

METODO SIMPLIFICADO PARA EL ANALISIS DE AFLATOXINAS EN MAIZ BLANCO

Fausto Camacho**
Miguel Mora**

RESUMEN

Se desarrolló y probó un método para la determinación de aflatoxinas en maíz blanco (*Zea mays*), al que se le llamó método simplificado (MS). Sus principales variantes son el uso de muestras pequeñas y de una forma fácil de filtración y purificación de los extractos.

Para la prueba del MS se hicieron determinaciones de aflatoxinas en muestras de maíz con niveles de contaminación de 0, 75, 150 y 350 ng/g de aflatoxinas aproximadamente. Para cada nivel de contaminación se usaron pesos de muestra de 12,5; 25 y 50 g.

La extracción de aflatoxinas se realizó según los métodos MS y CBM. En este último se combinan la forma de extracción utilizada en el método CB y la purificación y obtención de los extractos según el método MS. Además se usó el método CB como control.

Posterior a la extracción y purificación de los extractos se procedió a la cuantificación de aflatoxinas mediante el uso de minicolumnas de cromatografía, realizándose las lecturas respectivas en un fluorotóxico NEOTEC.

El análisis estadístico de los resultados del trabajo no mostró diferencias significativas entre los diferentes pesos de muestra, ni entre los dos métodos empleados para la extracción (MS y CBM) ni entre el método CB (control). Por lo tanto este nuevo método simplificado (MS) puede ser utilizado con muestras pequeñas de maíz para análisis de aflatoxinas, consiguiéndose con él resultados similares a

los obtenidos con el método CB, pero en una forma más fácil, más rápida y a un costo menor que con éste y otros métodos similares.

INTRODUCCION

En Costa Rica la mayor parte de la cosecha de maíz (*Zea mays*) se produce en la zona tropical húmeda, en donde existen condiciones óptimas de humedad y temperatura para el desarrollo de hongos del grupo de *Aspergillus flavus*. Esto, ligado a un manejo inadecuado del grano después de la cosecha, trae como consecuencia un alto grado de contaminación por aflatoxinas, lo que ya ha sido confirmado en experiencias anteriores en el CIGRAS (UCR) y otros laboratorios en el país.

La persistencia del problema de contaminación del maíz ha obligado a realizar, en nuestro país, análisis de aflatoxinas en forma rutinaria. Los métodos adoptados para realizar estos análisis, a pesar de ser los que ofrecen más ventajas por su simplicidad de uso, grado de confianza en los resultados obtenidos y facilidades disponibles en el país, siguen siendo caros y no son muy prácticos cuando se necesita realizar un número grande de análisis en forma rutinaria.

El objetivo de este trabajo fue entonces la formulación y evaluación de una metodología simple y económica para el análisis de aflatoxinas en maíz, utilizando para este propósito un tamaño menor de muestra que la utilizada en el método CB y una forma diferente de preparación y purificación de la muestra, que facilite el filtrado y la ejecución del análisis en general.

* Parte de la tesis para obtener el grado de Licenciado en Fitotecnia, Agronomía, UCR, del primer autor.

** Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. El segundo autor es beneficiario del programa de apoyo a investigadores que patrocina el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) Costa Rica

MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se realizó en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica.

En la búsqueda de una metodología más simple para realizar análisis de aflatoxinas en maíz, luego de una serie preliminar de pruebas, se observó la conveniencia de usar muestras pequeñas. Con los resultados de esas pruebas y partiendo de una muestra finamente molida (20 mesh), se integró el Método Simplificado (MS) descrito seguidamente paso por paso.

