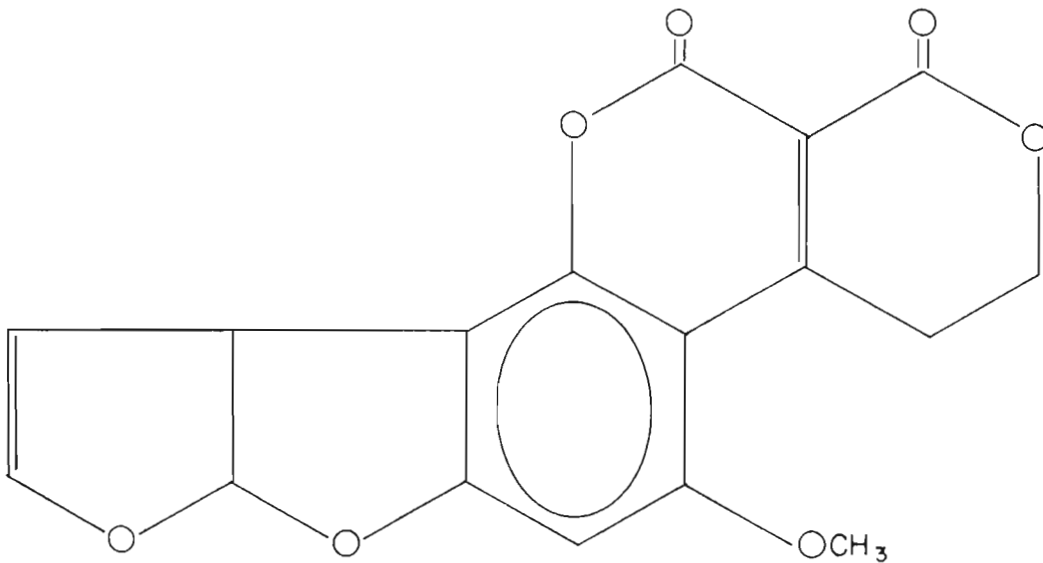
NOMBRE COMUN : AFLATOXINA B₂

NOMBRE QUIMICO
SEGUN CHEMICAL
ABSTRACT

: (6 aR-Cis) (2,3,6a, 8,9,9a) Hexahidro-4-metoxi-ciclopenta (C) furo (3',2':4,5) furo (2,3,h) ("2)benzopirán--1,11 diona

PESO MOLECULAR : 314.3

FORMULA QUIMICA : C₁₇ H₁₄ O₆

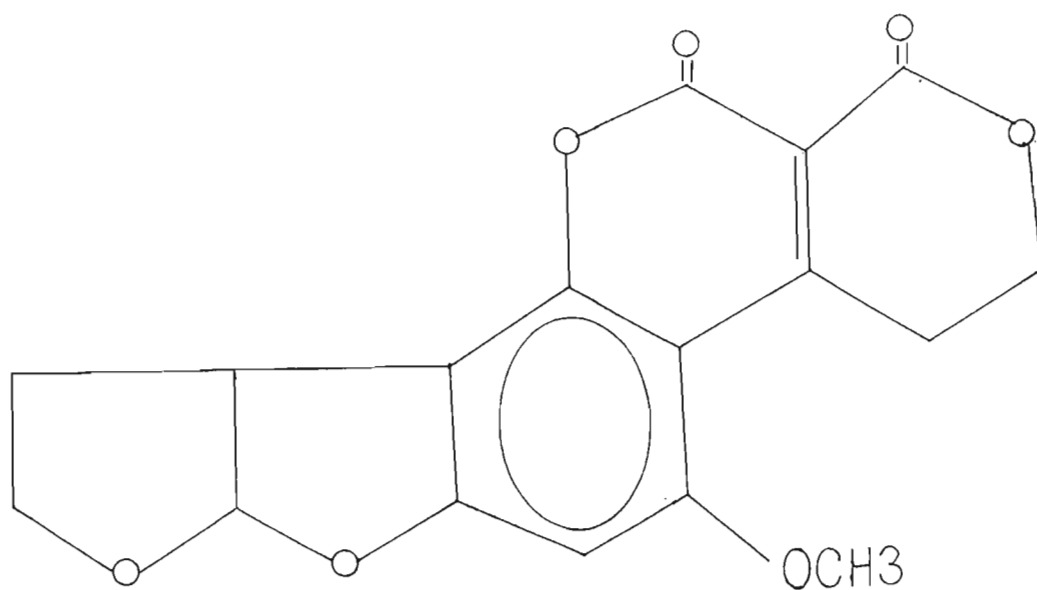


NOMBRE COMUN : AFLATOXINA G₁

NOMBRE QUIMICO
SEGUN CHEMICAL
ABSTRACT : (3, 4, 7a, 10a) Tetrahidro-5-metoxi-
1H, 12H furo-(3',2':4, 5) furo (2,3,h)
pirano (3, 4,c) (2) benzopiran 1, 12

