



**AFLATOXINAS EN ALIMENTOS:
SU DETECCION Y CUANTIFICACION POR
METODOS FISICOQUIMICOS**

**POR
L.C.O. KARIM ACUÑA ASKAR**

**TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA**

MONTERREY, N.L., MEXICO AGOSTO DE 1991

TM

Z6658

FM

1991

A2



1020071193

**AFLATOXINAS EN ALIMENTOS :
SU DETECCION Y CUANTIFICACION POR
METODOS FISICOQUIMICOS.**

POR

L.C.Q. KARIM ACUÑA ASKAR

**TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA**

MONTERREY, N.L., MEXICO AGOSTO DE 1991

TM
26658
FM
1991
A2



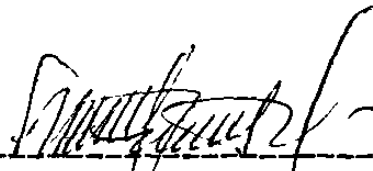
FONDO TESIS
163669

EL COMITE DE TESIS:



DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

PRESIDENTE



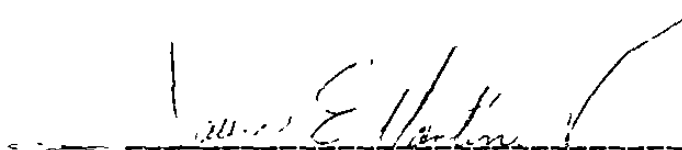
DR. MANUEL RODRIGUEZ QUINTANILLA

PRIMER VOCAL



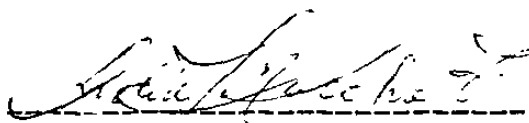
G.C.B. Ma. CARMEN MONTEMAYOR GAYTAN

SEGUNDO VOCAL



M.C. LAURA E. MARTÍNEZ VILLARREAL

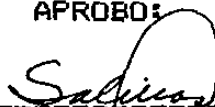
TERCER VOCAL



M.C. LIDIA R. NACCHA TORRES

SECRETARIO

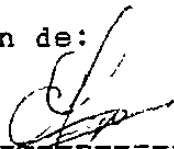
APROBO:



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA

SRIO. ACADEMICO DE AREA BASICA, SUBDIRECCION DE INVESTIGACION
Y ESTUDIOS DE POST-GRADO, FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

El presente trabajo se llevó a cabo
en el Laboratorio de Micotoxinas
del Departamento de Química Analítica
de la Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Nuevo León,
bajo la dirección de:



DR. MANAHÉN FERNÁNDEZ ALONSO
JEFE DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA.

" Semejante es al hombre que al edificar una casa,
cavò y ahondò y puso el fundamento sobre la roca;
y cuando vino una inundaciòn el rio dio con impetu
contra aquella casa, pero no la pudo mover, porque
estaba fundada sobre la roca "

Jesùs

(Lucas, 6: 48)

A mis padres:

Lic. Carlos Acuña Nuding y Sra. Herlinda Askar de Acuña, quienes han sido para mí fuente inagotable de estímulo y que gracias a su infinito apoyo, la consecución de un arduo esfuerzo una vez más fructificò.

Con amor y gratitud.

A mis hermanos:

Lissilette, Carlos, Hapssi, Antonio y Jorge, por su ilimitada disposición en brindarme su apoyo.

A mis tíos:

Sr. Alfredo Nacoud Askar y Sra. Loriz Askar de Nacoud,
quienes siempre han estado atentos de mi formación en
Monterrey.

Al Dr. Alfredo Nacoud Askar, alguien valioso con quien contar.

A mi asesor:

Dr. Manahèn Fernández Alonso, quien a través de su visionaria y dinámica estrategia de Dirección, la meta de esta investigación llegó a ser una realidad.

Por la trascendencia de sus enseñanzas.

Con aprecio y gratitud.

A mis sinodales:

Por su ilimitada disposición de proveerme los medios necesarios en la búsqueda por la superación académica.

A mis maestros:

Por la nobleza que envuelve su labor socrática.

A mis alumnos.

Por ser participes del ilustre proceso de enseñanza.

A mis compañeros y amigos.

Por su apoyo al enfrentar los retos.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación difícilmente podría haberse realizado sin la ayuda sostenida de mucha gente.

Agradezco al cuerpo de sinodales la revisión del manuscrito y las valiosas sugerencias que me hicieron a fin de llevar a cabo lo más perfectamente posible el presente trabajo.

Por sus sabios consejos debo expresar mi agradecimiento al M.C. Humberto Garza Ulloa, director general de INDEQUIM, cuya instrucción me ayudó a comprender mejor muchos de los fenómenos cromatográficos involucrados, lo cual me fue útil en la toma de decisiones.

Dentro de la enorme gama de posibilidades para abordar un problema, es de esperarse la existencia de la mejor opción para hacerlo. Sea patente mi gratitud al Dr. Thomas B. Whitaker del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en la Universidad Estatal de Carolina del Norte por haberme orientado a elegir las óptimas condiciones para la extracción de aflatoxinas a partir de cacahuates; igualmente por ilustrarme con minucioso detalle sobre la dependencia de la variabilidad en función del tamaño seleccionado de muestra.

Agradezco al Dr. Leonard S. Stoloff su valiosa ayuda brindada a través del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos.

Estoy agradecido con el Dr. Julio Martínez Burnes de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas por el apoyo que recibí cuando acepté su invitación para exponer en su entidad las metodologías de análisis que en ese tiempo estaba desarrollando. Igualmente con el Dr. René Rosiles Martínez de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM por su interés en cooperar abiertamente con nuestros laboratorios. Asimismo, con el personal de la UNAM por las atenciones que me proporcionó durante mi estancia allí.

Expreso mi agradecimiento a la Biól. Carmen Borrego López de la Universidad Autónoma de Coahuila por haberme proporcionado valiosa literatura sobre micotoxinas que yo desconocía. Igualmente por su franco interés en colaborar con nuestra investigación.

Deseo dar las gracias al personal del Centro Internacional para el Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT) en El Batán Texcoco, Edo. de México que amablemente me atendió durante mi visita.

Muchas dificultades fueron superadas gracias a la generosidad de la M.C. Graciela García de la Facultad de Biología de la UANL, quien me concedió la oportunidad de trabajar en sus laboratorios y de esta manera sacar adelante lo que parecía imposible.

Los altos costos de operación que demanda la técnica de HPLC fueron aventajados gracias al decisivo apoyo que dió al área de investigación la maestra Q.C.B. Esperanza Torres de Navarro, Jefe del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL, a quien expreso mi gratitud por haberme proporcionado los medios económicos necesarios. Igualmente por su comprensión y paciencia ante mi incesante insistencia. De la misma manera agradezco al Q.C.B. Lorenzo Heyer Rodríguez del Departamento de Química Analítica, quien atendió la totalidad del Servicio Externo de Análisis y que con su esmerado empeño produjo más de los recursos suficientes.

Infinito agradecimiento a la Dra. Graciela López de Garza, Subdirector de Pre-Grado de la Facultad de Medicina de la UANL por permitirme disponer de los servicios de información y comunicación de telefax.

Mi gratitud a la Lic. Georgina Arteaga, directora de la biblioteca de nuestra Facultad por su abierta disposición de proveerme la más actualizada bibliografía. De la misma manera al dinámico grupo del Centro Regional de Información y Documentación en Salud (CRIDS) que me facilitó toda información de manera oportuna.

Debo agradecer la colaboración de las Q.C.B. Rosa Nelly Arroyo Díaz y Thelma Avila Rodríguez quienes participaron en el comienzo de esta investigación y que mostraron una inagotable paciencia ante la minuciosa práctica que impone la búsqueda de la precisión y exactitud.

Deseo expresar mi agradecimiento a la Q.C.B. María de la Luz Salazar Cavazos por la generosa ayuda que me brindó para sortear un sinnúmero de dificultades que se presentaron durante la realización de este trabajo.

Igualmente con profunda gratitud deseo reconocer el desinteresado apoyo que recibí del Lic. Rodolfo Cortés Martínez quien siempre estuvo al pendiente de mis aprietos frente a las computadoras. De la misma manera al M.C. Enrique A. Alcorta Garza, quien me proporcionó ayuda oportuna siempre que se la solicité.

Deseo dar las gracias a la Q.C.B. Judith Rocha Gámez, quien durante mi ausencia emprendió la organización y presentación de algunos de los trabajos de investigación en el VIII Encuentro de Investigación Biomédica.

Asimismo a los estudiantes Alejandro Balderas Mireles, Juan P. Castrellón Santa Anna y Ricardo Montoya Olivera por su entusiasmo en la presentación de los trabajos en el mismo Encuentro. Vaya también merecido reconocimiento a ellos por haber triunfado en un concurso nacional estudiantil celebrado en Guadalajara, al presentar parte de esta investigación.

Un trabajo de la naturaleza de éste, requiere sin duda del apoyo continuo de los más especializados proveedores de material y equipo; expreso mi agradecimiento al Ing. Ramón Pérez Schmidt de IASA, representante de VARIAN por las atenciones que recibí de su parte.

De la misma manera agradezco al Ing. Rodolfo Valadez de RODVAL, representante de MILLIPORE por la asistencia constante y eficaz que me proporcionó para seleccionar los materiales más adecuados según las necesidades que se iban presentando.

También estoy agradecido con Agustina de los Santos Vega Alonso, Maribel Esparza Duque, Graciela Peña Abundis y Agustín Nambo Aspera, personal del almacén quienes me asistieron en la búsqueda de materiales y reactivos y que a pesar de que para ellos era parte de su rutina normal, para mí representaba cual insólita perquisición en medio de una incomprensible organización.

Igualmente deseo dar las gracias a la Srta. Angeles Martínez Martínez y a Gloria M. Martínez Peña, secretarías del Departamento de Química Analítica por su colaboración en la preparación de las figuras del manuscrito. Asimismo a los Sres. Eliezer Alanís y Benigno Leal del Departamento de Fotografía por la disposición que me mostraron al tenerme en forma oportuna todo el material de diapositivas que generó esta investigación.

Mi agradecimiento a la Sra. Socorro Valles de la Subdirección de Investigación y Estudios de Post-Grado por llevar en orden y a tiempo todos mis registros académicos.

Expreso mi gratitud a mis compañeras de oficina, Q.C.B. Azeneth A. Guzmán Rodríguez y M.C. Lidia Naccha, quienes a pesar de su delicadeza por mantener el orden, las acostumbré a ver montones de papeles, libros y revistas por doquier. Al resto del personal del Dpto. de Química Analítica agradezco la tolerancia que me tuvieron cuando en muchas ocasiones mostré el adusto carácter en el que derivaron los desvelos, igualmente por haberme permitido mantener los laboratorios en lo que para ellos era un estado entrópico, pero para quien trabajó y supo lo que hacía no lo fue.

Finalmente, deseo dar las gracias al M.C. Carlos R. Escalante, M.C. Aurelio Alvarez y M.C. Adrián Vilalta de la Universidad Georgetown y al Dr. Manuel Villagarcía de la Universidad Johns Hopkins por todas las atenciones que me brindaron y muy especialmente durante la preparación del cartel con el cual se presentó esta investigación en la Conferencia de Pittsburgh celebrada en Chicago en este mismo año. Asimismo agradezco al Lic. Alfonso Reyes Garza su incondicional apoyo a lo largo de un intenso esfuerzo que fructificó en esta modesta aportación del autor.

Monterrey, N.L. 1991.