Método simplificado (MS)

1. Tomar una muestra representativa del lote que se va a analizar, molerla en un molino equipado con una criba Nº 20 (20 mesh) y homogenizarla adecuadamente.
2. Tomar una submuestra de 15 g y colocarla en un erlenmeyer de 125 ml.
3. Adicionar a la muestra 12,5 ml de una solución de agua-etanol-sulfato de amonio en una relación de (100:50:15, ml/ml/g).
4. Adicionarle a la muestra 75 ml de cloroformo.
5. Tapar el erlenmeyer con un tapón de hule forrado con plástico.
6. Agitar fuertemente durante 30 minutos en un agitador Burrel o equivalente.
7. Filtrar en papel Whatman Nº 4 de 15 cm o equivalente.
8. Tomar 50 ml de filtrado y evaporarlo hasta sequedad por medio de una plantilla con temperatura graduable, evaporador rotativo o con nitrógeno.
9. Disolver los residuos del extracto evaporado con 10 ml de metanol-hexano (2:1).
10. Agregar a los residuos disueltos 20 ml de gel férrico, transvasar a un erlenmeyer de 50 ml y agitar durante un minuto. El gel férrico se prepara de la siguiente forma: a 1 litro de agua destilada se le agregan 100 ml de solución de cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) al 15% y aproximadamente 150 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 4% y se ajusta el pH entre 4,6 y 4,8.
11. Filtrar con papel filtro Whatman Nº 4 de 12 cm; recoger 15 ml de filtrado en un tubo de ensayo de 20 x 150 mm con tapa de bakelita, o en un vial de 25 ml de capacidad.

12. Agregar al filtrado 3 ml de cloroformo, tapar el tubo, poniendo un plástico a la tapa y agitar durante un minuto.
13. La estimación del contenido de aflatoxinas se puede realizar por alguno de los métodos conocidos para este fin, como la cromatografía de capa fina o, tal como se hizo en este trabajo, con columnas de cromatografía donde las lecturas se realizaron mediante un fluorotóximetro NEOTEC según recomienda Velasco (1984). Para utilizar el método de columnas de cromatografía según Velasco (1984) se agrega 1 ml de extracto de cloroformo (capa inferior del tubo). Una vez drenada la columna se le agrega 1 ml de cloroformo-metanol (96:4).
14. El contenido de aflatoxinas estimado con el fluorotóximetro NEOTEC se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ng/g de aflatoxina} = L \times D \times 1,4$$

en donde:

L = lectura del fluorotóximetro NEOTEC

D = factor de dilución del extracto final

1,4 = factor resultante de otros aspectos del método.

Para determinar y cuantificar las aflatoxinas por cromatografía de capa fina se toma 1 ml del extracto final, se trasvasa a un vial de 10 ml de capacidad y se evapora, luego se redisuelve con 0,2 ml de benceno acetonitrilo 98:2. Las placas de cromatografía se preparan, revelan y se hacen las estimaciones según recomienda la AOAC (1984).

Muestras

Para probar esta metodología se seleccionaron cuatro muestras de maíz blanco de 5 kg cada una. Una de estas muestras no estaba contaminada, mientras que las otras se habían contaminado en forma natural con niveles de aflatoxina de 65, 150 y 350 ng/g aproximadamente. Las muestras se molieron en un molino de martillos, equipado con una criba Nº 20 (20 mesh), después se homogenizaron para luego proceder a la toma y análisis de submuestras.

Se partió de la premisa de que si se usa una muestra finamente molida y bien homogenizada para análisis de aflatoxinas, las muestras pequeñas

deberían de comportarse en forma similar a muestras de mayor peso. Para comprobar esta hipótesis se ejecutó este ensayo utilizando siete métodos de análisis (tratamiento) dispuestos en un diseño completamente al azar. Se hicieron cinco repeticiones por tratamiento. Estos tratamientos surgen al usar dos métodos diferentes para la obtención de los extractos (el Método MS y el CBM, este último es una combinación que usa la extracción utilizada por el método CB y la purificación y obtención de los extractos del MS), con tres pesos de muestra (12,5; 25 y 50 g). El séptimo tratamiento es el método CB, aprobado por la AOAC (1984), que fue utilizado como control.

