

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 26):

B 1: 150 ng/g G 2: 250 ng/g B 2: 210 ng/g

Cálculos para encontrar el porcentaje de recuperación:

Aflatoxina B 1:

Hm: 7.1 cm.	Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm.	V: 3 ml.
Cs: 100 ng/ml.	E: 150 ng/g
Hs: 8.7 cm.	Cn: 0.5 ng/g.

$$(7.1) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (150 + 0.5)] = 84.5\%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 9.5 cm.	Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm	V: 3 ml.
Cs: 200 ng/ml.	E: 250 ng/g
Hs: 13.7 cm.	Cn: 1 ng/g.

$$(9.5) (0.2) (200) [1 / (13.7) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (250 + 1)] = 86.2 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 10.4 cm.	Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm.	V: 3 ml.
Cs: 30 ng/ml.	E: 210 ng/g
Hs: 2.4 cm	Cn: 0.8 ng/g.

$$(10.4) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (210 + 0.8)] = 96.2 \%$$

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 28):

B 1 : 32 ng/g G 2: 24 ng/g B 2: 20 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación.

Aflatoxina B 1:

Hm: 9 cm.	Bs: 0.2 cm.
-----------	-------------

Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 100 ng/ml. E: 32 ng/g
Hs: 17.4 cm. Cn: 0.5 ng/g.

$$(9) (0.2) (100) [1 / (17.4) (0.2)] (1) (5.2) (1/10) [100 (32+0.5)] = 82.7 \%$$

Aflatoxina G 2 :

Hm: 4.8 cm Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm. V: 1 ml.
Cs: 25 ng/ml. E: 24 ng/g.
Hs: 3.2 cm Cn: 1 ng/g.

$$(4.8) (0.4) (25) [1 / (3.2) (0.4)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (24+1)] = 78.0 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 6.9 cm. Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm V: 1 ml.
Cs: 20 ng/ml. E: 20 ng/g
Hs: 4.2 cm Cn: 0.8 ng/g.

$$(6.9) (0.5) (20) [1 / (4.2) (0.5)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (20+0.8)] = 82.1 \%$$

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 29):

B 1: 15 ng/g G 2: 19 ng/g B 2: 15 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación.

Aflatoxina B 1 :

Hm: 8.5 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 10 ng/g. E: 15 ng/g.
Hs: 3.5 cm. Cn: 0.5 ng/g.

$$(8.5) (0.2) (10) [1 / (3.5) (0.2)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (15+0.5)] = 81.4 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 16.4 cm.	Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm.	V: 1 ml.
Cs: 25 ng/ml.	E: 19 ng/g
Hs: 13 cm.	Cn: 1 ng/g.

$$(16.4) (0.4) (25) [1 / (13) (0.4)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (19+1)] = 82.0 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 11 cm.	Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm.	V: 1 ml.
Cs: 20 ng/ml.	E: 15 ng/g
Hs: 8.5 cm	Cn: 0.8 ng/g.

$$(11) (0.5) (20) [1 / (8.5) (0.5)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (15+0.8)] = 85.1 \%$$

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

MUESTRA: NUEZ SIN ENRIQUECER USADA COMO CONTROL.

OBSERVACION: La muestra no presentó contaminación natural de ninguna aflatoxina.

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

$$F.D. = 140/25 = 5.6.$$

Donde: 140 : Volumen total ocupado por los solventes usados en la extracción.

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

Debido a que la muestra que fue usada como control no presentó contaminación natural de aflatoxinas, a continuación se presentan las muestras que fueron enriquecidas.

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 33):

B 1: 15 ng/g

G 2: 20 ng/g

B 2: 16 ng/g

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de las aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 8.4 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 1 ml.
Cs: 10 ng/ml. E: 15 ng/g.
Hs: 3.5 cm

$$(8.4) (0.2) (10) [1 / (3.5) (0.2)] (1) (5.6) (1/10) (100/15) = 89.6 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 8.2 Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm. V: 1 ml.
Cs: 25 ng/ml. E: 20 ng/g.
Hs: 6.5 cm

$$(8.2) (0.4) (25) [1 / (6.5) (0.4)] (1) (5.6) (1/10) (100/20) = 88.3 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 11.1 cm. Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm. V: 1 ml.
Cs: 20 ng/ml. E: 16 ng/g .
Hs: 8.6 cm.

$$(11.1) (0.5) (20) [1 / (8.6) (0.5)] (1) (5.6) (1/10) (100/16) = 90.3 \%$$

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 34):

B1: 30 ng/g G 2: 25 ng/g B 2: 20 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 16.8 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 1 ml.
Cs: 10 ng/ml. E: 30 ng/g.
Hs: 3.5 cm

$$(16.8) (0.2) (10) [1 / (3.5) (0.2)] (1) (5.6) (1/10) (100/30) = 89.6 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 9.1 cm. Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm V: 1 ml.
Cs: 25 ng/ml. E: 25 ng/g.
Hs: 6.4 cm.

$$(9.1) (0.4) (25) [1 / (6.4) (0.4)] (1) (5.6) (1/10) (100/25) = 80.0 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 13.0 cm Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm. V: 1 ml.
Cs: 20 ng/ml. E: 20 ng/g.
Hs: 8.6 cm.

$$(13.0) (0.5) (20) [1 / (8.6) (0.5)] (1) (5.6) (1/10) (100/20) = 85.0 \%$$

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 35):

B 1: 110 ng/g G 2: 170 ng/g B 2: 150 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.2 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 100 ng/ml. E: 110 ng/g
Hs: 8.7 cm

$$(5.2) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.6) (1/10) (100/110) = 91.2 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 6 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 200 ng/ml. E: 170 ng/g
Hs: 13.7 cm.

$$(6) (0.3) (200) [1 / (13.7) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/170) = 86.6 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 6.7 cm.
Bm: 0.3 cm.
Cs: 30 ng/ml
Hs: 2.4 cm

Bs: 0.3 cm.
V: 3 ml.
E: 150 ng/g.

$$(6.7) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/150) = 93.8 \%$$

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 36):

B 1: 160 ng/g

G 2: 270 ng/g

B 2: 240 ng/g

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 7.3 cm
Bm: 0.2 cm.
Cs: 100 ng/ml.
Hs: 8.7 cm.

Bs: 0.2 cm.
V: 3 ml.
E: 160 ng/g.

$$(7.3) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.6) (1/10) (100/160) = 88.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 9.8 cm.
Bm: 0.3 cm.
Cs: 200 ng/ml.
Hs: 13.7 cm

Bs: 0.3 cm.
V: 3 ml.
E: 270 ng/g.

$$(9.8) (0.3) (200) [1 / (13.7) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/270) = 89.0 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 10.9 cm.
Bm: 0.3 cm.
Cs: 30 ng/ml.
Hs: 2.4 cm

Bs: 0.3 cm.
V: 3 ml.
E: 240 ng/g.

$$(10.9) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/240) = 95.4 \%$$

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 37):

B 1: 120 ng/g

G 2: 170 ng/g

B 2 : 160 ng/g

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.5 cm.

Bs: 0.2 cm.

Bm: 0.2 cm.

V: 3 ml.

Cs: 100 ng/ml.

E: 120 ng/g.

Hs: 8.7 cm.

$$(5.5) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.6) (1/10) (100/120) = 88.5 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 6.5 cm.

Bs: 0.3 cm.

Bm: 0.3 cm.

V: 3 ml.

Cs: 200 ng/ml.

E: 170 ng/g.

Hs: 13.7 cm

$$(6.5) (0.3) (200) [1 / (13.7) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/170) = 93.7 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 7.1 cm.

Bs: 0.3 cm.

Bm: 0.3 cm.

V: 3 ml.

Cs: 30 ng/ml.

E: 160 ng/g.

Hs: 2.4 cm.

$$(7.1) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/160) = 93.1 \%$$

METODOLOGIA PARA LA EVALUACION DE LOS METODOS ANALITICOS

CALCULOS PARA OBTENER LOS LIMITES DE DETECCION DE LAS AFLATOXINAS

Definición.

Límite de detección. Es la mínima concentración de un analito a la cual el detector responde en forma directa a una señal equivalente al doble de su ruido.

METODOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

DETECCION POR FLUORESCENCIA MOLECULAR

MUESTRAS DE MAIZ .-

Aflatoxina B 1 derivatizada.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 30 x
Atenuación del registrador: 5 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Se seleccionó la muestra denominada "maíz amarillo contaminado en forma natural usado como control" que contenía 40 ng/g y cuya altura del pico fue de 8 cm. Se comparó con la muestra enriquecida de 2.5 ng/g de B 1, cuya altura fue de 8.5 cm. Así, se infiere que la altura remanente se debe al enriquecimiento:

Así, tenemos:

8.5 cm -- 8.0 cm = 0.5 cm ----> 2.5 ng/g

El doble del ruido: 0.1 cm ----> x = 0.5 ng/g. = Límite de detección.

A partir de este ejemplo se ha construido la siguiente ecuación para el cálculo de los límites de detección de aflatoxinas en maíz por HPLC-Fluorescencia.

$(C_m) (D) (1/H_a) = \text{Límite de detección.}$

Donde:

C_m : Concentración de la aflatoxina cuyo límite de detección se desea conocer.

H_a : Altura del pico de la aflatoxina cuyo límite de detección se desea conocer.

D : Doble del ruido del detector ante el cual se realizó el cromatograma.

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 30 x
Atenuación del registrador: 2 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Maíz amarillo contaminado en forma natural usado como control" (FIG. 14).

C_m : 4 ng/g.
 H_a : 2 cm.
 D : 0.2 cm.

$(4) (0.2) (1/2) = 0.4 \text{ ng / g}$

Aflatoxina G 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 30 x
Atenuación del registrador: 2 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: " Maiz amarillo contaminado en forma natural "
(FIG. 16).

Cm: 7.1 ng/g.

Ha: 1.5 cm.

D: 0.2 mv.

$$(7.1) (0.2) (1/1.5) = 0.95 , \text{ Aprox. } 1 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 30 x

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: " Maiz amarillo contaminado en forma natural "
(FIG. 16).

Cm: 9.6 ng/g.

Ha: 2.5 cm.

D: 0.2 cm.

$$(9.6) (0.2) (1/2.5) = 0.77 \quad \text{Aprox. } 0.8 \text{ ng/g.}$$

MUESTRAS DE CACAHUATE

Aflatoxina B 1 derivatizada

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Control" (FIG. 23).

Cm: 0.5 ng/g.

Ha: 4 cm.

D: 0.6 cm

$$(0.5) (0.6) (1/4) = 0.075 \quad \text{Aprox. } 0.08 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Control" (FIG. 23).

Cm: 1.3 ng/g

Ha: 5 cm.

D: 0.6 cm.

$$(1.3) (0.6) (1/5) = 0.15 \text{ ng / g}$$

Aflatoxina G 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Control" (FIG. 23).

Cm: 1 ng/g

Ha: 4 cm.

D: 0.6 cm.

$$(1) (0.6) (1/4) = 0.15 \text{ ng / g}$$

Aflatoxina B 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Control" (FIG. 23).

Cm: 0.75 ng/g

Ha: 5.8 cm.

D: 0.6 cm.

$$(0.75) (0.6) (1/5.8) = 0.077 \text{ Aprox. } 0.08 \text{ ng/g}$$

MUESTRAS DE NUEZ.

Aflatoxina B 1 derivatizada

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 10 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Muestra enriquecida" (FIG. 33).

Cm: 15 ng/g.

Ha: 8.4 cm.

