

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

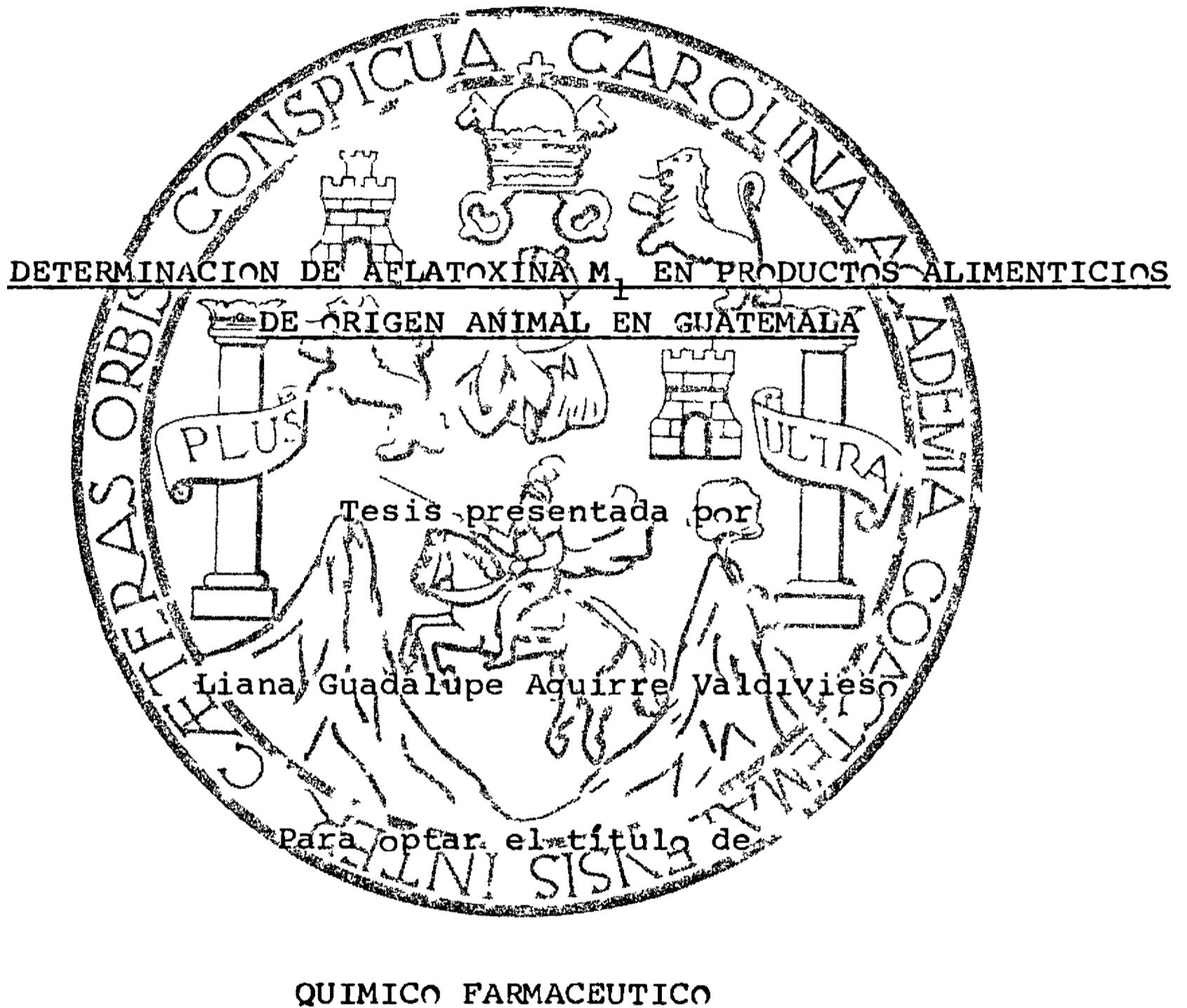
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



LIANA GUADALUPE AGUIRRE VALDIVIESO

Guatemala, Mayo de 1982.

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



T-352

GUATEMALA, MAYO DE 1982.-

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO: Dr. José Héctor Aguilar A.
SECRETARIO: Lic. Leonel Carrillo Reeves
VOCAL 1o.: Lic. Luis Fernando Girón Rodas
VOCAL 2o.: Lic. Francisco Monterroso Salinas
VOCAL 3o.: Lic. Justo Comas Fuxet
VOCAL 4o.: Br. Guido Arreola Smith
VOCAL 5o.: Br. Erick Juárez

ACTO QUE DEDICO

A DIOS TODOPODEROSO

A MIS TIOS

José Aguirre Silva

Rosita Aguirre de Cáceres

Manuel de J. Cáceres

A MI ESPOSO

M. Ricardo Benavides S.

A MI ABUELITA

Otilia S. v. de Aguirre

A MIS PRIMOS

Oscar Manuel

Glenda María

A MIS SUEGROS

Alfredo Benavides F.

Raquel S. de Benavides

A MI TIA POLITICA

Martha Soza

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

TESIS QUE DEDICO

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

A LA INGENIERA MARIT KRISTINE JOHANSEN DE CAMPOS

A MIS FAMILIARES

A MIS AMIGOS

RECONOCIMIENTO

Desear expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que contribuyeron a la realización del presente trabajo.

Al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) por haberme permitido realizar el estudio y a todo el personal de la Sección de Contaminantes; especialmente a la Ing. Marit J. de Campos, Jefe de dicha sección y a la Lic. Elsa de Reyes, Jefe del laboratorio mencionado, por su valiosa ayuda y asesoramiento.

I N D I C E

	Pág.
I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION.....	3
III.- ANTECEDENTES.....	8
IV.- JUSTIFICACIONES.....	18
V.- OBJETIVOS.....	22
VI.- HIPOTESIS.....	23
VII.- ASPECTOS METODOLÓGICOS.....	24
VIII.- RESULTADOS.....	44
IX.- DISCUSION.....	49
X.- CONCLUSIONES.....	55
XI.- RECOMENDACIONES.....	56
XII.- BIBLIOGRAFIA.....	57
XIII.- ANEXOS.....	61

I. RESUMEN

Un importante grupo de toxinas en la familia de las micotoxinas son las aflatoxinas. Estas toxinas son producidas por A. flavus y A. parasiticus y en menor grado por los hongos de los géneros Penicilium y Fusarium (7).

Cuando las aflatoxinas del reino vegetal son ingeridas por animales, son metabolizadas a las aflatoxinas M que son los hidroxiderivados de las aflatoxinas B. Se acumulan en diferentes tejidos y por esta razón pueden resultar contaminados productos tales como la leche, la carne y los huevos (38).

La importancia de este trabajo radica en el montaje de un método sensible y confiable para el análisis de aflatoxina M₁ en productos alimenticios de origen animal como leche, carne y huevos. En este trabajo se hizo una comparación de la eficacia y sensibilidad de dos métodos para la determinación de aflatoxina M₁; mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) y mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC). Con el primer método se obtuvo un límite de detección de 0.1 ppb (partes por billón*, microgramos por kilogramo) y con el segundo un límite de detección de 0.6-0.8 ppb.

NOTA:

*En este trabajo se entenderá que ppb = 1: 1 x 10⁹.

Se analizaron un total de 26 muestras; 10 de leche de vaca, 5 de leche humana, 5 de huevos y 6 de hígado de res; de las cuales 4 muestras de hígado (15% del total) resultaron contaminadas con residuos de aflatoxina M_1 . El valor máximo encontrado fué de 0.5 ppb y el mínimo de 0.1 ppb. No se encontró contaminación en ninguna de las muestras de leche de vaca, leche humana y huevos. Las muestras de hígado se analizaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión y las restantes por medio de Cromatografía en Capa Fina.

II. INTRODUCCION

Durante los últimos años se ha hecho énfasis en la importancia de las micotoxinas en la salud del hombre y de los animales. El descubrimiento de las aflatoxinas en 1961 estimuló enormemente su investigación en los campos de Química, Bioquímica, Micología, Nutrición y Tecnología de Alimentos (13). La palabra micotoxina se refiere a aquellos metabolitos producidos por hongos que son tóxicos al hombre y a los animales. Algunas de estas toxinas son cancerígenas, otras poseen efectos hormonales, trastornan el sistema nervioso o son muy irritantes a la piel (7).

Las aflatoxinas son metabolitos bisfuranocumarínicos tóxicos (37), cristalinos y muy fluorescentes; son producidos principalmente por Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus (11) y en menor grado por hongos de los géneros Penicillium y Fusarium (7).

Debido a las características fluorescentes de las aflatoxinas se facilita enormemente su análisis y hace posible la detección de pequeñas cantidades en los alimentos (39).

Las aflatoxinas del reino vegetal se denominan B₁, B₂, G₁ y G₂ y fueron aisladas por primera vez en la harina de maní (10).

De las cuatro aflatoxinas, es generalmente la B₁ la más abundante y la más tóxica del grupo (10, 12, 13, 30, 37), las otras con frecuencia están presentes en pequeñas cantidades o en niveles que en algunos casos no son detectables (13).

El A. flavus es un constituyente de la micoflora del aire y del suelo y se encuentra en plantas y animales, vivos o muertos, en todo el mundo (12). Este hongo también ha sido reportado frecuentemente como patógeno para los insectos (39). Una gran diversidad de productos vegetales están sujetos a la contaminación por hongos y sus metabolitos, considerándose el maíz y el maní los más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas (10).

El crecimiento de los hongos se asocia a condiciones óptimas que se encuentran en las zonas donde la humedad y la temperatura son altas. Los hongos productores de toxinas pueden infestar los productos ya cosechados y también las plantas en crecimiento, produciendo así toxinas antes de la recolección. La contaminación es en muchos casos una consecuencia de daños causados por insectos (10). El uso de plaguicidas, fungicidas y un secado adecuado antes del almacenamiento, pueden reducir la infestación fungal y disminuir la contaminación por aflatoxinas en los alimentos (39).

Cuando las aflatoxinas del reino vegetal son ingeridas por animales, son metabolizadas a las aflatoxinas M que son los

hidroxiderivados de las aflatoxinas B. Se acumulan en diferentes tejidos y por esta razón pueden resultar contaminados productos tales como la carne, la leche y los huevos (38). El órgano principal para la acumulación de las aflatoxinas es el hígado, pero también se han encontrado en los músculos, el corazón, el riñón, los tejidos cerebrales y la orina (10).

Las aflatoxinas son particularmente notables por su gran toxicidad. La toxicidad aguda, sub-aguda y crónica de las aflatoxinas varía considerablemente según la especie, la edad, el sexo, el estado nutricional, la dosis de aflatoxina en cuestión y la duración y grado de exposición (10). La toxicidad aguda es la más importante en animales, mientras que la intoxicación en el hombre es casi exclusivamente de tipo crónico.

Según los datos epidemiológicos disponibles existe una asociación entre el consumo diario de aflatoxinas y la incidencia de cáncer en el hígado en el hombre. Esta asociación se ha demostrado ya en regiones específicas de zonas sub-Saharianas de Africa y del Lejano Oriente, tales como Kenya, Mozambique, Swazilandia y Tailandia. Estudios epidemiológicos efectuados en Kenya y Swazilandia en tres niveles distintos de altitud, revelaron una elevada incidencia de cáncer hepático en la región de más baja altitud en donde era más alta la ingestión diaria de aflatoxinas. Como las regiones de altitudes elevadas son menos húmedas, los alimentos de esta zona tienen menos aflatoxinas (10).

hidroxiderivados de las aflatoxinas B. Se acumulan en diferentes tejidos y por esta razón pueden resultar contaminados productos tales como la carne, la leche y los huevos (38). El órgano principal para la acumulación de las aflatoxinas es el hígado, pero también se han encontrado en los músculos, el corazón, el riñón, los tejidos cerebrales y la orina (10).