PESO MOLECULAR : 328.3

FORMULA QUIMICA : C₁₇ H₁₂ O₇



NOMBRE COMUN : AFLATOXINA G₂

NOMBRE QUIMICO
SEGUN CHEMICAL
ABSTRACT

: (7aR-Cis) (3,4,7a,9,10,10a) Hexahidro-5-Metoxo-1H,12H-fuso (3',2': 4,5) furo (2,3-h) pirano (3,4-c) (2) benzopirán 1-12 diona

PESO MOLECULAR : 330.3

FORMULA QUIMICA : C₁₇ H₁₄ O₇

A - TECNICA DE LA MINICOLUMNA (5)Reactivos:

- _ Solventes acetona, Cloroformo y Benceno calidad reactivo, envasado en recipientes de vidrio.
 - Florisil 100-200 mesh (Fisher Scientific Co. No. F - 101) desecado a 110°C durante 2 horas.
 - Alumina neutra 80-100 mesh Brockman activity 1 (Fisher Scientific Co. No. A 950) desecada a 110°C durante 2 horas.
 - Silicagel E Merck No. 7734 desecada a 110°C durante 2 horas.
 - Tierras de diatomáceas. Celite 545 (Jhons-Manville Corp.)
 - Solución standard de Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂).
- NOTA: La Alumina, Florisil y Silicagel deberá mantenerse endesecador.

Preparación de la columna:

- Colocar en el extremo de un tubo de vidrio de 3mm. de diámetro interno y 23cm. de largo un tapon de 5mm. de lana de vidrio. Con la ayuda de una cucharita y un embudo, agregar en el siguiente orden:
 - 1o.) 5-7mm arena granulo fino
 - 2o.) 5-7 mm. florisil 100-200 mesh

3o.) 19-20mm silicagel

4o.) 10-15mm alúmina

Compactar un poco después de cada adición para formar capas finas.

Extracción de las Aflatoxinas

De una muestra representativa perfectamente mezclada, que deberá pasar por un tamiz No. 10, pesar 50 G y colocarlos en el vaso de la licuadora.

- Agregar unos 10 G de celite como auxiliar de filtración y 150 ml. de acetona-agua (85:15). Licuar - por 3 minutos a alta velocidad.
- Filtrar por gravedad através de un papel filtro de poro grueso de 18.5cm. de diámetro colectando de - 60-70ml. del filtrado.
- Transferir 50ml. del filtrado a un beaker de 250 ml. agregar 20 ml. de la solución de sulfato de amonio al 40% y 130ml. de agua destilada, agitar y dejarlo reposar por 2 ó 3 minutos.
- Agregar unos 10 gm. de Celite, agitar y filtrar - a través de un filtro de 18.5cm de diámetro de poro grueso.
- Transferir 100 ml. del filtrado a un embudo separador de 125 ml. con llave de teflón. Agregar 3.0 ml

de benceno medidos con pipeta, tapar el embudo y agitar vigorosamente por 60 segundos. Dejar en reposo.

- Luego que las fases se hallan separado, descartar la capa acuosa inferior, agregar 50 ml. de agua destilada a la capa de benceno y rotarlo suavemente para lavar, evitando que se forme una emulsión.
- Nuevamente descartar la capa acuosa. Transferir el extracto bencénico a un vial y evaporar a sequedad en - baño de vapor o por corriente de nitrógeno.
- Disolver el residuo en 3.0 ml. de cloroformo-acetona - (9:1)
- Preparar un blanco en idénticas condiciones usando un - maíz que no contenga aflatoxinas y que halla sido proba do por métodos oficiales.
- Preparar también un Standard, pero antes de la extrac-- ción con acetona, agregar el material libre de toxinas 0.5 ml. de solución standard de aflatoxina a una concen tración de 0.5 ug/ml en caso de maíz.

Análisis Cromatográfico:

- Usando jeringa, transferir una alícuota de 1.0 ml. de - blanco, muestra y standard en series de columnas prepa radas que han sido colocadas en posición vertical y de jar que corran completamente.

- A cada columna agregar 1.0ml. de cloroformo-acetona (9:1) y dejar correr.
- Observar fluorescencia bajo luz U/V/ de onda larga. La presencia de aflatoxinas en la muestra, forma una banda fluorescente en la parte superior de la capa de Florisil, claramente distinguible por comparación con el blanco.

