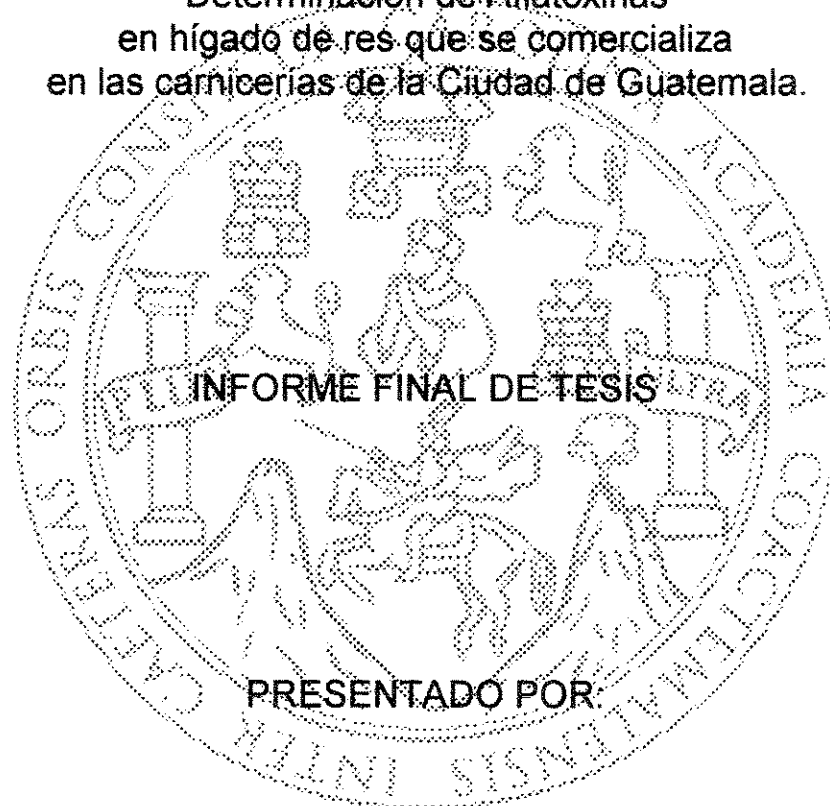


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Determinación de Aflatoxinas
en hígado de res que se comercializa
en las carnicerías de la Ciudad de Guatemala.



INFORME FINAL DE TESIS

PRESENTADO POR:

JOHNNY ERNESTO YALIBAT OVALLE

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 1997

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

06
T(1806)
C. 4

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. ANA MARIA RODAS CARDONA
VOCAL V	BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:

De quien es todo el conocimiento y sabiduría.

A MIS PADRES:

José Ernesto Yalibat.

Isabel Ovalle de Yalibat: Quienes hicieron de mí un Hombre de bien.

A MI AMADA ESPOSA:

Olga Lorena Flores de Yalibat, a quien amo con toda el alma y que sin su apoyo no hubiese alcanzado esta meta.

A MI ABUELITA:

Elia Yolanda Maldonado Vda. de Ovalle: A quien quiero y querré por siempre.

A MIS HERMANAS:

Johanna Elizabeth Yalibat Ovalle.

Jeannette Eunice Yalibat Ovalle.

A MIS TIOS:

Julio César Ovalle Maldonado.

Sonia Martínez de Ovalle.

A MI AMIGO:

Lionel Martínez: por su valiosa ayuda.

AGRADECIMIENTO

**Al Licenciado *Elfego Rolando Lopez*,
Por su asesoría y su incondicional apoyo y
amistad en tiempos difíciles.**

**Al Departamento de *Análisis Aplicado*,
por su ayuda en la elaboración de este trabajo.**

**A la Licenciada *Beatriz Medinilla*.
Por su invaluable apoyo en el laboratorio.**

**Al Licenciado *Luis Fernando Girón*,
Por la experiencia transmitida a través de
sus consejos y sugerencias.**

INDICE

01. RESUMEN	01
02. INTRODUCCION	02
03. ANTECEDENTES	04
04. JUSTIFICACION	10
05. OBJETIVOS	12
06. HIPOTESIS	13
07. MATERIALES Y METODOS	14
08. RESULTADOS	22
09. DISCUSION DE RESULTADOS	25
10. CONCLUSIONES	26
11. RECOMENDACIONES	27
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29
13. ANEXOS	33

1. RESUMEN

La presente investigación, se realizó con la finalidad de determinar la presencia de aflatoxinas en hígado de res, que la población guatemalteca adquiere en los diferentes puntos de distribución de la ciudad capital.

El objetivo de este trabajo fue determinar si las concentraciones de Aflatoxinas B₁ y B₂, están dentro de los límites permitidos por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos -FDA-.

El método se desarrolló de acuerdo a los parámetros indicados en la literatura consultada, se estandarizó por medio de fortificaciones del material de trabajo, con una concentración conocida de aflatoxina B₁ y B₂, midiéndose el valor de R_f. Posteriormente, se llevó a cabo la comparación de las muestras problema, mediante análisis por Cromatografía en Capa Fina y posterior exposición a luz ultravioleta de longitud de onda larga (365 nm).

La concentración de Aflatoxinas encontradas en dos de los casos positivos, sobrepasó las 20 partes por billón (ppb)^{*}, aunque el índice de contaminación puede ser mayor, ya que el método establece para cada muestra un peso de 100 gramos de los cuales únicamente se usaron 50 gramos, esto, para economizar reactivos y solventes. La identificación fue hecha comparando el tamaño e intensidad de fluorescencia de la mancha de la muestra contra la de un estándar.

Las 4 muestras contaminadas representan un 13.33 % del total de muestras analizadas de las cuales, el 50% sobrepasa los niveles permitidos de 20 ppb que es el límite superior aceptado por la Administración de Alimentos y drogas de los Estados Unidos -FDA- para cereales, adaptando este límite para carnes.

^{*}ppb: Corresponde a un millario, se usa el billón para mantener la terminología usual en documentos científicos.

2. INTRODUCCIÓN

En el año de 1960 se realizó el descubrimiento de una micotoxina a la que se denominó AFLATOXINA, esto estimuló la investigación de ésta en los campos de: Química, Bioquímica, Micología, Nutrición y Tecnología de Alimentos. Las aflatoxinas son metabolitos bisfuranocumarínicos tóxicos, cristalinos y fluorescentes; producidos principalmente por hongos, del tipo Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus (1) y en menor grado por hongos de los géneros Penicillium y Fusarium (2). Según los datos epidemiológicos disponibles, existe asociación entre el consumo diario de aflatoxinas y la incidencia de cáncer en el hígado del hombre. Dicha asociación se demuestra en regiones específicas de zonas Sud-Saharianas de Africa y en Tailandia (3).