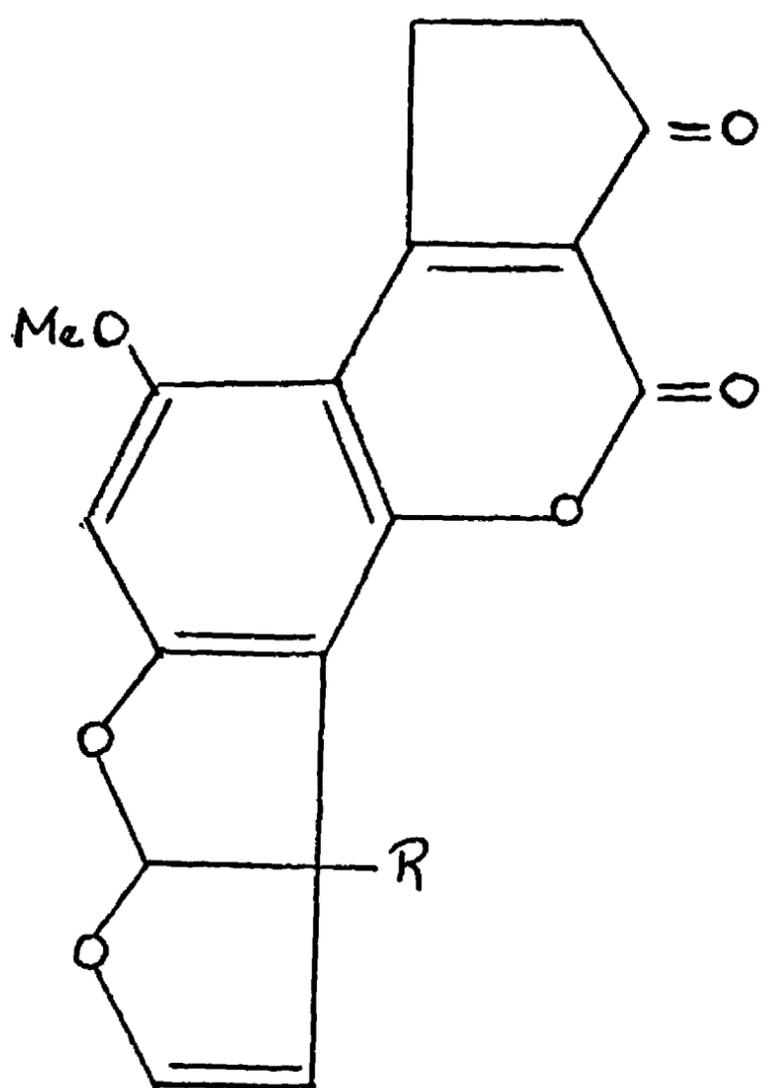
Las aflatoxinas son particularmente notables por su gran toxicidad. La toxicidad aguda, sub-aguda y crónica de las aflatoxinas varía considerablemente según la especie, la edad, el sexo, el estado nutricional, la dosis de aflatoxina en cuestión y la duración y grado de exposición (10). La toxicidad aguda es la más importante en animales, mientras que la intoxicación en el hombre es casi exclusivamente de tipo crónico.

Según los datos epidemiológicos disponibles existe una asociación entre el consumo diario de aflatoxinas y la incidencia de cáncer en el hígado en el hombre. Esta asociación se ha demostrado ya en regiones específicas de zonas sub-Saharianas de Africa y del Lejano Oriente, tales como Kenya, Mozambique, Swazilandia y Tailandia. Estudios epidemiológicos efectuados en Kenya y Swazilandia en tres niveles distintos de altitud, revelaron una elevada incidencia de cáncer hepático en la región de más baja altitud en donde era más alta la ingestión diaria de aflatoxinas. Como las regiones de altitudes elevadas son menos húmedas, los alimentos de esta zona tienen menos aflatoxinas (10).

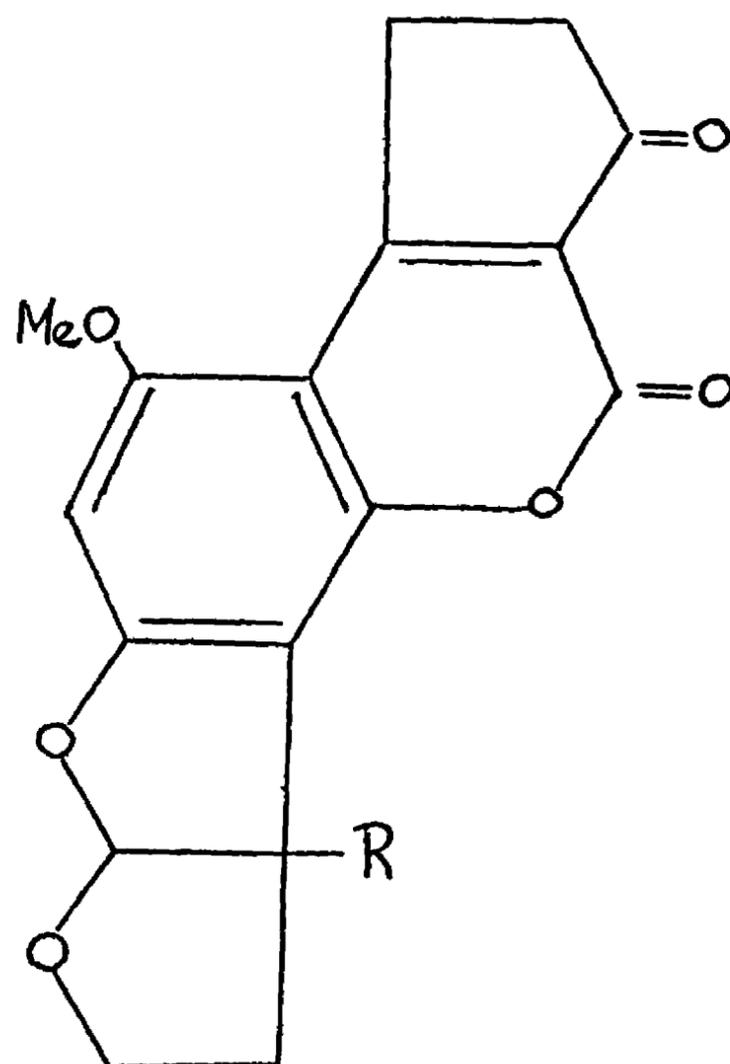
Existen técnicas analíticas que permiten identificar aflatoxinas M en carne, leche y huevos a niveles de 0.1 ppb (partes por billón, microgramos por kilogramo). Muchos estudios han demostrado que residuos de aflatoxinas M pueden ocurrir en carne, leche y huevos de animales que han ingerido alimentos con aflatoxinas B a un nivel suficientemente alto. Un nivel de 20 ppb en el forraje aseguran una ausencia de aflatoxinas en esos alimentos importantes (30). La aflatoxina B₁ en los alimentos a una concentración de más o menos 100 ppb se metaboliza en aflatoxina M₁, dando una concentración en la leche de más o menos 1 ppb (1 microgramo por litro) (38).

Figura No. 1

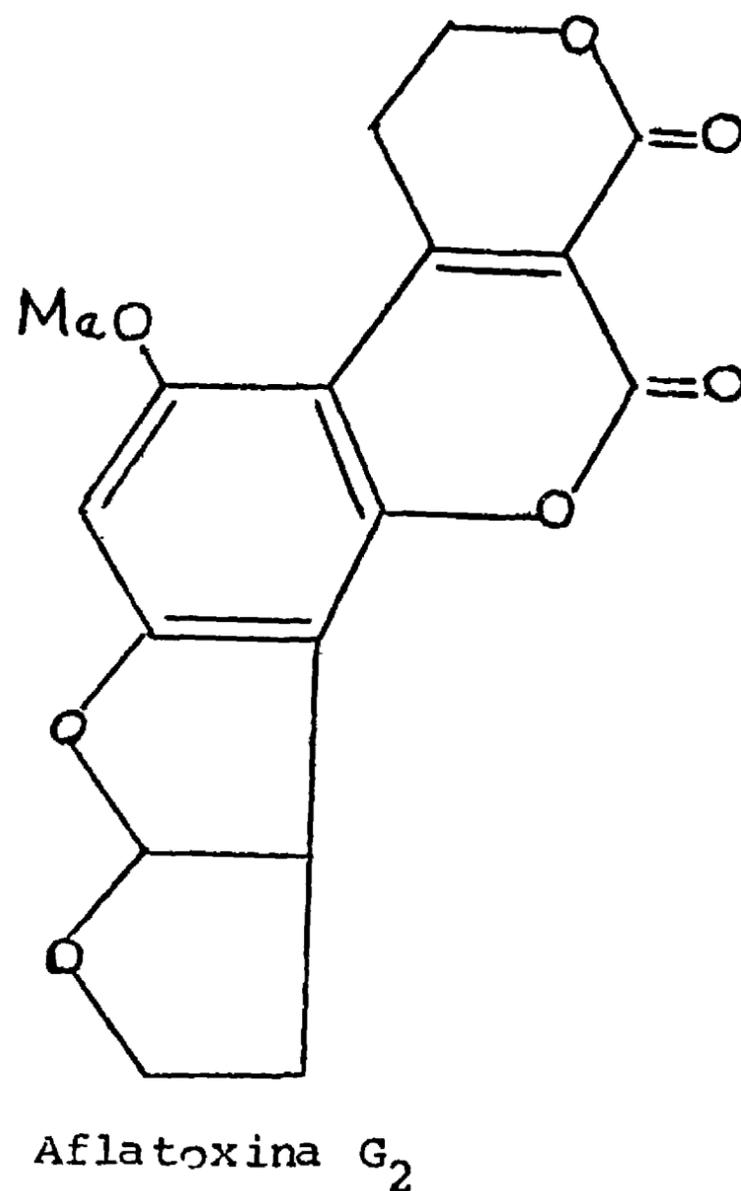
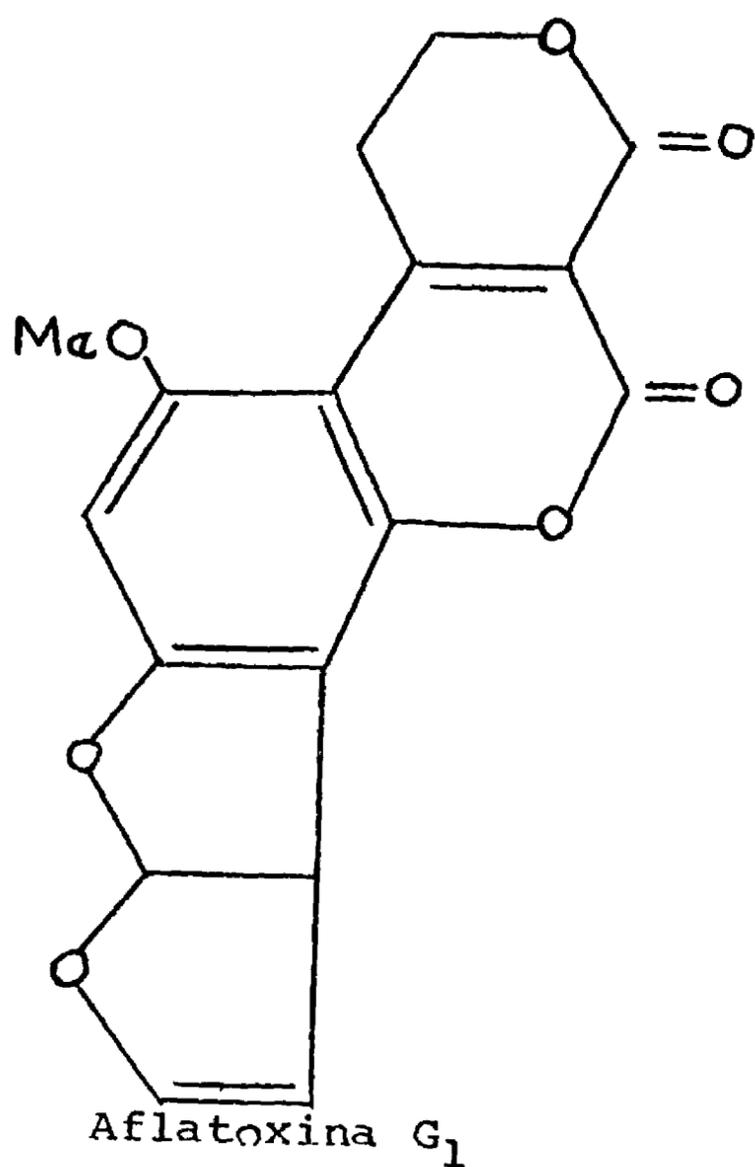
ESTRUCTURA DE LAS AFLATOXINAS (6)



R: H Aflatoxina B₁
 R: OH Aflatoxina M₁



R: H Aflatoxina B₂
 R: OH Aflatoxina M₂



III. ANTECEDENTES

Un importante grupo de toxinas en la familia de las micotoxinas son las aflatoxinas. Estas toxinas son producidas por A. flavus y A. parasiticus y en menor grado por hongos de los géneros Penicilium y Fusarium (7).

En 1954 Semeniuk clasificó al A. 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, su crecimiento se incrementa en las zonas donde la humedad y la temperatura son altas (12).

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

Se ha establecido que estos hongos crecen principalmente en el maíz y en el 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, constituyendo una posible causa de contaminación por aflatoxinas en la alimentación humana (10).