Si la fluorescencia de la muestra es menor que el -- standard, esto indica que el contenido de aflatoxinas es > 5 ug/Kg en maíz .

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA MINICOLUMNA

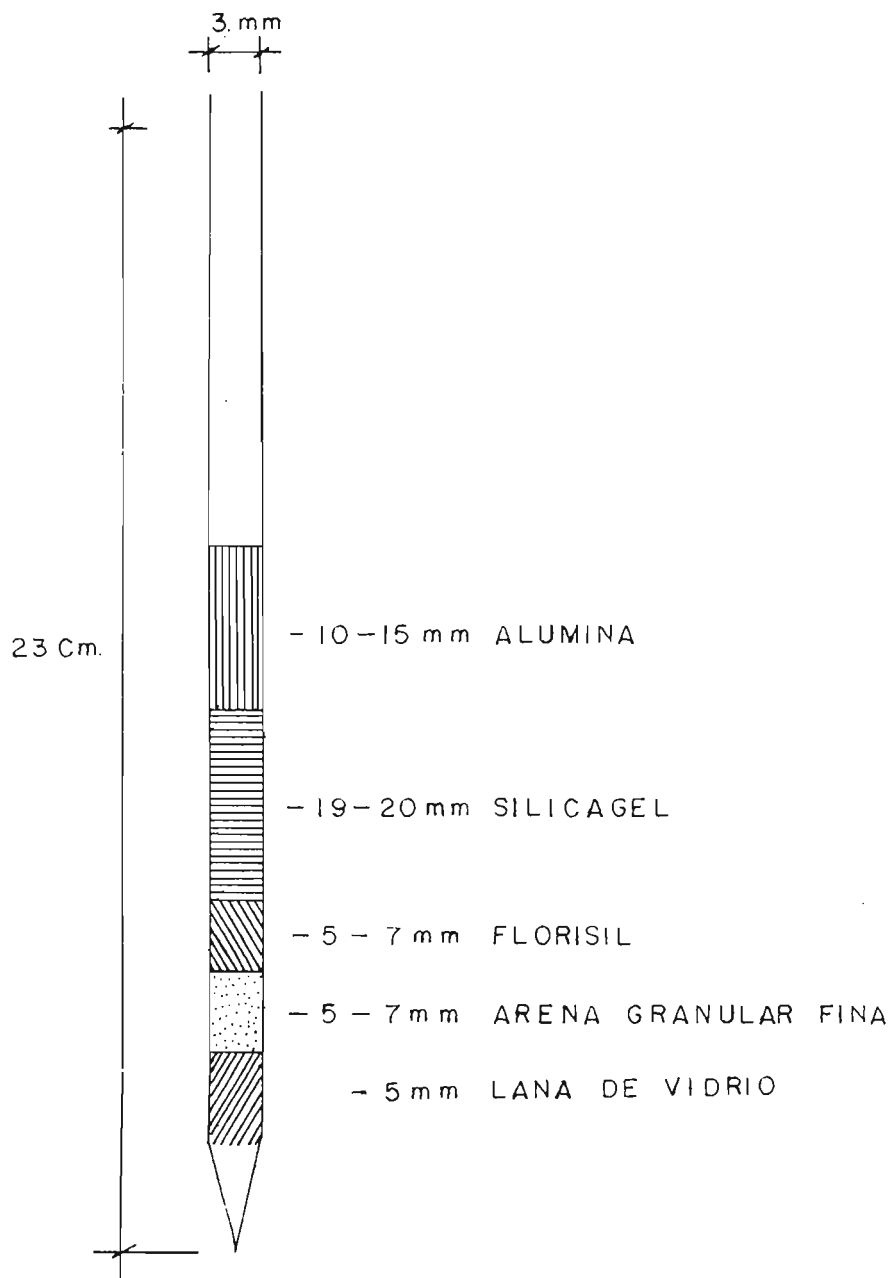


FIGURA Nº 1

B - METODO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PREVIA DEPURACION
POR COMATOGRAFIA EN COLUMNA (6)

Aparatos:

- Agitador mecánico de alta velocidad a prueba de explosión.
- Viales de 4 dracmas de capacidad con tapas de rosca
- Agitadora de tubos
- Cámara de luz U.V.
- Centrífuga
- Equipo para cromatografía en capa fina (placas de vidrio 20x20, aplicador, cabina desecadora con drierite o silicagel, tanque revelador, jeringa graduada en microlitros).