INDICE TEMATICO

	Pàg.
CAPITULO 1	
Antecedentes.	1
Detección de las aflatoxinas.	2
Diversidad estructural.	3
Condiciones que favorecen el crecimiento de <u>Aspergillus flavus</u> .	8
Sensibilidad en varios animales.	11
Propiedades carcinogénicas de las aflatoxinas.	17
Control de las aflatoxinas en varios países.	22
Hipòtesis.	23
Objetivo general.	23
CAPITULO 2	
Materiales y métodos.	24
Preparación de soluciones patròn.	24
Anàlisis cromatogràfico.	27
Mediciones por HPLC.	28
Mediciones directas.	29
Extracción de aflatoxinas en maiz.	31
Metodologia para evaluar las intc eferncias del maiz.	35
Extracción de aflatoxinas en cacahuate.	37
Extracción de aflatoxinas en nuez.	38

Metodología de los cálculos para obtener los porcentajes de recuperación en maíz.	41
Metodología de los cálculos para obtener los porcentajes de recuperación en cacahuete.	54
Metodología de los cálculos para obtener los porcentajes de recuperación en nuez.	61
Metodología de los cálculos para obtener los límites de detección.	66
Métodos de HPLC-Fluorescencia molecular.	66
Métodos de HPLC-Absorción ultravioleta.	72
Métodos directos de fluorescencia molecular.	78
Métodos directos de absorción ultravioleta.	83
CAPITULO 3	
Resultados y discusión.	88
Discusión de los procedimientos de extracción de aflatoxinas a partir de maíz.	88
Discusión de los procedimientos de extracción de aflatoxinas a partir de cacahuete.	114
Discusión de los procedimientos de extracción de aflatoxinas a partir de nuez.	123
Discusión de los métodos fisicoquímicos de detección.	126
Métodos por HPLC.	126
Métodos directos.	134
Conclusiones.	155
CAPITULO 4	
Bibliografía.	156
Lecturas sugeridas.	165

CAPITULO 5

Apèndice A

Glosario. 174

Apèndice B

Metodologia de análisis usando estándar interno. 176

Apèndice C

Evaluación de parámetros cromatográficos del empaque Micropak. 179

Apendice D

Condiciones de seguridad para el manejo de aflatoxinas. 180

Apèndice E

Curvas de calibración por fluorescencia directa y ultravioleta y espectros de fluorescencia de las aflatoxinas. 183

INDICE DE FIGURAS

Figuras	Págs.
1	6
2	7
3-5	89-91
6	94
7	95
8	97
9	98
10-22	100-112
23-29	115-121
30	124
31	125
32-37	127-132
38-46	138-146

INDICE DE TABLAS

Tablas	Pág.
I	93
II	113
III	122
IV	133
V	135
VI	136
VII	147
VIII	149
IX	150
X	151
XI	152
XII	153
XIII	154

C A P I T U L O 1

ANTECEDENTES

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos que debido a su estructura molecular se les clasifica dentro de las difuranocoumarinas (figs.1 y 2). Los estudios toxicológicos han demostrado su actividad carcinogénica, hepatotóxica, teratogénica e inmunosupresora (1).

Una gran variedad de hongos producen las aflatoxinas, destacando como los de mayor producción Aspergillus flavus LINK y Aspergillus parasiticus SPEARE. Estos hongos se encuentran con frecuencia en gránulos alimenticios cuyas condiciones favorecen su desarrollo y, por ende, la producción de aflatoxinas.

Las investigaciones realizadas sobre aflatoxinas han sido producto de la inquietud que se presentó por una serie de brotes de enfermedades en aves de corral y peces en diversos lugares del mundo durante 1960. El caso de mayor relevancia fue el de pérdidas de pavos en Inglaterra como resultado de un agente etiológico entonces desconocido: así, el padecimiento se denominó como "la enfermedad X del pavo". Esta se caracterizó por necrosis hepática aguda con hiperplasia en los conductos biliares. La sintomatología en su estado agudo se manifestó con pérdida del apetito, letargo y debilidad. En su estado avanzado la muerte era inevitable. Mediante una búsqueda de la fuente de intoxicación se encontró como común denominador de la enfermedad el consumo de cacahuate molido, un subproducto de la extracción del aceite de cacahuate procedente de Brasil y algunos países africanos.

En el mes de septiembre de 1960, dos investigadores: Ayerst y Austwick, analizando el alimento consumido por los animales hallaron la presencia de micelio fungal. Este hallazgo motivó su aislamiento siendo identificado como Aspergillus flavus. En 1962, un grupo de investigadores del Departamento de Investigación Científica e Industrial del Instituto de Productos Tropicales en Londres, Inglaterra encabezados por Nesbitt y O'Kelly (2), reportaron el aislamiento de las aflatoxinas B 1 y G 1 y, un año más tarde, ellos mismos reportaron el aislamiento de B 2 y G 2 (3), (figs. 1 y 2). Las letras se refieren a los colores que emiten cuando son irradiadas con longitud de onda cercana a 360 nm. (las B emiten un color azul y las G un color verde); los subíndices se refieren a su posición relativa en las placas cromatográficas.

Aspergillus flavus se asoció con brotes previos de síntomas tóxicos posteriores a 1961. En 1952, Seibold y Bailey describieron una enfermedad en perros que denominaron "hepatitis X". Posteriormente se determinó que la causa era la ingestión de cacahuete en la dieta de estos animales. Igualmente, el envenenamiento del ganado vacuno y porcino con maíz mohoso se asoció con la presencia de Aspergillus flavus y otros hongos, entre ellos Penicillium rubrum. Más tarde se demostró que el envenenamiento del ganado porcino produjo la misma "hepatitis X" que se había presentado anteriormente en los canes.

La amplia contaminación de una variedad de alimentos refleja la distribución tan extensa de A. flavus en la naturaleza. El maíz y el cacahuete representan los alimentos que proveen las más altas posibilidades de contaminación, mientras que el frijol de soya presenta cierta resistencia a la producción de aflatoxinas pero no a la contaminación fungal.

Inicialmente, la producción de aflatoxinas en el campo se consideró un problema debido al almacenamiento inadecuado de los granos; sin embargo, mediante investigaciones posteriores se comprobó la presencia de A. flavus y aflatoxinas en maíz antes de cosecharse (4). Resultados similares se obtuvieron para el algodón y el cacahuete, lo cual significa que el problema incluye tanto el cultivo como el almacenamiento (5).

Cabe destacar que los insectos desempeñan el papel de vectores en la contaminación de los plantíos, así también, otros factores tales como temperatura, humedad, trazas de cinc son esenciales para estimular el desarrollo de los hongos.

DETECCION DE LAS AFLATOXINAS.

Para la detección de las aflatoxinas existen numerosos métodos tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. Generalmente se emplea la extracción con solventes orgánicos, la separación de compuestos de interferencia y finalmente, la característica fluorescencia o absorción en la zona del espectro ultravioleta.

Sin embargo, la mayoría de los métodos reportados en la literatura presentan una serie de inconvenientes entre los que se encuentran el uso de solventes demasiado costosos, así como sistemas sofisti-

cados de detección como la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases (6). Se han reportado métodos sencillos y muy accesibles, como la minicolumna (7), sin embargo, su demasiada simplicidad los hace ser poco cuantitativos.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución constituye una poderosa técnica para separar aflatoxinas y, aunque se han reportado métodos indicando su uso (8, 9, 10, 11), cabe señalar que los solventes usados como fase móvil son costosos para laboratorios modestos, además de que los métodos de aislamiento de las toxinas son complejos y laboriosos. Asimismo, el uso de muestras de 50 gramos resta poder de recuperación.

Recientemente se han desarrollado métodos de ELISA (12), para el análisis de aflatoxina B₁, pero presenta el inconveniente del uso de reactivos demasiado específicos y de alto precio, lo cual disminuye la disponibilidad que pudiera tenerse para llevar a cabo esta técnica.

Pueden también encontrarse en el mercado equipos de prueba para el aislamiento rápido de aflatoxinas, conocido comercialmente como "Aflatest"; sin embargo, con este método no se puede obtener la cantidad exacta de cada toxina, puesto que la medición que se realiza es para el conjunto de todas ellas es decir, el total de las aflatoxinas presentes.

Así pues, por lo anteriormente expuesto, se puede ver que aunque existen métodos propuestos, aún persisten inconvenientes; es por ello que, con la finalidad de seleccionar los métodos más adecuados para el análisis, nos avocamos a la tarea de evaluar métodos físico-químicos de detección tales como fluorescencia y ultravioleta. Igualmente para cada una de estas dos variantes se comparó la detección directa después de la extracción de la muestra y el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución como un medio de separación antes de la detección de los analitos. Estos métodos fueron aplicados al análisis de maíz, cacahuate y nuez.

DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE AFLATOXINAS.

En varios laboratorios del mundo se llevaron a cabo esfuerzos para conocer las estructuras moleculares de las aflatoxinas. Para ello era necesario lograr primero la identificación de las muestras tóxicas y a partir de ellas lograr su aislamiento.

Originalmente, los factores tóxicos se aislaron a partir de alimento para consumo animal, y fueron separados cromatográficamente, siendo cuatro los compuestos distintos: aflatoxinas B 1, B 2, G 1, G 2. La elucidación estructural de las B 2 y G 2 indicó que se trataba de derivados dihidrogenados de las originales B 1 y G 1 (13, 14, 15, 16). Las aflatoxinas contienen un núcleo de coumarina fusionado a un difurano y, dependiendo de si son del conjunto de las B, contienen una pentanona, si son del conjunto de las G, contienen una lactona de seis miembros. De acuerdo con las pruebas efectuadas las aflatoxinas B 1 y G 1 resultaron ser más tóxicas que las B 2 y G 2, en patos (3), ratas (17) y peces (18).

La aflatoxina B 1 destaca por ser la más tóxica de las cuatro; igualmente la potencia carcinogénica lleva el siguiente orden: B 1 > G 1 > B 2 > G 2.

Los derivados hidroxilados de las aflatoxinas, denominados aflatoxinas M 1 y M 2 pueden encontrarse en la leche de vacas alimentadas con raciones contaminadas de aflatoxina B 1.

La aflatoxina G M 1, un derivado hidroxilado de la aflatoxina G 1 puede encontrarse también en cultivos de Aspergillus flavus. Sin embargo, la aflatoxina G M 1 es un metabolito que se encuentra en muy reducida cantidad. Otros derivados producidos por A. flavus, son las 2--hidroxiaflatoxinas, las que se conocen con los nombres de B 2a y G 2a (19).

El Parasiticol o aflatoxina B 3, se considera un posible precursor de la biosíntesis de las aflatoxinas; su aislamiento fue posible a partir del arroz y del trigo inoculado en el laboratorio (20). Los patos jóvenes son tan sensibles a la B 3 como a la B 1; mientras que los embriones de pollo son menos sensibles a la B 3 que a la B 1 (21).

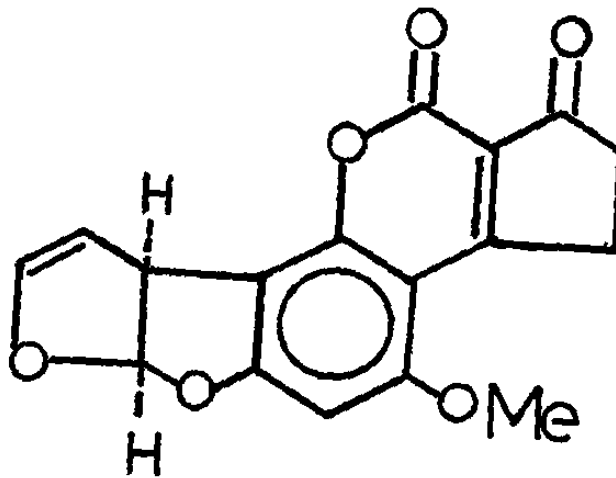
La reducción de la pentanona de la aflatoxina B 1 llevada a cabo por microorganismos produce aflatoxicol (22).