Las aflatoxinas son altamente resistentes al calor y no se eliminan de los comestibles o del pienso de los animales ni con las prácticas ordinarias de cocción, ni con la pasteurización. Sin embargo, son relativamente inestables cuando se exponen a la luz y particularmente a la radiación UV (ultra-violeta), pueden ser químicamente degradadas con agentes oxidantes, álcalis, peróxido de hidrógeno y con amoníaco. Pueden ser totalmente destruidas autoclaveándolas en presencia de amonio o por tratamiento con hipoclorito (39).

Las aflatoxinas del reino vegetal se denominan B_1 , B_2 , G_1 y G_2 y fueron aisladas por primera vez en la harina de maní (10). La contaminación de la harina de maní con hongos y el subsiguiente desarrollo de metabolitos tóxicos, dió origen al desarrollo del brote de la "Enfermedad X del Pavo" en el Sur y en el Oriente de Inglaterra donde en 1960 murieron 100,000 pavos (30, 39). Descubrimientos posteriores revelaron que la enfermedad fué causada por aflatoxinas contenidas en la harina de maní proveniente de Brazil (3, 30, 39). La concentración de aflatoxina B_1 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 (39).

En animales la toxicidad aguda es manifiesta. Experimentos en el laboratorio con animales domésticos han demostrado que

existe una gran diferencia en la susceptibilidad a los efectos de las aflatoxinas para diferentes especies (2, 10, 35). Los patitos son particularmente susceptibles, los pavos y pollos menos. Cerdos de 3-12 semanas de edad, cerdas preñadas y terneros de 1-6 semanas de edad son muy susceptibles cuando la dieta contiene aflatoxinas (3).

La dosis letal media (DL_{50} o LD_{50}) 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, hamsters y ratas (hembras) (39). Los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos (10, 32), probablemente se deba a que los adultos tienen un mejor desarrollo del sistema enzimático "Oxidasas de Función Mixta". La actividad de estas enzimas del hígado puede ser afectada por la composición de la dieta (32). 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 existen simultáneamente la malnutrición, aflatoxinas en la dieta y una alta incidencia de daños hepáticos, incluyendo cáncer (28). Varios investigadores reportan que dietas ricas en proteínas protegen contra los efectos de las aflatoxinas (25, 28); Madhavan y Gopalan (1968) confirmaron esta protección para efectos tóxicos en general, pero encontraron que no se aplica a los efectos carcinogénicos del hígado (24).

En todas las especies estudiadas de animales, los primeros síntomas clínicos en aflatoxicosis aguda son inapetencia, reducción del crecimiento y pérdida de peso (3). Observaciones patológicas han revelado ictericia, hemorragias generalizadas, acumulación de grasa en el hígado y posteriormente cirrosis y fibrosis (3). La patología del hígado es la más característica en todas las especies. La elevación en la actividad de la fosfatasa alcalina sérica es un buen indicador del mal funcionamiento del hígado asociado con la aflatoxicosis (32).

En pollos la aflatoxicosis se produce con varios grados de severidad con una administración diaria de aflatoxinas. La evidencia del daño se puede confirmar por las lesiones vistas al microscopio. Se ha demostrado que las aflatoxinas y/o sus metabolitos se encuentran en el músculo esquelético y en el hígado de los pollos afectados (37).

En gallinas el efecto de las aflatoxinas sobre la producción de huevos fué investigada por Howart y Wyatt. Durante 4 semanas las gallinas fueron alimentadas con dietas contaminadas con 5 y 10.0 mg/kg de aflatoxinas. La producción de huevos disminuyó de la 3a. a la 4a. semana después de iniciada la alimentación con aflatoxinas. Seis gallinas a las cuales se les hizo la necropsia al final de la 4a. semana de tratamiento, presentaron signos típicos de aflatoxicosis incluyendo hígado graso y bazo agrandado (18).

En un estudio similar Hamilton y Garlich también demostraron que las aflatoxinas producen una disminución en la producción de los huevos y un incremento en la incidencia de hígado graso caracterizado como "Síndrome de hígado graso" (14).

Animales que consumen pienso contaminado con aflatoxinas pueden excretar los metabolitos M_1 y M_2 en la leche, en los huevos y en otros tejidos. Estos metabolitos son los hidroxiderivados de las aflatoxinas B_1 y B_2 respectivamente (4, 10). La aflatoxina M_1 es la 4-hidroxi B_1 y la M_2 la 4-hidroxi B_2 (16). (ver figura No. 1, pag. 5).

Como cancerígeno el metabolito M_1 es igualmente potente como el compuesto original, o sea la aflatoxina B_1 (38). En los tejidos la aflatoxina M_2 se encuentra en una concentración mucho menor.

En 1962 Allcroft y Carnaghan reportaron por primera vez que vacas alimentadas con raciones contaminadas con aflatoxinas excretaban en la leche un factor tóxico que tenía un efecto biológico en patos similar al efecto causado por las aflatoxinas (1, 2, 4). Este factor fué después designado como aflatoxina M. Las aflatoxinas M fueron conocidas primero entonces como "toxinas de la leche" (4, 13); la designación M viene de "Milk" en inglés. Estas pueden ser excretadas en varios tipos de leche: de ganado vacuno, cabras, ovejas y humanos (31).

Subsecuentemente los metabolitos M_1 y M_2 fueron detectados también en hígado, riñón y orina (13).

La aflatoxina B_1 en los alimentos se metaboliza en aflatoxina M_1 : una concentración de 100 ppb (microgramos por kilogramo) da una concentración en la leche de más o menos 1 ppb (microgramos por litro) (38).

Los residuos de aflatoxinas en carne, leche y huevos varían con el tiempo transcurrido después de la exposición (31). Se ha encontrado que la excreción de aflatoxina M_1 en la leche de vaca se incrementa al máximo a los 5-6 días y es completamente excretada después de 9-10 días. Estos resultados se obtuvieron agregando 1 kg de harina de maní contaminada a la dieta de las vacas; el nivel de aflatoxinas en la dieta fué 10.9 ppm, o sea 10,900 ppb (partes por billón, microgramos por kg) (22).

Hayes et al establecen que los residuos de aflatoxina M_1 en carne de animales alimentados con menos de 46 ppb de aflatoxina B_1 no producen ningún riesgo para los humanos que la consumen (17). Loetzsch y Leistner 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 (23). 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 B_1 en el alimento (23).

Polan et al y Mackinny et al han reportado una relación pienso/tejido de aproximadamente 7000/1 (0.014%) (26, 29), mientras que Stoloff reportó una relación pienso/hígado de 14000/1 (0.007%) (32). Aunque con una concentración de 100 ppb (microgramos por kilogramo) de aflatoxina B₁ en el forraje se pueden detectar residuos de aflatoxinas en los tejidos, no hay evidencia de síntomas de aflatoxicosis en los animales; solamente concentraciones de 1000-2000 ppb de aflatoxina B₁ en el alimento origina daños visibles. En Alemania signos visibles de aflatoxicosis en un animal destazado causan un rechazo legal (23).

En humanos la toxicidad crónica de las aflatoxinas es la más importante. Datos epidemiológicos indican una asociación entre la ingestión diaria de aflatoxinas y la incidencia de cáncer hepático en diferentes poblaciones. El cáncer hepático es más común en algunas regiones de Africa y del Sud-Este de Asia que en otras partes del mundo; en estas regiones el riesgo de cáncer hepático está incrementado por la exposición a las aflatoxinas. Datos de Kenya, Mozambique, Swazilandia y Tailandia demuestran una correlación positiva entre la ingestión diaria de aflatoxinas (de 3.5 a 222.4 ug/kg de peso corporal por día) y la incidencia del cáncer hepático (de 1.2 a 13.0 casos por 100,000 personas por año) (39).

En 1976 Maleki et al realizaron un estudio para evaluar la excreción urinaria de aflatoxinas en pacientes con cirrosis en una área rural de Irán; en el cual encontraron aflatoxina M₁ en

la orina de 6 de 25 pacientes con un diagnóstico de cirrosis (39). En un estudio de niños cirróticos en las Filipinas, donde la cirrosis no se ha reportado como endémica, se encontró que la aflatoxina M_1 fué secretada en la leche de las madres y excretada en la orina. La aflatoxina M_1 fué observada en la orina cuando la cantidad de aflatoxina B_1 ingerida excedía de 15 ug/día (0.8 a 1.0 ug/kg de peso corporal); el límite de detección de aflatoxina M_1 en orina fué de 5 ug/l. En este caso se encontró una correlación entre los niveles excretados de aflatoxina M_1 y los niveles ingeridos de aflatoxina B_1 (9).

Aunque la intoxicación por aflatoxinas en el hombre es casi exclusivamente de tipo crónico, conviene señalar los posibles efectos agudos. Aparte de la muerte de 3 niños en Taiwan y de un niño en Uganda donde se asoció la necrosis hepática aguda con la ingestión de arroz y cassava contaminados con aflatoxinas a niveles de 200 ppb y 1700 ppb (microgramos por kilogramo) respectivamente, los casos más convincentes de la asociación de aflatoxinas con daños hepáticos fué en una epidemia de hepatitis en el Nor-Oeste de la India en 1974. En esta epidemia varios cientos de campesinos que habían consumido maíz presumiblemente contaminado con aflatoxinas a niveles de 15 ppm, o sea 15,000 ppb, se intoxicaron. Varios de ellos exhibieron síntomas de envenenamiento y más de un ciento de personas murieron. Se reportó un nivel de ingestión diaria arriba de 6 mg por per-

sona, correspondiendo a una dosis arriba de 120 microgramos por kilogramo de peso corporal por día (39).

En 1966 Becroft sugirió la posibilidad que en algunos casos el Síndrome de Reye, o sea encefalopatía con degeneración grasa de las vísceras, podría deberse a la ingestión de aflatoxinas. En 1972 se reportó la presencia de aflatoxinas B₁ y G₁ en el hígado de 2 niños con Síndrome de Reye en Nueva Zelanda (39). Dvorackova et al realizaron un estudio en 27 niños entre 3 días y 8 años de edad con Síndrome de Reye en los cuales encontraron en el hígado aflatoxina B₁ en la mayoría de los casos y aflatoxina M₁ en 4 casos (39).

En Guatemala no se ha hecho ningún estudio relacionado con aflatoxina M₁ y sobre las aflatoxinas B y G son muy pocos los estudios llevados a cabo. Cabrera encontró una contaminación por aflatoxinas en 4% de 99 muestras de semilla de algodón cosechada en el área centroamericana (7). Campos y Olzyna-Marzys encontraron una alta contaminación por aflatoxinas en granos en Guatemala, reportando un 17% de contaminación en 264 muestras de granos cosechados en la época lluviosa y almacenados durante la época seca (8). Crespo realizó un estudio sobre la "Incidencia de la Contaminación por Aflatoxinas en granos de la Costa Suroriental de Guatemala" sobre un total de 145 muestras, encontrando una 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 de 1650 ppb (microgramos por kilogramo) fué encontrado en una muestra de maíz (12). Este valor es más o menos 80 veces el límite establecido para granos de 20 ppb.

NIVELES Y NORMAS

En los Estados Unidos de América la FDA (Food and Drug Administration) ha fijado como guía para residuos de aflatoxinas totales una concentración de 20 ppb para todos los productos afectados (38), excepto para el maní para el cual ha propuesto una concentración de 15 ppb (30). En muchos países como Suecia, Italia, Polonia y Holanda, se ha establecido un límite de 5 ppb, mientras que en otros como Alemania y Francia, no tienen regulación oficial (19). En suplementos proteínicos para niños desnutridos FAO/OMS* propone un límite de 30 ppb (19). Para niveles de aflatoxinas en tejido animal específicamente, no existen normas. En Alemania se ha discutido como posible un límite de 10 ppb (23). 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 ha fijado ningún límite para niveles de aflatoxinas en tejido animal. Las aflatoxinas M₁ y aún B₁ pueden aparecer en carne, leche y huevos si los animales han ingerido alimento contaminado con aflatoxinas B en niveles lo suficientemente altos.

*FAO/OMS (Organización para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud).

IV. JUSTIFICACIONES

Las aflatoxinas son producidas principalmente por las especies de hongos Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus. Estos hongos se encuentran esparcidos por todo el mundo contaminando los comestibles y el pienso para animales, siendo los cereales especialmente vulnerables al ataque de los hongos. La presencia de aflatoxinas y el nivel de contaminación varía con los factores geográficos y estacionales, por las condiciones bajo las cuales crecen, se recolectan y se almacenan (32).

El nivel de exposición a las aflatoxinas depende de la disponibilidad del alimento contaminado y de los hábitos nutricionales que varían de país a país. En lugares donde el maíz o el maní son la base de la dieta y estos se encuentran contaminados, el nivel de exposición es mucho mayor que en aquellos lugares donde los alimentos presentan un bajo grado de contaminación.