Reactivos:

- Solventes: acetona, benceno, cloroformo, etanol 95% calidad reactivo o redestilado, n-hexano, alcohol metílico.
- Solvente de extracción: Mezclar 550 ml. de alcohol metílico y 450ml. de agua destilada, guardar en frasco ambar.
- Solvente de columna de elución: Mezclar volúmenes iguales de cloroformo y n-hexano, Guardar en frasco ambar.

- Solvente revelador: Cloroformo-acetona. Mezclar - 900 ml. de cloroformo y 100 ml. de acetona. Guardar en frasco ambar.
- Auxiliar para filtrar. Celite 545
- Perlas de ebullición
- Algodón absorbente purificado
- Silicagel GHR
- Standares de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

Procedimiento

Pesar 100 Gm. de la muestra y transferirla cuantitativamente al vaso de la licuadora, agregar 200 ml. de hexano y 500 ml. del solvente de extracción (alcohol metílico-agua). Licuar a alta velocidad por 3.5 minutos.

- Inmediatamente después de la extracción y antes de que vaya a ocurrir cualquier separación, transferir una porción del extracto, perfectamente homogenizado a una botella de centrifuga descartando el remanente.
- Centrifugar por 30 minutos a 1800-2000 r.p.m. No se tome en cuenta cualquier turbidez que se presente en el metanol acuoso (capa media).

Partición en columna cromatográfica

- Con una pipeta volumétrica, transferir 50 ml. de la capa -

- acuosa de metanol a un beaker de 600-1000 ml., agregar - 5ml. de agua destilada y agitar.
- Agregar 55 Gm. de celite y mezclar con una espátula hasta que la mezcla sea uniforme cuando se presiona contra el fondo ó las paredes del beaker.
 - Colocar un tapón de algodón de 1.5 pulgadas de diámetro - al inicio de la columna cromatográfica. Transferir la muestra uniformemente mezclada a la columna en 3 porcio-- nes empacando con una varilla de vidrio para obtener una columna suave.
 - Lavar el beaker que contenía la muestra y el celite con - hexano y agregar este lavado a la columna. Lavar la co- lumna con un volumen total de 500ml. de hexano, eluir a - un un flujo de 20-60ml/minuto.
 - Cuando el hexano de los lavados llegue a la parte superior del celite, cambiar el receptor y descartar el hexano co- lectado. Lavar el beaker que contenía el celite con la muestra con 2 porciones de 100ml. de cloroformo: n-hexano, agregando los lavados a la columna.
 - Agregar solvente de elución (cloroformo:n-hexano) y eluir las aflatoxinas hasta coleccionar 600ml. en el receptor. No debe permitirse que la columna se seque durante la elu- ción. El tiempo total deberá ser menos de una hora.
 - Agregar varias perlas de ebullición al receptor y evapo- rar casi a sequedad en baño de vapor evitando sobrecalen- tar el extracto seco. Lavar las paredes del beaker con

un chorrito fino de cloroformo y transferir cuantitativamente a un vial de 4 dracmas.

- Agregar de 2 a 3 perlas de ebullición al vial y evaporar el cloroformo preferiblemente bajo corriente de nitrógeno. Sellar el vial y reservarlo para cromatografía en capa fina.

Cromatografía de Capa Fina

Preparación de las placas: Pesar 30 G. de sílica Gel en un erlenmeyer de 300ml. agregar 60ml. de agua destilada, tapar y agitar vigorosamente por 1 minuto. Colocar inmediatamente en el aplicador y cubrir 5 placas con una capa de - 0.25mm (250 micrones) de espesor. Dejar que las placas se sequen al aire por 10 minutos y activar por lo menos 2 ho--ras a 80°C en una estufa. Guardar las placas activadas en un desecador sobre drierite o sílicagel.

- Al vial que contiene el extracto de la muestra, agregar - 0.5ml (500ul) de benceno, tapar nuevamente y agitarlo con el agitador de tubos aproximadamente 1 minuto.
- Destapar el vial y con una jeringa aplicar 2,5 y 10 ul - del extracto de la muestra sobre la placa cromatográfica dejando una separación de 1cm. entre una aplicación y otra a lo largo de una línea imaginaria colocada a 4cm. sobre -

- la parte inferior de la placa.
- En la misma placa aplicar alicuotas de 1, 3 y 5 μ l de estándares de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.
- Dibujar una línea a lo largo de la placa para marcar el frente del solvente y otra de 0.5cm. a los lados de la placa.
- Colocar 50 ml. de solvente revelador cloroformo: acetona (9:1) en un tanque cromatográfico. Insertar inmediatamente la placa, sellar el tanque y eluir la placa por 40 minutos a 23-25°C.
- Dejar que la placa eluida seque al aire por 15 minutos y cuando esté seca observarla bajo la luz ultravioleta protegiéndose los ojos con lentes especiales.
- Observar las cuatro manchas fluorescentes patrones de los estándares de las aflatoxinas. Se notará una pequeña diferencia en la fluorescencia azulada de las aflatoxinas B, que contrasta con la fluorescencia un poco verde de las G.
- Examinar las muestras que presenten fluorescencia y cuya mancha tenga un R_f cercano al de los estándares y aspecto semejante (color).