Si se consideran los aspectos sociales de la economía guatemalteca, la población mayoritaria debe agenciarse de productos alimenticios del más bajo costo que sea posible y en cuanto a productos cárnicos, las vísceras animales como: hígado, cerebro, riñones, corazón, etc., tienen un precio más bajo que los demás, lo cual los hace más accesibles para la población.

Las vísceras animales en general y el hígado en particular pueden representar una fuente de contaminación por aflatoxinas, ya que éstas provienen de ganado que se alimenta con granos y forrajes, que de acuerdo a estudios realizados, se estableció que podrían estar contaminados con este tipo de toxinas, así mismo por su ubicación geográfica, Guatemala posee el tipo de clima que contribuye a la proliferación de hongos productores de micotoxinas.

En atención a lo anterior es evidente que las víceras animales sin un control sanitario de la calidad, exponen a la población que lo consume, al riesgo de intoxicación por Aflatoxinas.

Mediante la presente investigación, se evaluó si el hígado de res el cual es el órgano animal donde se depositan y metabolizan este tipo de micotoxinas; está contaminado con aflatoxinas y de ser así, establecer si cumple o no con los estándares de la Administración de Alimentos y Drogas de Los Estados Unidos -FDA- para alimentos, que es la base adoptada en Guatemala por la Comisión Guatemalteca de Normas -COGUANOR-.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

3. ANTECEDENTES

En 1971, Keyl, A. C. et al. reporta que en 1944 informaciones de Rusia revelaron que en un distrito, el 10 % de la población se enfermó por haber ingerido cereales contaminados con hongos productores de toxinas (4).

En 1969 Diener, L. U. informa que en 1954, Semeniuk, J. L. clasificó al Aspergillus flavus como un hongo mesofílico con las temperaturas de crecimiento siguientes: mínima de 6-8 ° C, óptima de 36-38 ° C y máxima de 44-47 ° C. Además se incrementa su crecimiento en las zonas de humedad y temperatura altas (5).

La ocurrencia y la magnitud de la contaminación por aflatoxinas varía con los factores geográficos y estacionales. En áreas tropicales y subtropicales como las costas de Guatemala donde la humedad y temperatura son altas, se favorece considerablemente el crecimiento de hongos.

Se sabe que estos hongos se desarrollan principalmente en el maíz y en maní, pero también crecen en una gran variedad de productos vegetales. La contaminación por hongos puede ocurrir en el campo antes de la cosecha, durante la recolección, en el almacenamiento cuando el secado no es adecuado y durante el transporte, lo cual constituye una posible causa de contaminación por aflatoxinas en la alimentación humana (3).

Las aflatoxinas del reino vegetal se clasifican como: B₁, B₂, G₁ y G₂ y fueron aisladas por primera vez en la harina de maní (3). La contaminación de la harina de maní y el subsiguiente desarrollo de metabolitos tóxicos, originó el brote de la "Enfermedad X del Pavo" en el Sur y Oriente de Inglaterra, donde en 1960 murieron 100,000 pavos (6, 7). Descubrimientos posteriores revelaron

que la enfermedad fue causada por aflatoxinas contenidas en la harina de maní proveniente de Brasil (6, 7, 8). La concentración de Aflatoxina B₁ en la harina de maní se estimó que era de 10 ppm (partes por millón, miligramos por kilogramo). La enfermedad se caracterizó por un rápido decaimiento, hemorragia subcutánea y la muerte (7).

Tradicionalmente se consideró que el crecimiento de Aspergillus flavus era un problema que afectaba los granos de los cereales después de la cosecha solamente, pero estudios en el campo demuestra que el hongo también infecta a la semilla antes de la cosecha, si las esporas penetran dentro de la región de crecimiento de éste (9).

La aplicación de insecticidas a plantas en desarrollo reduce la presencia de Aspergillus flavus y aflatoxinas hasta la madurez. Tábanos y Lillehoj et al. observaron que las primeras 2-3 semanas después de la formación de los pelillos del maíz tierno proveen la máxima oportunidad para la infección por Aspergillus flavus (10).

El mayor peligro para el hombre por la ingestión de productos contaminados por aflatoxinas radica en el poder carcinógeno de estos metabolitos. En regiones de Sud-Sahara en Africa y Sur- Este de Asia se encontraron datos epidemiológicos que respaldan la relación positiva entre el consumo de aflatoxinas y el cáncer de hígado, enfermedad crónica que puede manifestarse después de muchos años (3).

En un estudio realizado en 1979 en la Universidad de Nuevo León, México, sobre la incidencia de aflatoxinas en alimentos para marranos, aves y conejos se encontró que el 50 % de las muestras estaban contaminadas con aflatoxinas. En las muestras positivas los niveles reportados, oscilan entre 2 ppb (partes por billón o microgramo por kilogramo), hasta 1111 ppb (11).

En 1965 Martínez et al. efectuaron un estudio sobre la prevalencia de hongos en granos de maíz de Guatemala. Se analizaron 62 muestras de maíz y se encontró que los géneros diseminados frecuentemente en las muestras infectadas fueron: Penicillium, Fusarium y Aspergillus. Los géneros Aspergillus y Penicillium, abundantes en las muestras que tenían un tiempo largo de almacenamiento y un alto contenido de humedad. No se investigaron las posibles micotoxinas contaminantes (4).

En 1974, Shneider, S. Encontró contaminación por aflatoxinas en 4 % de 99 muestras de semilla de algodón analizadas (12).

La Dosis Letal Media (DLM o DL₅₀) varía de 0.3 a 17.9 mg/kg de peso corporal para diferentes especies de animales: en orden decreciente de susceptibilidad están: cerdos, perros, ovejas, mandriles, ratas (machos), macacos, ratones, hámsteres y ratas hembras (7). Los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos (3, 13), probablemente se deba a que los adultos tienen un mejor desarrollo del sistema enzimático "oxidasa de Función mixta". La actividad de estas enzimas del hígado puede ser afectada por la composición de la dieta (13). La influencia de la nutrición sobre la respuesta a la toxicidad de las aflatoxinas es particularmente interesante en humanos, porque en muchas poblaciones alrededor del mundo existe: malnutrición, aflatoxinas en la dieta y la alta incidencia de daños hepáticos, incluye cáncer (14).