D: 0.1 cm.

$$(15) (0.1) (1/8.4) = 0.18 \text{ ng / g.}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

A fin de obtener el límite de detección para la nuez, se tomó la relación de límites de detección entre B 1 y G 1 del cacahuate, la cual se expone a continuación:

$$G 1 / B 1 = 0.156 / 0.08 = 1.95 \text{ Aprox. } 2 \text{ ng/g.}$$

Así, el valor de 2 se tomará como parámetro para referirlo al límite de detección de B 1 a partir de nuez. Suponiendo que G 1 se hubiera registrado a las siguientes condiciones:

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Límite de detección de B 1 a partir de nuez: 0.18 ng/g.

Así, tendríamos para G 1 a partir de nuez: $0.18 \times 2 = 0.36$ ng/g.

Aflatoxina G 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Muestra enriquecida" (FIG. 33).

Cm: 20 ng/g.
Ha: 8.2 cm.
D: 0.1 cm.

$(20) (0.1) (1/8.2) = 0.24$ ng / g

Aflatoxina B 2

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Muestra enriquecida" (FIG. 33).

Cm: 16 ng/g.
Ha: 11.1 cm
D: 0.1 cm.

$(16) (0.1) (1/11.1) = 0.14$ ng / g.

MÉTODOS DE CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

DETECCIÓN POR ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA

Los límites de detección para estándares se pueden observar a continuación. Sin embargo, si se quisieran conocer aquellos que se esperarían para muestras contaminadas de maíz, cacahuate y nuez, a continuación se presentan los cálculos sugeridos para ello.

LÍMITES DE DETECCIÓN QUE SE ESPERARÍAN PARA MAÍZ

Aflatoxina B₁

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 956 ng/ml.
Ha: 4.1 cm.
D: 0.5 cm.

Así, se obtiene:

$(956) (0.5) (1/4.1) = 116.5 \text{ ng/ml}$ Valor del límite de detección para el estándar:

L_s

A fin de calcular el límite de detección de la aflatoxina que sería obtenido a partir de muestras de maíz, se toma en cuenta el proceso de extracción y el porcentaje de recuperación como se indica a continuación.

Así, la ecuación queda:

$(L_s) (F.D.) (V) (1/10) (100 / P.R.) = \text{Límite de detección sugerido.}$

Sustituyendo:

$$(116.5 \text{ ng/ml}) (5) (1 \text{ ml}) (1/10 \text{ g}) (100/85) = 68.2 \text{ ng/g}$$

Valor del límite de detección para la aflatoxina.

Aflatoxina G 1.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador 10 mv.
Volumen de recuperación : 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 658 ng/ml. Ha: 4.1 cm P.R. 92 %
D: 0.5 cm. F.D. 5

$$(658) (0.5) (1/4.1) = \text{Ls: } 80.2 \text{ ng/ml.}$$

$$(80.2) (5) (1) (1/10) (100/92) = 43.6 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 1020 ng/ml Ha: 10.2 cm P.R.: 86.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5

$$(1020) (0.5) (1/10.2) = 50 \text{ ng/ml}$$

$$(50) (5) (1) (1/10) (100/86.5) = 29 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B2

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 984 ng/ml. Ha: 10.6 cm P.R.: 93.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5

$(984) (0.5) (1/10.6) = 46.4 \text{ ng/ml.}$

$(46.4) (5) (1) (1/10) (100/93.5) = 25 \text{ ng/g.}$

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA CACAHUATE

Aflatoxina B1.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 956 ng/ml. Ha: 4.1 cm P.R.: 84.2 %
D: 0.5 cm. F.D. 5.2

$(956) (0.5) (1/4.1) = 116 \text{ ng/ml.}$

$(116) (5.2) (1) (1/10) (100 / 84.2) = 71.6 \text{ Aprox. } 72 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina G 1.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 658 ng/ml. Ha: 4.1 cm P.R.: 92 %
D: 0.5 cm F.D.: 5.2

$(658) (0.5) (1/4.1) = 80.2 \text{ ng/ml.}$

$(80.2) (5.2) (1) (1/10) (100/92) = 45.3 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina G 2.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 1020 ng/ml. Ha: 10.2 cm P.R.: 86.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5.2

$(1020) (0.5) (1/10.2) = 50 \text{ ng/ml.}$

$(50) (5.2) (1) (1/10) (100/86.5) = 30 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina B 2.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 984 ng/ml. Ha: 10.6 cm P.R.: 93.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5.2

$(984) (0.5) (1/10.6) = 46.4 \text{ ng/ml}$

$(46.4) (5.2) (1) (1/10) (100/93.5) = 25.8 \text{ Aprox. } .26 \text{ ng/g.}$

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA NUEZ.

Aflatoxina B 1.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 956 ng/ml. Ha: 4.1 cm P.R.: 89.4 %
D: 0.5 cm F.D. 5.6

$(956) (0.5) (1/4.1) = 116 \text{ ng/ml.}$

$(116) (5.6) (1) (1/10) (100/89.4) = 72.6 \text{ Aprox. } 73 \text{ ng/g}$

Aflatoxina G 1.

Si se asume que la relación de los límites de detección entre G 1 y B 1 se mantuviera igual en la nuez como en el cacahuate, tendríamos:

$$G 1 / B 1 = 45.3 / 72 = 0.63$$

Así, el valor de 0.63 se tomará como parámetro para referirlo al límite de detección de B 1 a partir de nuez. Suponiendo que G 1 se hubiera registrado a las siguientes condiciones:

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Límite de detección de B 1 a partir de nuez: 73 ng/g.

Así, tendríamos para G 1 a partir de nuez: $73 \times 0.63 = 46 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina G 2.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 1020 ng/g Ha: 10.2 cm P.R.: 86.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5.6

$(1020) (0.5) (1/10.2) = 50 \text{ ng/ml.}$

$(50) (5.6) (1) (1/10) (100/86.5) = 32.4 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina B 2

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 984 ng/ml. Ha: 10.6 cm P.R.: 93.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5.6

$(984) (0.5) (1/10.6) = 46.4 \text{ ng/ml.}$

$(46.4) (5.6) (1) (1/10) (100/93.5) = 27.8 \text{ Aprox. } 28 \text{ ng/g.}$

METODOS DE LECTURA DIRECTOS

DETECCION POR FLUORESCENCIA MOLECULAR

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA MUESTRAS DE MAIZ

Si se asume que no hubiera interferencia en la fluorescencia total causada por compuestos diferentes de las aflatoxinas, se procedería como a continuación se indica.

Para los cálculos se usaron las intensidades de fluorescencia de los estándares de aflatoxinas, el factor de dilución debido al procedimiento de extracción y el porcentaje de recuperación.

Condiciones generales a las cuales se midieron los estándares.

Sensibilidad del detector: 100×10
Slit: 0.5 mm.
Volumen de recuperación: 3 ml.
Trayecto óptico de celda: 1 cm.
Lambda de excitación: 365 nm.
Lambda de emisión: 436 nm.

Aflatoxina B 1 derivatizada.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. III):

Cs: 5 ng/ml.	If: 10.5	P.R: 85 %
D: 1.0	F.D.: 5	

Donde If : Intensidad de fluorescencia del estándar.
Todos los demás términos han sido previamente definidos.

Así, se obtiene:

$(5) (1.0) (1 / 10.5) = 0.47 \text{ ng/ml}$ Límite de detección para el estándar.

A fin de calcular el límite de detección de la aflatoxina que sería obtenido a partir de muestras de maíz, se toma en cuenta el proceso de extracción y el porcentaje de recuperación como se indica a continuación:

$$(0.47) (5) (3) (1/10) (100/85) = 0.82 \text{ ng/g para maíz.}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. IV):

Cs: 5 ng/ml If: 9 P.R.: 92 %
D: 1 F.D.: 5

$$(5) (1) (1/9) = 0.55 \text{ ng / ml.}$$

$$(0.55) (5) (3) (1/10) (100/92) = 0.89 \text{ ng / g}$$

Aflatoxina G 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. V):

Cs: 5 ng/ml If: 8.5 P.R.: 86.5 %
D: 1 F.D.: 5

$$(5) (1) (1/8.5) = 0.58 \text{ ng/ml.}$$

$$(0.58) (5) (3) (1/10) (100/86.5) = 1 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. VI):

Cs: 5 ng/ml. If: 22.5 P.R.: 93.5 %
D: 1 F.D.: 5

$$(5) (1) (1/22.5) = 0.22 \text{ ng/ml.}$$

$$(0.22) (5) (3) (1/10) (100/93.5) = 0.35 \text{ ng/g.}$$

LIMITES DE DETECCION PARA MUESTRAS DE CACAHUATE

Se contaminaron muestras de cacahuate con la finalidad de conocer los limites de deteccion de cada aflatoxina. Los niveles de contaminación se representan mediante Cm.

Condiciones generales a las cuales se hicieron las mediciones.

Sensibilidad del detector: 100×10 .
Slit: 0.5 mm
Volumen de recuperación: 3 ml.
Trayecto óptico de celda: 1 cm.
Lambda de excitación: 365 nm.
Lambda de emisión: 436 nm.

Aflatoxina B 1 derivatizada.

Cm: 10 ng/g
If: 11.5
D: 1

$$(10) (1) (1/11.5) = 0.87 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Cm: 10 ng/g
If: 11.0
D: 1

$$(10) (1) (1/11) = 0.90 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2

Cm: 10 ng/g
If: 10
D: 1

$$(10) (1) (1/10) = 1 \text{ ng / g.}$$

Aflatoxina B 2.

Cm: 10 ng/g

If: 25.0

D: 1

$$(10) (1) (1/25) = 0.40 \text{ ng/g.}$$

LIMITES DE DETECCION PARA MUESTRAS DE NUEZ

Se contaminaron muestras de nuez con la finalidad de conocer los límites de detección de cada aflatoxina. Los niveles de contaminación se representan mediante Cm.

Condiciones generales a las cuales se hicieron las mediciones

Sensibilidad del detector: 100×10

Slit: 0.5 mm.

Volumen de recuperación: 3 ml.

Trayecto óptico de celda: 1 cm.

Lambda de excitación: 365 nm.

Lambda de emisión: 436 nm.

Aflatoxina B 1 derivatizada.

Cm: 10 ng/g.

If: 10.5

D: 1

$$(10) (1) (1/10.5) = 0.95 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Asumiendo que la relación de los límites de detección entre G 1 y B 1 se mantiene igual en la nuez que en el cacahuete, se tendría:

$$G 1 / B 1 = 0.90 / 0.87 = 1.03$$

Así, el valor de 1.03 se tomará como parámetro para referirlo al límite de detección de B 1 a partir de nuez. Suponiendo que G 1 se hubiera sometido a las mismas condiciones que B 1 :

Límite de detección de B 1 a partir de nuez : 0.95 ng/g.

Así, tendríamos para G 1 a partir de nuez: $0.95 \times 1.03 = 0.98$ ng/g

Aprox.: 1 ng/g.

Aflatoxina G 2.

Cm: 10 ng/g.

If: 9.0

D: 1

$$(10) (1) (1/9) = 1.11 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2.

Cm: 10 ng/g.

If: 24.0

D: 1

$$(10) (1) (1/24) = 0.41 \text{ ng/g.}$$

MÉTODOS DE LECTURA DIRECTOS

DETECCION POR ABSORCION ULTRAVIOLETA

Los límites de detección para estándares se pueden observar a continuación. Sin embargo, si se quisieran conocer aquellos que se esperarían para muestras contaminadas de maíz, cacahuete y nuez, a continuación se presentan los cálculos sugeridos para ello.

Condiciones generales a las cuales se midieron los estándares.