Cálculos:

Para calcular las aflatoxinas B₁ en un μ g/kg en la muestra se usará la siguiente ecuación:

$$\text{Aflatoxina B}_1 \text{ (}\mu\text{g/kg)} = (S)(Y)(V) / (X)(W)$$

En donde:

- (S) Son los ug de aflatoxina B₁ (Standard) igual al desconecido.
- (Y) Concentración del standard de aflatoxina B₁, en ug/ml.
- (V) ul de dilución del extracto de la muestra usados.
- (X) ul del extracto de la muestra que dió la fluorescencia igual a (S).
- (W) granos de la muestra original aplicados a la cromatografía encolumna (10 G. si se usaron 50 ml. del extracto - metanol agua).

C) Técnica por cromatografía directa en capa fina

Aparatos:

- Mezclador Osterizer
- Vaso de 1000 ml. de capacidad para el mezclador
- Lámpara de luz U.V. de onda larga
- Beakers graduados de 250 ml.
- Embudos para filtrar de 160 ml.
- Cilindros graduados de 10 y 20 ml.
- Papel whatman No. 1 de 200 mm. de diámetro
- Ampollas de separación de 500 ml.
- Balanza para pesar 50 Gm. de muestra
- Embudos filtrantes tipo buchner

Reactivos:

- Cloroformo grado ASC
- Solvente de extracción acetona-agua (85:15). Mezclar 850ml. de acetona con 150 ml. de agua.
- Reactivo precipitante; solución de acetato de plomo. Disolver 200 Gm. de acetato de plomo neutro trihidratado en agua con calentamiento, agregar 3 ml. de ácido acético glacial y diluir a un litro.
- Celite como auxiliar de filtración (tierras de diatomáceas)
- Sulfato de sodio anhidro.
- Standards de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

Preparación de la Muestra:

Extracción y depuración:

- Pesar 50 Gm. de la muestra previamente homogenizada y que pase a través de un tamiz No. 10 y colocarla en el vaso de la licuadora, agregar 125 ml. de solvente de extracción y licuar por tres minutos.
- Colocar un embudo de cuello largo en un erlenmeyer de 250 ml. y filtrar el contenido a través de papel whatman No. 1 de 200 mm. de diámetro
- Medir 50 ml. del extracto acetónico en una probeta de 180 ml. y agregarle suficiente agua para completar 90ml.
- Transferir a un beaker de 250 ml. y agregar 50 ml. de la solución de acetato de plomo y cuatro gram os de celite.

Agitar el contenido por 3 minutos o déjese reposar por -
10 minutos agitando de vez en cuando hasta obtener una -
fase transparente supernadante. Filtrar en Buchner.

- Tomar una alícuota de 120 ml. de filtrado anterior y --
transferir a una ampolla separadora de 500 ml. contenie
ndo 60 ml. de agua y 10 ml. de cloroformo. Agitar vigo-
rosamente por 3 minutos y dejar que se separen las fases.
- Filtrar por papel whatman No. 1 que contenga unos gramos
de sulfato de sodio anhidro y coleccionar una alícuota de -
6 ml. del extracto de cloroformo en una probeta de 10 ml
En caso de que se forme una emulsión, agregar más sulfa--
to de sodio anhidro.
- Transferir la alícuota de 6 ml. a un vial de 4 drácmas.
Rotar el embudo suavemente por 30 segundos y dejar que -
se separe el cloroformo. Descartarlo y repetir la ex-
tracción con otros 10 ml. de cloroformo, coleccionando otros
6 ml. para el vial.
- Evaporar a sequedad a 40°C colocándolo en una estufa o
directamente bajo corriente de nitrógeno.

Quantificación por cromatografía en capa fina.