Varios investigadores reportan que dietas ricas en proteínas protegen contra los efectos de las aflatoxinas (14, 15); Madhavan, T. y Gopalan, J., (1968) confirmaron esta protección para efectos tóxicos en general, pero encontraron que no se aplica a los efectos carcinogénicos del hígado (16).

En pollos la aflatoxicosis se produce en varios grados de severidad con la administración diaria de aflatoxinas. La evidencia del daño se puede confirmar por las lesiones observadas al microscopio. Se demuestra también, que las aflatoxinas o sus metabolitos se encuentran en el músculo esquelético y en el hígado de pollos afectados (17).

La aflatoxina B₁ en los alimentos se metaboliza en aflatoxina M₁: una concentración de 100 ppb., presenta una concentración en la leche de más o menos 1 ppb (18).

Los residuos de aflatoxinas en carne, leche y huevos varían con el tiempo transcurrido después de la exposición (19). Se reporta que la excreción de aflatoxina M₁ en la leche de vaca se incrementa al máximo a lo 5-6 días y es completa después de 9-10 días. Estos resultados se obtuvieron al agregar 1 kg de harina de maní contaminada a la dieta de las vacas; el nivel de aflatoxinas en la dieta fue 10.9 ppm, o sea 10,900 ppb (20).

En 1977, Hayes, J. R. et al. Establecen que los residuos de aflatoxina M₁ en carne de animales alimentados con menos de 46 ppb de aflatoxina B₁ no producen ningún riesgo para los humanos que la consumen (21).

En 1976, Loetzsch, T. y Leistner, L. Demostraron que los residuos de Aflatoxinas pueden detectarse en los órganos y músculos del ganado vacuno, cerdos y pollos cuando consumen alimento contaminado con más de 100 ppb de aflatoxinas (22). Según estos investigadores el 0.3 y el 0.1 % se recupera

en el hígado y el músculo respectivamente y esos valores son independientes de la concentración de aflatoxina B₁ en el alimento (22).

En 1976, Maleki, R. et al realizaron un estudio para evaluar la excreción urinaria de aflatoxinas en pacientes con cirrosis en un área rural de Irán; en el cual encontraron aflatoxina M₁ en la orina de 6 de 25 pacientes con un diagnóstico de cirrosis (7).

En un estudio de cirróticos en las Filipinas, donde la cirrosis no se reporta como endémica, se encontró que la aflatoxina M₁ fue secretada en la leche de las madres y excretada en la orina. La aflatoxina M₁ fue observada en la orina cuando la cantidad de aflatoxina B₁ ingerida excedía de 15 ug/día (0.8 a 1.0 ug/kg de peso corporal); el límite de detección de aflatoxina M₁ en orina fue de 5 ug/l. En este caso se encontró una correlación entre los niveles excretados de aflatoxina M₁ y los niveles ingeridos de aflatoxina B₁ (7).

En Guatemala se reportan pocos estudios referente a aflatoxinas, entre estos puede mencionarse:

En 1979, Campos, Marit de y Olzyna-Marzys, encontraron una alta contaminación por aflatoxinas de granos en Guatemala, reportan un 17 % de contaminación en 264 muestras de granos cosechados en la época lluviosa y almacenados durante la época seca (2).

En 1979, Crespo, J. realizó un estudio sobre la "Incidencia de la contaminación por aflatoxinas en granos de la costa Sur-Oriental de Guatemala", investigó un total de 145 muestras y reportó alta contaminación por aflatoxinas. Los niveles más altos se encontraron en granos que se almacenaron en la costa Sur por dos meses. El nivel más alto fue de 1,650 ppb., de una muestra de maíz; este valor es 80 veces mayor que el límite establecido para granos de 20 ppb (23).

NORMAS

En los Estados Unidos de América la Administración de Alimentos y Drogas -FDA- fija como guía para residuos de aflatoxinas totales una concentración de 20 ppb para todos los productos afectados (18), excepto para el maní para el cual ha propuesto una concentración de 15 ppb (6). En muchos países como Suecia, Italia, Polonia y Holanda, se establece también un límite de 5 ppb, mientras que en otros como Alemania y Francia, no tienen regulación oficial (9). En suplementos proteínicos para niños desnutridos FAO/OMS (Organización para la Agricultura y la Alimentación / Organización Mundial de la Salud) propone un límite de 30 ppb (9). Para niveles de aflatoxinas en tejido animal específicamente, no existen normas. En Alemania se discute como posible un límite de 10 ppb.(22). En Guatemala los límites adoptados por la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) son de 20 ppb en granos. Esta norma se adoptó en el mes de Agosto de 1981. No se dispone de límites para niveles de aflatoxinas en tejido animal. Las aflatoxinas M₁ y aún B₁ pueden aparecer en carne, leche y huevos, si los animales ingieren alimentos contaminados con aflatoxinas B₁ en niveles suficientemente altos.

4. JUSTIFICACIÓN

En la ciudad Capital, como en otras ciudades de Guatemala la pobreza y sobrepoblación, trae implícito un aumento de los problemas alimenticios y de servicios ya existentes, los habitantes de escasos recursos tienen que recurrir a alimentos de bajo costo, como ocurre con las víceras animales entre las que se mencionan: hígado, riñones, cerebro, etc., para satisfacer sus necesidades de proteína animal. Las prácticas agrícolas y las condiciones ambientales, favorecen que el alimento del ganado vacuno esté contaminado con aflatoxinas constituyéndose estos, un intermediario de la contaminación por dichas micotoxinas.

Según la Administración de Alimentos y Drogas -FDA- de los Estados Unidos de América, la concentración de aflatoxinas en granos de cereales, no debe exceder las 20 ppb. y la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) adoptó esta norma para granos de cereales en el mes de agosto de 1981, pero no estableció límites para tejido animal, por lo cual y para fines del estudio se tomó el parámetro utilizado para granos.

Las víceras consumidas en mayor proporción en Guatemala son las de procedencia vacuna, ya que es la de mayor producción en el país. El ganado vacuno es criado en su mayoría, en los departamentos de Escuintla, Suchitepequez, Retalhuleu, Petén, etc., donde el clima cálido-húmedo, es predominante, favoreciendo el crecimiento de hongos típicos de almacenamiento en los forrajes y granos, con los que se alimenta dicho ganado, siendo el hongo responsable el Aspergillus flavus, por su toxina conocida como AFLATOXINA, de los tipos B₁ y B₂.