Slit: 0.1 mm.

Volumen de recuperación: 3 ml.

Trayecto óptico de celda: 1 cm.

LÍMITES DE DETECCIÓN QUE SE ESPERARÍAN PARA EL MAÍZ.

Aflatoxina B 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XI):

Cs: 320 ng/ml.
D: 0.004

As: 0.020
F.D. 5

P.R.: 85 %

Donde: As = Absorbancia del estándar.
Todos los demás términos han sido previamente definidos.

Así, se obtiene:

$(320) (0.004) (1/0.020) = 64 \text{ ng/ml.}$ Valor del límite de detección para el estándar.

A fin de calcular el límite de detección de la aflatoxina que sería obtenido a partir de muestras de maíz, se toma en cuenta el proceso de extracción y el porcentaje de recuperación como se indica a continuación.

(64) (5) (3) (1/10) (100/85) = 113 ng/g

Aflatoxina G 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XII):

Cs: 345 ng/ml. As: 0.018 P.R. 92 %
D: 0.004 F.D. 5

(345) (0.004) (1/0.018) = 76.6 ng/ml.

(76.6) (5) (3) (1/10) (100/92) = 125 ng/g

Aflatoxina G 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XIII):

Cs: 380 ng/ml. As: 0.021 P.R. 86.5 %
D: 0.004 F.D. 5

(380) (0.004) (1/0.021) = 72.3 ng/ml.

(72.3) (5) (3) (1/10) (100/86.5) = 126 ng/g

Aflatoxina B 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XV):

Cs: 270 ng/ml As: 0.018 P.R. 93.5 %
D: 0.004 F.D. 5

(270) (0.004) (1/0.018) = 60 ng/ml.

(60) (5) (3) (1/10) (100/93.5) = 96 ng/g

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA EL CACAHUATE.

Aflatoxina B 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XI):

Cs: 320 ng/ml. As: 0.020 P.R. 85 %
D: 0.004 F.D. 5.2

(320) (0.004) (1/0.020) = 64 ng/ml.

(64) (5.2) (3) (1/10) (100/85) = 118 ng/ml.

Aflatoxina G 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XII):

Cs: 345 ng/ml. As: 0.018 P.R. 92 %
D: 0.004 F.D. 5.2

(345) (0.004) (1/0.018) = 76.6 ng/ml.

(76.6) (5.2) (3) (1/10) (100/92) = 130 ng/g.

Aflatoxina G 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XIII):

Cs: 380 ng/ml. As: 0.021 P.R. 86.5 %
D: 0.004 F.D. 5.2

(380) (0.004) (1/0.021) = 72.3 ng/ml.

(72.3) (5.2) (3) (1/10) (100/86.5) = 130 ng/g

Aflatoxina B 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XIV):

Cs: 270 ng/ml. As: 0.018 P.R. 93.5 %
D: 0.004 F.D. 5.2

(270) (0.004) (1/0.018) = 60 ng/ml.

(60) (5.2) (3) (1/10) (100/93.5) = 100 ng/g.

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA LA NUEZ.

Aflatoxina B 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XI):

Cs: 320 ng/ml. As: 0.020 P.R. 85 %
D: 0.004 F.D. 5.6

$$(320) (0.004) (1/0.020) = 64 \text{ ng/ml.}$$

$$(64) (5.6) (3) (1/10) (100/85) = 127 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 1.

Si se asume que la relación de los límites de detección entre G 1 y B 1 se mantuviera igual en la nuez como en el cacahuate se tendría:

$$G 1 / B 1 = 130 / 118 = 1.10$$

Así, el valor de 1.10 se tomará como parámetro para referirlo al límite de detección de B 1 a partir de nuez. Suponiendo que G 1 se hubiera sometido a las mismas condiciones que B 1 :

Límite de detección de B 1 a partir de nuez: 127 ng/g.

Así, tendríamos para G 1 a partir de nuez: $127 \times 1.10 = 140 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina G 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XIII)

Cs: 380 ng/ml. As: 0.021 P.R. 86.5 %
D: 0.004 F.D. 5.6

$$(380) (0.004) (1/0.021) = 72.3 \text{ ng/ml.}$$

$$(72.3) (5.6) (3) (1/10) (100/86.5) = 140 \text{ ng/g.}$$

" Analytical chemistry, or the art of recognizing different substances and determining their constituents, takes a prominent position among the applications of the science, since the questions which it enables us to answer arise wherever chemical processes are employed for scientific or technical purposes. Its supreme importance has caused it to be assiduously cultivated from a very early period in the history of chemistry, and its records comprise a large part of the quantitative work which is spread over the whole domain of the science . "

Wilhelm Ostwald

(1894)

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

Discusión de procedimientos.

Varios procedimientos de derivatización han sido previamente publicados (11,96,97,98).

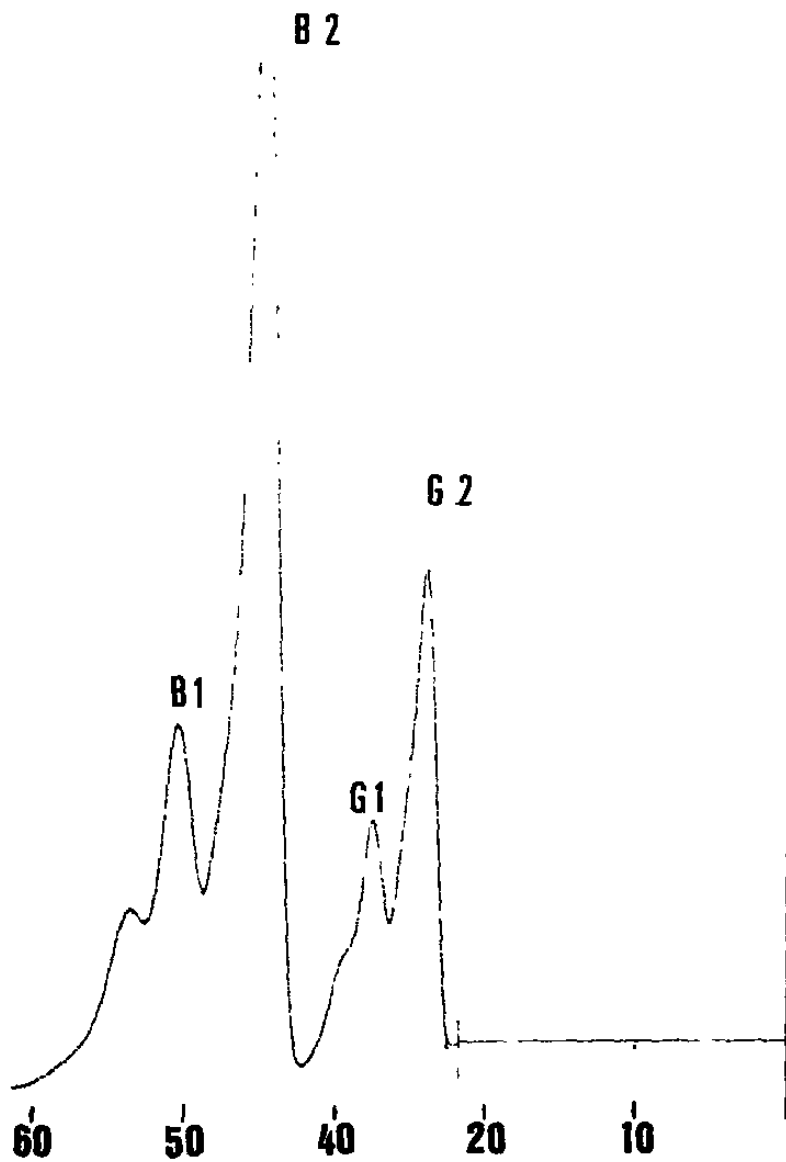
Las determinaciones hechas por HPLC usando la detección por fluorescencia fueron sometidas al procedimiento de derivatización (83) a fin de incrementar la fluorescencia de las aflatoxinas B 1 y G 1. La diferencia que existe en la intensidad es bastante notable (figs. 3 y 4). Para el caso de la detección por UV usando HPLC también se llevó a cabo la derivatización, pues aunque ésta no produce efecto alguno en la detección, sí produjo mejor resolución sobre los cromatogramas (Fig. 5).

Para las determinaciones directas por fluorescencia, en ocasiones se derivatizaron las aflatoxinas y en otras no, esto a fin de evaluar comparativamente la influencia que ejerce la derivatización en los límites de detección. Las determinaciones directas por UV no se sometieron a la derivatización, ya que ésta por razones obvias, no produce fenómeno alguno que origine un cambio significativo capaz de ser detectado en la región ultravioleta.

Aunque B 1 y G 1 derivatizadas se encuentran comercialmente disponibles, ninguna de las muestras que se usaron para obtener los porcentajes de recuperación se contaminaron con ellas, sino que se hicieron con aflatoxinas libres de la derivatización por la razón de que difieren en la polaridad, y así de este modo se evitaron mediciones de recuperación fuera de los objetivos de este trabajo.

MAIZ.

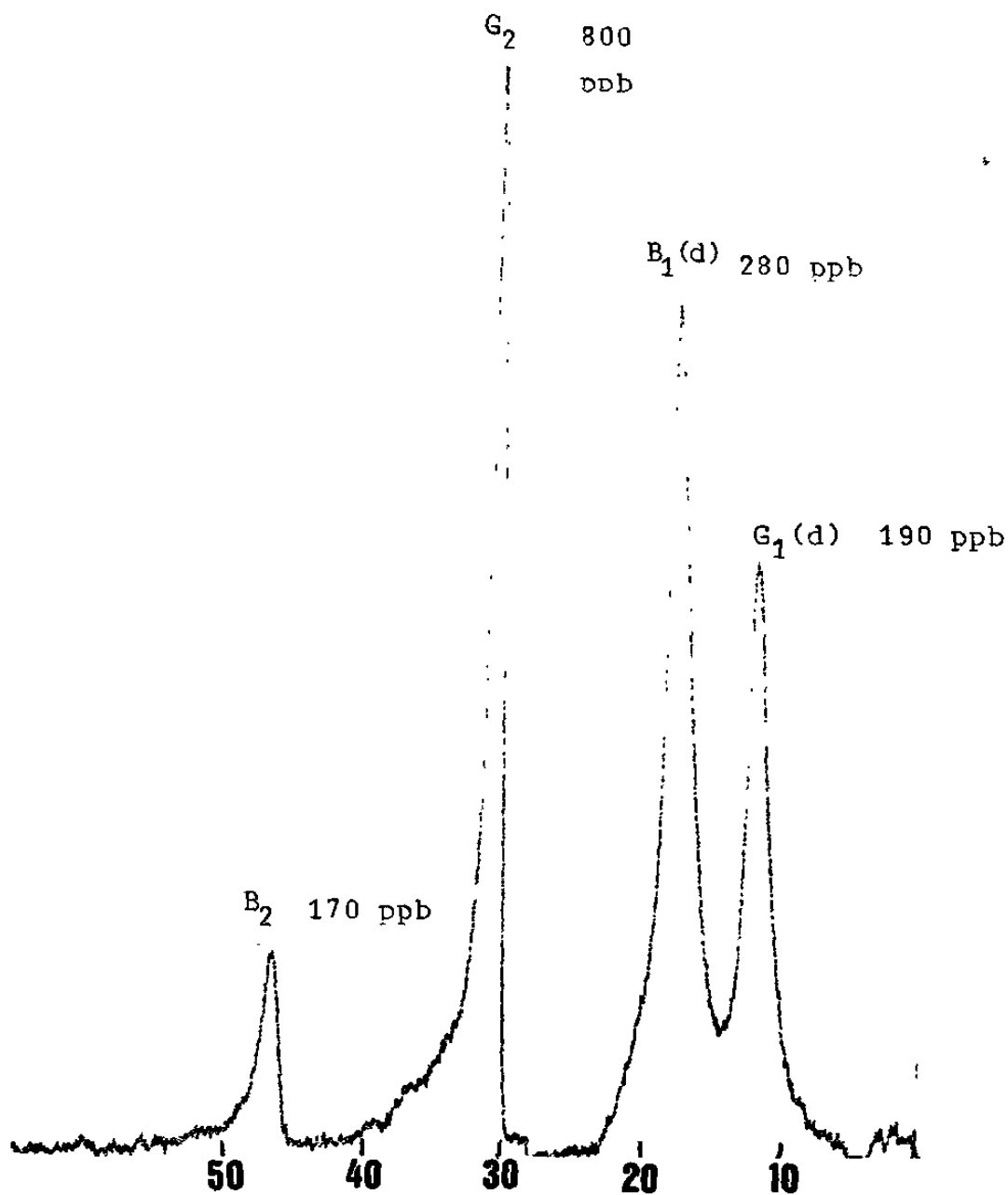
En la búsqueda por desarrollar un método adecuado para la preparación de muestras de maíz que reuniera las condiciones óptimas de análisis, se optó por tomar como punto de partida un método desarrollado previamente en nuestro laboratorio (83). Al llevar a cabo dicho método se encontró que presenta una serie de ventajas entre las cuales destaca el uso de un solo solvente como el cloroformo para la extracción de aflatoxinas. Adicionalmente se pudo constatar