Extracción

En el Cuadro No. 1 se presenta la información sobre los siete tratamientos y la forma en que se

prepararon las muestras para la extracción. El tamaño de la cristalería, así como la cantidad de reactivos usados en cada tratamiento van en relación con el peso de muestra empleado. Los reactivos fueron adicionados a cada tratamiento en el orden presentado en este cuadro.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro No. 2 se presenta el comportamiento de los siete tratamientos empleados en esta investigación en cuanto a cantidad de aflatoxina extraída, la cual es expresada como porcentaje con respecto a los valores obtenidos con el método CB que es el control. A este valor porcentual se le llama aquí **valor de recuperación de aflatoxinas**. En este cuadro se manifiesta que los tratamientos realizados con el método MS se comportaron igual que los

CUADRO No. 1. Tratamientos empleados en muestras de maíz blanco con niveles de contaminación de aflatoxinas de 0, 75, 150 y 350 ng/g

Tratamiento	Tipo de cristalería	Peso de muestra (g)	Cantidad de reactivos y de solvente agregados, a cada tratamiento
1 CBM ¹ -1	Erlenmeyer de 125 ml	12,5	6,25 ml de agua destilada, 6,25 g de diatomita más 62,5 ml de cloroformo
2 CBM-2	Erlenmeyer de 250 ml	25	12,5 ml de agua destilada, 12,5 g de diatomita más 125 ml de cloroformo
3 CBM-3	Erlenmeyer de 500 ml	50	25 ml de agua destilada, 25 g de diatomita más 250 ml de cloroformo
4 MS-1	Erlenmeyer de 125 ml	12,5	10 ml de reactivo No. 1 ² y 62,5 ml de cloroformo
5 MS-2	Erlenmeyer de 250 ml	25	20 ml de reactivo No. 1 y 125 ml de cloroformo
6 MS-3	Erlenmeyer de 500 ml	50	40 ml de reactivo No. 1 y 250 ml de cloroformo
7 CB	Erlenmeyer de 500 ml	50	25 ml de agua destilada, 25 g de diatomita más 250 ml de cloroformo

1 Con extracción según CB y purificación según MS.

2 Reactivo No. 1: agua-etanol-sulfato de amonio (100:50:15, ml/ml/g).

realizados con el CBM y el CB en cuanto a recuperación de aflatoxinas, lo que se confirmó en el análisis estadístico donde no se encontró diferencia significativa.

Otro aspecto que se manifiesta en el Cuadro No. 2 es que los diferentes pesos de muestra utilizados fueron igualmente efectivos al recuperar cantidades similares de aflatoxinas con la ventaja de las muestras más pequeñas de 12,5 g que utilizan solamente un 25% del solvente con respecto a las muestras grandes.

El método CBM es una combinación del método CB y del MS, en el que se utiliza el principio de extracción empleado por el método CB y la purificación de los extractos del MS. Al haber un comportamiento similar de ambos métodos indica que el principio de extracción empleado por el método MS es igualmente efectivo que el empleado por el método CB. A la vez indica que en el procedimiento de limpieza utilizado por el MS y el CBM no se pierde aflatoxina, ya que se recuperaron porcentajes similares a los obtenidos con el CB.

El método MS presenta dos aspectos favorables con respecto al CB:

1. El tratamiento dado a la muestra en el MS permite filtrar con mucha facilidad, lo que se dificulta un poco con el CB,
2. El método MS permite recuperar cantidades mayores de solvente (86%) en relación con el CB (68%).

La recuperación de la mayor parte del solvente es importante cuando se utilizan muestras pequeñas. En

el caso del método MS, en una muestra de 12,5 g donde se usan 62,5 ml de cloroformo se logra recuperar más de 50 ml de filtrado para proseguir el análisis con una cantidad de solvente igual a la que se usa en el método CB (50 ml de solvente filtrado).