Por las implicaciones que conlleva para la salud este tipo de contaminante, los resultados que genere esta investigación, serán de utilidad a las autoridades que regulan la calidad de los alimentos en Guatemala, así como a la población guatemalteca en general.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL:

5.1.1. Extraer por medio del método de la Asociación Oficial de Químicos Analistas -AOAC las aflatoxinas tipo B₁ y B₂, y determinar por medio de Cromatografía en Capa Fina la presencia y cantidad de éstas, en el hígado de res que se consume en la ciudad capital, el cual es distribuido por las carnicerías y ventas de víceras (cholojerías).

5.2. ESPECÍFICOS:

5.2.1. Identificar aflatoxinas presentes en el hígado de res.

5.2.2. Cuantificar la concentración de aflatoxinas tipo B₁ y B₂ en el órgano ya mencionado.

5.2.3. Determinar si la concentración de Aflatoxinas, se encuentra abajo del límite de 20 ppb (microgramos por kilogramo), el cual es el límite permitido para granos, según la Administración de Alimentos y Drogas -FDA- de Los Estados Unidos y adoptado por la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR).

6. HIPÓTESIS

Los niveles de aflatoxinas contenidos en el hígado de res, comercializados por las carnicerías de la ciudad de Guatemala, se encuentran por debajo de 20 ppb, límite permitido por la administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos-FDA-, para cereales y adoptado por la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), para consumo humano.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo:

Se recolectaron en carnicerías de diferentes zonas de la ciudad de Guatemala, las muestras de tejido hepático de origen vacuno, para el análisis, una muestra por cada carnicería que resultó incluida en el estudio.

Para el análisis de las muestras de tejido hepático se empleó el método de la Asociación Oficial de Químicos Analistas -AOAC- (26)

7.2. Medios:

7.2.1. Recurso Humano:

Autor: Br. Johnny Ernesto Yalibat Ovalle.

Asesor: Lic. Elfego Rolando Lopez G.

7.2.2. Recursos materiales.

- Licuadora.
- Molino de carne. Molino tipo EP-1 u otra clase de molino manual.
- Balanza semianalítica.
- Probetas graduadas de 25, 50, 100 y 1000ml.
- Embudos para filtración.
- Embudos Buchner
- Varillas de vidrio.
- Vidrios de reloj de 10 y 20 cm de diámetro.

- Espátulas.
- Beakers de 25, 50, 100, 250 y 400 ml.
- Erlenmeyers de 250 y 500 ml.
- Papel filtro Whatman No. 4.
- Homogenizador tipo Omni-mixer.
- Evaporador rotatorio con vacío (Rota-Vapor).
- Balones de Evaporación de 250 y 500 ml.
- Agitador mecánico.
- Columnas cromatográficas.- columnas de vidrio de 30 X 1.0 cm con poros de polietileno de 35 micrómetros y una llave de paso de nylon.
- Agitador Vortex.
- Lana de vidrio.
- Pipetas pasteur.
- Viales de fondo cónico.
- Microjeringas de 10, 25 y 100 ul.
- Quitasato de 250 y 500 ml.

7.2.3. Reactivos:

1. Acido Acético glacial, grado reactivo.
2. Benceno, grado reactivo.
3. Diclorometano, grado analítico.
4. Eter Dietilico, grado reactivo.
5. Hexano.
6. Acetonitrilo, grado analítico.
7. Alcohol Isopropílico.
8. Cloroformo, grado analítico.
9. Acetona, grado analítico.
10. Metanol, grado analítico.
11. Eter de Petróleo, grado analítico.
12. Sulfato de sodio anhidro.
13. Solución de Acido cítrico al 20 %: Disolver 200 g de Acido cítrico monohidratado en 1000 ml de agua.
14. Tierra de Diatomeas: Hyflo Super-Cel.
15. Perlas de ebullición.
16. Estándar de Aflatoxinas B1 y B2, 1 ug/ml en Benceno + Acetonitrilo (9+1).
17. Sílica gel granular: Sílica gel 60 (No7734), 0.063-0.200 mm (70-230 mesh), o su equivalente. Agitar durante 1 hora en metanol, filtrar y tratarla de igual manera con Cloroformo, se activa durante 1 hora al horno a 105 °C, agregarle 1 ml de agua por cada 100 g de Sílica gel, sellar y agitar hasta que esté completamente mezclada, debe almacenarse en un contenedor a prueba de aire durante 15 horas mínimo antes de ser utilizada.

7.3. Recolección de Muestras.

7.3.1. Análisis de las Muestras inmediatamente después de su

recolección, cuando esto sea posible, de lo contrario se almacenan en congelación para evitar el crecimiento de microorganismos.

Análisis de Aflatoxina B₁ por el método de la Asociación Oficial de Químicos Analistas -AOAC- (26).

7.4. Procedimiento.

7.4.1. Método de la -AOAC-

7.4.1.1. Extracción y Partición:

Mezclar y moler el tejido de la carne hasta que esta se haga homogénea. Pesar 50 gramos de la mezcla en un erlenmeyer de boca ancha con tapón esmerilado de vidrio o su equivalente. Agregarle 05 mililitros de la solución de Ácido cítrico y mezclarlo completamente con una varilla de vidrio de 30 cm de largo por 1 cm de diámetro, se deja reposar y después de 5 minutos se vuelve a agitar y se mezcla con 10 gramos de tierra de diatomeas. Se le agregan 200 mL de CH_2Cl_2 y agitar para remover el exceso de sólidos de la varilla. Agitar el frasco vigorosamente en un agitador manual por 30 minutos. Filtrar la mezcla a través de un papel filtro de flujo rápido a un erlenmeyer de 250 mL que contiene previamente 10 gramos de Sulfato de Sodio. En la parte superior del embudo se presiona el sólido obtenido contra el embudo para obtener el máximo volumen de filtrado. Agitar gentilmente el frasco intermitentemente durante 2 minutos y filtrar de nuevo el contenido con un papel filtro de mediano flujo a una probeta graduada de 250 mL y registrar el volumen obtenido, tapar el embudo con un vidrio

de reloj para evitar la evaporación del solvente. Evaporar el filtrado al vacío en un balón de fondo redondo **casi a sequedad** y guarde el residuo para la Cromatografía en Columna.