MUESTRA: CROMATOGRAMA DE LAS AFLATOXINAS
G 1, B 1, G 2, B 2 SIN EL
PROCEDIMIENTO DE DERIVATIZACION.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
OBSERVACION: NO HAY RESOLUCION TOTAL DE LOS ANALITOS

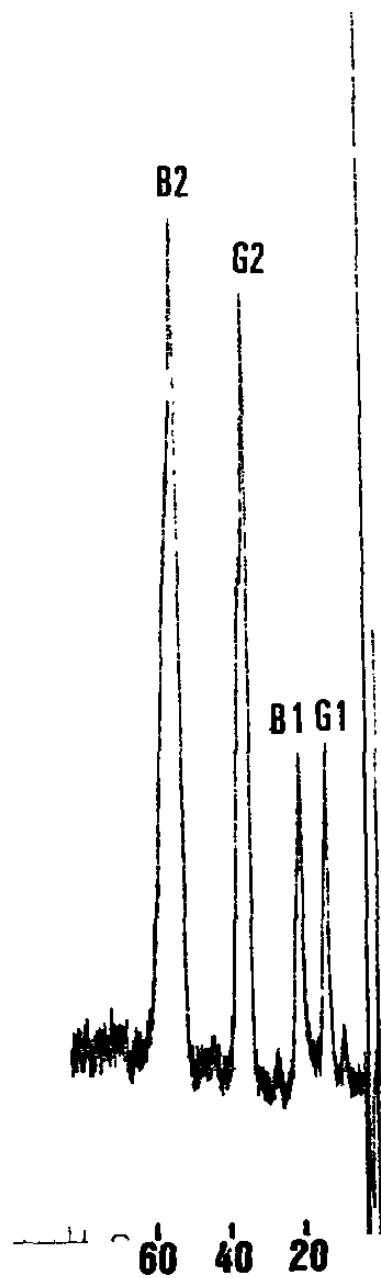
FIG. 3

SENSIBILIDAD: 10 x 5 mv.



MUESTRA: CROMATOGRAMA DE LAS AFLATOXINAS
G 1, B 1, G 2, B 2 CON EL
PROCEDIMIENTO DE DERIVATIZACION.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SE OBSERVA RESOLUCION DE LOS ANALITOS.

FIG. 4



MUESTRA: SOLUCION NORMALIZADA DE AFLATOXINAS:
 G 1: 658 NG/ML. B 1: 956 NG/ML.
 G 2: 1,020 NG/ML. B 2: 984 NG/ML.
 DETECCION POR ABSORCION ULTRAVIOLETA.
 SENSIBILIDAD: 0.001 x 10 MV.
 VELOCIDAD DE CARTA: 0.5 MM/MIN.

FIG. 5

que el proceso de extracción se ve favorecido por el contacto muy cercano que se produce entre la muestra y el solvente. Sin embargo, se observó que a pesar de que las aflatoxinas se solubilizaron en el cloroformo, también las grasas lo hicieron, de tal manera que el manejo de la solución se complicó, particularmente al pasar la solución de extracción a través de las membranas de filtración de 0.45 micras. Además, aunque no existirían problemas de detección de grasas debido a que no presentan fluorescencia, sí se podrían presentar complicaciones en la columna analítica debidas a su acumulación ya que la mayoría de ellas posee menor polaridad que las aflatoxinas. Por ello se modificó el método haciendo una purificación de la muestra previa a la extracción de las toxinas. La refinación consistió en extraer los compuestos de polaridad diferente a la de los analitos de interés. Para ello se usaron hexano y éter etílico en el respectivo orden previamente a la adición de cloroformo.

A pesar de que la muestra de inyección obtenida fue más pura, los porcentajes de recuperación fueron muy bajos (tabla I) y los volúmenes de solventes resultaron grandes. Por ello se decidió cambiar la metodología ensayando un procedimiento de extracción que requiriera menor cantidad de muestra a fin de reducir los volúmenes de solventes.

Recientemente se reportó (84) que siguiendo el procedimiento CB de la AOAC (81), el uso de muestras analíticas de 10 g procedentes de muestras finamente molidas (malla No. 20) provee una varianza estadísticamente comparable con muestras de 50 g. Sin embargo, se ha demostrado (83) pérdidas en la recuperación de las toxinas causada por su retención en la tierra de diatomeas y la gel de sílice usadas en este método. Por ello, aunque se decidió usar muestras de 10 g, se consideró llevar a cabo un procedimiento de extracción diferente como lo es el líquido-líquido, mediante el cual se evitara el uso de adsorbentes.

Sin embargo, al llevar a cabo el método de extracción líquido-líquido, se pudo verificar que, aunque los cromatogramas reportaron reproducibilidad, no mostraron recuperación de las aflatoxinas G 1 y B 2 a los niveles de interés toxicológico (Figs. 6 y 7), por lo cual se decidió descartar este método.

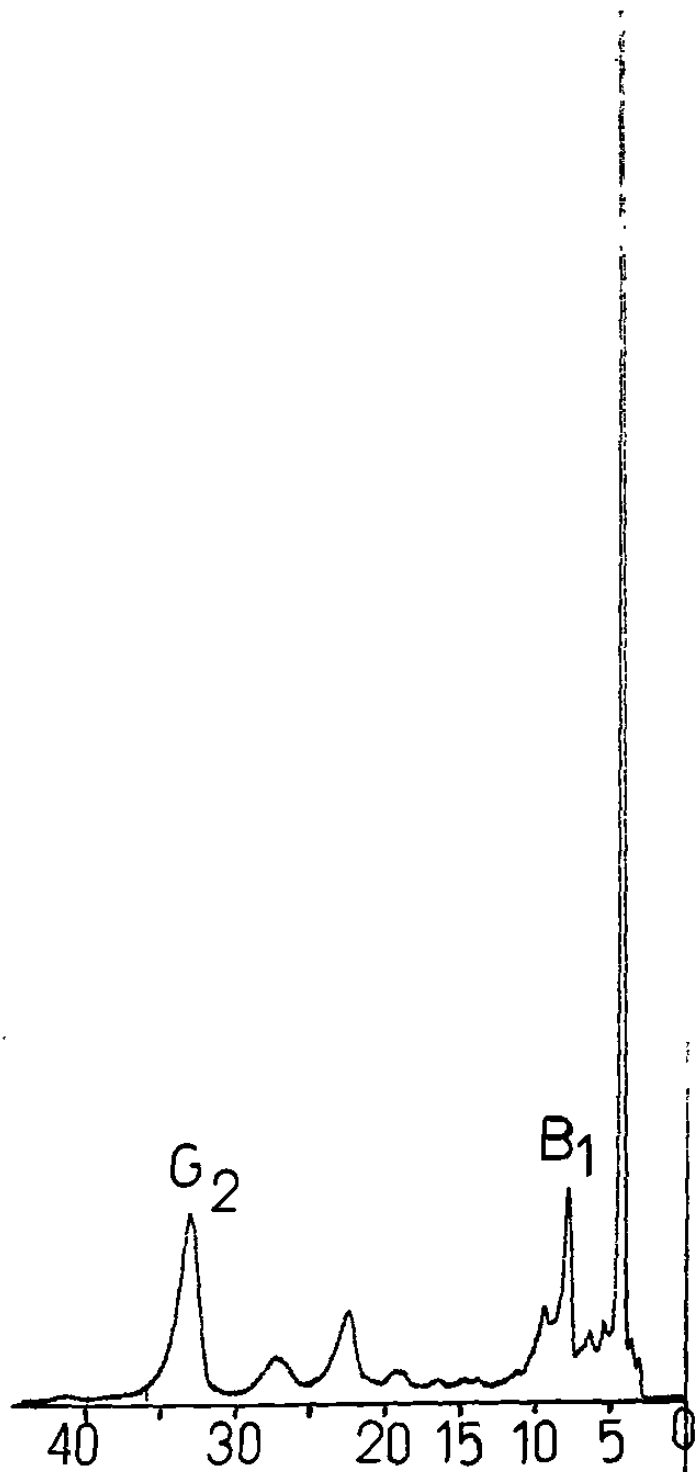
La búsqueda por desarrollar otros métodos condujo a indagar acerca del uso de columnas pequeñas rellenas de fase sólida. Estas columnas presentan ciertas ventajas como por ejemplo, el uso de reducidos volúmenes de solventes y corto tiempo en la preparación de las muestras, particularmente para su uso en el análisis de maíz (9,91,92).

TABLA I.

PORCENTAJES DE RECUPERACION DEL METODO HEX-ETER-CLOR USADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MAIZ.