El segundo aspecto favorable del método MS con respecto al CB es la forma de purificación de los extractos. El método CB emplea para este propósito una columna de cromatografía, donde se utilizan 50 ml de extracto crudo (sin purificar) que son purificados con 150 ml de éter y 150 ml de hexano. Para recuperar las aflatoxinas de la columna de cromatografía, se utilizan 150 ml de cloroformo, que deben ser evaporados para reducir el volumen de extracto que se quiere analizar. Esto hace que la purificación de los extractos empleada por el método CB, resulte lenta y de mucho mayor costo que el MS.

La purificación empleada por el método MS es muy simple. En este caso también se utilizan 50 ml de extracto crudo (filtrado sin purificar) que es evaporado y luego los residuos son disueltos en 10 ml de metanol-hexano 2:1 para disolver los residuos que quedaron al evaporar los 50 ml de cloroformo. A esa solución de metanol-hexano (con los residuos disueltos) se le adicionan 20 ml de gel férrico, que hace una purificación muy eficiente. Al filtrar ese gel férrico queda una solución de agua-metanol 75:25 muy purificada, donde las aflatoxinas son extraídas de esa fase acuosa con 3 ml de cloroformo por un proceso denominado partición líquida-líquida que se

CUADRO No. 2. Comportamiento de diferentes tratamientos en cuanto a recuperación de aflatoxinas en muestras de maíz con diferente grado de contaminación

Tratamiento	Método	Peso de muestra g	Volumen de solvente ml	Nº de muestras	Recuperación de aflatoxinas %
1	CBM ¹ -1	12,5	62,5	15	99 ± 13 ^{ns}
2	CBM-2	25	125	15	106 ± 19 ^{ns}
3	CBM-3	50	250	15	105 ± 12 ^{ns}
4	MS-1	12,5	62,5	15	106 ± 15 ^{ns}
5	MS-2	25	125	15	102 ± 14 ^{ns}
6	MS-3	50	250	15	98 ± 10 ^{ns}
7	CB	50	250	15	100 ± 12 ^{ns}

ns: No hay diferencias significativas ($P \leq 0,05$)

CBM¹: Con extracción según CB y con purificación según MS

basa en la afinidad de las aflatoxinas al cloroformo, por lo que se trasladan de la fase acuosa (metanol-agua) a la orgánica (cloroformo), que es el extracto que está listo para analizar por columnas de cromatografía, o por cromatografía de capa fina. Con este procedimiento de limpieza se obtienen extractos con un grado de purificación mayor al logrado por el método CB, los cuales son más favorables para evaluar con minicolumnas, ya que al ser muy purificados causan muy poca interferencia en la lectura. Lo mismo sucede en placas de cromato-

grafía de capa fina donde se obtienen separaciones con poca interferencia por impurezas.

En párrafos anteriores se discutió que el método MS tiene ventajas de ejecución sobre el CB, dando resultados similares a éste y a otros métodos empleados para este fin. En el Cuadro No. 3 se comparan varios aspectos generales de los métodos CB, Velasco y MS. Entre las características que se señalan en este cuadro se destacan el menor volumen de solvente utilizado por el método MS, así como la pequeña cantidad de reactivos que se

CUADRO No. 3. Comparación de tres métodos para análisis de aflatoxinas en maíz blanco

Tópico	CB	Velasco	Método simplificado (MS)
Extracción con	250 ml de cloroformo	250 ml de acetona-agua (85:15)	75 ml de cloroformo
Purificación	Con columna de cromatografía 150 ml de éter 150 ml de hexano	Con 125 ml de gel férrico	Con 20 ml de gel férrico
Recuperación de aflatoxinas	Con 150 ml de cloroformo: metanol (97:3)	En embudo separador de 500 ml con 50 ml de cloroformo	En tubo de ensayo de 20 x 150 mm con 3 ml de cloroformo
Volumen de solvente a evaporar	150 ml de cloroformo	50 ml de cloroformo	50 ml de cloroformo
Grado de purificación de extractos	Con impurezas color ámbar claro	Con impurezas color ámbar claro	Con poca impureza cristalino
Tiempo de ejecución para una muestra	3 horas	1,5 horas	1 hora
Facilidad de ejecución	Muy laborioso	Más simple que el CB	Más simple que el de Velasco
Recuperación de aflatoxinas	Buena	Similar al CB	Similar al CB
Número de muestras que se pueden correr a la vez por una persona	5 muestras	10 muestras	15 muestras
Determinación de aflatoxinas	Cromatografía de capa fina	Por minicolumnas de cromatografía y por CCF	Por minicolumnas de cromatografía y por CCF
Costo por muestra con respecto al CB	100%	60%	20%