Los animales también metabolizan B 1 por la O-dimetilación para producir aflatoxina P 1; la cual ha sido detectada en la orina de varias especies de animales (23). Sin embargo P 1 ha demostrado ser menos tóxica que B 1 (24).

La aflatoxina Q 1 es el principal metabolito producido por B 1 en los microsomas del hígado in vitro tanto de monos como de humanos; contiene un grupo hidroxilo en la posición del carbono-3.

Los procedimientos de destoxificación usando amoniaco producen dos principales metabolitos de B 1; estos son: aflatoxina D-1 y aflatoxina D-2 (25). El tratamiento con amoniaco abre el anillo de lactona de seis miembros de la aflatoxina B 1.

B₁



B₂

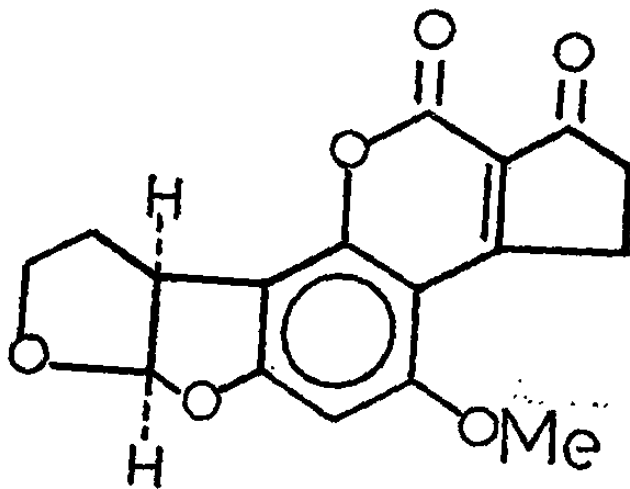
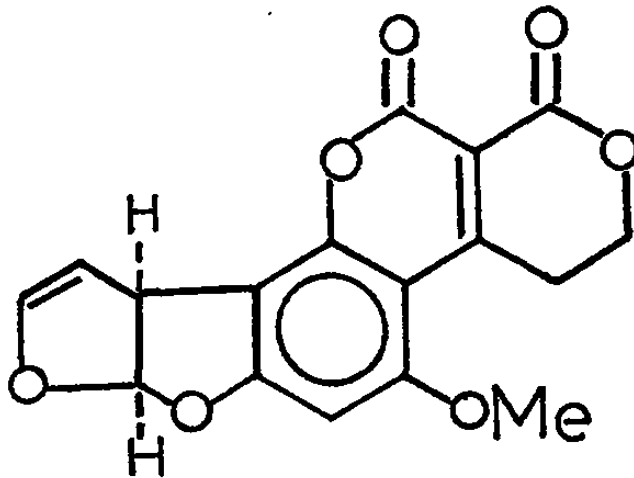


FIG.1

G₁



G₂

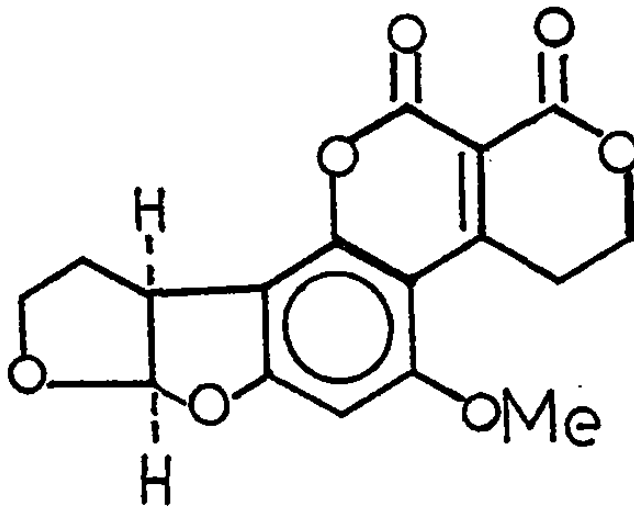


FIG. 2

PRESENCIA DE ASPERGILLUS FLAVUS.

Se ha encontrado la presencia de Aspergillus flavus, el mayor productor de aflatoxinas en :

MAIZ	PULPA DE BETABEL
CACAHUATE	ALGARROBA
NUEZ	HABICHUELA
FRIJOL DE SOYA	PISTACHO
CACAO	MIJO
CAFE	PIMIENTA ROJA
TABACO	CHICHARO
SORGO	GIRASOL

Las condiciones que propician el crecimiento de Aspergillus flavus son las siguientes:

CONDICIONES	EXTREMAS (26)	OPTIMAS (27)
Temperatura	6-54 oC	15-30 oC
Humedad	9-35 %	15-25 %

Otras condiciones que favorecen el crecimiento de Aspergillus flavus son las siguientes (27):

SACAROSA : 30-200 G/L

NITRATO COMO FUENTE DE NITROGENO.

Los metales presentes en el grano huésped que estimulan la producción de aflatoxinas son los siguientes:

CINC (28)	CADMIO (28)
MAGNESIO (29)	HIERRO (29)

El metal que inhibe la producción de aflatoxinas: bario, preferentemente como acetato (28).

ALGUNOS HONGOS QUE PRODUCEN AFLATOXINAS SON LOS SIGUIENTES:

<u>Aspergillus flavus</u>	LINK
<u>Aspergillus parasiticus</u>	SPEARE
<u>Aspergillus tamarii</u>	KITA
<u>Aspergillus niger</u>	TLEGEH
<u>Aspergillus ostianus</u>	WEHMER
<u>Aspergillus ruber</u>	T.y C.

HONGOS QUE PRODUCEN TRAZAS DE AFLATOXINAS SON LOS SIGUIENTES:

<u>Penicillium citrinum</u>	THOM
<u>Penicillium variable</u>	SOFP
<u>Penicillium frequentans</u>	WESTL

CARACTERISTICAS DE LA TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS.

Dosis letal para patos jóvenes.

Una vez identificadas las aflatoxinas y habiéndose conocido sus propiedades tóxicas, varios laboratorios del mundo se avocaron a la tarea de conocer las dosis letales para diferentes géneros y especies. Las primeras investigaciones se enfocaron hacia patos de un día de nacidos dada su alta susceptibilidad toxicológica.

Los resultados se basaron en el suministro de 0.1 ml. de diferentes concentraciones de aflatoxinas en propilenglicol a Patos -- Blancos de Pekin de un día de nacidos (peso corporal 51 g). La mortalidad se registró a las 48 horas después de la administración a través de la molleja. Bajo estas condiciones se determinaron las dosis letales 50% (13) :

AFLATOXINAS	D L
	50
B 1	0.564 mg/Kg
G 1	1.8 mg/Kg

La mayor parte de las determinaciones de DL ~~50~~ usando patos jóvenes se registraron seis días después de la administración de las aflatoxinas en propilenglicol o en dimetilformamida.

Posteriores trabajos reportaron los valores de DL ₅₀ para las otras aflatoxinas (30):

AFLATOXINAS	D L 50
B 2	1.096 mg/Kg
G 2	3.450 mg/Kg

Siendo que la única diferencia que existe entre las aflatoxinas de subíndice 1 respecto de las de subíndice 2 consiste en que las dos primeras presentan un doble enlace en el sistema de anillos de difurano, puede observarse que es la ausencia de éste lo que les confiere menor toxicidad a las aflatoxinas. También puede observarse una menor toxicidad debido a la expansión del anillo de ciclopentenona a un segundo anillo de lactona.

DOSIS LETAL PARA UNA VARIEDAD DE MAMIFEROS DE LABORATORIO.

Al mismo tiempo en otros laboratorios se experimentaban las dosis letales para mamíferos de laboratorio como se menciona a continuación.

Para la rata macho tipo Fischer recién destetada la DL ₅₀ oral de aflatoxina B 1 fue 5.55 mg/Kg; es decir, diez veces más que el valor para los patos de un día de nacidos. Cabe señalar que la rata hembra es menos sensible que el macho, ya que se encontró su valor de DL ₅₀ en 7.44 mg/Kg (17).

La rata tipo Wistar mostró aún mayor diferencia en la sensibilidad entre el macho y la hembra; siendo para el primero la DL ₅₀ de 7.2 mg/Kg y para la hembra 17.9mg/Kg (31).

El ratón es particularmente resistente a las aflatoxinas (32), mientras que el conejo tiene una sensibilidad comparable a la de los patos jóvenes (33); la DL ₅₀ oral para el conejo joven se ubica entre 0.2-0.4 mg/Kg (34). En los cobayos la dosis máxima que no provoca cambios histopatológicos observables es del orden de 6.25 microgramos de aflatoxina B 1, 100 microgramos de B 2, 25 microgramos de G 1 y 800 microgramos de G 2 (35). La dosis teratogénica para los fetos de ocho días del Hamster es 4 mg/Kg suministrada por inyección (36).

SENSIBILIDAD EN VARIOS ANIMALES.

Aunque los animales de granja son por lo general sensibles a las aflatoxinas, los ruminantes están entre los más resistentes. Los animales jóvenes son siempre más sensibles que los adultos.

Mamíferos de granja.

Orden decreciente de la susceptibilidad a las aflatoxinas:

CERDOS
VACAS
CABALLOS
OVEJAS.

Mientras el cerdo joven de tres a doce semanas es muy sensible a las aflatoxinas, esta sensibilidad desciende en el adulto y es necesario tener considerables cantidades de toxinas en el alimento (una ración conteniendo 17.5-20 % de forraje tóxico por un período de 22-182 días) con la finalidad de observar una reducción notable en el desarrollo y la aparición de cambios en el hígado (37,38).

Algunas experiencias que se registraron al alimentar ganado con harina de cacahuate procedente de Brasil se mencionan a continuación.

En vacas de dos años de edad, concentraciones correspondientes a 0.22, 0.44 o 0.66 mg de aflatoxina B 1 por kilogramo de la alimentación diaria tuvo pequeños efectos después de 20 semanas, aunque se presentaron ligeras lesiones hepáticas (39). Cuando el alimento suministrado contenía 2.4 mg de aflatoxina B 1 por kilogramo y se alimentó durante trece meses a vacas de diez años de edad, los efectos resultaron notorios después del séptimo mes (40).

No se han detectado mutaciones en gestantes de vaca (40), y de rata, aunque en estas últimas se han encontrado residuos de aflatoxinas en placenta (41).

La alta resistencia de las ovejas a las aflatoxinas se explica por su capacidad eficiente de excreción (42).

Aves de corral.

Las aves de corral se clasifican en el siguiente orden decreciente de susceptibilidad:

PATOS JOVENES
PAVOS
GANSOS Y FAISAN
POLLOS.

Algunos otros experimentos se realizaron en aves de corral como el pollo, el cual, demostró ser relativamente resistente, y aunque la mortalidad es baja en ellos, si ocurren cambios hepáticos (43,44). Se ha reportado también que los pavos y los faisanes son un poco más sensibles que los pollos.

La literatura también reporta que cuando se alimentó a patos jóvenes con una dieta conteniendo 2.5 % de alimento tóxico correspondiente a 0.3 mg de B 1 por kilogramo, diariamente por seis semanas, presentaron una mortalidad del 30 % y los que sobrevivieron mostraron una considerable pérdida de peso.

Cuando a los patos de un día de nacidos se les administraron 100 microgramos diariamente durante 5 días, se produjeron lesiones hepáticas; dosis de 2000 microgramos por más de cinco días causaron proliferaciones de tejido en los conductos biliares en todos los casos.

Una dieta conteniendo solamente 6.25 % de cacahuate contaminado puede matar a patos jóvenes dentro de los trece días si la alimentación comienza dentro de los primeros seis días de su vida (45).