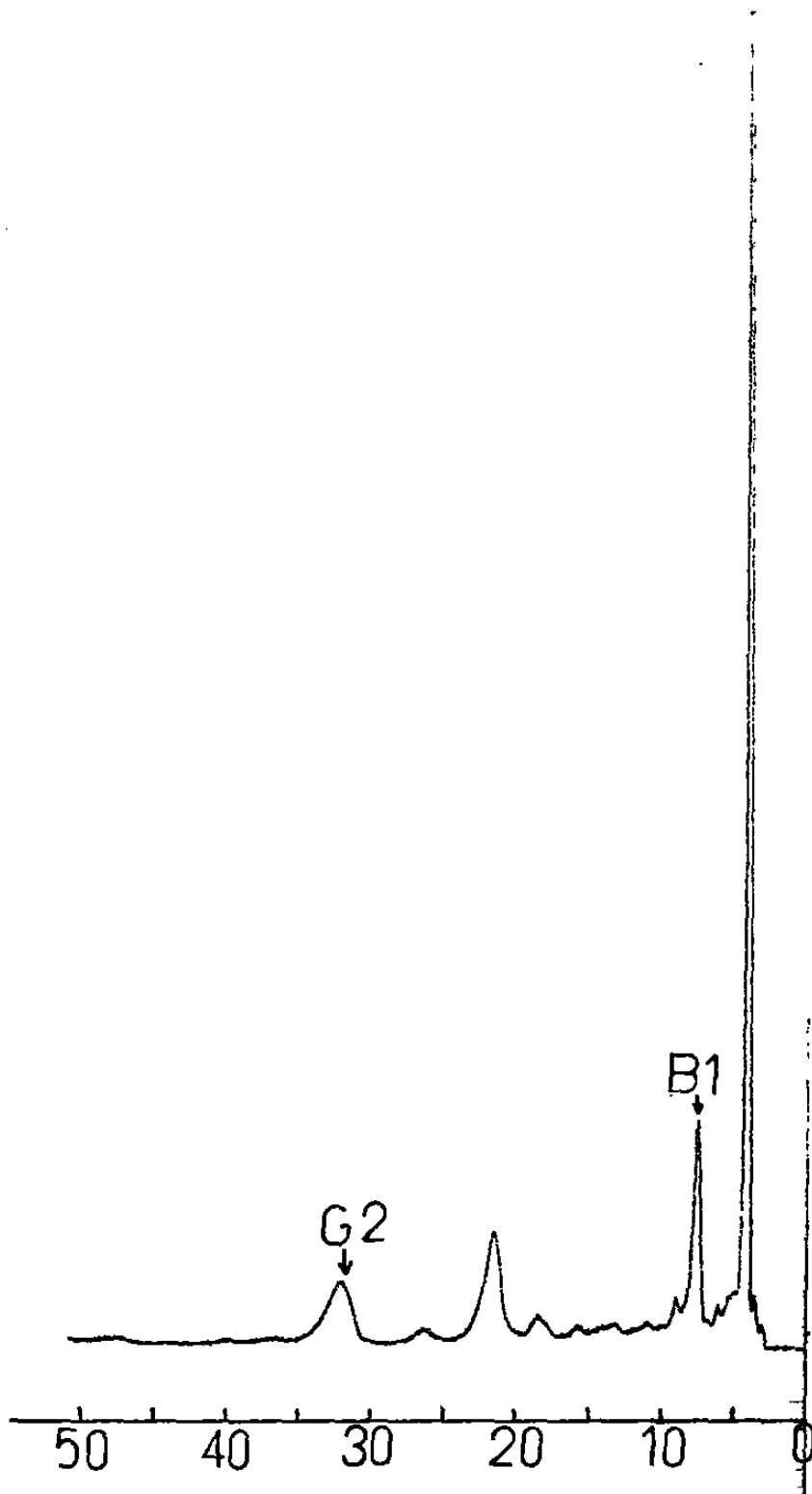
AFLATOXINAS	PORCENTAJES DE RECUPERACION*
B 1 *	26.7 %
G 1 *	15.3 %
G 2	12.6 %
B 2	10.0 %

***EVALUADOS A PARTIR DE UNA SOLA MUESTRA.**



MUESTRA: MAIZ ENRIQUECIDO CON 90 NG/G DE AFLATOXINAS
TOTALES.
METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV.

FIG. 6



MUESTRA: CONTROL DE MAIZ HECHO POR EL METODO
DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV

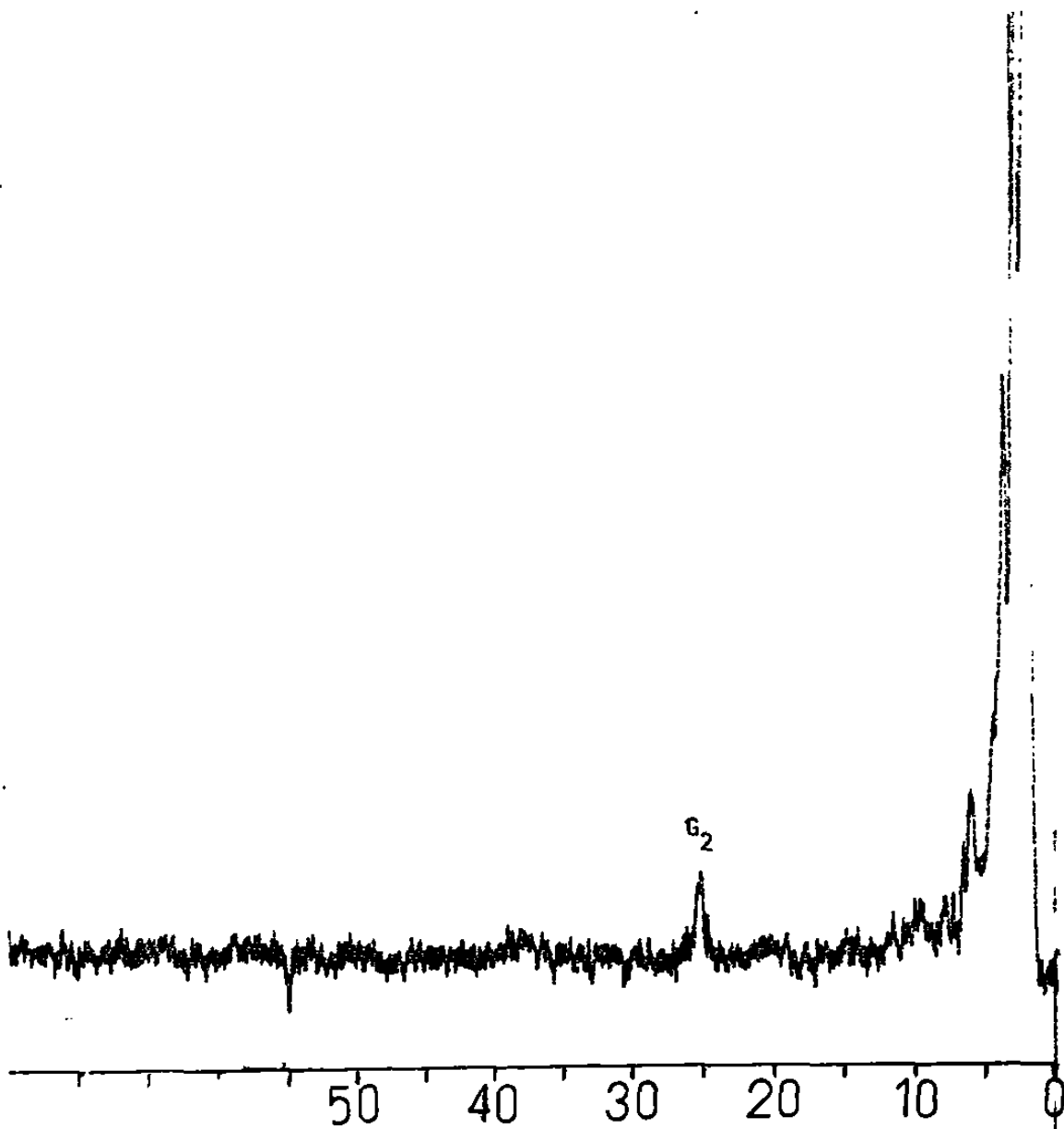
FIG. 7

Sin embargo no se especifica la cantidad de la fase s6lida que contienen las columnas ni la relaci6n de fase s6lida versus cantidad de muestra. Tampoco se especifican las condiciones 6ptimas para la preparaci6n de las muestras a fin de prolongar la vida media de las columnas. Se hicieron varios ensayos cambiando la cantidad de fase C-18 y se encontr6 que el uso de 600 mg fue superior en rendimiento a las dem6s cantidades ensayadas. Menores cantidades tales como 50, 100, 380 y 500 mg no lograron limpiar de grasas a las muestras lo suficiente, asi como tambi6n se registraron p6rdidas de las toxinas. El uso de cantidades superiores a 600 mg conduciria a usar mayores cantidades de solventes.

Para el procedimiento de extracci6n se probaron diferentes combinaciones de metanol-agua y, aunque algunas de ellas han sido reportadas (81,91), se probaron tres combinaciones que no se encontraron descritas a las condiciones de trabajo.

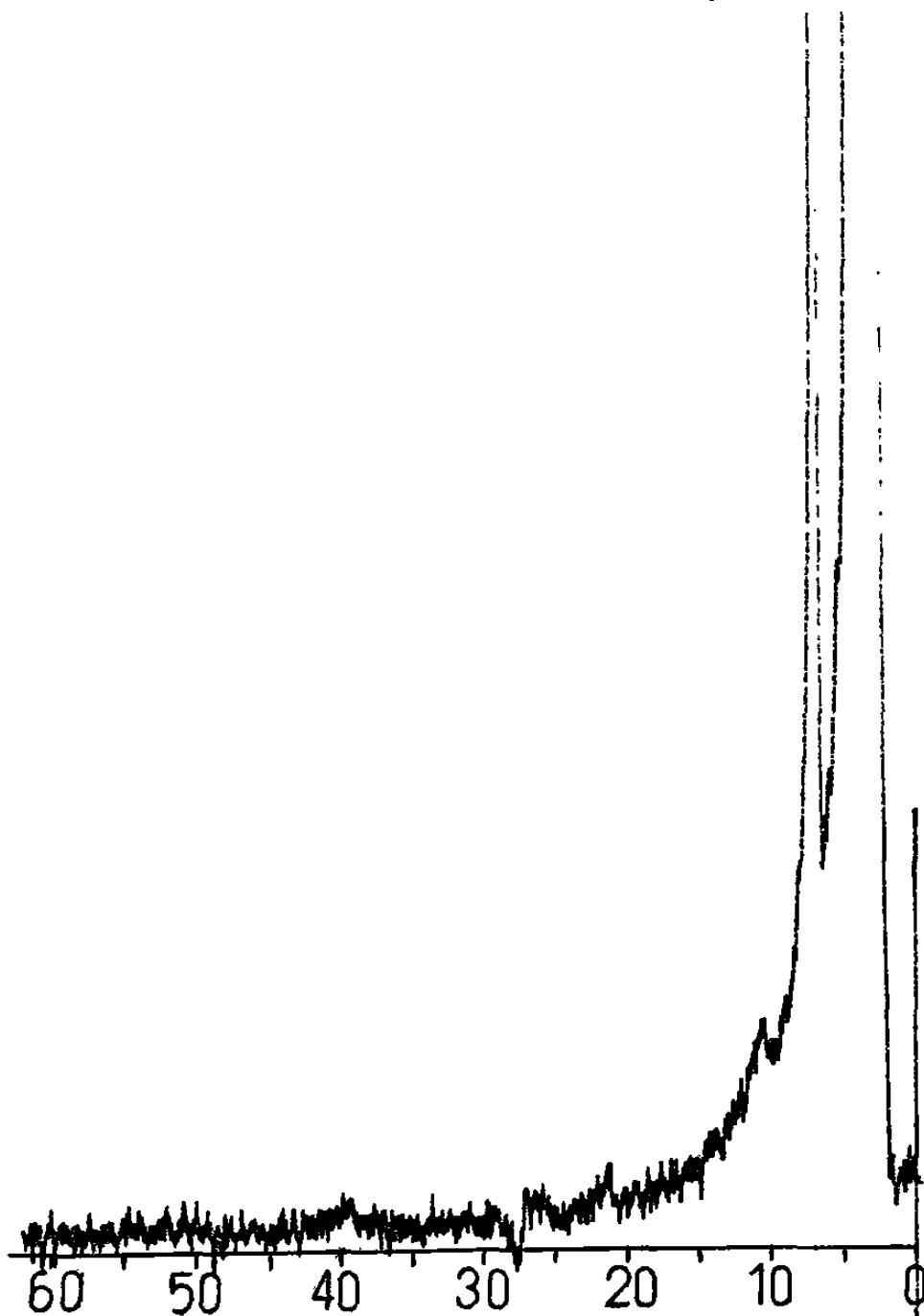
Las combinaciones de metanol-agua que se probaron fueron (70+30), (80+20) y (90+10). Usando la primer combinaci6n se extrajeron menores cantidades de aflatoxinas. Al usar la tercera combinaci6n se encontraron dificultades para llevar a cabo la percolaci6n a trav6s de la primer columna acondicionada, igualmente en el paso de filtraci6n a trav6s de membranas de poro de 0.45 micras. Probablemente ello fue debido a la mayor extracci6n de compuestos oleosos. La segunda combinaci6n produjo mayor uniformidad en el procedimiento de refinaci6n, lo cual se manifest6 en mejor reproducibilidad sobre los cromatogramas (Figs. 14-22).