Aunque en Guatemala se ha encontrado contaminación por aflatoxinas en todo el país, son especialmente la Costa Sur y el Petén los que tienen un clima muy propicio para el crecimiento de hongos, ya que la humedad y la temperatura son altas en estas zonas. Estudios realizados anteriormente han demostrado una alta contaminación por aflatoxinas en granos en general y en maíz en especial, lo que representa un grave problema para

la población, ya que el maíz constituye la base de la dieta del guatemalteco. Cuando se consume leche, carne y huevos, estos productos pueden estar contaminados si los animales han ingerido pienso contaminado por aflatoxina B_1 . También se ha demostrado que la aflatoxina M_1 se puede excretar en la leche humana si las madres consumen alimento altamente contaminado con aflatoxinas (9). La aflatoxina B_1 puede convertirse en su metabolito hidroxilado, o sea la aflatoxina M_1 . Esto representa un peligro potencial para la salud, ya que las dos aflatoxinas son cancerígenas. Se sabe que la concentración de aflatoxina M_1 en los alimentos es mucho menor que en el pienso, pero los investigadores reportan datos muy diferentes sobre la relación entre la contaminación en el pienso y en el tejido. Sin embargo, todos concuerdan que la mayor concentración se encuentra en el hígado.

Instituciones como la FAO, OMS y UNICEF* están dando asistencia en este campo a científicos e instituciones en los países subdesarrollados, lo cuales sufren el grave problema de la aflatoxicosis (27).

*UNICEF (Fondos de las Naciones Unidas para la Infancia).

En Nairobi, Kenya se llevó a cabo en Septiembre de 1977 la Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA** sobre micotoxinas. Una de las recomendaciones de la Conferencia es prestar una mayor atención al control de micotoxinas en zonas tropicales de alta humedad, dado que los climas cálidos y húmedos favorecen considerablemente el crecimiento de hongos (10).

Hasta el presente, en Guatemala no se había realizado ningún estudio sobre los niveles de aflatoxina M_1 en productos alimenticios de origen animal, por lo tanto se consideró de suma importancia establecer si esta contaminación existe, así como su frecuencia y magnitud. Según los resultados publicados en la literatura mundial, la aflatoxina M_1 se ha encontrado principalmente en leche, hígado y huevos y por esta razón una investigación preliminar como esta se concentró en estos productos. Se incluyeron 5 muestras de leche humana, ya que se ha demostrado que la aflatoxina M_1 puede excretarse en esta también (9). Se ha dado más énfasis a los residuos de M_1 que a los de M_2 , la M_1 es metabolito de la B_1 que es la aflatoxina más abundante y más tóxica.

**FAO/OMS/PNUMA (Organización para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud/Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente).

Los niveles que se encuentran en los tejidos son generalmente muy bajos, de 0.1 ppb (microgramos por kilogramo) en adelante y por esta razón el análisis de aflatoxina M_1 es bastante complicado. Los procedimientos disponibles para leche, carne y huevos son largos, principalmente el paso de la extracción. Debido a que las cantidades detectables son mínimas, de 5 ng (nanogramos = $1\text{g} \times 10^{-9}$) en adelante en 50 g de muestra, el método de la detección final tiene que ser muy sensible; además su análisis requiere mucha destreza de parte del analista. A pesar de la importancia de este tipo de análisis, ningún laboratorio en Guatemala había hecho, hasta la fecha, determinaciones de aflatoxina M_1 en tejido animal. Por estas razones se consideró de mucha utilidad poner en práctica un método sencillo y confiable para el análisis de aflatoxina M_1 y poner mucho énfasis en los aspectos metodológicos del trabajo.

V. OBJETIVOS

- Establecer si en Guatemala existe una contaminación con aflatoxina M_1 en productos alimenticios de origen animal, tales como hígado, leche y huevos.
- Determinar la frecuencia y la magnitud de la contaminación con aflatoxina M_1 en los productos mencionados.
- Poner en práctica y comprobar la eficiencia de procedimientos económicos, rápidos, sensibles y exactos para la determinación de aflatoxina M_1 en alimentos de origen animal.

VI. HIPOTESIS

Los productos alimenticios tales como leche, hígado y huevos que se consumen en Guatemala, están contaminados con aflatoxina M_1 , metabolito hidroxilado de la aflatoxina B_1 , por provenir de ganado y de aves alimentadas con pienso contaminado por la aflatoxina B_1 . La leche humana de madres guatemaltecas también está contaminada por consumir alimentos altamente contaminados.

VII. ASPECTOS METODOLÓGICOS

1. Universo de trabajo.

Se recolectaron en diferentes zonas de la ciudad de Guatemala un total de 26 muestras; 5 de huevos, 6 de hígado de res, 10 de leche de vaca y 5 de leche humana. Las muestras de leche humana se obtuvieron de la Sección de Maternidad del Hospital General San Juan de Dios de esta capital; cada muestra se formó por leche de dos donadoras, debido a la dificultad de conseguir la cantidad suficiente de una sola madre. Las pacientes tuvieron un parto normal, una dieta a base de granos básicos y leche, poca verdura y huevos y muy poco hígado de res; sus edades oscilaron entre 14 y 45 años y todas residen en la ciudad de Guatemala.

Para el análisis de las muestras se empleó el método de Trucksess (34, 35) para hígado y huevos y el método de Tuinstra (36) para leche*.

2. Medios.

2.1. Recursos humanos: Estudiante que efectuó la investigación y personal profesional asesor.

* Las muestras se analizaron en el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM).

2.2. Recursos materiales para los métodos de análisis.

2.2.1. Material y equipo para análisis de leche:

- Balanza semianálítica
- Frascos de centrífuga de 250 o 500 ml
- Baño de María
- Estufa con agitación magnética
- Termómetro
- Probetas graduadas de 5, 25, y 50 ml
- Beakers de 25 y 50 ml
- Embudos de filtración
- Papel filtro Whatman No. 4
- Varillas de vidrio
- Espátulas
- Pipetas Pasteur
- Balones de evaporación de 250 y 500 ml
- Evaporadores tipo Kuderna-Danish de 250 o 500 ml
- Tubos concentradores graduados con tapón esmerilado de 4 y 10 ml
- Viales de fondo cónico
- Columna cromatográfica de 6.5 mm de diámetro interno.
- Lana de vidrio
- Microjeringas de 10, 25 y 100 ul
- Placas de Adsorbosil-1 (Sílica gel) 20 x 20 cm

- Horno
- Desecadora
- Secadora manual
- Centrífuga
- Papel de aluminio
- Evaporador rotatorio con vacío (Rota-Vapor)
- Cámara con tapadera para desarrollo de placas
- Lámpara UV de onda larga

2.2.2. Material y equipo para análisis de hígado y huevos:

- Balanza semianalítica
- Probetas graduadas de 25, 50, 100 y 1000 ml
- Embudos de filtración
- Varillas de vidrio
- Espátulas
- Beakers e 25, 50, 100 y 250 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
- Evaporadores tipo Kuderna-Danish de 250 y 500 ml
- Tubos concentradores graduados de 4 y 10 ml
- Embudos separadores de 250 y 500 ml
- Agitador mecánico
- Columna cromatográfica de 21 mm de diam. int.
- Agitador Vortex

- Lana de vidrio
- Pipetas Pasteur
- Viales de fondo cónico
- Microjeringas de 10, 25 y 100 ul
- Cromatógrafo Líquido de Alta Presión

2.2 .3. Reactivos.

2.2.3.1. Reactivos para análisis de leche:

1. Sulfato de Cadmio al 10%
2. Cloroformo, grado análisis
3. Metanol, grado análisis
4. Eter dietílico, grado análisis
5. Cloroformo+Metanol (97+3)
6. Sulfato de Sodio Anhidro
7. Sílica gel granular: Sílica gel 60, 0.063-0.200 mm (70-230 mesh ASTM*).
La sílica gel se pesa en un Erlenmeyer con tapón esmerilado, se activa a 105°C por 1 hora, luego se desactiva con 3% de agua, se mezcla en agitador mecánico y se guarda una noche antes de usarla.
8. Perlas de ebullición o Carborundum
9. Nitrógeno

*ASTM= American Standard Testing Materials.

9. Estándar de aflatoxina M₁, 1 ug/ml en Benceno+Acetonitrilo (9+1)
10. Cloroformo+Acetona+Isopropanol (85+10+5)

2.2.3.2. Reactivos para el análisis de hígado y huevos:

1. Fase móvil para HPLC; Acetonitrilo ACS+Agua (35+65)
2. Agua desionizada
3. Cloroformo, grado análisis
4. Acetona, grado análisis
5. Metanol, grado Espectroanalizado y grado análisis
6. Cloroformo+Acetona (9+1)
7. Cloroformo+Acetona(50+50)
8. Eter de Petróleo, grado análisis
9. Sulfato de Amonio
10. Solución de Cloruro de Sodio-Acido Cítrico, grado ACS: 40 g de cloruro de sodio y 4.8 g de ácido cítrico monohidratado/100 ml de agua
11. Solución de Acetato de Plomo trihidratado: disolver 200 g de $Pb(OAC)_2 \cdot 3H_2O$ en 500 ml de agua conteniendo 3 ml de ácido acético y diluir a 1 litro con agua

12. Tierra de diatomeas: Hyflo Super-Cel
13. Perlas de ebullición o Carborundum
14. Estándar de aflatoxina M_1 , 1 ug/ml
en Benceno+Acetonitrilo (9+1)
15. Sílica gel granular: preparar la sílica como se describe en reactivo No. 7 para análisis de leche.

3. Procedimiento para el análisis de las muestras.

- Recolección de muestras.
- Análisis de muestras inmediatamente después de su recolección cuando fué posible. Las muestras que no se pudieron analizar inmediatamente, se guardaron en el congelador para evitar el crecimiento de mohos.
- Análisis de aflatoxina M_1 por el método modificado de Trucksess (34, 35), para hígado y huevos y el método de Tuinstra modificado (36) para leche. Se introdujeron cambios en la metodología que facilitaron o abarataron los métodos. No se introdujo ningún cambio sin haber comprobado la validez analítica del mismo.
- Determinación final de aflatoxina M_1 por Cromatografía Líquida de Alta Presión (33) o por Cromatografía en Capa Fina (34).

3.1. Método de análisis.

Para el análisis de las muestras se empleó el mé-

todo de Trucksess (34, 35) para hígado y huevos y el método de Tuinstra (36) para leche, con modificaciones del Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) y otras originadas en el presente trabajo de investigación. Con el propósito de ahorrar reactivos se usó la mitad de las cantidades indicadas en el método original para la extracción y limpieza del extracto; como el producto fué homogenizado totalmente antes del procedimiento, se consideró que esto no afecta la exactitud del método.

3.1.1. Método I, Análisis de leche.

Medir 30 ml de leche en un frasco de centrifuga, tapar con papel de aluminio y calentar en baño de maría a 100°C por 15 min. Enfriar y diluir con 25 ml de agua, agregar 5 ml de sulfato de cadmio al 10% (v/v) y mezclar, agregar 25 ml de cloroformo y mezclar con magneto.

Centrifugar, sacar la capa inferior de cloroformo con pipeta Pasteur y pasarla a un balón evaporador a través de un filtro con sulfato de sodio anhidro. Re-extraer de igual manera la solución y el sedimento en el frasco con dos porciones más de 25 ml de cloroformo reuniendo las fracciones en el mismo balón evaporador.

Evaporar a sequedad en Rota-Vapor con vacío teniendo sumo cuidado de suspender la evapora-

ción en el momento que llegue a sequedad para evitar pérdida de aflatoxina. Disolver el residuo en 5 ml de éter dietílico. Preparar la columna cromatográfica de la siguiente manera: agregar un tapón flojo de lana de vidrio en la punta. Si el tapón queda apretado, disminuye la velocidad de elución. Agregar 25 mm de sílica gel (Reactivo No. 7) más 5 ml de éter dietílico, drenar el éter. No dejar que la columna se seque para evitar la formación de grietas, lo que disminuye las propiedades de absorción y separación. Agregar el extracto de la muestra a la columna cromatográfica. Lavar el balón con 5 ml de éter dietílico pasándolo a la columna lavando las paredes.

Eluir la aflatoxina M_1 con 10 ml de cloroformo+metanol (97+3) y recibir el eluyente en un tubo colector de 10 ml con tapón esmerilado y evaporar casi a sequedad en baño de maría a 40°C. Evaporar con cuidado a sequedad con corriente de nitrógeno, suspender la corriente de nitrógeno en el momento que llegue a sequedad para evitar pérdida de aflatoxina. Disolver el residuo en 25 μ l de metanol. Esta solución es lista para Cromatografía Líquida de Alta Presión o para Cromatografía en Capa Fina.