Reactivos:

- Acetona y cloroformo
- Solvente revelador cloroformo-acetona (9:1)

- Tanque revelador para cromatografía
- Benceno-Acetonitrilo (98:2)
- Jeringas de 10 ul.
- Silicagel G Merck 773 o Adsorbil 1 ó Silicar TLC-7G Ma-llinckrodt Chemical Works.
- Lámpara de luz U.V. onda larga
- Placas para cromatografía 20 x 20

Preparación de las Placas:

- Pesar 30 gm. de silicagel en un erlenmeyer de 300 ml. agregar la cantidad de agua recomendada por el fabricante, agitar vigorosamente por un minuto y colocar en el aplicador. Cubrir placas con una capa de 0.25 mm. de espesor. De-jarar las placas reposando hasta que se sequen (aproximada-mente 10 minutos).
- Secar las placas recubiertas por 2 horas a 80°C o una hora a 110°C y guardarlas en un desecador con silicagel activada cuando menos una noche.

Cuantificación:

Al frasco que contiene el extracto de la muestra, agregar - 100 ul. de benceno=acetonitrilo (98:2) si se espera un bajo nivel de contaminación. Agregar 200 ul, para obtener una evaluación preliminar para niveles más altos de contamina--

ción.

- Resellar el frasco y agitar vigorosamente para disolver preferiblemente con un agitador Vortex.
- Aplicar 2ul., 4ul., y 6 ul. sobre una línea imaginaria - de 2 a 5 cm. del borde de la placa.
- Aplicar las mismas cantidades de standars. Si se desea, aplicar 6 ul. de la solución standard en 6 ul. de la muestra como standard interno.
- Colocar suficiente cantidad de cloroformo-acetona (9:1) en el tanque revelador hasta alcanzar 0.8 cm. de nivel - de solvente, Inmediatamente insertar la placa en el - tanque y sellarlo.
- Eluir . hasta que el solvente alcance la línea de solvente (10 cm.) Sacar la placa del tanque, evaporar el solvente a temperatura ambiente o en una estufa a 80°C por un minuto.
- Iluminar las placas desde abajo con la lámpara de luz -- U.V. en un cuarto oscuro o en una cabina Cromato Vue. Examinar los patrones con las muestras que tengan el mismo RF y fluorescencia que los patrones.
- Basados en los resultados obtenidos de la observación de las placas, diluir los extractos de la muestra para ulte_riores cuantificaciones, luego de haberlas evaporado a -

sequedad, usando benceno-acetonitrilo (98:2) y aplicar nuevamente.

- Calcular la concentración de aflatoxinas en ug/kg por medio de la fórmula:

$$\text{Ug/Kg} = 1.67 (S \times Y \times V) / (X \times W)$$

En donde:

S = ul. de aflatoxina standard igual al desconocido.

Y = concentración de aflatoxina standard en Ug/Ml

V = ul. de la dilución final del extracto de la muestra

X = ul del extracto de la muestra aplicada que dió la fluorescencia igual al standard.

W = gramos de muestra extraída por 20 ml. de cloroformo (17.14 G para 50 ml. y 6.86 G para 20 ml. del extracto acetónico).

$$1.67 = \frac{20}{12} \quad (\text{de los extractos clorofórmicos}).$$

CUADRO No. 1
 SUCEPTIBILIDAD Y NIVELES TOXICOS DE AFLATOXINA
 ALIMENTARIA EN ANIMALES DOMESTICOS

GRADO DE SUCEPTIBILIDAD	ANIMAL	NIVEL TOXICO Ugm/kilo
Máxima	Patito	0.03
	Ternero	0.20
	Broiler	0.21
	Pavipollo	0.25
	Faisán	0.25
	Lechón	0.28
	Cerda gravida	0.30-0.50-0.45
Mínima	Vacuno de cebo	0.66
	Cerdo de cebo	0.69
	Vaca lechera	1.50 (0.05 en la leche)

(10) Zintzen, H. El problema de las Aflatoxinas, Servicio Técnico Roche, Roche International Ltda. Casilla 149 Montevideo, Uruguay 1975.

CUADRO No. 2
 TOXICIDAD DE AFLATOXINAS EN PATITOS DESPUES DE ADMINISTRACION ORAL
 (CARNAGHAN Y COL., 1963; PURCHASE, 1967)

VARIANTE DE AFLATOXINA	LD ₅₀ EN MCG/50 GM DE PATITO
B ₁	18.2
B ₂	84.8
G ₁₁	39.2
G ₁₂	172.5
M ₁	16.0
M ₂	61.4

(10)

CUADRO No. 3

TRASTORNOS HEPATICOS EN DIVERSOS TIPOS DE GANADO A
CONTINUACION DE LA ALIMENTACION CON HARINA DE CACAHUETE CONTAMINADO
CON AFLATOXINAS