Para el procedimiento de extracci6n en fase s6lida (SPE) se evaluaron las eluciones que se hicieron tanto en la primer columna como en la segunda. Al evaluar la primer columna se comprob6 que la mayoria de los compuestos grasos quedaron retenidos. Al hacer un seguimiento de las etapas de eluci6n de la segunda columna se encontraron dos pasos criticos. El primero de ellos ocurre al pasar la diluci6n de 10 ml a trav6s de la columna previamente acondicionada. Este acondicionamiento permite la retenci6n de las aflatoxinas y de otros compuestos de polaridad ligeramente mayor. Un inadecuado acondicionamiento derivaria en la eluci6n de las toxinas y en la consecuente p6rdida de ellas. Los cromatogramas mostraron que en este paso en ocasiones se presenta una ligera p6rdida de la aflatoxina G 2 (Fig. 8). Para evitar tal p6rdida existen varias opciones: entre ellas, aumentar la cantidad de fase s6lida de la segunda columna o incrementar la polaridad de la diluci6n que se hace pasar a trav6s de ella; para cualquier alternativa se sugiere hacer un seguimiento por HPLC. Sin embargo, otros cromatogramas mostraron que en ocasiones se observa retenci6n de las toxinas (Fig. 9).



METODO DE EXTRACCION PARA MAIZ: DOS COLUMNAS.
MUESTRA: EVALUACION DE LA SEGUNDA COLUMNA.
PRIMER PASO CRITICO EN LA ELUCION.
ESTE CROMATOGRAMA MUESTRA QUE EN OCASIONES HAY LIGERA
PERDIDA DE LA AFLATOXINA B 2.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV (MAXIMA).
DETECCION POR FLUORESCENCIA.

FIG. 8



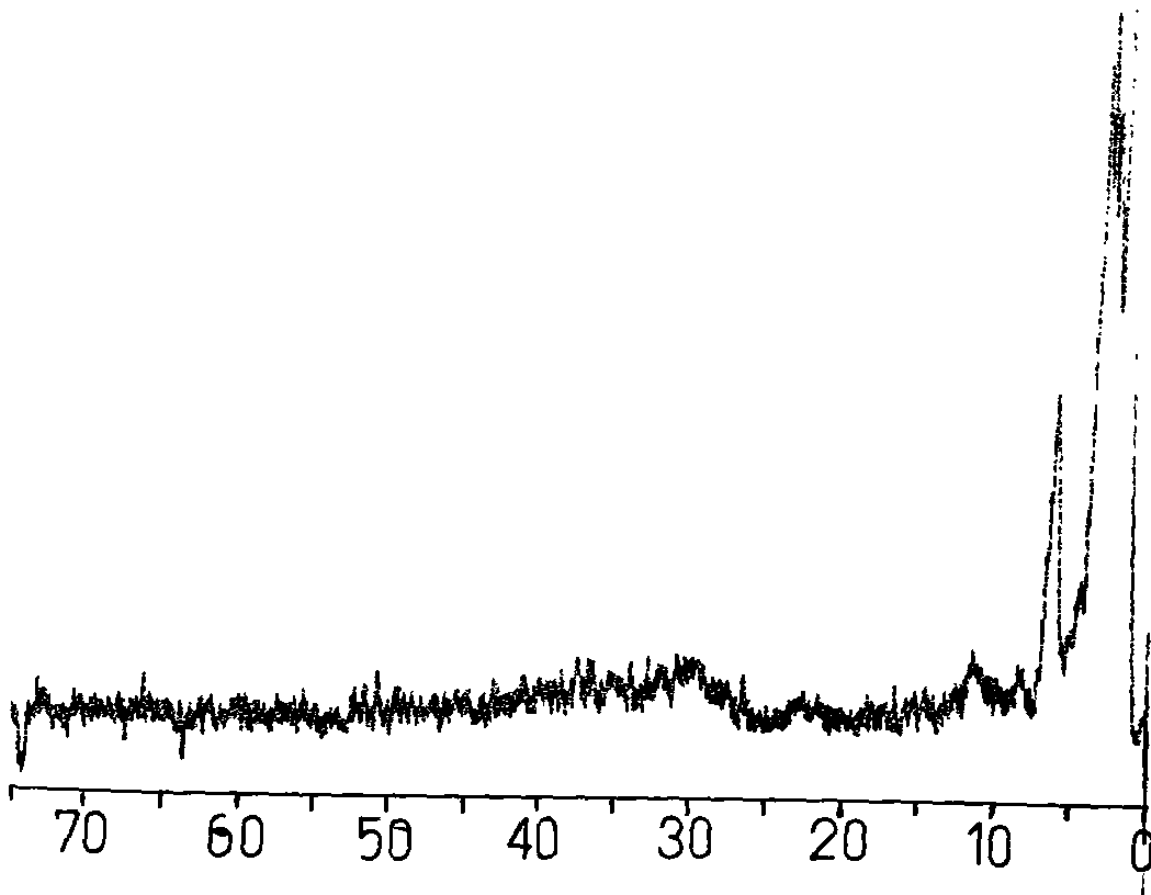
METODO DE EXTRACCION PARA MAIZ: DOS COLUMNAS.
MUESTRA: EVALUACION DE LA SEGUNDA COLUMNA.
PRIMER PASO CRITICO EN LA ELUCION
ESTE CROMATOGRAMA MUESTRA QUE EN ESTE PASO DE ELUCION
NO HAY PERDIDA DE LA AFLATOXINA G 2.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV (MAXIMA).

FIG. 9

El segundo paso crítico se presenta en la adición de 6 ml de agua a través de la columna. En este paso se podría presentar una indeseable elución de las toxinas porque la finalidad de esta etapa es la de eluir compuestos de polaridad ligeramente mayor; sin embargo, los cromatogramas no mostraron pérdida de alguna de ellas (Fig. 10).

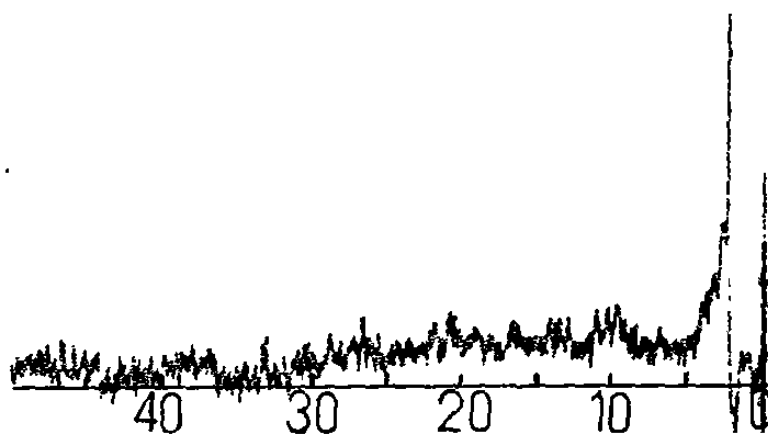
Al término del procedimiento SPE se hizo una evaluación para probar que la totalidad de las toxinas hubieran sido eluidas. Se repitió la percolación exclusivamente a base de solventes, pero los cromatogramas no mostraron pérdidas (Fig. 11).

Posteriormente se evaluó la extracción y purificación de las aflatoxinas para el procedimiento SPE mediante el tratamiento de muestras libres de maíz. Los cromatogramas mostraron recuperaciones que van desde un 85 % hasta un 92 % (Figs. 12 y 13). Las recuperaciones que se hicieron después, mostraron que no sólo dependen de cada toxina sino también de la cantidad con la que se encuentran presentes en las muestras (Tabla II).



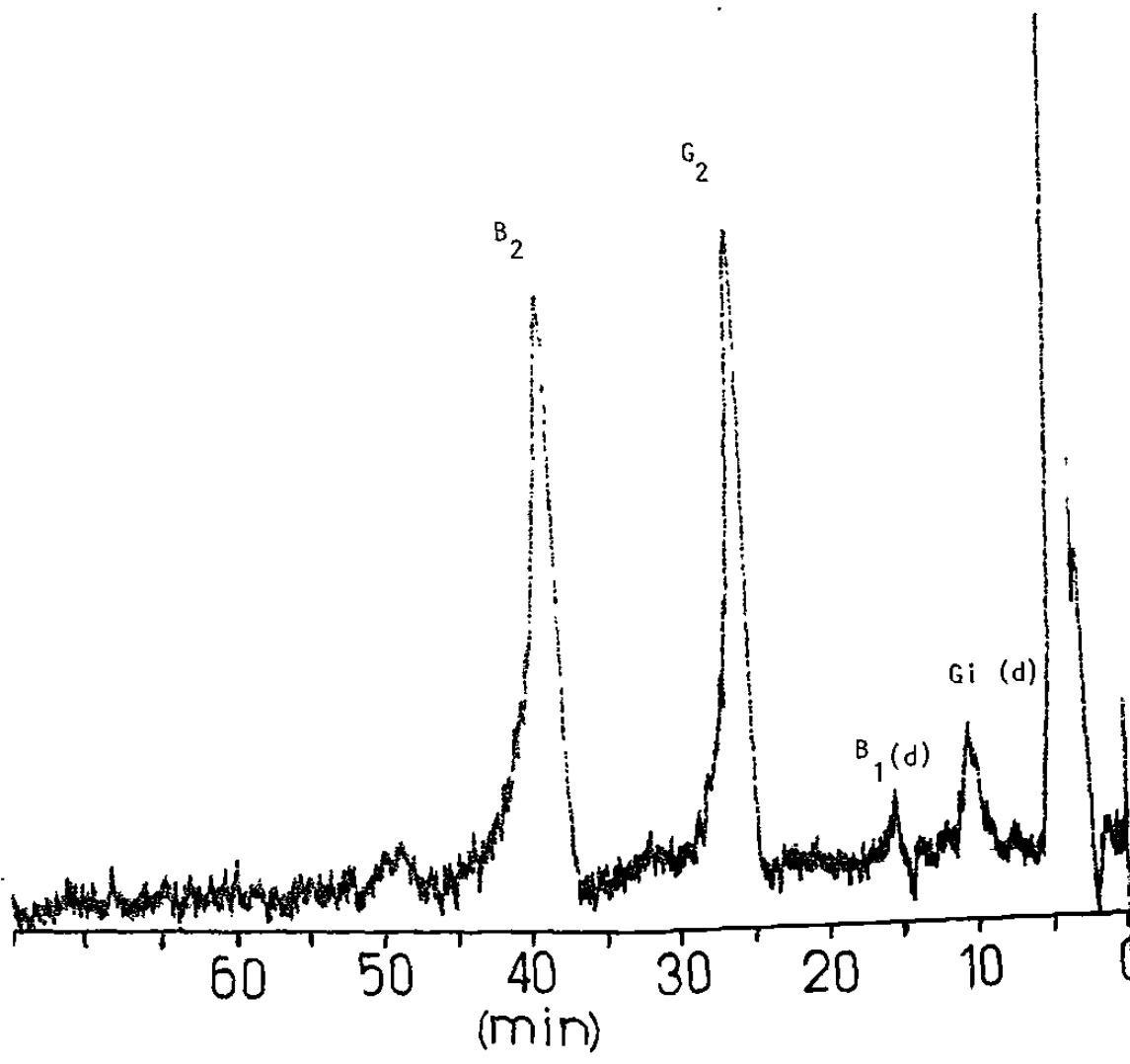
METODO DE EXTRACCION PARA MAIZ: DOS COLUMNAS.
MUESTRA: EVALUACION DE LA SEGUNDA COLUMNA
SEGUNDO PASO CRITICO EN LA ELUCION.
SE OBSERVA RETENCION TOTAL DE AFLATOXINAS.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV (MAXIMA).