3.1.2. Método II, Análisis de hígado.

Extracción y partición:

Pesar 50 g de muestra en un vaso homogenizador, agregar 21 ml de solución de cloruro de sodio-ácido cítrico monohidratado (Reactivo No. 10) y mezclar por 2 min a velocidad moderada. Agregar 150 ml de acetona y mezclar nuevamente por 5 min. Filtrar a una probeta de 250 ml, anotar el volumen (\pm 118 ml) y transferir el filtrado a un Erlenmeyer de 250 ml. Agregar 10 ml de solución de $\text{Pb}(\text{OAC})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Reactivo No. 11), enjuagar la probeta con 75 ml de agua y agregarlos al Erlenmeyer, agitar y luego agregar 3.5 g de sulfato de amonio en polvo. Agitar a mano 30 seg, agregar 5 g de tierra de diatomeas, agitar de nuevo y dejar reposar 5 min. Filtrar en una probeta de 250 ml, anotar el volumen (\pm 163 ml) y transferir el filtrado a un embudo separador de 250 ml. Este extracto representa 23 g de muestra.

Agregar al embudo 50 ml de éter de petróleo y agitar vigorosamente por 1 min. Dejar que las fases se separen, drenar la capa acuosa inferior a otro embudo separador de 250 ml y descartar la capa superior de éter. Agregar 25 ml de cloroformo a la capa acuosa, agitar vigorosamente por 1 min y dejar que las fases se separen. Drenar la capa inferior de cloroformo a un balón evaporador de 250 ml. Agregar 25 ml de cloroformo a-

cetona (50+50) a la fase acuosa en el embudo, agitar 1 min y permitir que las fases se separen. Combinar la segunda capa de cloroformo con la primera en el balón evaporador.

Evaporar los extractos clorofórmicos casi a sequedad en Rota-Vapor y proseguir a la cromatografía en columna.

Cromatografía en Columna:

Disolver el extracto en 5 ml de cloroformo. Preparar la columna cromatográfica insertando un tapón flojo de lana de vidrio en la punta. Si el tapón queda apretado, disminuye la velocidad de elución. Agregar 1 cm de sulfato de sodio anhidro más 25 ml de cloroformo, agregar suavemente 5 g de sílica gel.

Drenar el cloroformo, agregar otro cm de sulfato de sodio anhidro encima de la sílica gel, la columna en ningún momento debe quedar seca. Si se seca la columna se pueden formar grietas, lo que disminuye las propiedades de absorción y separación. Agregar el extracto de la muestra a la columna, dejar que el cloroformo llegue a la superficie de la sílica, agregar 75 ml de cloroformo+metanol (97+3) y eluir la aflatoxina con una velocidad de 1-2 gotas/seg.

Recolectar el eluyente en un evaporador ti-

po Kuderna-Danish de 500 ml con tubo graduado de 4 ml. Evaporar casi a sequedad en Rota-Vapor. Colocar el tubo en baño de maría a 55°C y evaporar lentamente a sequedad en corriente de nitrógeno.

Disolver el residuo en 50 ul de metanol (Equivalente a 23 g de muestra). Esta solución está lista para Cromatografía Líquida de Alta Presión o para Cromatografía en Capa Fina.

3.1.3. Método III, Análisis de huevos.

Extracción y remoción de lípidos:

Pesar 50 g de muestra dentro de un vaso homogenizador, agregar 21 ml de agua y luego mezclar 1 min. Agregar 5 g de tierra de diatomeas y 150 ml de acetona, mezclar 3 min a velocidad moderada. Filtrar a una probeta de 250 ml, anotar el volumen (\pm 118 ml) y transferir el filtrado a un Erlenmeyer de 250 ml.

Agregar 10 ml de solución de $\text{Pb}(\text{OAC})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Reactivo No. 11). Enjuagar el frasco con 75 ml de agua y agregarlos al mismo frasco. Agitar y permitir que repose 5 min. Agregar 5 g de tierra de diatomeas, agitar y filtrar a una probeta de 250 ml y pasar el filtrado (\pm 163 ml) a un embudo separador de 250 ml (Este extracto equivale a 22.5 g de muestra).

Agregar 50 ml de éter de petróleo y agitar vigorosamente por 1 min. Permitir que las fases se separen, drenar la fase acuosa inferior a otro embudo separador de 250 ml y descartar la fase superior de éter de petróleo. Agregar al embudo 25 ml de cloroformo, agitar vigorosamente por 1 min y permitir que las fases se separen. Proseguir a la cromatografía en columna.

Cromatografía en Columna:

Preparar la columna como se describió en el método II, agregar la capa inferior de cloroformo del embudo separador a la columna y recolectar el filtrado en un evaporador tipo Kuderna-Danish con tubo graduado de 4 ml a una velocidad de 1-2 gotas/seg.

Agregar 10 ml de acetona a la fase acuosa en el embudo separador y extraer por segunda vez con 25 ml de cloroformo, separar fases y agregar el extracto de cloroformo a la columna cromatográfica. No dejar que en ningún momento la columna quede completamente seca para evitar que se formen grietas, lo que bajaría la eficiencia de la columna.

Lavar la columna con 10 ml de cloroformo+acetona (9+1), recibir el eluyente en un evaporador

tipo Kuderna-Danish de 500 ml con tubo graduado de 4 ml. Evaporar el extracto casi a sequedad en Rota-Vapor. Colocar el tubo en baño de maría a 55°C y evaporar lentamente a sequedad en corriente de nitrógeno. Disolver el residuo en 50 ul de metanol (Equivalente a 22.5 g de huevo). Esta solución está lista para Cromatografía Líquida de Alta Presión o para Cromatografía en Capa Fina.

3.1.4. Control de Análisis:

Para comprobar que los solventes no interfirieran en el análisis, se llevaron blancos de reactivos a través del método completo. El análisis se llevó a cabo con todos los reactivos, pero sin muestra.

Se evaluó la confiabilidad de los métodos mediante fortificación de muestras libres de aflatoxinas con cantidades conocidas de aflatoxina M_1 , usando los mismos métodos de análisis que se usaron para las muestras normales.

Para la determinación con Cromatografía Líquida de Alta Presión las muestras se fortificaron con niveles de 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 ppb (microgramos por kilogramo) y para Cromatografía en Capa Fina con 2 ppb. Se obtuvo una recuperación promedio de 80%.

3.1.5. CROMATOGRAFIA

3.1.5.1. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

3.1.5.2. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

3.1.5.1. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

Cromatógrafo:

- Instrumento: Cromatógrafo Líquido
- Marca: DU PONT
- Modelo: 830
- Columnas: a) Bondapac C₁₈/Porasil B, de 1 m de largo
b) Micropart C₁₈, 1 m de largo (menos sensible)
- Detector: Fotométrico
- Gas compresor para la bomba: N₂

Condiciones del Cromatógrafo:

- Fase móvil: Acetonitrilo+Agua (35+65)
- Filtro de Absorbancia: Filtro Corning CS-7-60: 325-385 nm
- Atenuación del detector: 8 x 10 au
- Presión de la bomba: 1200 lbs/pulg²
- Velocidad de la bomba: 1 ml/min
- Velocidad del papel registrador: 0.1 pulg/min
- Temperatura de la columna: Ambiente

Procedimiento:

- Ajustar las condiciones del cromatógrafo, agregar el solvente (Fase móvil: Acetonitrilo+Agua 35+65) y degasificarlo con vacío para sacar gases solubles. Las burbujas causan interferencia y ruido en la celda, lo que se refleja en una línea base inestable y ruidosa y una menor sensibilidad.
- Encender el aparato y dejar que el detector se estabilice por 2 horas.
- Hacer una curva estándar de 5 a 50 ng de aflatoxina M_1 para establecer la linealidad. Después, si se trabaja dentro del rango lineal, no es necesario repetir cada vez toda la curva. Es suficiente usar un solo estándar como solución de trabajo.
- Inyectar solvente puro para limpiar el sistema antes y después de cada inyección de estándar o de muestra.

- Inyectar 25-50 ul del extracto de la muestra dependiendo de la concentración de aflatoxina presente.
- Identificar la aflatoxina M₁ comparando el tiempo de retención de las muestras y del estándar.
- Calcular el contenido de aflatoxina relacionando alturas de picos de muestra y estándar.

Para la cuantificación se usa la siguiente

fórmula:

$$\text{ppb (microgramos/kg)} = \frac{\text{Altura pico muestra, mm} \times \text{ng estándar inyectado, ul} \times \text{Vol. final del extracto, ul}}{\text{Altura pico estándar, mm} \times \text{Cantidad de muestra inyectada, ul} \times \text{Peso muestra en alícuota, final} \text{ g.}}$$

*Carne 23.0 g

*Huevos 22.5 g

Cantidades variables según volúmenes obtenidos en el método.

3.1.5.2. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Preparación de placas:

- Activar la placa en horno a 100°C durante 1 hora. Pasar la placa a desecadora para enfriar (\pm 15 min).
- Una vez que la placa está lista, sembrar los estándares y la muestra a 4 cm del extremo inferior de la placa.
- Trazar una línea a 4 cm del extremo superior de la placa (línea límite).

Procedimiento:

- Llenar la cámara con solvente de desarrollo cloroformo+acetona+isopropanol (85+10+5) a una altura de 2 cm y saturar durante 90 min. El proceso de saturación se puede acelerar poniendo dentro de la cámara otra placa forrada con papel filtro.
- Sembrar con microjeringa estándares de aflatoxina M₁ (5, 10, 25, y 50 ng) intercalando con 13 μ l de extracto de las muestras.

- Dejar la placa en la cámara con solvente de desarrollo y sacarla cuando el solvente llegue a la línea límite (\pm 30-40 min).
- Secar la placa con secadora por 1 min, seguido por 2 min en horno a 110°C.
- Examinar la placa bajo luz UV (ultra-violeta) de onda larga, las placas deben secarse completamente antes de exponerlas a dicha luz. La luz UV de la luz solar o de lámparas fluorescentes pueden catalizar cambios en los compuestos que se examinan en superficies adsorbentes. Estos cambios son particularmente notables en presencia de solventes. Se debe evitar la exposición a la luz UV de las placas que no han sido examinadas y los puntos que se están examinando deben exponerse el menor tiempo posible para evitar que sucedan esos cambios durante la visualización (5).
- Identificar la aflatoxina M_1 por comparación del R_f de la muestra con el del estándar.

- Calcular el contenido de aflatoxina comparando la intensidad de la fluorescencia de la muestra con la del estándar. Para la cuantificación se usa la siguiente fórmula:

$$\text{ppb} \quad \text{microgramos/kg} = \frac{\text{ng estándar con intensidad igual a la muestra} \times \text{Volumen final del extracto, ul}}{\text{Cantidad muestra sembrada, ul} \times \text{Peso muestra, g}}$$

VIII. RESULTADOS

Los resultados del análisis de aflatoxina M_1 en las 26 muestras se resume en el cuadro No. 1; están reportados en ppb (partes por billón, microgramos por kg).

Como se puede observar, se encontraron residuos de aflatoxinas en muestras de hígado solamente. El análisis reportó que de las 26 muestras, cuatro (15% del total) estaban contaminadas por aflatoxina M_1 . El valor máximo encontrado fué de 0.5 ppb y el mínimo de 0.1 ppb.

No se encontró contaminación en ninguna de las muestras de huevos, leche de vaca y leche humana.

Las muestras de hígado se analizaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), el cual es un método muy sensible. Se obtuvo un nivel de detección tan bajo como 0.1 ppb.

Las demás muestras se analizaron mediante Cromatografía de Capa Fina donde se logró un nivel de detección de 0.6-0.8 ppb. Esto significa que las muestras reportadas como negativas con esta técnica pueden contener niveles bajos, no detectables, o sea niveles menores de 0.6 ppb.

Uno de los objetivos principales del presente trabajo fué encontrar la metodología más adecuada para el análisis de niveles bajos de aflatoxina M_1 .

En este trabajo se consideró de mucha importancia poner en práctica dos diferentes técnicas para la determinación de aflatoxina M_1 : por medio de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) y por Cromatografía en Capa Fina (TLC). El método de HPLC es un método muy sensible y exacto que poco a poco irá desplazando a la TLC para este tipo de análisis, pero existen muchos laboratorios que debido al alto costo del aparato no pueden utilizar este método. Por esa razón se consideró de mucha utilidad montar métodos confiables para el análisis de aflatoxina M_1 , tanto para Cromatografía Líquida de Alta Presión como para Cromatografía en Capa Fina.