7.4.1.2. Cromatografía en Columna:

Llenar la columna a la mitad con CH_2Cl_2 y agregarle 2 gramos de Sílica gel. Luego agregarle de 3 a 4 mL de CH_2Cl_2 y acomode la sílica gel con una varilla de acero inoxidable de 3.2 milímetros de diámetro. Drene el CH_2Cl_2 hasta llegar a la sílica gel, enjuagar la sílica gel de los lados de la columna con CH_2Cl_2 . Agregar 2 gramos de Sulfato de sodio al sobrenadante encima de la sílica gel para tapar la columna y drenar el exceso de CH_2Cl_2 hasta una altura de 1 cm arriba de el empacado de la columna.

Disolver el filtrado concentrado en 25 ml de CH_2Cl_2 , agregar a la columna, enjuague el balón de fondo redondo con CH_2Cl_2 y agregar a la columna, drenar la solución completamente a través de la columna por gravedad. Si el flujo pasa despacio, agitar suavemente el Sulfato de sodio. Cuando el filtrado alcanza el Sulfato de sodio, enjuagar los lados de la columna con CH_2Cl_2 y drenar de igual manera. Lavar la columna con 25 mL de Tolueno- CH_3COOH (9+1), 25 mL de hexano y 25 mL de hexano-eter- CH_3CN (6+3+1) y descartar los lavados. Eluir las aflatoxinas con 40 mL de CH_2Cl_2 -acetona (4+1) y

evaporar al vacío el eluido en un baño maría. Cuantitativamente transferir el extracto con lavados de CHCl_3 o CH_2Cl_2 a un pequeño vial con tapadera de teflón de rosca. Evaporar hasta sequedad con corriente caliente de Nitrógeno evitar el sobrecalentamiento del extracto. Guardar para el análisis por Cromatografía en capa fina.

Ver anexos (cuadro No. 1).

7.4.1.3. Cromatografía en Capa Fina:

En el tubo de ensayo con el extracto seco agregar 100 microlitros de benceno- CH_3CN (9+1) tapar el vial y mezclar vigorosamente durante 1 minuto, preferentemente en un mezclador vortex, velocidad 5.

Medir 20 microlitros del extracto y se aplican a la placa cromatográfica. Ver anexos (cuadro No. 2), se eluye en la primera dirección, ver anexos (cuadro No. 3), con Eter dietílico - Metanol - Agua (95+4+1), sacar de la cámara cromatográfica y secar con aire caliente, colocar en el horno a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 minutos y dejar enfriar, seguidamente eluir en la segunda dirección, ver anexos (cuadro No. 3), con Cloroformo-Acetona-Isopropanol (87+10+3) y se procede de igual manera que como en la primera elución. Se observan las placas bajo la luz ultravioleta para la detección de fluorescencia azul o violeta para derminar Aflatoxinas B_1 .

7.5.

Control de Análisis:

Para comprobar que los solventes no interfieren en el análisis, elaborar los blancos correspondientes. El análisis se lleva a cabo con todos los reactivos, sin muestra. Se evaluó la confiabilidad del método mediante fortificación de muestras libres de aflatoxinas con cantidades conocidas de aflatoxinas B₁. Utilizar los mismos métodos de análisis para las muestras normales, dicha fortificación se realizó con los niveles de 1, 5, 10 y 20 ppb.

7.6.

Diseño de Investigación

7.6.1.

Número de Muestras:

En el presente trabajo fueron utilizadas un total de 30 muestras por conveniencia y las carnicerías seleccionadas, totalmente al azar.

7.7

Análisis de Datos:

Los resultados obtenidos fueron analizados por medio de Estadística Descriptiva.

8. RESULTADOS

TABLA No. 1
CONTENIDO DE AFLATOXINAS
POR MUESTRA ENCONTRADA POSITIVA

Número de muestra	Cantidad total de ppb en la muestra
1	10
2	20
3	25
4	40

TABLA No. 2
Rf CALCULADOS DEL ESTANDAR Y LAS MUESTRAS
ENCONTRADAS POSITIVAS

Número de muestra	Rf del Estándar en la Placa Cromatográfica	Rf de la muestra con Aflatoxina encontrada en la Placa Cromatográfica
1	0.77	0.85
2	0.55	0.47
3	0.46	0.42
4	0.55	0.60

