
COMPARACION DE CUATRO METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MAIZ.

*Juan Carlos Medina, Javier Lara y Joel Muñoz

NUTEK, S.A. DE C.V.

7 Norte 416. Tehuacán, Pue. México

E mail: gpoidisa@acnet.net

INTRODUCCION:

La contaminación con micotoxinas es un problema de graves consecuencias económicas para los productores pecuarios, por ejemplo la industria pecuaria del Estado de Carolina del Norte, reportó una pérdida de 32,000 USD, en 1992, siendo los porcicultores severamente afectados (1). Por lo tanto una de las principales herramientas para enfrentar este problema es la realización de contratos de adquisición de granos, en que se especifiquen los niveles máximos de contaminación con micotoxinas, y por supuesto, la comprobación de dichos parámetros. Sin embargo, la realización de los ensayos de micotoxinas representa, a la fecha, una serie de problemas, siendo la elección del método analítico uno de los principales. Con el objeto de establecer un método analítico oficial, para la determinación de aflatoxinas, en nuestro país, se presenta la información que reporta la Oficina de Servicios Técnicos del Departamento de Inspección de Granos (GIPSA), del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) de sus programas de pruebas (check sample) (6). Se evaluaron 3 métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas. Estos ensayos fueron realizados, por duplicado, en las 60 oficinas autorizadas, cabe mencionar que participaron todos los laboratorios que evalúan los granos de exportación hacia México y el resto del mundo.

OBJETIVO

Realizar un estudio comparativo sobre la concentración de aflatoxinas, reportadas en muestras de maíz de concentración conocida, correspondiente a tres de los ensayos del programa de aseguramiento de calidad, realizada por el GIPSA. En este trabajo se considera como método de referencia el HPLC (994.08 AOAC International) y se evalúan los procedimientos de detección, por fluorescencia con columna de inmovilización (V), con un sistema de purificación en fase sólida (R) y una técnica ELISA comercial (N).

MATERIAL Y METODOS

Las muestras de maíz, con aflatoxinas a las concentraciones de 35 ppb (Junio 98), 50 ppb (Agosto de 98) y 40 ppb (Noviembre de 98), fueron repartidas a los 60 laboratorios participantes. Cada laboratorio eligió el método de análisis; 26 seleccionaron el método fluorométrico con columna de inmovilización (V), 6 utilizaron el método fluorométrico con columna de purificación en fase sólida (R) y el resto utilizó un procedimiento ELISA comercial (N). No todos los laboratorios entregaron sus resultados en la fecha límite. Todos los ensayos se efectuaron por duplicado. Como referencia se utilizó el método oficial por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (994.08 AOAC International).

RESULTADOS:

En las siguientes tablas se describen los resultados de los diferentes experimentos: las tablas identificadas como referencia corresponden a los resultados obtenidos en el laboratorio central.

COMPARACION DE CUATRO METODOS ANALITICOS
PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MAIZ

Juan Carlos Medina, Javier Lora y José Muñoz

Ensayos de referencia, Junio de 1998: Valor teórico 35 ppb

Método	Promedio	% Recuperación	% C V	
HPLC	33.50 pp	95.7	7.6	
Fluorométrico V	27.25 ppb	77.9	28.4	
Fluorométrico R	30.00 ppb	85.7	1.7	
ELISA	N	50.25 ppb	143.6	3.5

Resultados reportados por los laboratorios participantes, Junio de 1998.

Método	Promedio	% Recuperación	% C V	Labs.	Rango ppb
Fluorométrico V	27.70 ppb	79.1	18.5	22	46 - 15
Fluorométrico R	23.67 ppb	67.6	35.4	4	47 - 10
ELISA N	43.93 ppb	125.5	22.0	22	77 - 23

Ensayos de referencia, Agosto de 1998: Valor teórico 50 ppb

Método	Promedio	% Recuperación	% CV
HPLC	48.43	96.9	2.7
Fluorométrico V	28.25	56.5	0.4
Fluorométrico R	33.50	67.0	0.0
ELISAN	52.25	104.5	18.7

Resultados reportados por los laboratorios participantes, Agosto de 1998.

Método	Promedio	% Recuperación	% CV	Labs.	Rango ppb
Fluorométrico V	35.38 ppb	70.8	25.2	24	64 - 17
Fluorométrico R	28.67 ppb	57.3	26.5	5	39 - 15
ELISA N	45.69 ppb	91.4	21.2	23	74 - 21

Ensayos de referencia, Noviembre de 1998, Valor teórico 40 ppb

Método	Promedio	% Recuperación	% CV
HPLC	39.75 ppb	99.4	20.8

Resultados reportados por los laboratorios participantes, Noviembre de 1998

Método	Promedio	% Recuperación	% C.V	Labs.	Rango
Fluorométrico V	30.66	76.7	45.9	25	67 - 8
Fluorométrico R	38.58	96.5	42.7	6	77 - 14
ELISA N	46.23			22	80 - 21

DISCUSION:

La variación analítica que se presenta en los ensayos analíticos de micotoxinas ha sido estudiada y reportada por el AOAC International. En 1982 Horwitz reportó que el coeficiente de variación (% CV) es función de la concentración del analito y no del método utilizado, y se expresa mediante la siguiente ecuación: $CV (\%) = 2 C^{-0.1505}$, donde la concentración se expresa como potencia de 10, por ejemplo ppb es igual a 10^{-9} . De modo tal que el CV esperado para concentraciones de 10 ppb es del 32 % (2).