Un amplio intervalo de lesiones hepáticas (hiperplasia del epitelio del conducto biliar, colangitis, hepatoma, colangioma) se han observado en truchas alimentadas con harina de cacahuate contaminado, semillas de algodón y soya (46).

SINTOMAS DE TOXICIDAD REGISTRADOS EN DIFERENTES GENEROS Y ESPECIES.

Toxicidad aguda y crónica.

Las aflatoxinas producen un número de síntomas asociados con la toxicidad aguda y cambios asociados con toxicidad crónica. Esto último incluye tres tipos de actividad anteriormente mencionados: carcinogénica, teratogénica y mutagénica (47).

La toxicidad aguda se expresa como la muerte del animal en un tiempo que depende de la sensibilidad particular (48). En general, el hígado se muestra pálido, decolorido, y se incrementa en tamaño. Las necrosis del parénquima hepático y las hemorragias se registran frecuentemente en cerdos y patos jóvenes y en pavos. Si la muerte no ha ocurrido dentro de una semana, puede hallarse una proliferación característica de células no diferenciadas en los espacios de la vena porta (48). El riñón puede mostrar lesiones entre las cuales se encuentra la nefritis glomerular.

Los cambios asociados con envenenamiento crónico son muy distintos. Los primeros síntomas visibles aparecen como una pérdida del apetito y reducción en el crecimiento, pero es el hígado, el que es más rápidamente afectado por la actividad de la toxina (49); se congestiona y muestra zonas hemorrágicas y necróticas. La proliferación de células epiteliales de los conductos biliares es característico en ganado, patos jóvenes y pavos. En pollos, la destrucción de las células del parénquima hepático y la proliferación de células epiteliales ocurren durante las dos primeras semanas (43).

La mayor parte de las indicaciones características de toxicidad con frecuencia aparecen solamente unos pocos días antes de morir.

EXAMENES CLINICOS E HISTOPATOLOGICOS.

Toxicidad en cerdos.

Los síntomas característicos de aflatoxicosis en los cerdos son ataxia y severo tenesmo. Anorexia y pérdida de peso acompañan a estos síntomas cuando la dosis de aflatoxina es mayor de 0.1 mg/Kg (50).

Toxicidad en vacas.

En la vaca, las lesiones hepáticas consisten principalmente de cirrosis. En intoxicación experimental de la vaca se notó hiperplasia de las células hepáticas desde el final del primer mes; este fenómeno se incrementa durante el segundo y el tercer mes, hasta que llega a aparecer degeneración centrolobular de las células hepáticas (51).

Toxicidad en aves de corral.

En las aves de corral, la anorexia se acompaña por una reducción en el desarrollo. Suceden hemorragias subcutáneas (52). Contraria a la situación en mamíferos, el hígado de las aves de corral sufriendo aflatoxicosis, no muestra fibrosis. La degeneración de las células del parénquima hepático es particularmente notorio acompañado por regeneración activa mediante la proliferación del epitelio de los conductos biliares de las regiones periportales. Los riñones se congestionan; muestran múltiples hemorragias; en el pavo joven se presenta nefritis glomerular, pero no en los patos jóvenes (53).

En los patos jóvenes una sola dosis de aflatoxinas es suficiente para obtener rápida proliferación que alcanza su máximo después de tres días. Después de treinta días de tratamiento con aflatoxinas, el hígado se agranda y muestra un color café o grisáceo; la superficie presenta granulaciones irregulares.

En los pollos, una mínima dosis de 0.8 mg de aflatoxinas por kilogramo se requiere para producir desórdenes hepáticos primarios (54).

Toxicidad en conejos.

El conejo, después de la ingestión de aflatoxinas muestra una degeneración grasa extensiva del parénquima hepático; las células se hinchan y muestran cambios nucleares. Se observa proliferación de células del tejido periportal y de los conductos biliares (55).

Toxicidad en cobayos.

Los cobayos responden a la toxicosis aguda en una forma análoga a los patos jóvenes. Una dieta conteniendo 1.4-1.6 mg de aflatoxina

por kilogramo es letal dentro de las tres semanas. Dosis más bajas permiten, desde luego, mayor tiempo de supervivencia pero causan severas lesiones en el hígado: necrosis centrolobular y proliferación masiva de células en los conductos biliares(56).

Toxicidad en ratas.

Las ratas pueden tolerar dosis mucho más altas de alimentos contaminados que los patos jóvenes. La rata es menos sensible a los efectos agudos de las aflatoxinas que muchos otros animales; el corazón, el bazo, el tracto intestinal y el tracto urogenital no se afectan (57). Sin embargo, los pulmones muestran lesiones macroscópicas grises con áreas de hemorragia. El hígado se ve afectado llegando incluso, a duplicar su tamaño y se observa la aparición de necrosis difusa en la región periportal (58).

Cuando a las ratas se les alimenta con 0.94 mg de aflatoxina B 1 por día durante 23 días, pueden detectarse hepatocitos de gran tamaño y de forma irregular (59). Además, en envenenamiento crónico se presentan lesiones testiculares y fusión de espermatozoides lo cual puede observarse dentro del primer mes de envenenamiento (60).

Toxicidad en perros.

La administración oral de alimento contaminado en dosis diarias de 1.5 y 20 microgramos por kilogramo por cinco días a la semana, durante un periodo de diez semanas arrojó los siguientes resultados (61):

MICROGRAMOS / KILOGRAMO

SINTOMAS

1	No mostraron sintomas
5	No mostraron sintomas
20	Pérdida del apetito. Orina amarillo-naranja. Incremento de protrombina. Acumulación de pigmentos biliares en las regiones portales.

Toxicidad en monos.

La administración diaria de 1 mg de aflatoxina B 1 por kilogramo a monos de dos a tres meses de edad produce alta mortalidad después de cuatro meses. Los exámenes post-mortem revelaron cambios hepáticos severos caracterizados por infiltraciones de grasas en la región de vena porta. Además se presentan cambios en las concentraciones de transaminasas y de bilirrubina (62).

La aparición de necrosis hepática en monos jóvenes se produce por la aparición diaria de 0.15-0.25 mg de aflatoxina por kilogramo.

En Cercopithecus aethiops, dosis diarias de 0.01-1 mg/Kg produjeron hepatitis (62).

En Macaca irus dosis diarias de 1.8 mg/Kg produjeron muerte en aproximadamente un mes (63).

PROPIEDADES CARCINOGENICAS DE LAS AFLATOXINAS.

Hepatomas en la rata.

La alimentación de ratas con material conteniendo aflatoxinas provoca la aparición de carcinomas hepatocelulares multicéntricos en la mayoría de los casos. Los nódulos tumorales son amarillos-grisáceos o hemorrágicos y necróticos (64).

En la siguiente tabla puede observarse que la incidencia de tumores hepáticos en ratas es proporcional a la concentración de aflatoxinas en el alimento (65):

RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE AFLATOXINA, DETERMINADA POR FLUORESCENCIA Y LA INCIDENCIA DE TUMORES DE HIGADO EN RATA.

Concentración de aflatoxina en alimento. (mg/Kg)	Duración del Experimento. (Días)	Incidencia de de tumores de hígado.
5.0	370	14/15
3.5	340	11/15
3.5	335	7/10
1.0	294	5/9
1.0	323	8/15
0.2	360	2/10
0.2	361	1/10
0.005	384	0/10

Naturaleza Carcinogénica De Hepatomas Asociados Con Aflatoxinas:

Ha habido un creciente interés por conocer si los hepatomas causados por aflatoxinas son de naturaleza maligna.

Por definición, la propiedad de un cáncer es la posesión de caracteres invasivos no diferenciados y metastásicos (66).

Una proliferación anormal de células puede, ya sea proveer un tumor benigno formado de células idénticas no invasivas o proveer un tumor maligno de células no diferenciadas, algunas creciendo más rápidamente que otras.

En el caso de carcinoma de hígado, el diagnóstico es fácil si el tumor presenta metástasis o puede ser transplantado (67). En ausencia de estos dos criterios es posible usar una combinación de criterios microscópicos y macroscópicos.

Las aflatoxinas han sido útiles en el estudio de la naturaleza de las células cancerígenas. De hecho, la fase de inducción de carcinogénesis es muy breve, sobre todo cuando se aplica a animales jóvenes o a tejido de hígado en crecimiento, y la cantidad necesaria para la iniciación es muy pequeña: 5 microgramos por día por varios meses en la rata (68).

EFFECTOS BIOQUIMICOS DE LAS AFLATOXINAS.

Se ha hecho énfasis acerca de que las aflatoxinas puedan considerarse como inhibidores biosintéticos, causando inhibición total y reducidas dosis lo hacen progresivamente afectando diferentes sistemas (69).

Se pueden mencionar las etapas sucesivas en la actividad biológica de las aflatoxinas sobre las células del hígado; siendo cada etapa una consecuencia de la etapa previa (70):

- 1.- Interacción con DNA e inhibición de las polimerasas responsables para la síntesis de DNA y RNA.
- 2.- Supresión de la síntesis de DNA.
- 3.- Reducción de la síntesis de RNA y la inhibición del RNA mensajero.
- 4.- Alteraciones de la morfología nucleolar.
- 5.- Reducción de la biosíntesis de proteínas.

Interacción con DNA.

La aflatoxina B 1 es la biológicamente más activa y su interacción ocurre preferencialmente con el anillo purínico de guanina (70). La aflatoxina también puede unirse con el DNA de una sola

hélice. Sin embargo, su unión es tan débil que el sólo hecho de pasarlo a través de una columna de sephadex se disocia el complejo. Estas interacciones pueden explicar la inhibición de la síntesis de DNA y RNA al mismo tiempo (71).

Supresión de la síntesis de DNA.

Los estudios de la supresión de la síntesis de DNA por aflatoxina B 1 se han hecho usando como base la estimulación de síntesis mediante hepatectomía. Por ejemplo, se probó que si la toxina se inyecta entre 30 a 60 microgramos /día durante los cinco días previos a la remoción quirúrgica de dos tercios del hígado ocurre una inhibición significativa de la síntesis de DNA (72). Si la toxina se inyecta 24 horas después de la remoción parcial del hígado, es decir, cuando han comenzado los procesos de regeneración celular, se ha encontrado que todos los procesos biosintéticos están bloqueados. Estos resultados se han confirmado usando ácido orótico marcado con carbono-14 (73).

Por otra parte, se ha demostrado que la aflatoxina B 1 inhibe la DNA polimerasa de E. coli en una manera análoga a la mitomicina C (74). La polimerasa se reduce un 60 % en su actividad.

Reducción en la síntesis de RNA.

Las aflatoxinas también pueden afectar la biosíntesis del RNA previniendo la transcripción del DNA por la RNA polimerasa (75). La actividad del RNA citoplásmico se inhibe totalmente, mientras que el RNA nuclear lo hace en menor escala. La biosíntesis del RNA nucleolar se inhibe en una etapa temprana. Después de tan sólo 15 minutos de haber hecho contacto con la aflatoxina, la biosíntesis se inhibe hasta en un 95 %.

Cambios en la morfología nucleolar.

Con una dosis intraperitoneal de 0.2 mg de aflatoxina B 1 por kilogramo en ratas macho tipo Fischer de 100 g de peso se han podido observar cambios ultraestructurales en los nucléolos de las células del hígado en un tiempo de tan sólo 36 horas (76).

Reducción de la biosíntesis de proteínas.

Los procesos de inhibición descritos anteriormente conducen finalmente a la reducción en la biosíntesis de proteínas.