TABLA No 3
PORCENTAJES ENTRE
POSITIVAS Y NEGATIVAS

	Cantidad de Muestras	%
Negativas	26	86.67
Positivas	4	13.33
TOTAL	30	100

GRAFICA No. 1
GRAFICA DIFERENCIAL ENTRE
POSITIVAS Y NEGATIVAS

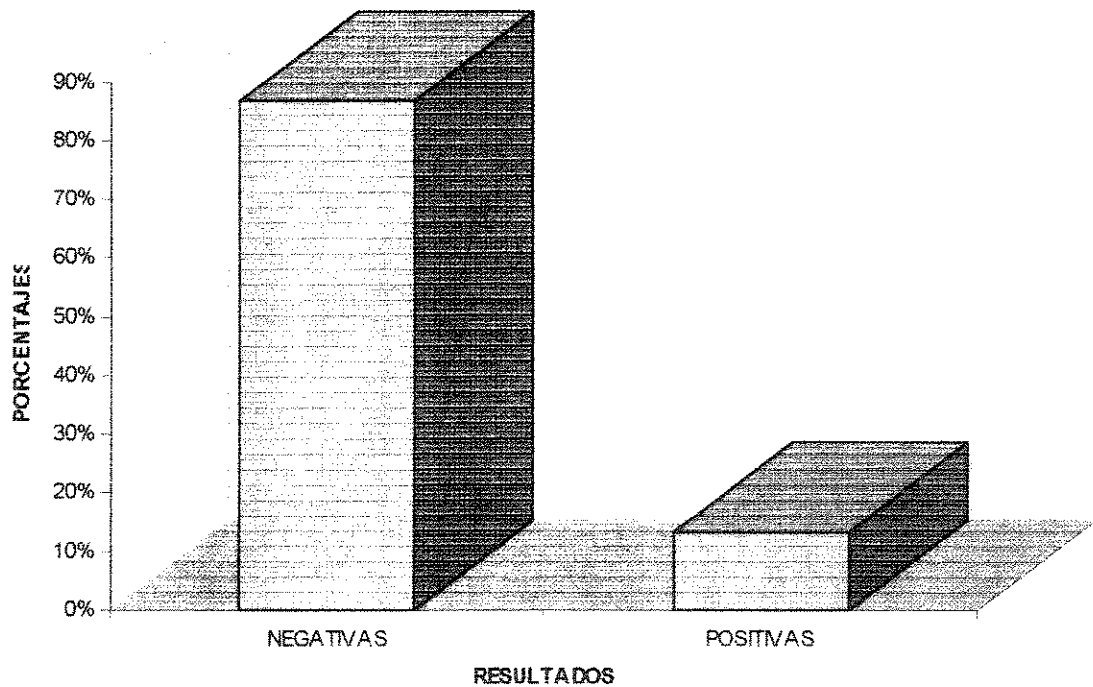


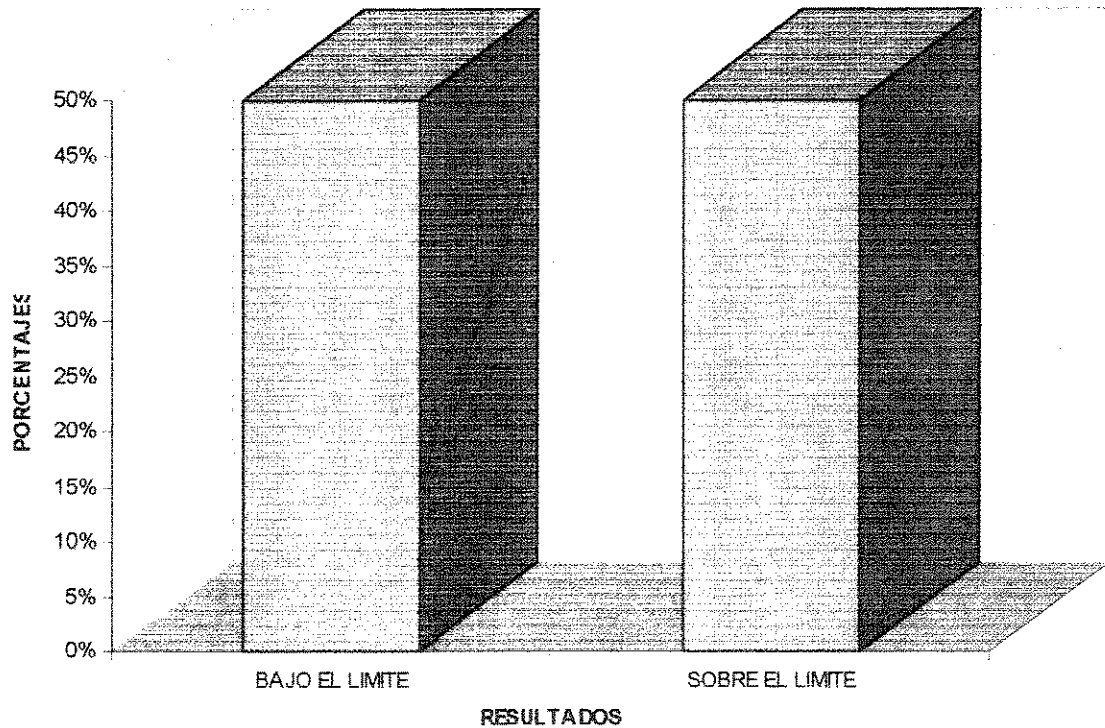
TABLA No. 4

DIFERENCIA ENTRE MUESTRAS
ENCONTRADAS POSITIVAS

	Cantidad de Muestras	%
Bajo el Límite	2	50
Sobre el Límite	2	50
Total de Positivas	4	100

GRAFICA No. 2

GRAFICA DIFERENCIAL ENTRE POSITIVAS



9. DISCUSION DE RESULTADOS

Se trabajó con un método de confiabilidad reconocida, utilizándose la Cromatografía en Capa Fina, como alternativa de identificación, aunque la cuantificación sería de forma aproximada.

Es importante mencionar que el método empleado, indica que la muestra debe pesar 100 gramos, en tanto que, para el presente estudio únicamente se utilizaron 50 gramos de muestra, ya que de esta manera se economizó solventes y reactivos, sin embargo esta economía no permitió obtener resultados más exactos, debido a la poca resolución de la cromatografía en capa fina.

El método utilizado para la extracción, limpieza y cuantificación de las Aflatoxinas es específico para los tipos B1 y M1, este método fue el de la Asociación de Químicos Analistas Oficiales -AOAC-, (Ver Tablas Nos. 1 y 2 de Resultados), ya que es directo, sencillo y de poca manipulación de muestra.

Los resultados del análisis del tejido hepático vacuno, demuestra que de las muestras investigadas el 13 % (Ver Tabla No. 3 y Gráfica No. 1 de Resultados), presentaron contaminación con Aflatoxinas.

Del 13 % de muestras contaminadas, se determinó, por cuantificación comparativa, que el 50 % de ellas sobrepasan los estándares recomendados por la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) que es de 20 ppb (Ver Tabla No. 4 y Gráfica No. 2 de Resultados).

10. CONCLUSIONES

De las muestras de hígado de res analizadas, el 13 % presentaron contaminación con Aflatoxinas.

De las muestras encontradas positivas, el 50 % sobrepasan el límite permitido por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos -FDA- para consumo humano, que es de 20 ppb, para granos de cereales.

Se deben utilizar los 100 gramos de muestra que indica el método utilizado, en lugar de 50, para lograr mejores y más exactos resultados.

El Hígado de res, es susceptible a depósitos de toxinas y el haber encontrado Aflatoxinas del tipo B1 en éste, es un indicador de contaminación por hongos en los alimentos del ganado vacuno.

El método de Cromatografía en Capa Fina, no es lo suficientemente sensible o exacto, para la cuantificación de Aflatoxinas, por lo que debe utilizarse un método más sensible, como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

La Cromatografía en Capa Fina es un método barato y rápido, para el desarrollo de investigaciones como la presente, pero su inexactitud por no contar con densitómetro, el cual cuantifica niveles de fluorescencia, hace a este método poco eficaz.

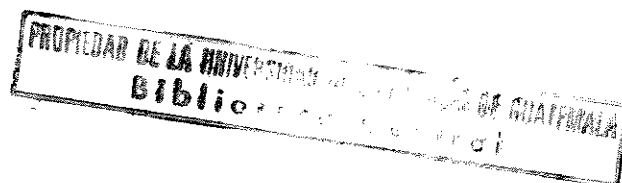
11. RECOMENDACIONES

Que expertos en toxicología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, con el auspicio del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, analicen los alimentos utilizados para la alimentación del ganado y así, determinar el grado de contaminación de éste y si la cantidad de toxinas en éstos, es o no peligrosa para la salud humana.

Es necesario obtener recursos económicos, humanos, técnicos e infraestructurales, para desarrollar en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, investigaciones de este tipo, para que posteriormente y de acuerdo a los resultados, el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, establezca medidas necesarias para evitar que el consumidor, esté expuesto a riesgos que deterioren su salud, por el consumo de alimentos contaminados por toxinas de origen natural.