La primera parte del trabajo se hizo con Cromatografía Líquida de Alta Presión. Se probaron dos columnas: la columna Micropart C_{18} y la recomendada en la literatura citada: Bondapac C_{18} /Porasil B. Estas columnas son de sílica gel con un largo de 1 m.

La columna que dió el mejor resultado fué la Bondapac C_{18} /Porasil B. Con esta columna se encontró un nivel mínimo de detección de 5 ng que con las condiciones utilizadas dió un pico de 6 mm, dos veces del nivel del ruido. En Cromatografía Líquida como en Cromatografía de gas se con-

sidera que un pico definido debe ser por lo menos dos veces más alto que el nivel del ruido en la línea base. Un pico de 5 ng que es el límite de detección, puede observarse en la Figura No. 2. Este nivel de sensibilidad da un límite de detección de 0.1 ppb (microgramos por kilogramo) de aflatoxina M_1 en la muestra. La columna Micropart C_{18} demostró una sensibilidad inferior con un límite de detección de 10 ng, lo que equivale a 0.5 ppb en la muestra.

Para obtener buenos resultados en HPLC es importante que los solventes utilizados no tengan interferencias, o sea que no den picos en el mismo lugar que la aflatoxina M_1 . Para disolver la muestra para la inyección final el método de Trucksess recomienda usar cloroformo sin especificar el grado de pureza. Se trató de utilizar cloroformo p. a. (para análisis), pero este dió picos interferentes. Se cambió por metanol grado Espectroanalizado que no dió ninguna interferencia. Para la fase móvil se utilizó agua desionizada y acetonitrilo grado ACS que no dieron ninguna interferencia.

Estos resultados demuestran que aunque los mejores solventes para HPLC son los de grado Espectroanalizado, otros solventes de una pureza inferior pueden utilizarse y así el costo del análisis baja considerablemente. Los blancos de reactivos, para los cuales se siguió todo el método, pero sin agregar muestra no tenían interferencias.

Para establecer la linealidad de la aflatoxina M_1 bajo las condiciones descritas se inyectó el estándar en cantidades de 5 a 50 ng. La curva estándar se hizo una sola vez. Al trabajar dentro del rango lineal no es necesario repetir toda la curva diariamente, es suficiente intercalar las inyecciones de muestra con un estándar único. La curva estándar y sus gráficas pueden observarse en las Figuras No. 3 y 4. La curva es lineal hasta 50 ng, no se hicieron pruebas para determinar el límite de la linealidad.

Para la identificación de la aflatoxina M_1 se compararon los tiempos de retención (R_t) del estándar y de la muestra. El R_t promedio fué de 4.5 min. Para la cuantificación se usó la altura del pico del estándar y la altura de los picos de las muestras.

La sensibilidad del sistema no es estable, cambia de un día para otro y puede incluso cambiar dentro del mismo día. Esto puede ser debido a impurezas en los extractos inyectados. Si no se tiene el cuidado de inyectar estándares frecuentemente, los cambios en la sensibilidad afectan la altura de los picos y alteran por consiguiente los resultados del análisis.

Las muestras de huevos y leche se analizaron mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC) y en ninguna de ellas se encontró aflatoxina M_1 . Con este método se llegó a detectar una cantidad mínima de 10 ng, lo que da un límite de detección de 0.6 ppb (microgramos por kilogramo) con el método usado para leche y 0.8 ppb para el de huevos.

La pureza de los solventes de desarrollo es también un factor muy importante para la sensibilidad. Cuando se cambió el cloroformo grado análisis por uno con una pureza superior, el límite de detección bajó de 50 a 10 ng, o sea equivalente a 0.6 ppb en una muestra de leche.

Para obtener una mejor sensibilidad, las placas deben estar correctamente activadas (1 h a 105°C).

Para la identificación de la aflatoxina M_1 se comparó el R_f del estándar con el de las muestras, el R_f de la aflatoxina M_1 en el sistema de solventes empleado es de 0.40. El tiempo de desarrollo promedio fué de 30-40 min.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

De las 26 muestras analizadas se encontró que el 15% de las muestras estaba contaminado con residuos de aflatoxina M_1 . Todas las muestras contaminadas eran de hígado, en las muestras de huevos, leche de vaca y leche humana no se detectaron residuos. Estos resultados confirman que el hígado es el tejido donde más se concentran los residuos (17, 23). El valor más alto de aflatoxina M_1 encontrado en hígado fué de 0.5 ppb (microgramos por kilogramo) y el más bajo de 0.1 ppb.

Varios investigadores (15, 20, 21, 26, 29) han tratado de encontrar una relación entre los niveles de aflatoxina B_1 en el alimento ingerido por el animal y los niveles de aflatoxina M_1 en el tejido. Los diferentes investigadores han reportado resultados muy variables al respecto; no solo hay variación entre las diferentes especies, sino aún entre la misma especie. Estas diferencias probablemente se deban a diferencias individuales en la velocidad de la detoxicación metabólica y a otros factores como por ejemplo la clase de alimento, las condiciones climatológicas, la edad y el sexo del animal.

Loetzsch y Leistner en Alemania reportaron que los residuos de aflatoxinas pueden detectarse en los órganos y mús-

cuños del ganado vacuno, cerdos y pollos cuando los animales consumen alimentos contaminados con más de 100 ppb (microgramos por kilogramo) de aflatoxinas (23), sin embargo, con este nivel de contaminación no hay signos de aflatoxicosis en los animales. Solamente concentraciones de 1000-2000 ppb de aflatoxina B₁ en el alimento originan daños visibles que pueden causar rechazo legal en Alemania (23). Dos equipos de investigadores, Polan et al (29) y MacKinny et al (26), han reportado datos muy semejantes con una relación pienso/tejido de aproximadamente 7,000/1, mientras que Stoloff reportó una relación pienso/hígado de 14,000/1. Esto significa que es posible encontrar aflatoxina M₁ en los tejidos solamente cuando el alimento está contaminado a niveles considerablemente altos y de esto se puede concluir que la conversión de granos contaminados en leche, carne y huevos reduce para el humano la ingestión de aflatoxinas (31, 32).

Como dos grupos diferentes han reportado la misma relación pienso/tejido de 7,000/1 esta se ha usado para estimar los niveles de contaminación en los alimentos ingeridos por los animales muestreados. Si en el presente estudio se encontraron niveles de 0.1, 0.2 y 0.5 ppb de aflatoxina M₁ en las muestras, quiere decir que el alimento se encontraba contaminado con niveles de 700, 1,400 y 3,500 ppb de aflatoxina B₁ respectivamente.

El factor de Loetzsch y Leistner darían valores estimados más bajos y el de Stoloff uno más alto. De todas maneras se puede concluir que los niveles de aflatoxina en los alimentos ingeridos por los animales estaban sumamente altos.

La presencia de aflatoxinas en el pienso puede originar un envenenamiento en los animales domésticos que trae consecuencias, tanto económicas como de salud animal. Para la industria ganadera y lechera por ejemplo es importante el retardo en el crecimiento del ganado y una disminución en la producción lechera. Estos efectos no siempre serán detectados y atribuidos a la presencia de aflatoxinas en el pienso. Solamente si la intoxicación es más severa los efectos son más evidentes, puede producir incluso la muerte de los animales.

Los niveles estimados de aflatoxinas en el pienso de los animales muestreados en el presente estudio pueden haber producido efectos nocivos, ya que estos niveles están por encima de los que varios investigadores reportan como críticos para producir aflatoxicosis en los animales.

Garrett et al (1968), así como Loetzsch y Leistner (1974) reportaron que con niveles de 100 ppb (microgramos por kilogramo) no se presentan síntomas de aflatoxicosis en los animales.

En Alemania se ha propuesto 10 ppb (microgramos por kilogramo) como límite legal para aflatoxinas en tejido animal (23).

Otro componente del presente trabajo fué la investigación llevada a cabo sobre la metodología de análisis. El método de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) resultó más sensible que el de Cromatografía en Capa Fina (TLC) para la detección de aflatoxina M_1 . Con HPLC se obtuvo un límite de detección de 0.1 ppb, mientras que con TLC el límite de detección fué de 0.6-0.8 ppb. Esto indica que muestras analizadas con TLC pueden reportarse como negativas teniendo niveles menores que 0.6-0.8 ppb.

El análisis de aflatoxinas no siempre puede realizarse mediante HPLC. Debido al costo elevado del instrumento, pocos laboratorios cuentan actualmente con este instrumento. Como alternativa, aunque menos exacto, el análisis puede realizarse mediante TLC. Este método tiene la ventaja de ser barato y rápido. Se pueden analizar varias muestras en una sola corrida, en la placa pueden sembrarse al mismo tiempo hasta 12 muestras con estándares intercalados.

Para el análisis con TLC el residuo final se disolvió en 25 μ l y de esto se sembró 13 μ l en la placa. La sensi-

bilidad puede aumentarse si el extracto se disuelve en una cantidad menor de solvente y se siembra todo el extracto. Así el nivel de detección puede bajarse a un nivel cercano al límite de detección que se obtiene con HPLC. Sin embargo, el HPLC es más exacto que el TLC. Para la cuantificación con HPLC se mide la altura de los picos que da una cifra más exacta que la estimación subjetiva de la intensidad de la fluorescencia de las manchas en la placa cromatográfica. Si se cuenta con un densitómetro la exactitud del método con TLC también aumenta.

Para HPLC se probaron dos columnas para verificar en cual se obtenían mejores resultados. Se usó la columna Micropart C₁₈ y la recomendada en la literatura citada, Bondapac C₁₈/Porasil B (33). Con la última se obtuvo una mejor respuesta, la sensibilidad fué dos veces mayor que la detectada con la primera. Esto confirma que la columna es un factor muy importante para la sensibilidad del método.

En cuanto a solventes es importante que no tengan interferencias. Por otro lado, solventes de alta pureza son mucho más caros que los demás. Se hicieron varios ensayos para ver si se podían utilizar solventes con un grado menor de pureza. Se obtuvieron buenos resultados utilizando solventes grado análisis a través de todo el método con excepción del extracto final para HPLC que se disolvió en meta-

no1 grado Espectroanalizado. El cloroformo grado análisis para este propósito dió picos interferentes. Aunque los solventes de grado Espectroanalizado son óptimos para HPLC, se comprobó que para la fase móvil el acetonitrilo grado ACS no dió ninguna interferencia. Esto indica que los solventes de una pureza inferior pueden utilizarse sin causar interferencia, lo que para el análisis de varias muestras, resulta económico. En estos casos es muy importante comprobar la ausencia de interferencias mediante blancos, o sea que se sigue todo el procedimiento de análisis sin agregar muestra.

Para TLC varios factores influyen sobre la sensibilidad.

La pureza de los solventes es un factor importante para el desarrollo de placas; se obtuvo un cambio muy marcado en la sensibilidad al cambiar el cloroformo grado análisis por uno con una pureza superior. Es importante que las placas sean activadas correctamente (1 h a 105°C), la sensibilidad disminuye grandemente cuando no son activadas o cuando la activación no es suficiente. Para que la saturación de la cámara fuera más rápida, se colocó dentro de la cámara otra placa forrada de papel filtro. Con esto el tiempo de saturación de la cámara bajó a más o menos 30 min, lo que ahorra 1 h en el tiempo de análisis.

X. CONCLUSIONES

- Los residuos de aflatoxina M_1 se encontraron solamente en las muestras de hígado. Estos resultados confirman que es el hígado el órgano donde más se concentran los residuos de aflatoxina M_1 .
- El análisis de aflatoxina M_1 mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión es más sensible y más exacto que el de Cromatografía en Capa Fina.
- El método de Cromatografía en Capa Fina resultó también muy sensible y además es más rápido y más barato que el de Cromatografía Líquida de Alta Presión. Por lo tanto este método es adecuado para análisis de rutina.
- Los solventes grado análisis utilizados a través de todo el método, no dieron ninguna interferencia por lo que pueden utilizarse para este tipo de análisis disminuyendo así el costo del mismo.
- La sensibilidad de la columna Bondapac C_{18} /Porasil B fué mayor que la de la columna Micropart C_{18} .
- Con las placas activadas 1 h a 105°C se obtuvieron mejores resultados que con las placas no activadas.

XI. RECOMENDACIONES

- Hacer uso del Cromatógrafo Líquido de Alta Presión en el análisis de aflatoxina M_1 para trabajos de investigación. Este método es más sensible y ofrece un resultado más preciso que la Cromatografía en Capa Fina.
- Para trabajos de rutina y cuando el laboratorio no tiene disponible un Cromatógrafo Líquido, la Cromatografía en Capa Fina puede ser utilizada para la determinación de aflatoxina M_1 .
- Efectuar programas de vigilancia y control para reducir las micotoxinas en los alimentos y piensos.
- Continuar con estudios sobre determinación de aflatoxina M_1 en base a la presente investigación.