La siguiente tabla muestra el efecto de la concentración de aflatoxina B 1 sobre la síntesis de DNA, RNA y proteína por Flavobacterium aurantiacum (77):

AFLATOXINA B 1 (microgramos/ml)	D N A (microgramos)	R N A (microgramos)	PROTEINA (microgramos)
0	33	70	190
10	27	60	190
25	21	60	180
50	0	60	170
100	0	50	165

LAS AFLATOXINAS Y SU RELACION CON EL HOMBRE.

Ha sido en Africa en donde se han presentado con mayor frecuencia casos que pudieran de alguna manera estar relacionados con la ingestión de aflatoxinas. Siendo este continente en cuyos alimentos, como el cacahuate y la harina de yuca, en donde han sido detectadas altas concentraciones de aflatoxinas como 1.7 mg/Kg.

La siguiente tabla muestra la diferencia que existe en la aparición de cáncer de hígado entre países desarrollados y algunos países de Africa.

En las Filipinas se midió la presencia de aflatoxina M 1 en la orina de todos los niños que habían ingerido crema de cacahuate contaminada de aflatoxina B 1 a una concentración de 0.5 mg/Kg. (78).

CANCER DE HIGADO EN HUMANOS.

PAIS	CASOS POR CADA 100,000 HABITANTES.
Países Bajos	1
Noruega	1
Canadá	1
Hawaii	9.7
Nigeria	9.8
Sudáfrica	19.2

Igualmente, en Uganda, en 1970 se detectó la muerte de un joven de 15 años de edad cuya autopsia reveló edema pulmonar, corazón dilatado y necrosis difusa centrolobular, todos estos síntomas asociados frecuentemente con aflatoxicosis. Otros miembros de la familia presentaron al mismo tiempo violentos dolores abdominales y la mayor parte de la dieta de la familia fue a base de yuca contaminada con 1.7 mg/kg (79).

En el sur y sureste de la República Mexicana es popular el uso de la yuca para la preparación de diversos platillos. Igualmente se emplea en la elaboración de harina.

CONTROL DE AFLATOXINAS EN VARIOS PAISES

Algunos países han impuesto regulaciones en torno al contenido de aflatoxinas en alimentos destinados tanto al consumo humano como animal. A continuación se muestran los límites máximos permisibles que algunos países han fijado para alimentos destinados al consumo humano (80).

PAIS	ALIMENTOS	LIMITES MAXIMOS DE B 1		AFLATOXINAS TOTALES			
				B1	B2	G1	G2
microgramos/kilogramo							
ALEMANIA	TODOS	5				10	
ARGENTINA	CACAHUATES	5				20	
	MAIZ	5				20	
BRASIL	TODOS	15				30	
CANADA	TODOS TIPO DE NUECES	15				20	
ESTADOS UNIDOS	TODOS					20	
FRANCIA	TODOS					10	
	ALIMENTOS INFANTILES					5	
JAPON	TODOS	10					
MEXICO	TODOS					20	
PAISES BAJOS	CACAHUATES	5					
POLONIA	TODOS					0	
PORTUGAL	CACAHUATE	25					
	ALIMENTOS INFANTILES	5					
	OTROS	20					
RUMANIA	TODOS					0	
SUDAFRICA	TODOS	5				10	
ZIMBAWE	CACAHUATE	5					
	MAIZ	5					
	SORGO	5					

HIPOTESIS DEL TRABAJO:

Debido a que las aflatoxinas y sus derivados absorben en la región del ultravioleta cercano y presentan fluorescencia, será posible llevar a cabo su identificación dentro de los rangos de interés toxicológico por métodos directos de absorción y/o fluorescencia después de una extracción adecuada de la muestra.

OBJETIVO GENERAL:

Utilizando la espectroscopia ultravioleta-visible y/o fluorescencia molecular, desarrollar un método que permita determinar el contenido de aflatoxinas en muestras alimenticias de alto consumo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Desarrollar un método para la determinación directa del contenido de aflatoxinas en extractos de alimentos por espectroscopia ultravioleta-visible.
- 2.- Desarrollar un método para la determinación directa del contenido de aflatoxinas en extractos de alimentos por fluorescencia molecular.
- 3.- Desarrollar un método eficiente para extracción de aflatoxinas en oleaginosas.
- 4.- Evaluar los métodos de los objetivos 1 y 2 en extractos de oleaginosas utilizando HPLC como técnica de referencia.

" We may lay it down as an incontestable axiom that, in all the operations of art and nature, nothing is created; an equal quantity of matter exists both before and after the experiment..."

Antoine Lavoisier

(France, 1789)

C A P I T U L O 2

MATERIALES Y METODOS

Introducción.

Este capítulo se ha dividido en dos partes: A y B. En la parte A se menciona la metodología que se llevó a cabo para la preparación de las soluciones normalizadas (estándares o patrón). En la parte B se mencionan los materiales usados y la metodología seguida tanto para el análisis cromatográfico por HPLC como para el análisis directo y, para ambos casos, los procedimientos de detección por fluorescencia molecular y absorción ultravioleta.

A continuación se hace una breve descripción acerca de lo que consistió la presente investigación.

Inicialmente se llevó a cabo la preparación y normalización de las soluciones patrón de aflatoxinas.

Una vez obtenidas las soluciones patrón se sometieron a evaluación los métodos directos de cuantificación: fluorescencia molecular y absorción ultravioleta. Después, se buscaron las condiciones cromatográficas por HPLC usando las dos modalidades de detección arriba mencionadas.

Posteriormente se desarrollaron métodos de extracción de aflatoxinas para muestras de maíz, cacahuate y nuez, y se comprobaron dichos métodos por HPLC.

Finalmente, se evaluaron comparativamente métodos usando separación por HPLC previa a la detección fisicoquímica versus métodos de cuantificación realizadas en forma directa después de la extracción de las muestras.

Parte A. Metodología para la preparación de soluciones patrón.

La preparación de las soluciones patrón de aflatoxinas constituye una parte esencial en la presente investigación, por ello se describe a continuación el procedimiento. Previamente a la normalización se procedió a determinar los criterios de pureza que deben cumplir las aflatoxinas de acuerdo con los procedimientos de la AOAC (81).

Criterios de pureza.

A).- Pureza cromatográfica.

B).- Absortividades molares dentro del límite de confianza de 95 %.

C).- Relaciones de los picos de absorción ultravioleta en metanol, dentro del límite de confianza de 95%.

A).-Determinación de pureza cromatográfica.

Se aplicaron en una placa cromatográfica cinco microlitros de una solución de referencia a intervalos de 2 cm. Se hizo un segundo sembrado de cinco microlitros para exclusivamente la solución de aflatoxinas, y adicionalmente en una tercera aplicación se incluyeron cinco microlitros de esta misma solución de aflatoxinas más cinco microlitros de la solución de referencia.

B).- Absortividades molares.

Una vez comprobada la pureza cromatográfica, se revisó que las absortividades molares de las aflatoxinas en metanol se encontraran dentro de un 95% de los límites de confianza. Para cumplir con este requisito se usó el espectrofotómetro ultravioleta el cual requirió previa calibración de acuerdo a los procedimientos de la AOAC.

Calibración del espectrofotómetro:

La calibración del espectrofotómetro es indispensable en la preparación de las soluciones normalizadas. Para llevar a cabo la calibración se hizo lo siguiente:

i).- Se determinó la absorbancia de soluciones de dicromato de potasio a la longitud de onda de 350 nm, empleando como blanco una solución 0.018 N. de ácido sulfúrico.

ii).- Se calculó el coeficiente de extinción molar para tres concentraciones conocidas de dicromato de potasio (0.0625mM, 0.125mM, 0.250 mM)

iii).- Se calculó el promedio del coeficiente de extinción molar de las soluciones de dicromato de potasio.

iv).- Se determinó el factor de corrección del aparato y celdas, dividiendo el valor teórico del coeficiente de extinción molar del dicromato por el obtenido experimentalmente en el inciso anterior.

Determinación de la concentración de aflatoxinas.

La determinación de la concentración de aflatoxinas se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{microgramos/mililitro} = (A \times M \times 1000 \times CF) / E$$

Donde:

A : Absorbancia de la solución de aflatoxinas.

M : Peso molecular de la aflatoxina.

CF: Factor de corrección del instrumento y celdas.

E : Coeficiente de extinción molar de la aflatoxina a la longitud de onda de 350 nm.

El coeficiente de extinción molar de cada aflatoxina se obtuvo a partir de los datos publicados en el manual de la AOAC.

C).- Relaciones de los picos mayores de espectros de absorción ultravioleta en metanol.

Una vez revisados los valores de las absorptividades molares se comprobó que las relaciones de los picos mayores de los espectros de absorción ultravioleta de las aflatoxinas disueltas en metanol se encontraran dentro de un 95% de los límites de confianza a partir de espectros individuales.

Parte B. Materiales y metodología seguida en el análisis cromatográfico y directo.

La cromatografía es una técnica analítica cuyos fenómenos fisicoquímicos la han conducido más bien hacia una aplicación cuantitativa que hacia una cualitativa. Sin embargo, esto no quiere decir que la cromatografía carezca de importantes usos cualitativos. De hecho, es una técnica ampliamente usada en la identificación de mezclas de analitos mediante la adición de patrones conocidos. Por mencionar un ejemplo, durante la realización del presente trabajo, la identificación de aflatoxinas se hizo mediante la adición de patrones conocidos y, una vez identificados los analitos, se llevó a cabo la cuantificación.

Análisis Cualitativo.

La identificación de las aflatoxinas B 1, G 1, B 2 y G 2 se llevó a cabo, como ya se mencionó anteriormente, mediante la adición de patrones conocidos y, dado el caso, mediante los tiempos de retención relativos. Aparte de las aflatoxinas mencionadas y del ácido trifluoroacético usado como agente derivatizante, no se pretendió analizar otros compuestos que aparecieron en los cromatogramas como en el caso del maíz en donde aparecieron compuestos fluorescentes distintos de las aflatoxinas.

Análisis Cuantitativo.

Como se sabe, son variados los métodos que se siguen en las determinaciones cuantitativas por cromatografía. Ellos están en función de los recursos con los que se cuentan para llevarlas a cabo y desde luego, de las propiedades y comportamiento fisicoquímico de los analitos. A continuación se menciona el procedimiento usado en este trabajo para la cuantificación de aflatoxinas.

Para el registro de datos se contó con un registrador gráfico; por lo cual las determinaciones cuantitativas se elaboraron mediante cálculos manuales. Dado que las determinaciones se hicieron en base a los productos de derivatización en aquellas aflatoxinas susceptibles a esta reacción, se optó por preparar bajo las mismas condiciones tanto las muestras como a las soluciones normalizadas (estándares).

Se usó el método de patrón externo y para la integración de las áreas el criterio "valle-valle" (82). Los patrones externos se prepararon en rangos de concentración cercanos a las de las muestras y se inyectaron antes y después que éstas.

Para la medida de los picos se tomó en cuenta la altura y el ancho a la mitad de la altura del pico (82). En todos los casos se corrigieron las alturas en función de la sensibilidad del detector y la atenuación del registrador. Los volúmenes de inyección permanecieron constantes como se especifica más adelante.

INSTRUMENTACION.

MEDICIONES POR METODOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION. (HPLC).

Las separaciones cromatográficas mediante HPLC se hicieron con un cromatógrafo de líquidos Beckman-Altex (San Ramon, CA) modelo 334. Se usó una columna Varian (Palo Alto CA) Micropak MCH-5 de fase monomérica C-18 unida a sílica irregular de 60 angstroms (5 μ m), 4 mm de diámetro interno x 30 cm de longitud a temperatura ambiente.

Los cromatogramas se graficaron en un registrador Keep & Zonen (Holland), modelo BD 40 de 130 ma. y 50/60 Hz.

Condiciones cromatográficas.