TIPO DE TRASTORNOS HEPATICO	VACUNO	CERDOS	PATOS	PAVOS	GALLINAS
Cirrosis hepática	+	+	+	+	-
Necrosis y hemorragias	-	+	+	+	-
Fibrosis	+	+	-	-	-
Proliferación del conducto biliar	+	+	+	+	+
Oclusión venosa	+	-	-	-	-
Magalocitosis	+	+	+	+	-

(10)

SIGNOS Y RESULTADOS "POST MORTEM" EN INTOXICACION POR AFLATOXINAS
EN DIVERSOS TIPOS DE ANIMALES

Animal	Consumo de pienso	Signos clínicos	Cambios Bioquímicos	Resultados "Post-mortem"	Curso
Pollitos, gallinas	Retraso del crecimiento, disminución de puesta.				Curso crónico
Pavillos, patitos.	Rechazan - pienso	Estado general pobre, opistótonos	Actividad reducida de las enzimas hepáticas	Síndrome hemorrágico trastornos hepáticos (cuadro No. 3) bazo y riñón edematosos	Curso agudo Mortandad 20 a 100 por 100
Lechones, cerdos	Rechazan - pienso	Ictericia apatía	Sin vitamina A en el hígado, aumento de gammaglobulinas séricas, aumento de enzimas en plasma.	Trastornos hepáticos (Cuadro No. 3) hemorragias, empeoramiento, coagulación - sangre.	Curso agudo - en lechones.
Terberos, vacuno	Crecimiento retardado, - producción de leche reducida.	Estado general pobre, temor, pulso 90-120, índice de respiración 50-90, ataxia y temblor muscular, diarrea, y emaciación, ceguera.	Sin vitamina A en el hígado - aumento de enzimas en plasma.	Trastornos hepáticos (Cuadro No. 3) hemorragias, enteritis, cambios ganglionares degenerativos.	Curso agudo - en terneros - crónicos en vacuno adulto

CUADRO No. 5
 CONTENIDO MAXIMO DE HUMEDAD ADMICIBLE PARA
 ALMACENAMIENTO ADECUADO DE DIVERSOS PRODUCTOS.

Ingredientes	Niveles de humedad para almace- namiento adecuado %	
	1 año	5 años
Cebada	13	11
Maíz y subproductos	13	11
Semilla de algodón y harina de algodón	10-11	--
Avena	13	11
Cacahuete y harina de cacahuete	7	--
Arroz y subproductos		
Centeno		
Sorgo	11	
Soja y harina de soja	11	10
Trigo y subproductos	13-14	11-12

(10)

RESULTADOS SOBRE INGESTION DE AFLATOXINAS E INCIDENCIA
DE CANCER EN DIFERENTES POBLACIONES

Población	Ingestión de aflatoxinas en la dieta. (ug/k bw/d)	Casos (por 10 ⁵) de cáncer primario en hígado por año (1)			
		En adultos (> 15 años)		En la población total ambos sexos	
		No. Inci- dencia	No. Inci- dencia	No. Inci- dencia	No. Incidencia
Kenya (max. altit.)	3-5	1	3.1	0	-
Kenya (mediana altitud)	6-8	13	10.8	6	3.3
Tailandia (Songkhla)	5-8	-	-	-	2
Kenya (baja altitud)	10-15	16	12.9	9	5.4
Tailandia (Ratburi)	45-77	-	-	-	6.0
Mozambique	222	-	-	-	25.4 (2)

(1) El período cubierto fue 4 años en Kenya, 1 año en Tailandia y 3 años en Mozambique.

(2) Hombres 35.0, mujeres 15.7, número de casos no disponibles

Establecimiento del contenido de aflatoxinas en piensos y la máxima mezcla admisible de componentes aflatoxinas en piensos compuestos (Agricultural Experimental and Research Institute. Kiel, Germany, tomado de Informations dienst Futter y Fütterung, 1969)