FIG. 10



METODO DE EXTRACCION: DOS COLUMNAS.
MUESTRA: ESTE CROMATOGRAMA DEMUESTRA QUE DESPUES DE
REALIZAR EL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA MEDIANTE EL USO
DE LA FASE SOLIDA NO QUEDAN RESIDUOS DE AFLATOXINAS EN
ELLA CAPACES DE SER DETECTADOS.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV.

FIG. 11



MUESTRA: BLANCO PARA EVALUAR LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS
SIN EMPLEAR MAIZ.

CONCENTRACION: SE SUFUSO UNA CONTAMINACION EQUIVALENTE A:

G 1: 7 NG/G

G 2: 80 NG/G

B 1: 4 NG/G

B 2: 60 NG/G

METODO DE EXTRACCION: DOS COLUMNAS.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 2 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV.

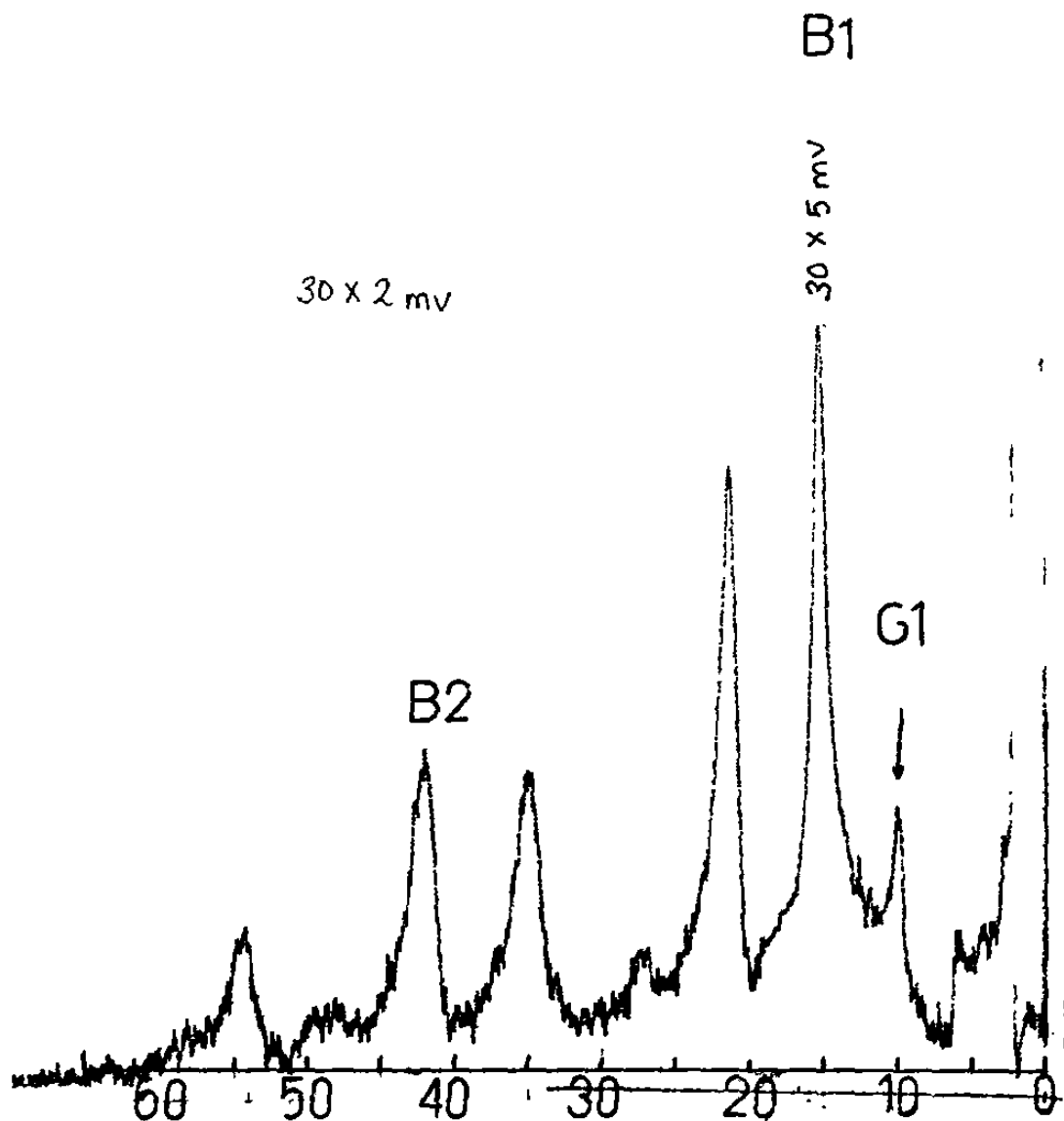
RECUPERACION: G 1: 89 %

G 2: 87 %

B 1: 86 %

B 2: 92 %

FIG. 12



MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL
USADO COMO CONTROL.

OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA UNA CONTAMINACION
NATURAL DE:

G 1: 4 NG/G

G 2: MENOS DE 1 NG/G.

B 1: 40 NG/G

B 2: 15 NG/G.

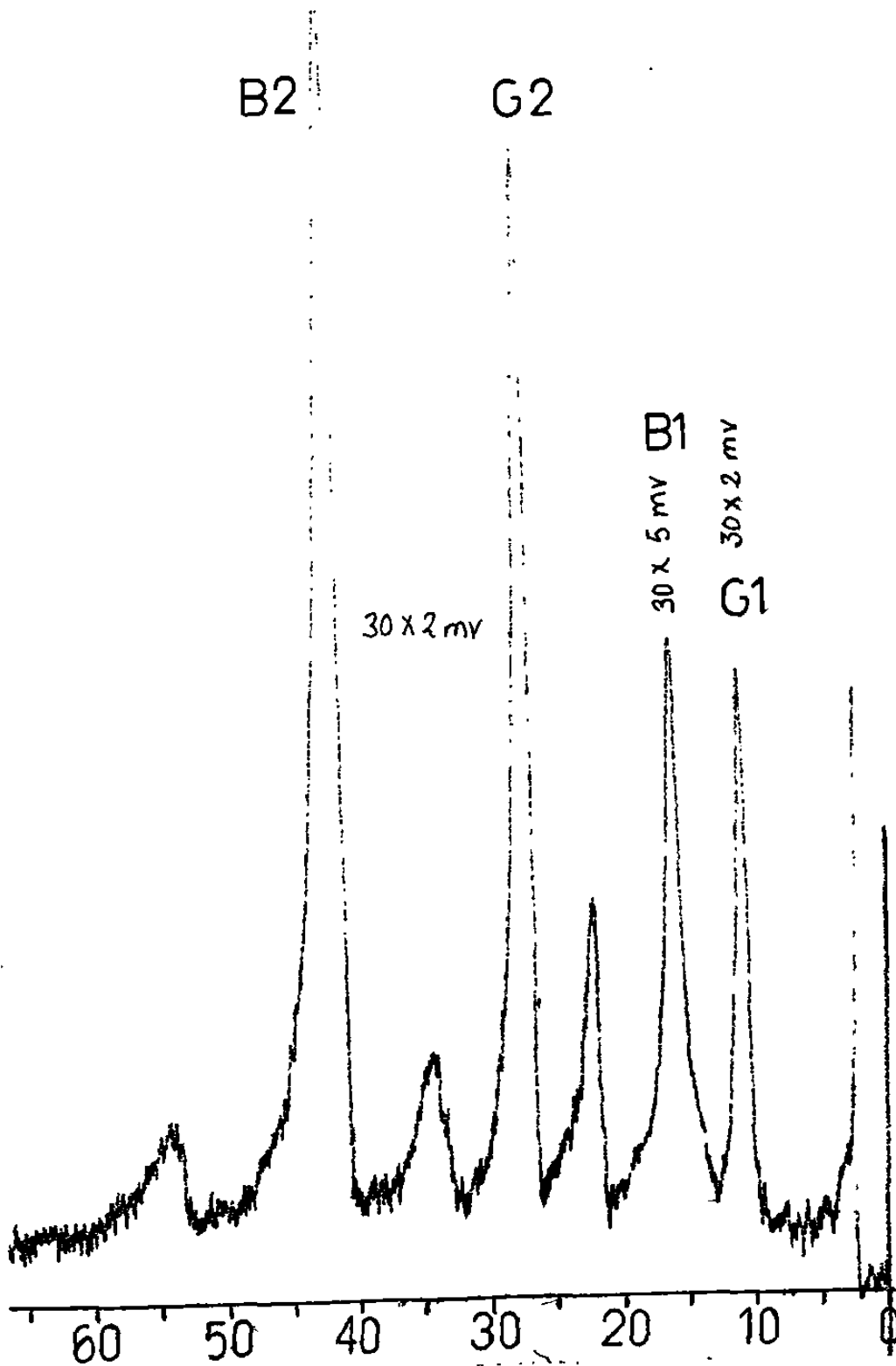
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA. METODO: DOS COLUMNAS.

SENSIBILIDAD: B 1 : 30 x 5 MV.

G 1, G 2, B 2: 30 x 2 MV.