La fase móvil usada fue una mezcla de MeOH + H₂O (45+55). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. El volumen de inyección se mantuvo constante en 20 microlitros para todas las determinaciones. Los cromatogramas se registraron a una velocidad de 2 mm/min.

Detección por fluorescencia molecular.

Para las determinaciones del maíz se usó un detector de fluorescencia Turner (Palo Alto, CA), modelo 111 provisto con filtros de excitación a 365 nm y de emisión a 436 nm.

Para las determinaciones del cacahuate y nuez se usó un detector de fluorescencia Beckman (San Ramon, CA), modelo 157 provisto con filtros de excitación a 365 nm y de emisión a 450 nm. La equivalencia de las unidades del rango de fluorescencia fueron como sigue:

1 R.F.U. = 10 mv.

8

Detección por absorción ultravioleta.

La detección por U.V. se hizo solamente para soluciones normalizadas de aflatoxinas (estándares) con la finalidad de calcular los límites de detección. Se usó un detector Varian modelo Star 9050 de longitud de onda variable, la cual se fijó a 365 nm.

MEDICIONES POR METODOS DIRECTOS.

Detección por fluorescencia molecular.

Las detecciones por fluorescencia molecular se hicieron con un fluorímetro Karl Zeiss (Deutschland) PMQ III provisto con filtro de excitación a 365 nm y con longitud de onda variable para la emisión, usándose a 435. Para la evaluación del fondo de fluorescencia, las lecturas se hicieron a la lambda de emisión de 455 nm.

Detección por absorción ultravioleta.

La detección por U.V. se hizo solamente para soluciones normalizadas de aflatoxinas (estándares) con la finalidad de calcular los límites de detección. Se usó un espectrofotómetro Beckman modelo 35 de longitud de onda variable, la cual se fijó a 365 nm.

Otros materiales usados en la metodología de trabajo.

Las extracciones de las aflatoxinas a partir de las muestras de laboratorio de 10 g se hicieron usando un vaso de licuadora de 250 ml. La característica que reúne el vaso es que cierra junto con la base de las aspas.

En todos los casos en que se aplicó vacío, éste se hizo usando una bomba de motor eléctrico monofásico a 1740 rpm de 7.7 amperes.

Para el caso de la limpieza de las muestras de maíz por extracción en fase sólida, las columnas utilizadas fueron de vidrio cuyas dimensiones fueron las siguientes: 30 cm de altura a partir de la base de vidrio poroso y 6 cm desde éste hasta la punta inferior. El diámetro interno fue de 1 cm. Tanto por arriba como por debajo de la fase C-18 se colocó fibra de vidrio, lo mínimo necesario para formar una capa delgada de 2 mm de ancho.

Derivatización de las aflatoxinas.

Las muestras se derivatizaron mediante la adición de 0.2 ml. de ácido trifluoroacético. Posteriormente las muestras derivatizadas fueron llevadas a sequedad y recuperadas con volumen conocido de MeOH + H₂O (1+9). Los volúmenes se especifican en cada una de las determinaciones que se muestran en la sección de cálculos para maíz, cacahuete y nuez.

METODOS QUE FUERON PROBADOS PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS
A PARTIR DE MUESTRAS DE MAIZ.

METODO DENOMINADO: HEX-ETER-CLOR.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg de maíz de malla No. 20 se tomaron 50 g y se introdujeron dentro de una columna de vidrio a manera de empaque. Luego se adicionó hexano hasta que ya no eluyera de color amarillo con la finalidad de solubilizar la mayor cantidad de las grasas; esto representó aproximadamente un volumen de 350 ml. Después se adicionaron 100 ml. de éter etílico con la finalidad de extraer otros componentes que no son de interés. Posteriormente se adicionó cloroformo hasta que su elución fuera incolora; esto representó aproximadamente 350 ml.

El extracto clorofórmico se llevó a sequedad a la temperatura de 35 °C. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml mediante cloroformo. El concentrado se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se procedió a la derivatización, se filtró con membrana de 0.45 micras y se inyectó al cromatógrafo.

METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO PARA LA SEPARACION DE AFLATOXINAS
A PARTIR DE MUESTRAS DE MAIZ.

METODO DENOMINADO: LIQUIDO-LIQUIDO.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg de maíz malla No. 20 se tomaron 10 g y se colocaron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se depositaron en el vaso 15 ml de agua destilada, la cual contenía 0.2 g de NaCl. Se dejó reposar cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 30 ml de agua y 20 ml de hexano. Se agitó lentamente con la mano manteniendo cerrado el vaso con la finalidad de que se formara el equilibrio de fases y se evitara alguna explosión. Posteriormente se agitó a alta velocidad durante 3 minutos. Después se filtró el homogenato en embudo Buchner a través de papel filtro de poro ancho.

El filtrado se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 10 min. se tomaron 25 ml. de la fase inferior y se transfirieron a otro embudo de separación. A éste se adicionaron 25 ml. de cloroformo; se agitó con la finalidad de extraer las aflatoxinas. La capa inferior se recogió en un tubo de ensayo y se hizo pasar corriente de nitrógeno para evaporar el solvente. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml en el cual se llevó a sequedad. Se llevó a cabo la derivatización, la muestra se filtró en membrana de 0.45 micras y se inyectó en el cromatógrafo.

EN BUSQUEDA DE UN METODO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS POR FASE SOLIDA INVERSA EN MUESTRAS DE MAIZ. METODO DENOMINADO: DOS COLUMNAS.

PROCEDIMIENTO:

A partir de 1 Kg de maiz de malla número 20 se tomaron 10 g y se introdujeron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron 20 ml. de una mezcla de MeOH + H₂O (80+20) y se agitó por cinco minutos. Aproximadamente 8 ml del homogenato previamente filtrado por poro ancho, se transfirieron a la primera columna, la cual se acondicionò de la siguiente manera.

ACONDICIONAMIENTO DE LA PRIMER COLUMNA.-

Se pesaron 600 mg de fase inversa C-18 y se depositaron dentro de una columna. Posteriormente se adicionaron 6 ml de metanol y se eluyeron mediante bomba de succiòn pero sin dejar secar la fase; despuès se adicionaron 6ml de MeOH + H₂O (80 + 20) y se eluyeron. La fase no se dejò secar en ningùn paso de eluciòn. Posteriormente se adicionò el homogenato. Se eluyò la soluciòn y se tomaron 4 ml. del eluido, los cuales se diluyeron mediante aforaciòn a 10 ml. con agua destilada (no se usò agua desionizada debido al contenido de residuos orgànicos) Estos 10 ml se filtraron con membrana de 0.45 micras y se pasaron por una segunda columna sometida a diferente acondicionamiento.

ACONDICIONAMIENTO DE LA SEGUNDA COLUMNA.

Se adicionaron 6 ml de metanol y se eluyeron; posteriormente se agregaron 6 ml de agua y se eluyeron tambièn. Despuès se pasaron los 10 ml obtenidos, en porciones de 3 en 3 ml.

Posterior a la eluciòn de los 10 mililitros, se adicionaron 6 ml de agua. Despuès se agregaron 2 ml de hexano sin dejar secar la columna y se eluyeron. La fase se secò por 15 minutos mediante bomba de succiòn. Para evitar oxidaciòn de las toxinas por el oxigeno del aire, una corriente de nitrògeno se mantuvo por la parte superior de la columna.

Al tèrmino de los 15 minutos se llevò a cabo la eluciòn de las aflatoxinas; para ello se adicionaron 4 ml de cloroformo repartidos en 3 alicuotas. La primera de ellas fue de 2 ml seguida por dos alicuotas

de 1 ml cada una (85). La elución se colectó en un tubo de ensayo colocado dentro de un matraz kitazato. Posteriormente se transfirió la solución a un vaso de 30 ml. en el cual, bajo corriente de nitrógeno se concentró la muestra a sequedad. Después de esto, se llevó a cabo el procedimiento de derivatización. La muestra ya derivatizada se filtró en membrana de 0.45 micras y se inyectó al cromatógrafo de líquidos.

METODOLOGIA SEGUIDA PARA EVALUAR LA INFLUENCIA QUE EJERCEN SUSTANCIAS DIFERENTES DE LAS AFLATOXINAS B 1, G 1, G 2 Y B 2 EN LAS LECTURAS DIRECTAS POR FLUOROMETRIA PARA EL ANALISIS DE MUESTRAS DE MAIZ, USANDO COMO TECNICA DE REFERENCIA HPLC.

A fin de conocer la influencia que ejercen las sustancias diferentes de las aflatoxinas en las lecturas directas por fluorometria, se llevò a cabo el experimento cuya metodologia se describe a continuación.

Metodología.

Tres muestras de maíz fueron escogidas para realizar los ensayos.

Las muestras se denominaron: Maíz blanco No.1, Maíz blanco No. 2 y Maíz amarillo.

Cada una de las muestras se sometió al mismo tratamiento de extracción en fase sólida, el cual ya se ha descrito anteriormente. (En adelante a este procedimiento de extracción se le llamará SPE).

El tratamiento de cada muestra se hizo como a continuación se describe:

Maíz solo.

Sometida al procedimiento SPE y cuya recuperación se hizo en un volumen final de 2 ml. de una mezcla MeOH + H₂O (1+9).

B) Maíz + Aflatoxinas.

Muestra de maíz más enriquecimiento con 5 ng/g de cada una de las aflatoxinas B 1, G 2 y B 2. Sometida al tratamiento SPE y cuya recuperación se hizo en un volumen final de 2 ml. de una mezcla MeOH + H₂O (1+9). No se hizo derivatización.

C) Maíz + Aflatoxinas + TFA.

Muestra de maíz más enriquecimiento con 5 ng/g de cada una de las aflatoxinas B 1, G 2 y B 2. Sometida al tratamiento SPE y cuya recuperación se hizo en un volumen final de 2 ml. de una mezcla MeOH + H₂O (1+9). Se llevó a cabo el procedimiento de derivatización para incrementar la fluorescencia de B 1.

Formas de análisis.

I. METODO POR FLUORESCENCIA DIRECTA.

II. METODO DE FLUORESCENCIA POR HPLC.

- I. Método de fluorescencia directa. Las mediciones se hicieron comparándose contra un blanco de referencia constituido por una solución de MeOH + H₂O (1+9).
- II. Método de fluorescencia por HPLC. El método usado para la cuantificación fue a base de pesadas en balanza analítica. Los picos correspondientes a los metabolitos y a las aflatoxinas se recortaron y se pesaron. Lo mismo se hizo para el fondo de fluorescencia. El peso total del cromatograma se tomó como el 100% y el porcentaje de cada componente se extrapolo a las lecturas directas.

PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MUESTRAS DE CACAHUATE.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg. de cacahuete de malla No. 20 se tomaron 10 g y se introdujeron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron al vaso 15 ml de agua destilada la cual contenia 0.2 g de NaCl. La mezcla se dejó reposar por cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 30 ml de agua y 20 ml de hexano. Se agitó con la mano manteniendo cerrado el vaso con la finalidad de que se formara el equilibrio de fases y se evitara alguna explosión. Luego se agitó a alta velocidad por 3 minutos. El homogenato se filtró en embudo Buchner, a través de papel de poro ancho.

Una vez filtrado el homogenato, la solución se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 15 minutos, una vez que se separaron las fases, se tomaron 25 ml. de la fase inferior y se vaciaron a otro embudo de separación. Posteriormente se adicionaron 25 ml. de cloroformo. Se agitó con la mano durante un minuto. Se colectó la fase inferior en un tubo de ensayo y se concentró mediante corriente de nitrógeno. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml en el cual se llevó a sequedad. El residuo se derivatizó, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.

METODOS QUE FUERON PROBADOS PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS
A PARTIR DE MUESTRAS DE NUEZ.