Contenido de aflatoxina	Tipo de pienso	Admisión de mezclas de ingredientes - que contienen aflatoxinas en el pienso.	Máxima total de contenido de aflatoxinas por kilogramos de pienso compuesto
Levemente positivo - (hasta 0.1 mg/kg).	Pienso de patito Pienso starter pavipollos Pienso de pollitos Pienso de cría cerdos Pienso de cría corderos Pienso de terneros Pienso de acabado pavos Pienso de acabado broiler Pienso de cerdos Pienso de ponedoras Pienso de cebo vacuno Pienso de vacuno lechero Pienso de ovejas	No admisión mezcla No admisión mezcla No admisión mezcla No admisión mezcla No admisión mezcla No admisión mezcla Máx. 5% Máx. 5% Máx. 7.5% Máx. 7.5% Máx. 7.5% Máx. 15% Máx. 15%	0 0 0 0 0 0 0,005 mg) (0,005 mg) (0,0075 mg) (0,0075 mg) (0,0075 mg) (0,015 mg) (0,015 mg)
Moderadamente a fuerte positivo (0,1 a 1,0 mg/kg)	Pienso de acabado pavos Pienso de acabado broilers Pienso de cerdos Pienso de ponedoras Pienso de cebo vacuno Pienso de ovejas Pienso de vacuno lechero	Máx. 2,5% Máx. 2,5% Máx. 3,75% Máx. 3,75% Máx. 3,75% Máx. 7,5% Máx. 7,5%	0,025 mg 0,038 mg 0,038 mg 0,038 mg 0,075 mg 0,075 mg
Muy gravemente positivo (1,0 a 2,0 mg/kg) Más de 2,0 mg/kg	Pienso de vacuno lechero Pienso de ovejas Inadecuado como ingrediente para piensos	Máx. 2,5% Máx. 2,5%	(0,05 mg) (0,05 mg)

Cuadro No.8

ALGUNAS CONSTANTES FISICO—QUIMICAS
DE LAS PRINCIPALES AFLATOXINAS.—

Aflatoxina	Punto de fusión en °C	Absorción al ultravioleta	
		h max	(nm) E:
B ₁	268-9	223	820
		265	430
		363	698
B ₂	286-9	222	541
		265	350
		363	662
G ₁	244-6	243	350
		264	305
		363	495
G ₂	237-9	214	851
		265	351
		363	233

Procedimientos recomendados para la descontaminación del - material infestado por aflatoxinas

Area de trabajo

El área de trabajo debe cubrirse completamente con solución de hipoclorito de sodio 5-6% (blanqueador doméstico), el - cual deberá conservarse en una botella lavadora plástica.

Si la superficie es tal que la solución tiende a formar gotas, es preferible colocar toallas de papel, ya sea antes - o después de aplicar el blanqueador, las cuales deberán quedar completamente mojadas, para asegurar el contacto completo con la toxina.

El tiempo de contacto debe ser por lo menos de 30 segundos pero el área debe ser revisada con lampara de luz U.V. hasta que toda fluorescencia sea destruida.

Recipientes

Toda la cristalería incluyendo láminas de cromatografía en capa fina, puede ser tratada con solución de ácido crómico, en tal caso no será necesario el uso del blanqueador, o bien puede adoptarse este método, sumergiendo los recipientes por

un minuto antes del lavado de rutina.

Es recomendable en todo caso revisar la cristalería con lámpara de luz U.V. hasta eliminar cualquier fluorescencia.

Para descontaminar los recipientes en los cuales han sido manejados los materiales tóxicos, es muy efectivo usar una mezcla de blanqueador no diluido y ácido clorhídrico, la cual genera cloro que ayuda a la descontaminación.

Personal

Para las personas que trabajen con material y productos contaminados, se recomienda el uso rutinario de guantes, y mascarillas protectoras en el caso que manejen aflatoxinas seca o material toxico finamente dividido como comida, polvo, etc. Si las manos se contaminan deberán ser lavadas inmediatamente con blanqueador no diluido (5-6%) antes del lavado rutinario con jabón.

Si la piel es muy sensible para este tratamiento puede usarse un detergente con perborato de sodio.

En caso de que el material tóxico entrara en la boca se deberán hacer gárgaras con una solución que contenga 1% de perborato de sodio y 1% de bicarbonato de sodio en agua.

Se puede usar como alternativa una pasta dental que contenga perborato.

Ropa de trabajo

Es preferible destinar ropa especial para trabajar con material contaminado y evitar que sea de algodón o rayón, para que no resulte dañada con el tratamiento de descontaminación

Antes del lavado de rutina la ropa debe de sumergirse en una solución de carbonato de sodio al 5% o blanqueador al 1% por una hora.

Muestras contaminadas

Estas muestras sospechosas deberán ser guardadas en recipientes bien cerrados tales como latas selladas, tarros y bolsas plásticas.

Este material puede ser descontaminado empapándolo totalmente con blanqueador no diluido por media hora. En algunos casos se necesita mezclar mecánicamente los productos para asegurar el contacto completo con la solución blanqueadora.

La incineración es otro método que puede usarse, aunque en muchos casos no resulta práctico.

(11) Stoloff, L y Trager, W. Recommended Decontamination Procedures for Aflatoxin
V. Assoc. off Chemist 48(3)