XII. BIBLIOGRAFIA

- 1- Allcroft, R. y R. B. A. Carnaghan. "Groundnut toxicity-*Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products; preliminary communication". Vet. Record, 74:863-864. 1962.
- 2- _____ y R. B. A. Carnaghan. "Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed groundnut meal". Vet. Record, 75:259-263. 1963.
- 3- _____. "Aspects of aflatoxicosis in farm animals". En: Wogan, G. N. ed. Mycotoxins in food-stuffs. Cambridge, Massachusetts, The M.I.T. Press, 1964. pp. 153-162.
- 4- _____ y B. A. Roberts. "Toxic groundnut meal: the relationship between aflatoxin B₁ intake by cows and excretion of aflatoxin M₁ in milk". Vet. Record, 82:116-118. 1968.
- 5- Association Official Analytical Chemist, Washington, D. C. Official methods of analysis of the AOAC. 13 th ed. Washington, D. C., 1975. pp. 414.
- 6- Büchi, G. y I. D. Rae. "The structure and chemistry of aflatoxins". En: Golblat, L. A. ed. Aflatoxin scientific background, control, and implications. New York, Academic Press, 1969. pp. 55-75.
- 7- Cabrera, S. de; R. de León, M. García-Prendes y C. Rolz. "Aflatoxin in Centralamérica cottonseed". En: Conferencia Interamericana sobre Toxi-infecciones de Origen Alimentario. Guatemala, Ciudad 22-26 de octubre de 1974. Memorias. Guatemala, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 1976. pp.89-98.
- 8- Campos, Marit de y A. E. Olzyna-Marzys. "Aflatoxin contamination in grain and grains products in the dry season in Guatemala". Bull. Environ. Contm. Toxicol., 22:350-356. 1979.
- 9- Campbell, T. C. y L. Stoloff. "Implication of mycotoxin for human health". J. Agric. Food Chem., 22(6):1006-1014. 1974.
- 10- Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas. Nairobi, Kenya, 19-27 septiembre 1977. Aspectos sanitarios y toxicológicos de las micotoxinas. [Roma, FAO, 1977]. 15 p. (Tema 4 del programa, MYC-4b).

- 11- Crespo, J. Incidencia de la contaminación por aflatoxinas en granos de la costa suroriental de Guatemala. Tesis (Licenciado Químico Farmacéutico)-Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 1979. pp. 27-32.
- 12- Diener, L. U. y N. D. Davis. "Aflatoxin by *Aspergillus flavus*". En: Goldblatt, L. A. ed. Aflatoxin scientific background, control, and implications. New York, Academic Press, 1969. pp. 13-54.
- 13- Feuell, A. J. "Types of mycotoxin in foods and feeds". En: Goldblatt, L. A. ed. Aflatoxin scientific background, control, and implications. New York, Academic Press, 1969. pp. 187-221.
- 14- Garlich, J. D.; Hsi-Tang Tung y P. B. Hamilton. "The effects of short term feeding of aflatoxin on egg production and some plasma constituents of the laying hen". Poultry Sci., 52:2206-2211. 1973.
- 15- Garrett, W. N.; Heitman, H. Jr. y Booth, A. N. "Aflatoxin toxicity in beef cattle". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127:188-190. 1968.
- 16- Goldblatt, L. A. ed. Aflatoxin scientific background, control, and implications. New York, Academic, Press, 1969. pp. 1-11.
- 17- Hayes, J. R.; C. E. Polan y T. C. Campbell. "Bovine liver metabolism and tissue distribution of aflatoxin B₁". J. Agric. Food Chem., 25(5):1189-1193. 1977.
- 18- Howart, B. Jr. y R. D. Wyatt. "Effect in dietary aflatoxin on fertility, hatchability, and progeny performance of broiler breeder hens". Appl. Environ. Microbiol., 31(5):680-684. 1976.
- 19- Jarvis, B. "The significance of mycotoxin in foods". Proc. of Inst. of Food Sci. and Tech., 8(2):88-92. 1975
- 20- Keyl, A. C. y Booth, A. N. "Aflatoxin effects in livestock". J. Am. Oil Chem. Soc., 48:599-604. 1971.
- 21- _____; Booth, A. N., Masri, M. S., Gumbmann, M. R. y Gagne, W. E. Chronic effects of aflatoxin in farm animal feeding studies. Citado por: 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. Mehlman. ed. Mycotoxin in human and animal health. Illinois, Pathotox Publishers, INC., 1977. pp. 73.

- 22- Kiermeir, F. "Aflatoxin M₁ secretion in cows milk depending on the quantity of aflatoxin B₁ ingested". Milchwissenschaft, 28(11):683-685. 1973. Original no consultado; compendiado en Chem. Abst., 81:22040n. 1974.
- 23- Loetzsch, R. y Leistner, L. "Carry-over effects of aflatoxins in meat". Bioziden Umweltchem Fleisch, (Public. 1975), 1974. pp. 130-140. Original no consultado; compendiado en Chem. Abst., 85:158076u. 1976.
- 24- Madhavan, T. V. y Gopalan, C. "The effect of dietary protein on carcinogenesis of aflatoxin". Arch. Pathol., 85:133-137. 1968.
- 25- _____; Rao, K. S. y Tulpule, P. G. "Effect of dietary protein level on susceptibility of monkeys to aflatoxin liver injury". Indian J. Med. Res., 53:984--989. 1965.
- 26- McKinney, J. D.; Cavanagh, G. C., Bell, J. T., Hoversland, A. S., Nelson, D. M., Pearson, J. y Selkirk, R. J. "Effects of ammoniation on aflatoxins in ration fed lactating cows". J. Am. Oil Chem. Soc., 50:79-84. 1973.
- 27- Milner, M. "Significance of mycotoxin in international protein foods efforts". En: Wogan, G. N. ed. Mycotoxins in food-stuffs. Cambridge, Massachusetts, The M.I.T Press, 1964. pp. 69-73.
- 28- Newberne, P. M. y R. L. Gross. "The role of nutrition in aflatoxin injury". En: Rodricks, J. V., C. W. Hesseltine y M. A. Mehlman. ed. Mycotoxin in human and animal health. Illinois, Pathotox Publishers, INC., 1977. pp. 51-65.
- 29- Polan, C. E.; Hayes, J. R. y Campbell, T. C. "Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows". J. Ag. Food Chem., 22:635-638. 1974.
- 30- Rodricks, J. V. "Hazards from nature aflatoxins". FDA Consumer, 12(4):16-19. 1978.
- 31- _____ 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. Mehlman. ed. Mycotoxin in human and animal health. Illinois, Pathotox Publishers, INC., 1977. pp. 67-79.

- 32- Stoloff, L. "Aflatoxins-An overview". En: Rodricks, J. V.; C. W. Hesseltine y M. A. Mehlman. ed. Mycotoxin in human and animal health. Illinois, Pathotox Publishers, INC., 1977. pp. 7-28.
- 33- 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.
- 34- 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.
- 35- _____; L. Stoloff, W. A. Pons Jr., Alva F. Cucullu, Louise, S. Lee y A. O. Franz Jr. "Thin layer chromatographic determination of aflatoxin B₁ in eggs". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60(4):795-798. 1977.
- 36- Tuinstra, L. G. M. Th., y J. M. Bronsgeest. "Determination of aflatoxin M₁ in the milk at the parts per trillion level". J. Chromatogr., 111:448-451. 1975.
- 37- Van Zytveld, Vm. A.; D. C. Kelley y S. M. Dennis. "Aflatoxicosis: The presence of aflatoxin or their metabolites in livers and skeletal muscles of chickens". Poultry Sci., 49:1350-1356. 1970.
- 38- 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.
- 39- World Health Organization. Mycotoxins. Geneva, 1979. pp. 21-82. (WHO, Environmental Health Criteria, No. 11).

XIII. A N E X O S

Cuadro No. 1

RESIDUOS DE AFLATOXINA M, EN PRODUCTOS
ALIMENTICIOS DE ORIGEN ANIMAL

Producto	No. Muestras Analizadas	Muestras Positivas	Resultados	
			HPLC (ppb, ug/kg)	TLC
Hígado	6	4	0.1 0.2 0.2 0.5	
Huevos	5	0		ND*
Leche humana	5	0		ND
Leche de vaca	10	0		ND

*ND= No detectado

Figura No. 2

LIMITE DE DETECCION PARA AFLATOXINA M, CON
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