METODO: LIQUIDO-LIQUIDO.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg de nuez de malla No. 20 se tomaron 10 g y se introdujeron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron al vaso 15 ml de agua destilada la cual contenia 0.3 g de NaCl. La mezcla se dejó reposar por cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 30 ml de agua y 30 ml de hexano. Se agitó con la mano manteniendo cerrado el vaso. Luego se agitó a alta velocidad por 3 minutos. El homogenato se filtró en embudo Buchner a través de papel de poro ancho.

Una vez filtrado el homogenato, la solución se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 15 minutos, una vez que se separaron las fases, se tomaron 25 ml de la fase inferior y se vaciaron a otro embudo de separación. Posteriormente se adicionaron 25 ml de cloroformo y se agitó con la mano por un minuto. Se recogió la fase inferior en un tubo de ensayo y se concentró mediante corriente de nitrógeno. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml, en el cual se llevo a sequedad. El residuo se derivatizó, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.

METODO: LIQUIDO-LIQUIDO ADICIONANDO 20 ML MAS DE AGUA.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg de nuez de malla No. 20 se tomaron 10 g y se introdujeron a un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron al vaso 15 ml de agua destilada la cual contenia 0.3 g de NaCl. La mezcla se dejó reposar cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 50 ml de agua y 30 ml de hexano. Se agitó con la mano manteniendo cerrado el vaso. Luego se agitó a alta velocidad por 3 minutos. El homogenato se filtró en embudo Buchner a través de papel de poro ancho.

Una vez filtrado el homogenato, la solución se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 15 minutos, una vez que se separaron las fases, se tomaron 25 ml de la fase inferior y se vaciaron a otro embudo de separación. Posteriormente se adicionaron 25 ml de cloroformo y se agitó con la mano por un minuto. Se recogió la fase inferior en un tubo de ensayo y se concentró mediante corriente de nitrógeno. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml, en el cual se llevó a sequedad. El residuo se derivatizó, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.

METODO PROBADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MUESTRAS DE NUEZ.

METODO DENOMINADO: LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg. de nuez de malla No. 20 se tomaron 10 g y se introdujeron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron al vaso 15 ml. de agua destilada la cual contenia 0.3 g de NaCl. La mezcla se dejó reposar por cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 30 ml de agua y 30 ml de hexano. Se agitó con la mano manteniendo cerrado el vaso con la finalidad de que se formara el equilibrio de fases y se evitara alguna explosión. Luego se agitó a alta velocidad por 3 minutos. El homogenato se filtró en embudo Buchner a través de papel de poro ancho.

Una vez filtrado el homogenato, la solución se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 15 minutos, una vez que se separaron las fases, se tomaron 25 ml de la fase inferior y se vaciaron a otro embudo de separación. Posteriormente se adicionaron 25 ml de una mezcla de cloroformo y tetracloruro de carbono (15 + 10). Se agitó con la mano durante 1 minuto. Se recogió la fase inferior en un tubo de ensayo y se concentró mediante corriente de nitrógeno. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml, en el cual se llevó a sequedad. El residuo se derivatizó, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.

METODOLOGIA SEGUIDA EN LOS CALCULOS PARA OBTENER LOS PORCENTAJES DE RECUPERACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE MAIZ.

MUESTRA: BLANCO PARA EVALUAR LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS SIN EMPLEAR MAIZ (FIG. 12).

CONCENTRACION: Se supuso una contaminación equivalente a:

G1 : 7 ng/g G2: 80 ng/g
 B1 : 4 ng/g B2: 60 ng/g

Volumen de recuperación 2 ml.
 Sensibilidad: 30 X 2 mv.
 Detector: Sequoia-Turner.

Todos los cálculos están hechos en base a alturas corregidas.

EJEMPLO:

Cálculos para G 1:

Altura de solución normalizada de G 1 de 57.5 ng/ml. : 16.5 cm

Ancho de la base a la mitad de la altura del pico: 0.2 cm

Por proporciones:

Muestra:	(16.5 cm)	(0.2 cm)	----->	57.5 ng/ml.
	(1.8 cm)	(0.2 cm)	----->	X = 6.27 ng/ml.
	1 ml.		----->	6.27 ng
	2 (vol. de recup)		----->	X= 12.54 ng
	4ml (alícuota)		----->	12.54 ng
	20ml (totales)		----->	X= 62.7 ng.
	10 g (totales)		----->	62.7 ng.
	1 g		----->	X= 6.27 ng/g = 6.27 ppb

A los supuestos 10 gramos de muestra (es decir, a los 20 ml.) se adicionaron 70 ng, es decir, equivalente a 7 ppb.

Así: 7 ppb -----> 100 %
 6.27 ppb -----> 89.6 % de recuperación.

A partir de este ejemplo, se ha construido la siguiente ecuación para el porcentaje de recuperación en muestras de MAIZ.

$$(H_m) (B_m) (C_s) (1/H_s B_s) (V) (5) (1/10) (100 / E) = \%$$

Donde:

- H m : Altura del pico de la aflatoxina cuyo porcentaje de recuperación se desea conocer.
- B m : Ancho de la base a la mitad de la altura del pico de la aflatoxina cuyo porcentaje de recuperación se desea conocer.
- C s : Concentración de solución normalizada (estándar).
- B s : Ancho de la base a la mitad de la altura del pico de la solución normalizada (estándar).
- H s : Altura del pico de la solución normalizada (estándar).
- V : Volumen de recuperación de la muestra
- 5 : Valor que corresponde a la quinta parte (4 ml.) del total (20 ml.) del volumen de extracción.
- 1/10: Valor que convierte el total de aflatoxina en aflatoxina/gramo de muestra.
- 100 : Valor de referencia al 100%.
- E : La cantidad en ng de aflatoxina/gramo de muestra con que se enriqueció la muestra analizada.

Cálculos para el porcentaje de recuperación de Aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

H m : 1 cm.	B s: 0.2 cm.
B m : 0.2 cm,	V : 2 ml.
C s : 63 ng/ml	E : 4 ng/g
H s : 18.5 cm.	

$$(1 \text{ cm}) (0.2) (63) [1 / (18.4) (0.2)] (2 \text{ ml.}) (5) (1/10) (100/4) = 85.6 \%$$

Aflatoxina G 1:

Hm: 1.8 cm.	Bs: 0.2 cm
Bm: 0.2 cm	V : 2 ml.
Cs: 57.5 ng/ml.	E: 7 ng/g
Hs: 16.5 cm.	

$$(1.8) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/7) = 89.6 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 8.5 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 2 ml.
Cs: 14 ng/ml E: 80 ng/g
Hs: 1.7 cm

$$(8.5) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/80) = 87.5 \%$$

Aflatoxina B 2 :

Hm: 7.7 cm Bs: 0.3 cm
Bm: 0.3 cm V: 2 ml.
Cs: 18 ng/ml E: 60 ng/g.
Hs: 2.5 cm

$$(7.7) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (2) (5) (1/10) (100/60) = 92.4 \%$$

MUESTRA: BLANCO PARA EVALUAR LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS SIN EMPLEAR MAIZ (FIG. 13).

Se supuso una contaminación equivalente a :

G 1: 10 ng/g G 2: 70 ng/g
B 1: 4 ng/g B 2: 50 ng/g

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas:

Aflatoxina G1 :

Hm: 2.4 cm. Bs: 0.2cm
Bm: 0.2 cm. V: 2 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. E: 10 ng/g.
Hs: 16.5 cm.

$$(2.4) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/10) = 83.6 \%$$

Aflatoxina B1:

Hm: 1 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 2 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 4 ng/g.
Hs: 18.5 cm

$$(1) (0.2) (63) [1 / (18.5) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/4) = 85.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 7.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 2 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 70 ng/g.
Hs: 1.7 cm

$$(7.5) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/70) = 88.2 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 6.4. Bs: 0.3 cm
Bm: 0.3 cm. V: 2 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 50 ng/g.
Hs: 2.5 cm.

$$(6.4) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (2) (5) (1/10) (100/50) = 92.1\%$$

MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL USADO COMO CONTROL (FIG. 14).

Esta muestra no está enriquecida, sin embargo presentó contaminación natural de aflatoxinas, por ello a continuación se exponen los cálculos para encontrar la concentración de cada una.

En los siguientes cálculos se incluirá el valor de P.R.

Donde: P.R. = Porcentaje de recuperación promedio obtenido para cada aflatoxina.

La ecuación queda así:

$$(Hm) (Bm) (Cs) [1 / HsBs] (V) (5) (1/10) (100/P.R.) = ng/g$$

Aflatoxina G 1 :

Hm: 2 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 1 ml.
Cs: 57.5 ng/g. P.R.: 92%
Hs: 16.5 cm.

$$(2) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (1) (5) (1/10) (100/92) = 3.8 \text{ ng/g} *$$

* para efectos prácticos este valor se aproximó a 4.0 ng/g

Aflatoxina B 1 :

Hm: 8 cm. Bs: 0.2 cm.
Hm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 63 ng/ml. P.R.: 85 %
Hs: 7.4 cm.

$$(8)(0.2)(63)[1/(7.4)(0.2)](1)(5)(1/10)(100/85) = 40 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina G 2: No se detectò a la máxima sensibilidad del detector. (30 x 2 mv).

El límite de detección de G 2 (ver más adelante los cálculos), equivale a 1.0 ng de G 2 por gramo de muestra de maíz. De aquí se concluye que la muestra analizada contiene menos de 1.0 ng/g.

Aflatoxina B 2:

Hm: 3.8 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 1 ml.
Cs: 18 ng/ml P.R. 93.5 %
Hs: 2.5 cm

$$(3.8)(0.3)(18)[1/(2.5)(0.3)](1)(5)(1/10)(100/93.5) = 14.6 \text{ ng/g.}^*$$

* para efectos prácticos, se aproximò a 15 ng/g.

MUESTRA: MAIZ AMARILLO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 15):

G 1: 12 ng/g. G 2: 75 ng/g
B 1: 2.5 ng/g B 2: 60 ng/g

Debido a que la muestra control presentò contaminación natural de aflatoxinas, se introducirà en las ecuaciones la variable "Cn" cuando así sea necesario.

Cn: Contaminación natural en ng de aflatoxina por gramo de muestra.

Así, la ecuación quedará:

$$(Hm)(Bm)(Cs)[1/HsBs](V)(5)(1/10)[100/(Cn+E)] = P.R.$$

Aflatoxina G 1:

Hm: 8.1 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. E: 12 ng/g
Hs: 16.5 cm. Cn: 4 ng/g

$$(8.1) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (1) (5) (1/10) [100 / (4+12)] = 88.2 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 8.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 2.5 ng/g
Hs: 7.4 cm. Cn: 40 ng/g.

$$(8.5) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (1) (5) (1/10) [100 / (40+2.5)] = 85.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 15.9 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 1 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 75 ng/g.
Hs: 1.7 cm. Cn: menos de 3.5 ng/g . Para efectos
de cálculos se consideró como cero.

$$(15.9) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (1) (5) (1/10) (100/75) = 87.3\%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 19.5 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm V: 1 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 60 ng/g.
Hs: 2.5 cm Cn: 15 ng/g.

$$(19.5) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (1) (5) (1/10) [100 / (15+60)] = 93.6 \%$$

MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL CON AFLATOXINAS (FIG. 16).

Cálculos para obtener los niveles de contaminación natural.