Continuar y propiciar investigaciones de este tipo, para generar información científica que fundamente la contaminación o no, de otros alimentos.

Buscar los mecanismos de apoyo económico, para el equipamiento de los laboratorios de Análisis Aplicado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, ya que la infraestructura con que cuenta actualmente no es suficiente para realizar estudios, con la precisión que el presente trabajo requería.



Concientizar a la gremial de ganaderos, así como a otras instituciones y empresas para obtener el apoyo y desarrollo de proyectos como éste, para una producción de ganado de mejor calidad para el consumo de los guatemaltecos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of the Joint FAO/WHO/UNEP, Conference on Mycotoxins. Nairobi, Kenya, 19-27 September 1977./Roma, FAO, 1977/pp 4-14.
2. Campos, Marit de y A.E. Olzyna-Marzys. "Aflatoxin Contamination in Grain and Grain Products in the Dry Season in Guatemala". Bull. Environ. Contm. Toxicol. 22: 350-356. 1979.
3. Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas. Nairobi, Kenya, 19-27 de septiembre 1977. Aspectos sanitarios y toxicológicos de las micotoxinas. 15 pp. (Tema 4 del programa, MYC-4b.)
4. Keyl, A. C. y Booth, A. N. "Aflatoxina effects in lives-tock". J. Am. Oil Chem. Soc., 48: 599.604. 1971.
5. Diener, L. U. y N. D. Davis. "Aflatoxin by *Aspergillus Flavus*". En: Goldblatt, L. A. Ed. Aflatoxin Scientific Backgroud, Control, and complications. New York, Academic, Press, 1969.
6. Rodricks, J. V. "Hazards From Nature Aflatoxins". FDA Consumer, 12(4):16-19. 1978.
7. World Health Organization. Mycotoxins. Geneva, 1979. pp. 21-82. (WHO, Environmental Health Criteria, No. 11).

8. Allcroft, R. y R. B. A. Carnaghan. "Groundnut Toxicity- *Aspergillus flavus* toxin (Aflatoxin) in Animal Products; preliminary communication". Vet. Record, 74: 863-864. 1962.
9. Jarvis, B. The Significance of Mycotoxin in Foods". Proc. of Inst. Food Sci. and Tech. 8(2):88-92. 1975
10. Howart, B. Jr. and R. D. Wayatt. "Effect in Dietary Aflatoxin on Fertility, Hatchability and Progeny Performance of Broiler Breeder Hens". Appl. Wnviron. Microbiol., 31(5):680-684. 1976.
11. Garza, J. L. de la. Aflatoxinas en alimentos para puercos, conejos y aves en el área de Monterrey. Monterrey, Mexico, Proveedora Técnica, S. A., 1977 5p (boletín interno No. 3).
12. Shneider, S. "Micotoxinas en alimentos". En: Conferencia Interamericana sobre Toxi-infecciones de Origen Alimentario. Guatemala, 22-26 octubre de 1974. Editor: A. E. Olszyna-Marzys. (Guatemala, INCAP, 1974). pp 89-96.
13. Stoloff, L. "Aflatoxins- An overview". Wn: Rodricks, J. V.; C. W. Hesseltine y M. A. Mehlman. ed. Micotoxin in Human and Animal Health. Illinois, Pathotox Publixhers, Inc., 1977 pp 7-28.
14. Newberne, P. M. y R. L. Gross. "The Role of Nutrition in Aflatoxin Injury". En Wogan, G. N. ed. Mycotoxins in fodd-stuffs. Cambridge, Massachusetts, The M.I.T. Press, 1964. pp 66-73.

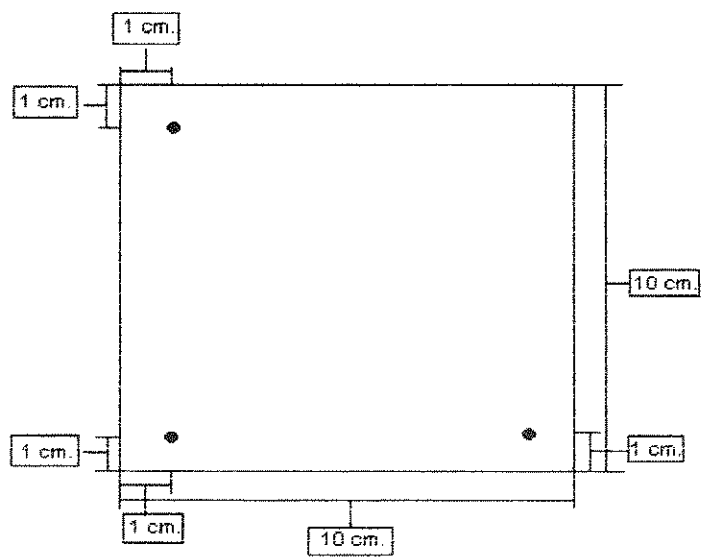
15. Madhaven, T. V., et al. "Effect of Dietary Protein Level on Susceptibility of Monkeys to Aflatoxin Liver Injury". Indian J. Med. Res., 53:79-84. 1973.
16. Madhaven, T. V. y Gopalan, C. "The Efect of Dietary Protein on Carcinogenesis of Aflatoxin" Archi. Pathol., 85:133-137. 1968.
17. Wan Zytveld, Vm. et al. "Aflatoxicosis: The Presence of Aflatoxin or Their Metabolites in Livers and Skeletal Muscles of Chickens" Poultry Sci., 49: 1350-1356. 1970.
18. Wessel, J.R. y L. Stoloff. "Regulatory Surveillance for Aflatoxin and other Mycotoxins in Feeds, Meat, and Milk". J. Ame. Vet. Med. Assoc., 163(11):1284-1287. 1973.
19. Rodricks, J. V. y L. Stoloff. "Aflatoxin Residues From Contaminated Feed in Edible Tissue of Food-producing Animals" En: Rodricks, J.V., C.W. Hesseltine y M.A. Nehlman. ed. Mycotoxin in human and animal health. Illinois, Pathotox Publisers, INC., 1977.
20. Kiermeir, F. "Aflatoxin M₁ Secretion in Cows Milk Depending on the Qty of Aflatoxin B₁ Ingested". milchwissenschaft, 28(11):683-685. 1973.
21. Hayes, J.R.; C.E. Pollan y T.C. Campbell. "Bovine Liver Metabolism and Tissue Distribution of Aflatoxin B₁". J. Agric. Food Chem., 25(5): 189-1193. 1977.