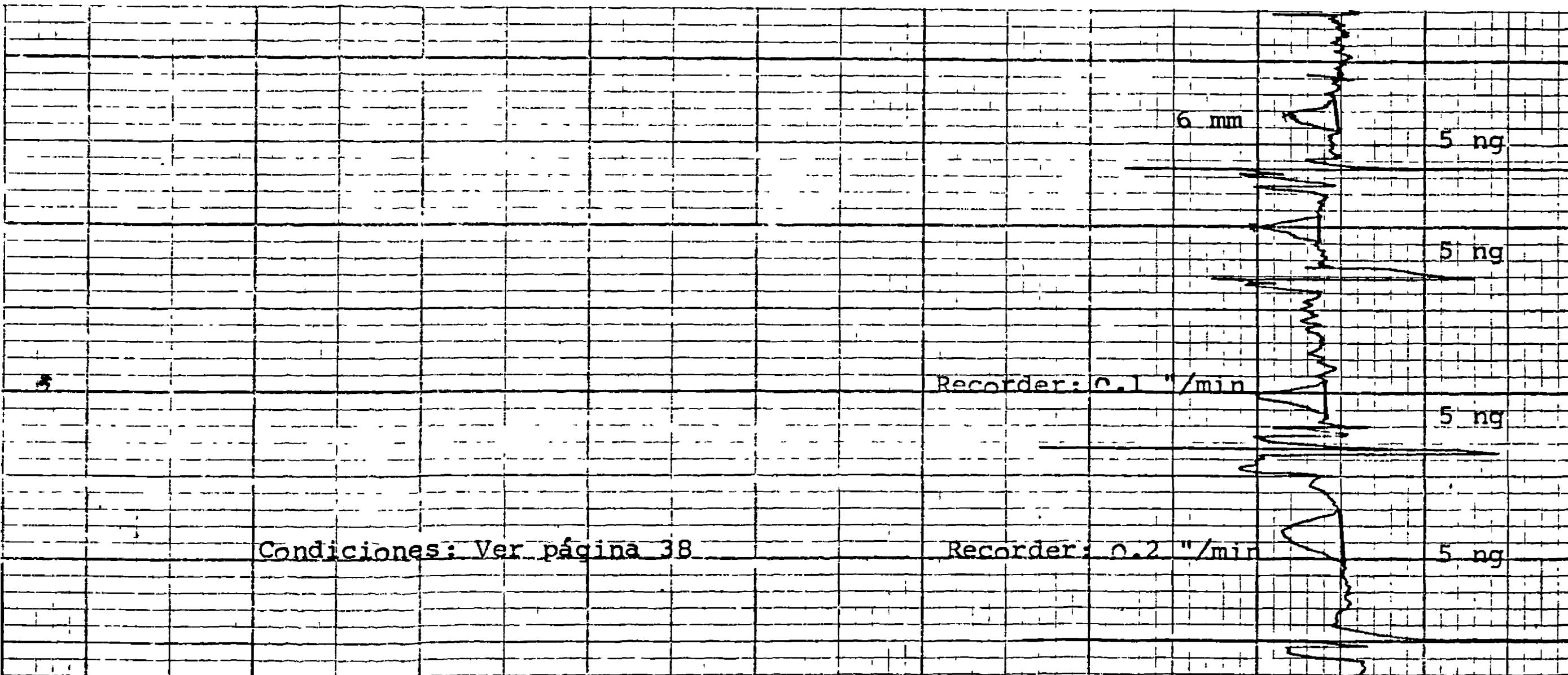


Figura No. 3

AFLATOXINA M₁ CON CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

Condiciones: Ver página 38

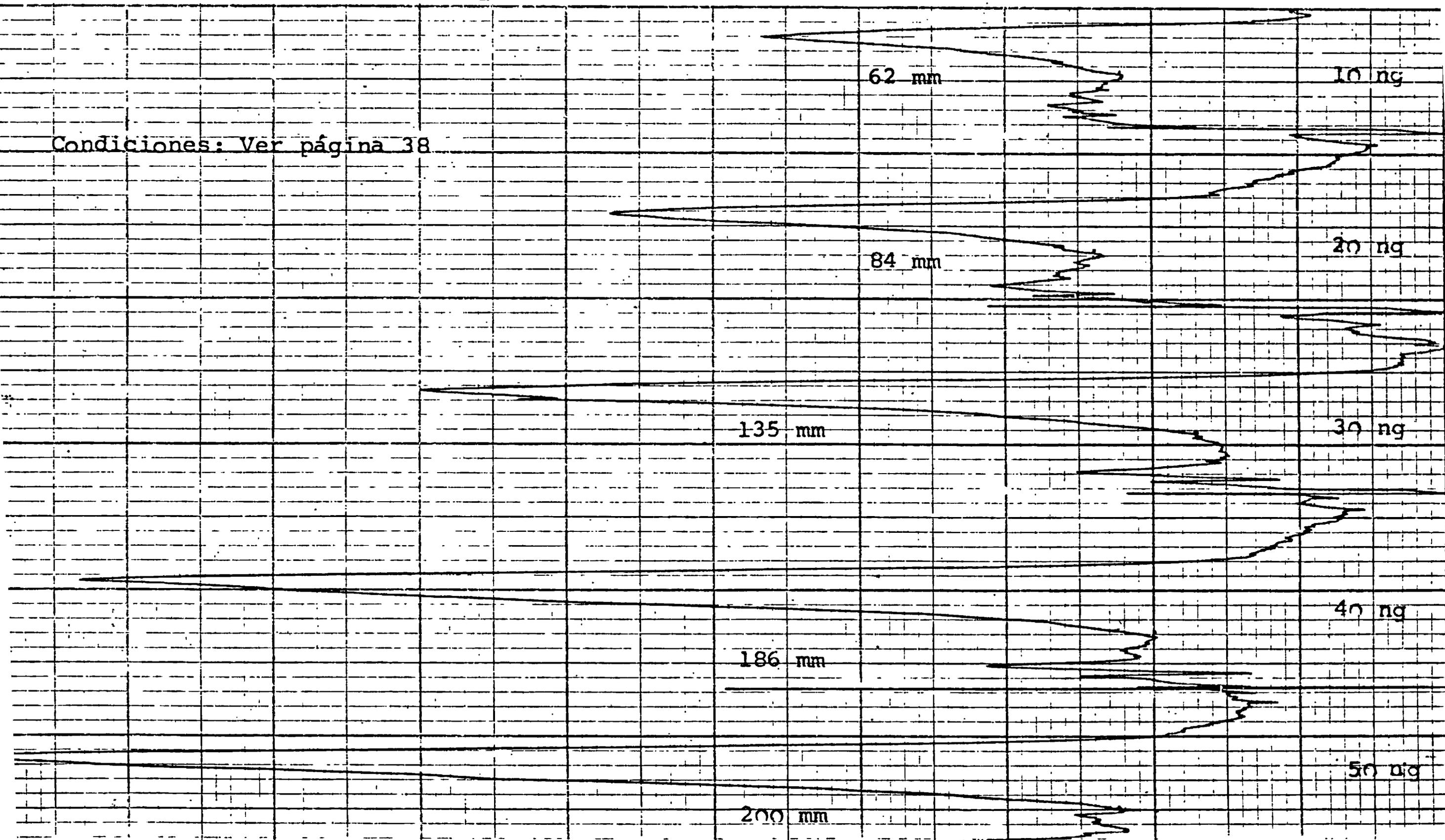
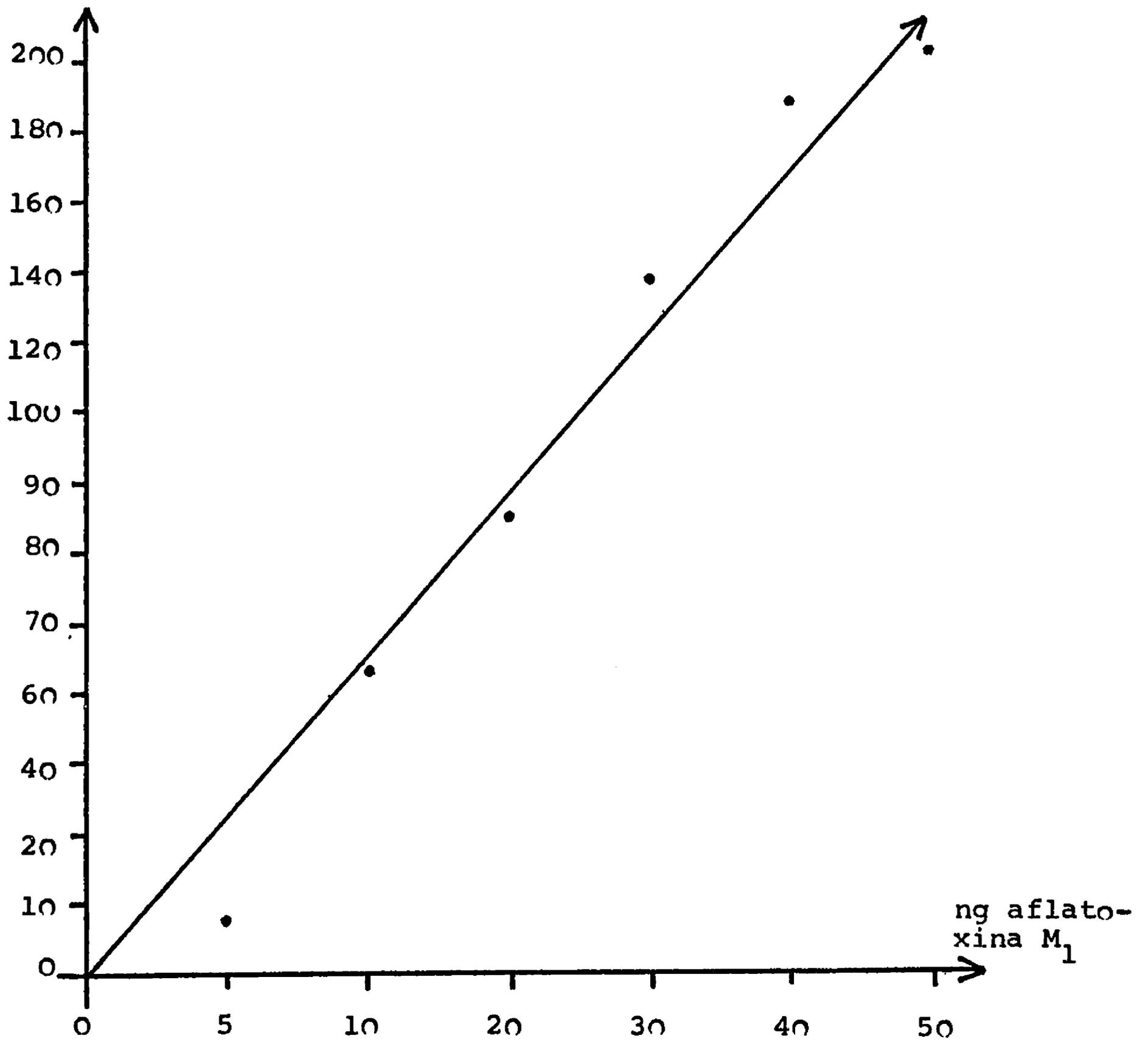
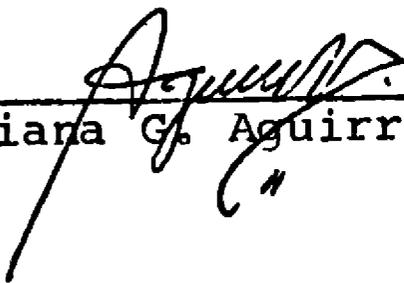


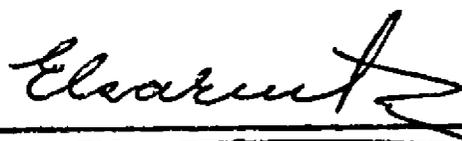
Figura No. 4AFLATOXINA M₁ CON CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESIONCURVA ESTANDAR

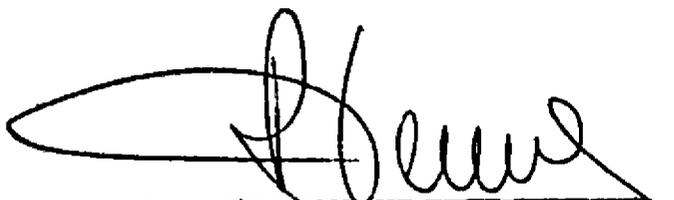
Altura de pico mm

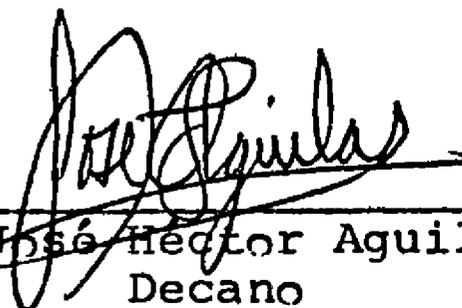



Br. Liana G. Aguirre V.

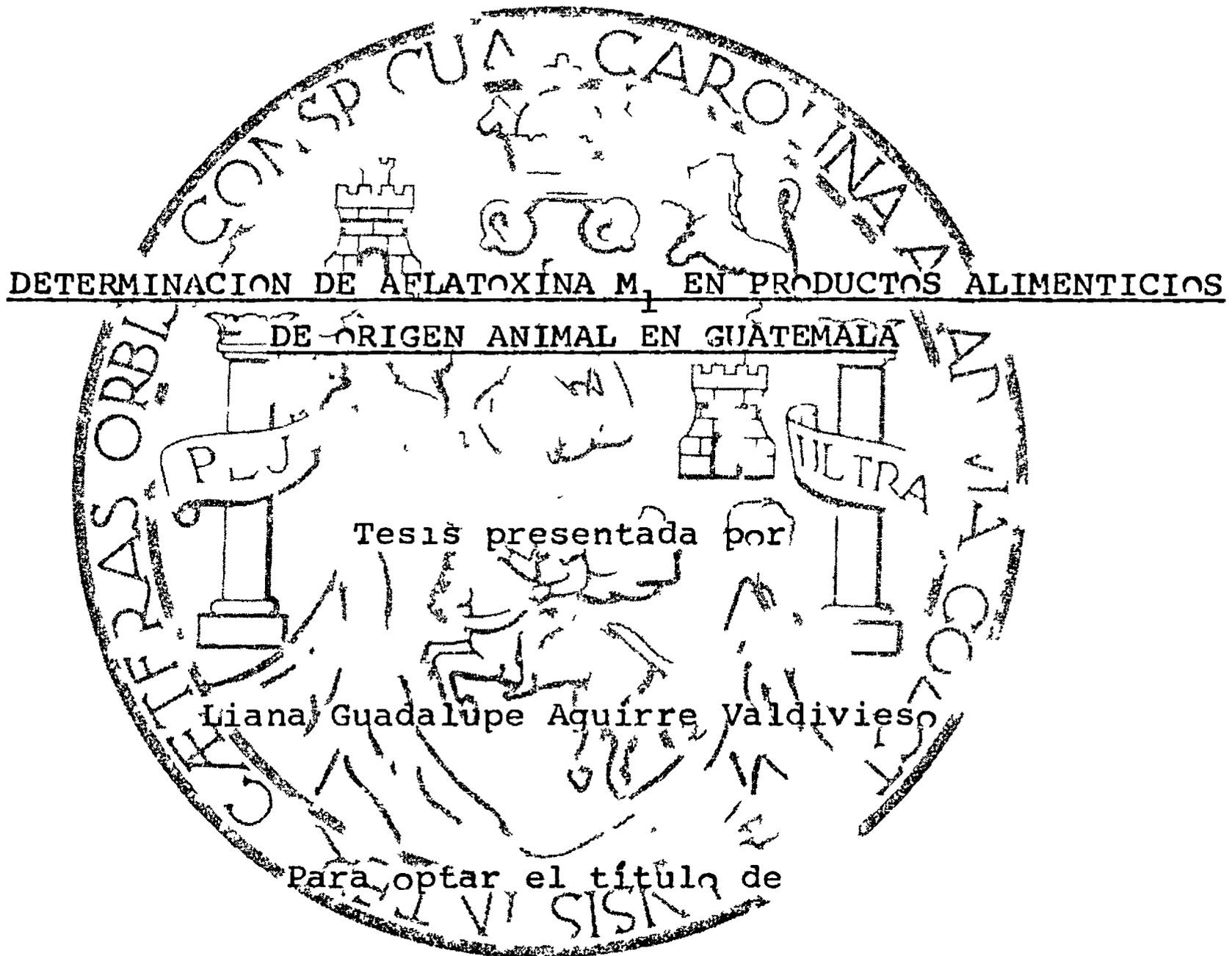

Ing. Marit J. de Campos
Asesor


Lie. Elsa de Reyes
Asesor


Lic. Rodrigo Herrera
Director de Escuela


Dr. José Héctor Aguilar
Decano

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



QUIMICO FARMACEUTICO