Recientemente Lara et al., 1999 (2), presentó un estudio de la variación analítica en la determinación de aflatoxinas, en la que se estudiaron los resultados de dos métodos analíticos.

Otro criterio a considerar es el porcentaje de recuperación de aflatoxinas, se ha reportado que la mezcla de metanol-agua, que se utiliza en todos los métodos rápidos, no logra extraer el total de las aflatoxinas (4,5), por lo que también se aplicará este criterio para evaluar los procedimientos analíticos.

Evaluación experimento de Junio de 1998. % CV máximo: 26.5 (35 ppb de aflatoxinas)

Método	Comparación	% CV	Interpretación	% Recuperación	
Fluorométrico V	18.5 <	26.5	Aceptado	79.1	
Fluorométrico R	35.4 >	26.5	Rechazado	67.6	
ELISA	N	22.0	<26.5	Aceptado	125.5

Evaluación experimento de Agosto de 1998. % CV máximo: 25.1 (50 ppb de aflatoxinas)

Método	Comparación	% CV	Interpretación	% Recuperación	
Fluorométrico V	25.2 >	25.1	Rechazado	70.8	
Fluorométrico R	26.5 >	25.1	Rechazado	57.3	
ELISA	N	21.2 <	25.1	Aceptado	91.4

Evaluación experimento de Noviembre de 1998. % CV máximo: 26.0 (40 ppb de aflatoxinas).

Método	Comparación	% CV	Interpretación	% Recuperación	
Fluorométrico V	45.9 >	26.0	Rechazado	70.8	
Fluorométrico R	42.7 >	26.0	Rechazado	57.3	
ELISA	N	35.6 <	26.0	Rechazado	91.4

CONCLUSION:

El USDA continua considerando el procedimiento 994.08 del AOAC International como método de referencia para el análisis de aflatoxinas. Utiliza como procedimiento de análisis para exportación de granos un sistema ELISA, cuyos resultados de evaluación se presentan en este reporte. El sistema ELISA considerado, no es comúnmente utilizado en nuestro país, las muestras se analizan una a una, por duplicado, y sólo se utiliza el estándar de referencia de 20 ppb. Los resultados se calculan con base en la información que se presenta en cada caja de este sistema, en que se manifiestan los valores de absorbancia del resto de los estándares para ese lote, en particular.

También se observa que los procedimientos fluorométricos tienden a subvalorar la concentración de aflatoxinas, por el tipo de extractante empleado, esto ha sido reportado con anterioridad (4,5). En el sistema ELISA ensayado, probablemente se efectuó una

modificación de los estándares, por que sus resultados de recuperación son mayores a los esperados, considerando que se utiliza el mismo extractante.

Nuestro laboratorio ha propuesto en diferentes foros, entre ellos CONASA (Consejo Nacional de Sanidad Animal) que se acepte el método AOAC Internacional 994.08, como el procedimiento oficial para certificación de la concentración de aflatoxinas en granos importados. En este laboratorio se utiliza este procedimiento desde hace varios años (3). De los resultados obtenidos con los métodos rápidos se concluyen que son una herramienta adecuada para obtener una información aproximada de la concentración de aflatoxinas y que se requiere de la utilización de un método oficial para realizar las reclamaciones convenientes, cuando un proveedor no cumple con la concentración de aflatoxinas especificada en el contrato de compra.

BIBLIOGRAFIA:

1. Hagler Wiston. 1999. Effects of Mycotoxins in Livestock Feed and Forage. Simposio Sobre Micotoxinas em Graos. Ponta Grossa, PR. Brasil.
2. Lara Javier, Rubén Pérez, Alicia Bringas, Joel Muñoz y Juan Carlos Medina. 1999. Variación Analítica en la Determinación de Aflatoxinas. XXIV Convención Anual ANECA. León, Gto.
3. Medina J.C., Castillo E., Muñoz J., Romero M. 1994. Problemas en la Cuantificación de Micotoxinas y Niveles de Contaminación en México. Proyecto Aquilla II. Documento de Campo No. 16. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
4. Medina J.C., Romero M. y Muñoz J. 1996. Cuantificación de aflatoxinas en maíz: Variabilidad asociada al tamaño de la muestra y a la composición del extractante. XXXI Congreso AMVEC. Veracruz, Ver.
5. Romer Tom and Wilson T. 1990. Mycotoxin Assay in Feeds: Molds, Mycotoxins and Feed Preservatives in the Feed Industry. A BASF Reference Manual.
6. USDA-GIPSA.1998 Check Samples Dates for Aflatoxin in Grain.