utilizan para realizar una limpieza muy eficiente, en donde se obtienen extractos de mayor pureza que los obtenidos por otros métodos.

Otro aspecto muy importante es que el método MS es más fácil de ejecutar, lo que permite realizar más muestras a la vez, o en menor tiempo y con cristalería de menor tamaño. En el aspecto económico el método MS resulta mucho más favorable, ya que cuesta aproximadamente un 20% con respecto al CB y un 30% con respecto al de Velasco.

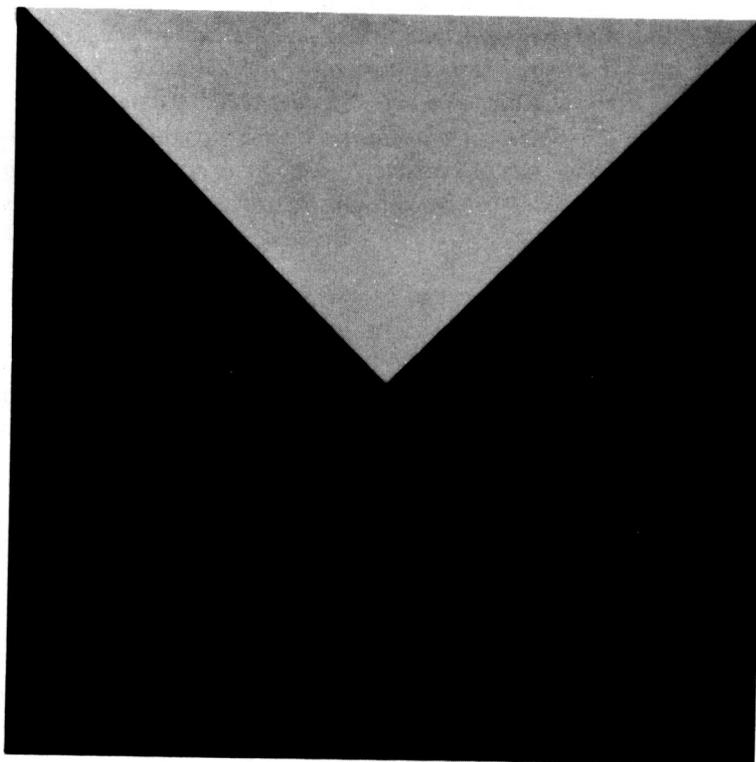
Después de comprobar que el método MS presenta características tan favorables con respecto a los otros probados como exactitud, facilidad de ejecución y menor costo, se recomienda utilizar este método con un peso de muestra de 15 g, con 75 ml de cloroformo para realizar la extracción, ya que así

se asegura recoger un volumen de filtrado mayor de 50 ml que es lo más recomendado para seguir el procedimiento MS descrito en este trabajo.

LITERATURA CITADA

Association of Official Analytical Chemists. **Natural Poisons, Official Methods of Analysis**. 14 ed. Arlington (EE.UU.) Association Official of Analytical Chemists (EE.UU.) 1984. pp. 477-495.

Velasco, J. *Fluorometric measurement of aflatoxin adsorbed on florasil in minicolumns*. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists** (EE.UU) 58:757-763. 1975.



Revista MODULO
 Suscripciones
 Apdo. 159-7050
 Cartago, Costa Rica
 América Central

Suscribase

REVISTA TRIMESTRAL DE DISEÑO INDUSTRIAL