Aflatoxina G 1:

Hm: 0.6 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 57.5 ng/ml P.R. 92 %
Hs: 6.8 cm.

$$(0.6) (0.2) (57.5) [1 / (6.8) (0.2)] (1) (5) (1/10) (100/92) = 2.75 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 11 cm. Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm. V : 1 ml.
Cs: 63 ng/g P.R. 85 %
Hs: 7.4 cm

$$(11) (0.5) (63) [1 / (7.4) (0.5)] (1) (5) (1/10) (100/85) = 55.1 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 1.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 14 ng/ml. P.R.: 86.5 %
Hs: 1.7 cm

$$(1.5) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (1) (5) (1/10) (100/86.5) = 7.1 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 2.5 cm. Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm. V: 1 ml.
Cs: 18 ng/ml. P.R.: 93.5 %
Hs: 2.5 cm.

$$(2.5) (0.4) (18) [1 / (2.5) (0.4)] (1) (5) (1/10) (100/93.5) = 9.6 \text{ ng/g}$$

MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL¹ CON AFLATOXINAS (FIG. 17).

Cálculos para obtener los niveles de contaminación natural.

Aflatoxina G 1:

Hm: 3.6 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. P.R. 92 %
Hs: 16.5 cm.

$$(3.6) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/92) = 20.5 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 9.2 cm. Hs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 63 ng/ml. P.R.: 85 %
Hs: 7.4 cm.

$$(9.2) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/85) = 138.2 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 1.5 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 14 ng/ml. P.R.: 86.5 %
Hs: 1.7 cm.

$$(1.5) (0.3) (14) [1 / (1.7) (0.3)] (3) (5) (1/10) (100/86.5) = 21.5 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 8.7 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 18 ng/ml. P.R.: 93.5 %
Hs: 2.5 cm.

$$(8.7) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (3) (5) (1/10) (100/93.5) = 100.4 \text{ ng/g.}$$

MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL CON AFLATOXINAS (FIG. 18).

Cálculos para obtener los niveles de contaminación natural.

Aflatoxina G 1:

Hm: 3.3 cm. Bs: 0.2 cm.
Hm: 0.2 cm V: 3 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. P.R.: 92 %
Hs: 16.5 cm.

$$(3.3) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/92) = 18.7 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 10.6 cm.
Bm: 0.2 cm.
Cs: 63 ng/ml.
Hs: 7.4 cm.

Bs: 0.2 cm.
V: 3 ml.
P.R.: 85 %

$$(10.6) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/85) = 159.2 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2 :

Hm: 1.6 cm.
Bm: 0.2 cm.
Cs: 14 ng/ml.
Hs: 1.7 cm

Bs: 0.2 cm.
V: 3 ml.
P.R.: 86.5 %

$$(1.6) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/86.5) = 22.8 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2 :

Hm: 3.5 cm.
Bm: 0.3 cm.
Cs: 18 ng/ml
Hs: 2.5 cm

Bs: 0.3 cm.
V: 3 ml.
P.R.: 93.5%

$$(3.5) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (3) (5) (1/10) (100/93.5) = 40.4 \text{ ng/g.}$$

MUESTRA: MAIZ BLANCO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL USADO
COMO CONTROL (FIG. 19).

Esta muestra no está enriquecida, sin embargo presentó contaminación natural de aflatoxina B 1; es por ello que a continuación se presentan los cálculos para conocer los niveles de contaminación.

Aflatoxina G 1: No se detectó a la sensibilidad utilizada (30 x 5 mv); de acuerdo con el límite de detección se establece que su contenido es menor a 5 ng/g

Aflatoxina B 1:

Hm: 3.6 cm	Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm.	V: 4 ml.
Cs: 63 ng/ml.	P.R.: 85 %
Hs: 7.4 cm	

$(3.6) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (4) (5) (1/10) (100/85) = 72.1 \text{ ng/g}$

Aflatoxina G 2: No se detectó, la muestra tiene menos de 3.5 ng/g.

Aflatoxina B 2: No se detectó, la muestra tiene menos de 2.3 ng/g.

MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 20):

G 1: 12 ng/g	G 2: 25 ng/g
B 1: 10 ng/g	B 2: 52 ng/g

Cálculos para conocer los porcentajes de recuperación:

Aflatoxina G 1:

Hm: 1.3 cm	Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm.	V: 2 ml.
Cs: 57.5 ng/ml.	E: 12 ng/g.
Hs: 6.8 cm.	

$(1.3) (0.2) (57.5) [1 / (6.8) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/12) = 91.6 \%$

Aflatoxina B 1:

Hm: 8.2 cm.	Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm.	V: 2 ml.
Cs: 63 ng/ml.	E: 10 ng/g.
Hs: 7.4 cm	Cn: 72 ng/g.

$$(8.2) (0.4) (63) [1 / (7.4) (0.4)] (2) (5) (1/10) [100 / (72+10)] = 85.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 1.1 cm	Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm.	V: 2 ml.
Cs: 14 ng/ml.	E: 25 ng/g.
Hs: 0.7 cm.	

$$(1.1) (0.2) (14) [1 / (0.7) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/25) = 88 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 2.4 cm.	Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm.	V: 2 ml.
Cs: 18 ng/ml.	E: 52 ng/g
Hs: 0.9 cm.	

$$(2.4) (0.3) (18) [1 / (0.9) (0.3)] (2) (5) (1/10) (100/52) = 92.3 \%$$

MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 21).

G 1: 60 ng/g.	G 2: 120 ng/g
B 1: 42 ng/g.	B 2: 450 ng/g

Cálculos para conocer los porcentajes de recuperación.

Aflatoxina G 1:

Hm: 8.3 cm.	Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm.	V: 4 ml.
Cs: 57.5 ng/ml.	E: 60 ng/g.
Hs: 16.5 cm	

$$(8.3) (0.1) (57.5) [1 / (16.5) (0.1)] (4) (5) (1/10) (100/60) = 96.4 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.7 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 4 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 42 ng/g
Hs: 7.4 cm. Cn: 72 ng/g.

$$(5.7) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (4) (5) (1/10) [100 / (72+42)] = 85.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 6.4 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 4 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 120 ng/g.
Hs: 1.7 cm.

$$(6.4) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (4) (5) (1/10) (100/120) = 87.8 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 10.3 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 4 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 450 ng/g
Hs: 0.9 cm.

$$(10.3) (0.3) (18) [1 / (0.9) (0.3)] (4) (5) (1/10) (100/450) = 91.5 \%$$

MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 22).

G 1: 60 ng/g. G 2: 130 ng/g.
B 1: 35 ng/g. B 2: 500 ng/g.

Aflatoxina G 1:

Hm: 3.3 cm. Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm. V: 4 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. E: 60 ng/g.
Hs: 6.8 cm.

$$(3.3) (0.1) (57.5) [1 / (6.8) (0.1)] (4) (5) (1/10) (100/60) = 93 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.3 Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 4 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 35 ng/g.
Hs: 7.4 cm. Cn: 72 ng/g.

$$(5.3) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (4) (5) (1/10) [100 / (72+35)] = 84.3 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 2.8 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 4 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 130 ng/g
Hs: 0.7 cm.

$$(2.8) (0.2) (14) [1 / (0.7) (0.2)] (4) (5) (1/10) (100/130) = 86.1 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 12 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 4 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 500 ng/g
Hs: 0.9 cm.

$$(12) (0.3) (18) [1 / (0.9) (0.3)] (4) (5) (1/10) (100/500) = 96 \%$$

METODOLOGIA SEGUIDA EN LOS CALCULOS PARA OBTENER PORCENTAJES DE RECUPERACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE CACAHUATE.

La ecuación que se usa para el cálculo de los porcentajes de recuperación de aflatoxinas para el cacahuete incorpora la constante del factor de dilución el cual corresponde a:

$$F.D. = 130/25 = 5.2$$

Donde: 130 : volumen total ocupado por los solventes usados en la extracción.

25 : volumen de la alicuota que se ocupa del volumen total de solventes.

Cálculos para determinar la concentración de aflatoxinas en la muestra usada como control.

MUESTRA DE CACAHUATE USADA COMO CONTROL (FIG. 23):

Aflatoxina G 1:

Hm: 5 cm. Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm. V: 1 ml.
Cs: 5.7 ng/ml.
Hs: 10.8 cm.

$$(5)(0.1)(5.7)[1/(10.8)(0.1)](1)(5.2)(1/10) = 1.3 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 4 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 0.55 ng/ml.
Hs: 2 cm.

$$(4)(0.2)(0.55)[1/(2)(0.2)](1)(5.2)(1/10) = 0.5 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 4 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 6.5 ng/ml
Hs: 14 cm

$$(4)(0.2)(6.5)[1/(14)(0.2)](1)(5.2)(1/10) = 0.96 \text{ ng/g.}$$

Aprox: 1 ng/g.

Aflatoxina B 2:

Hm: 5.8 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 1 ml.
Cs: 0.51 ng/ml.
Hs: 2 cm.

$$(5.8) (0.3) (0.5) [1 / (2) (0.3)] (1) (5.2) (1/10) = 0.75 \text{ ng/g.}$$

Aprox: 0.8 ng/g.

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 24):

G 1: 15 ng/g. G 2: 20 ng/g.
B 1: 10 ng/g. B 2: 15 ng/g.

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina G 1 :

Hm: 6.7 cm Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.7 ng/ml. E: 15 ng/g
Hs: 4.3 cm. Cn: 1.3 ng/g

$$(6.7) (0.1) (5.7) [1 / (4.3) (0.1)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (15+1.3)] = 84.9 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 9.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.5 ng/ml. E: 10 ng/g.
Hs: 8.8 cm. Cn: 0.5 ng/g.

$$(9.5) (0.2) (5.5) [1 / (8.8) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (10+0.5)] = 88.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 10.4 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 6.5 ng/ml E: 20 ng/g.
Hs: 5.6 cm. Cn: 1 ng/g.

$$(10.4) (0.2) (6.5) [1 / (5.6) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (20+1)] = 89.6 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 13.3 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.1 ng/ml. E: 15 ng/g
Hs: 8.1 cm. Cn: 0.8 ng/g.

$$(13.3) (0.3) (5.1) [1 / (8.1) (0.3)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (15+0.80)] = 82.6\%$$

MUESTRA : CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 25):

G 1: 60 ng/g. G 2: 120 ng/g
B 1: 50 ng/g B 2: 70 ng/g

Calculos para encontrar los porcentajes de recuperaci3n.

Aflatoxina G 1:

Hm: 6.6 cm. Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm. V: 3 ml.
Cs: 57 ng/ml. E: 60 ng/g
Hs: 10.8 cm. Cn: 1.3 ng/g

$$(6.6) (0.1) (57) [1 / (10.8) (0.1)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (60+1.3)] = 88.6 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 10.4 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.5 ng/ml E: 50 ng/g.
Hs: 2.2 cm Cn: 0.5 ng/g

$$(10.4) (0.2) (5.5) [1 / (2.2) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (50+0.5)] = 80.3 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 15.3 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 65 ng/ml. E: 120 ng/g.
Hs: 14 cm Cn: 1 ng/g.

$$(15.3) (0.3) (65) [1 / (14) (0.3)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (120+1)] = 91.6\%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 16.1 cm. Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.1 ng/ml. E: 70 ng/g
Hs: 2 cm. Cn: 0.8 ng/g

$$(16.1) (0.4) (5.1) [1 / (2) (0.4)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (70+0.8)] = 90.4 \%$$

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 27):

B 1: 110 ng/g G 2: 172 ng/g B 2: 150 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación:

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 100 ng/ml. E: 110 ng/g
Hs: 8.7 cm. Cn: 0.5 ng.

$$(5.5) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (110+0.5)] = 89.2\%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 6.6 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 3 ml.
Cs: 200 ng/ml. E: 172 ng/g
Hs: 13.7 cm Cn: 1 ng/g

$$(6.6) (0.2) (200) [1 / (13.7) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (172+1)] = 86.8 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 7.1 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 30 ng/ml. E: 150 ng/g
Hs: 2.4 cm Cn: 0.8 ng/g

$$(7.1) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (150+0.8)] = 91.8$$