22. Loetzsch, T: u Leistner, L. "Carry-over Effects of Aflatoxins in Meat". Bioxiden Umweltchem Fleisch, (Public. 1975), 1975. pp 130-140. Original no consultado; Compendio en Chem. Abst., 85(158076 u. 1976).
23. Crespo, J. Incidencia de la Contaminación por Aflatoxinas en granos de la costa Sur-Oriental de Guatemala. Tesis (Licenciado Químico Farmacéutico)-Universidad de San Carlos de Guatemala, Faculta de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 1979. pp 27-32.
24. Trucksess, Mary y L. Stoloff. "Extraction, Cleanup, and Quantitative Determination of Aflatoxin B₁ and M₁ in Beef Liver". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62(5): 1080-1082. 1979.
25. Stubblefield, R.D. y Oddette L. Shotwell. "Reverse Phase Analytical High Pressure Liquid Chromatography of Aflatoxins". J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60(4):784-790. 1977.
26. -AOAC- Official Methods of Analysis, AOAC Official Method 982.24 Aflatoxins B₁ and M₁ in Liver. Thin Layer Chromatographic Method. Chapter 49, pp 31-32, (1995).

13. ANEXOS

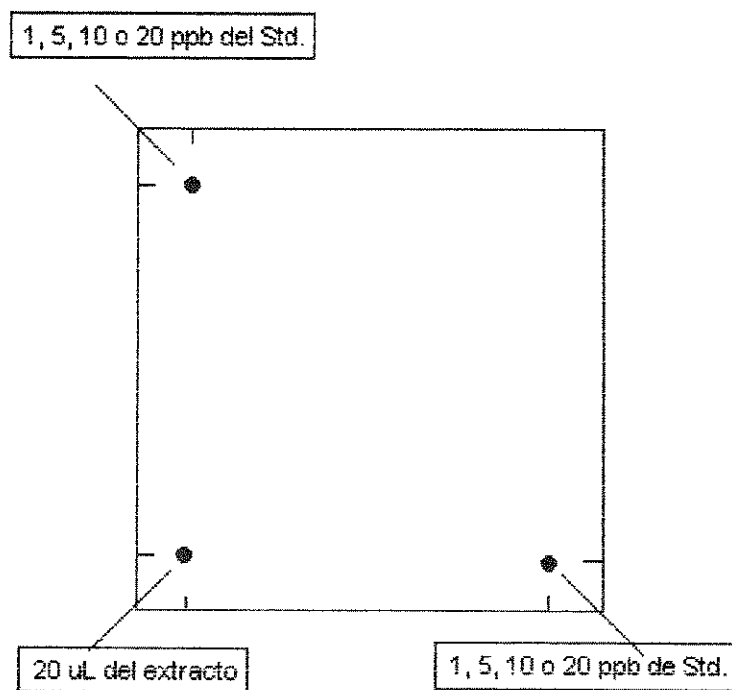
CUADRO No. 1

DIMENSIONES DE LA PLACA CROMATOGRAFICA A UTILIZARSE

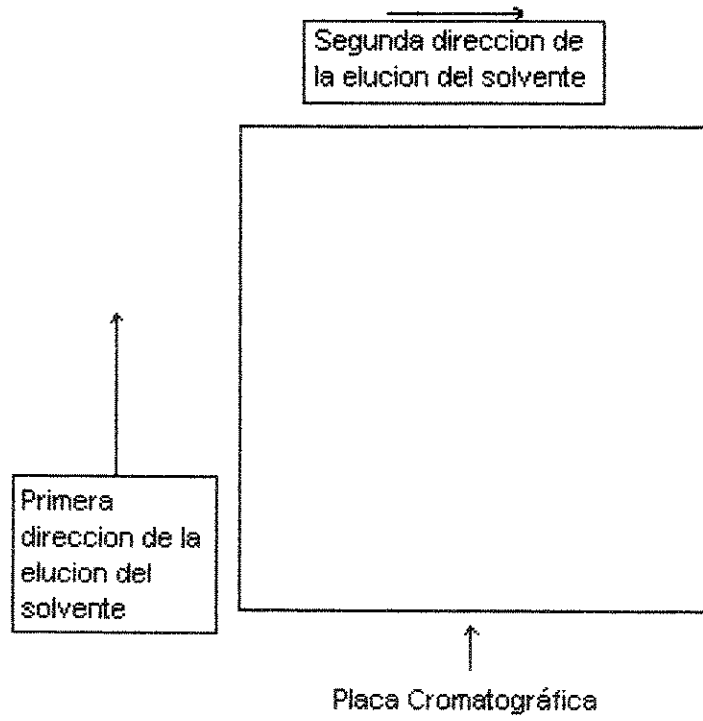


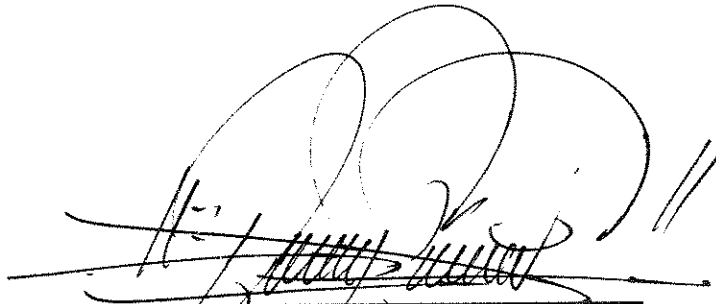
PROPIEDAD DE LA BIBLIOTECA DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

CUADRO No. 2
POSICION DE LA APLICACION DE LA MUESTRA
Y ESTANDARES.

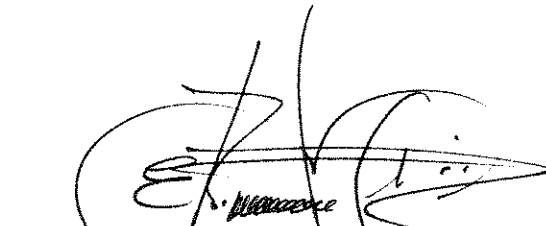


CUADRO No. 3
DIRECCION DE LOS SOLVENTES DE ELUCION





Johnny Ernesto Yalibat Ovalle
Autor




Lic. Elfege Rolando López
Asesor

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central



Licda. Beatriz Batrez de Jimenez
Directora



Lic. Jorge Rodolfo Perez Folgar
Decano .