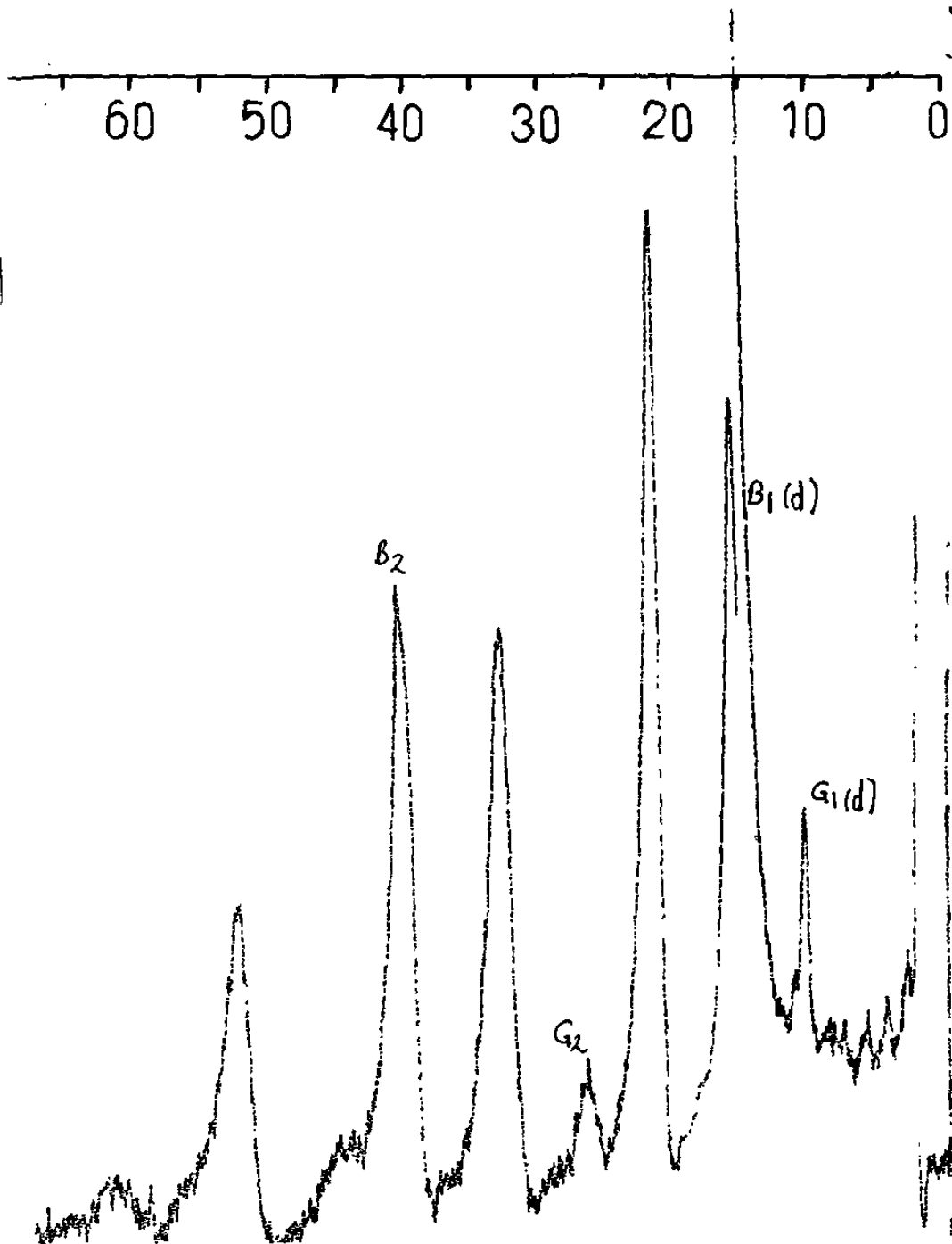
FIG. 14



MUESTRA: MAIZ ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:
 G 1: 12 NG/G G 2: 75 NG/G
 B 1: 2.5 NG/G B 2: 60 NG/G
DETECCION POR FLUORESCENCIA. METODO: DOS COLUMNAS.
VOL. DE RECUPERACION: 1 ML.
SENSIBILIDAD: B 1: 30 x 5 MV. G1, G2, B2: 30 x 2 MV.
RECUPERACION: G 1: 88 % G 2: 87 %
 B 1: 85 % B 2: 94 %

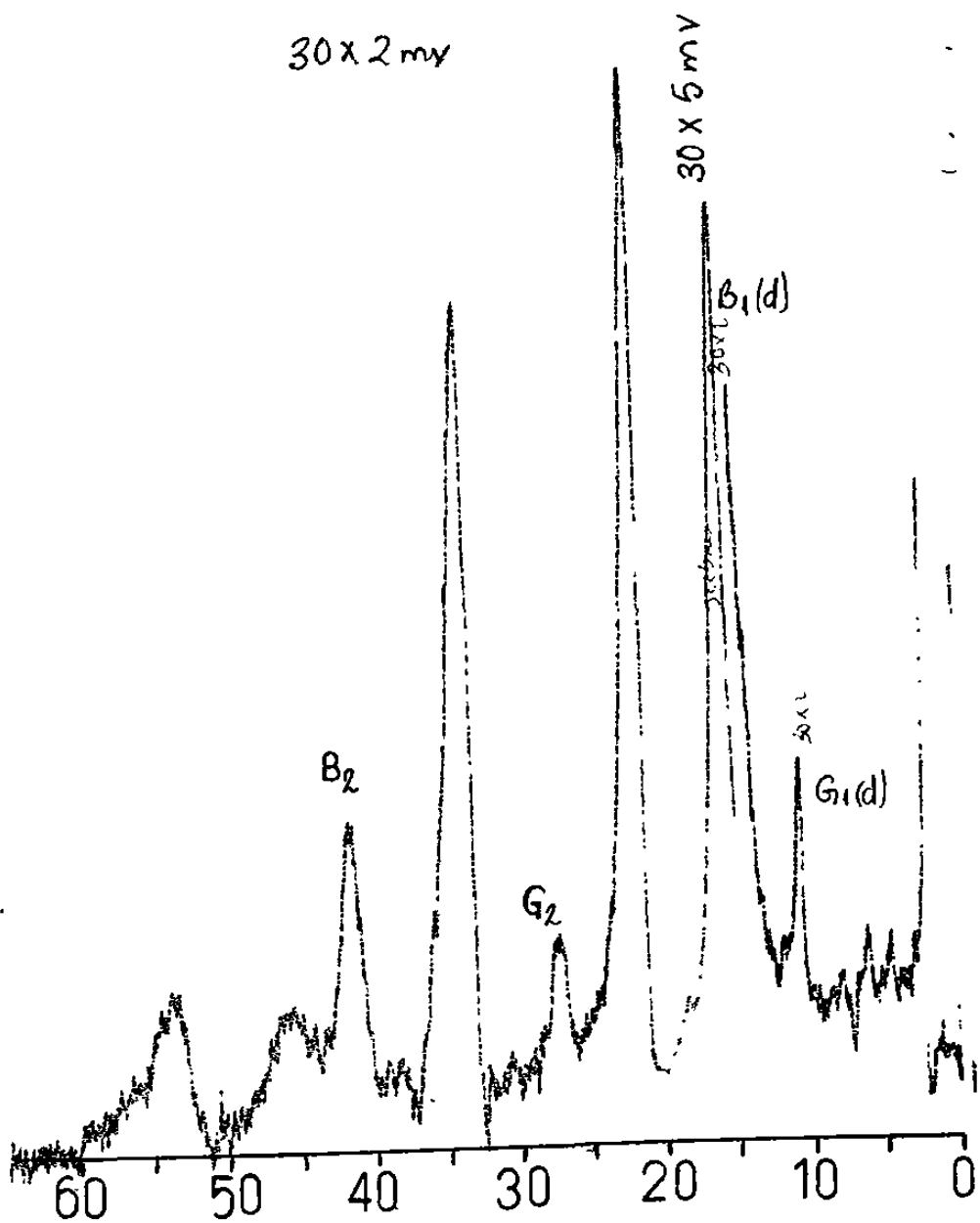
105

FIG. 15



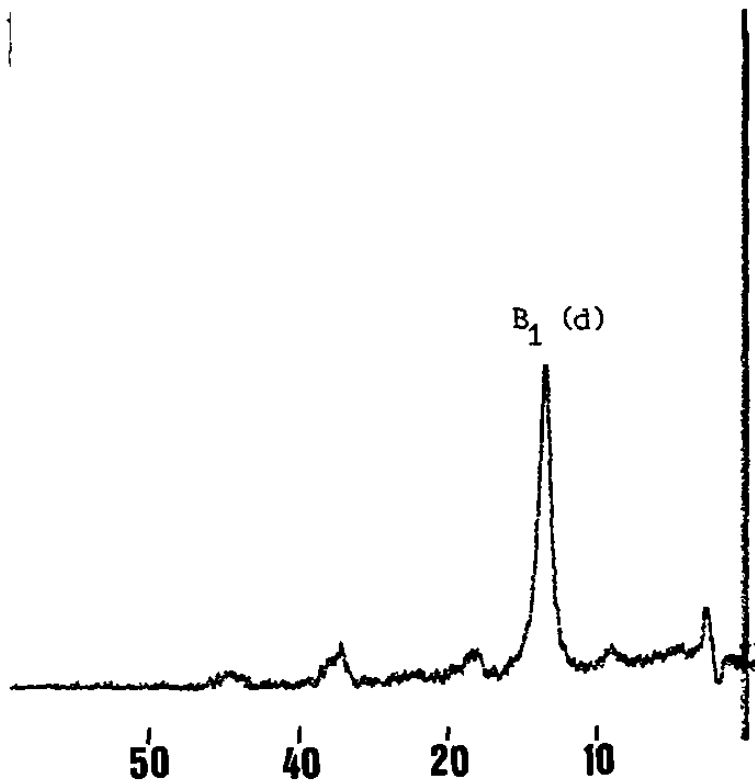
MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL
G 1: 21 NG/G G 2: 22 NG/G
B 1: 138 NG/G B 2: 100 NG/G
VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA. METODO: DOS COLUMNAS.
SENSIBILIDAD: G 1, G 2, B 2: 30 x 2 MV.
 B 1: 30 x 5 MV.

FIG. 17



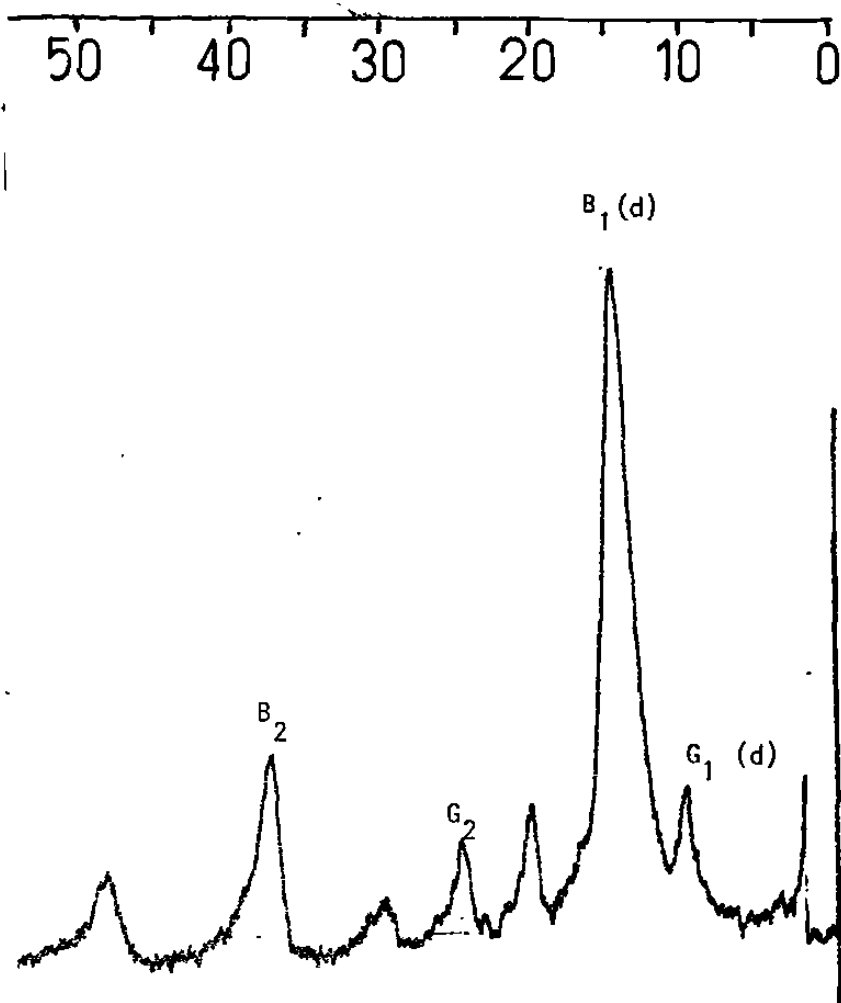
MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL
G 1: 19 NG/G G 2: 23 NG/G
B 1: 159 NG/G B 2: 41 NG/G
METODO: DOS COLUMNAS.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: G 1, B 2 : 30 x 2 MV
 B 1: 30 x 5 MV.

FIG. 18



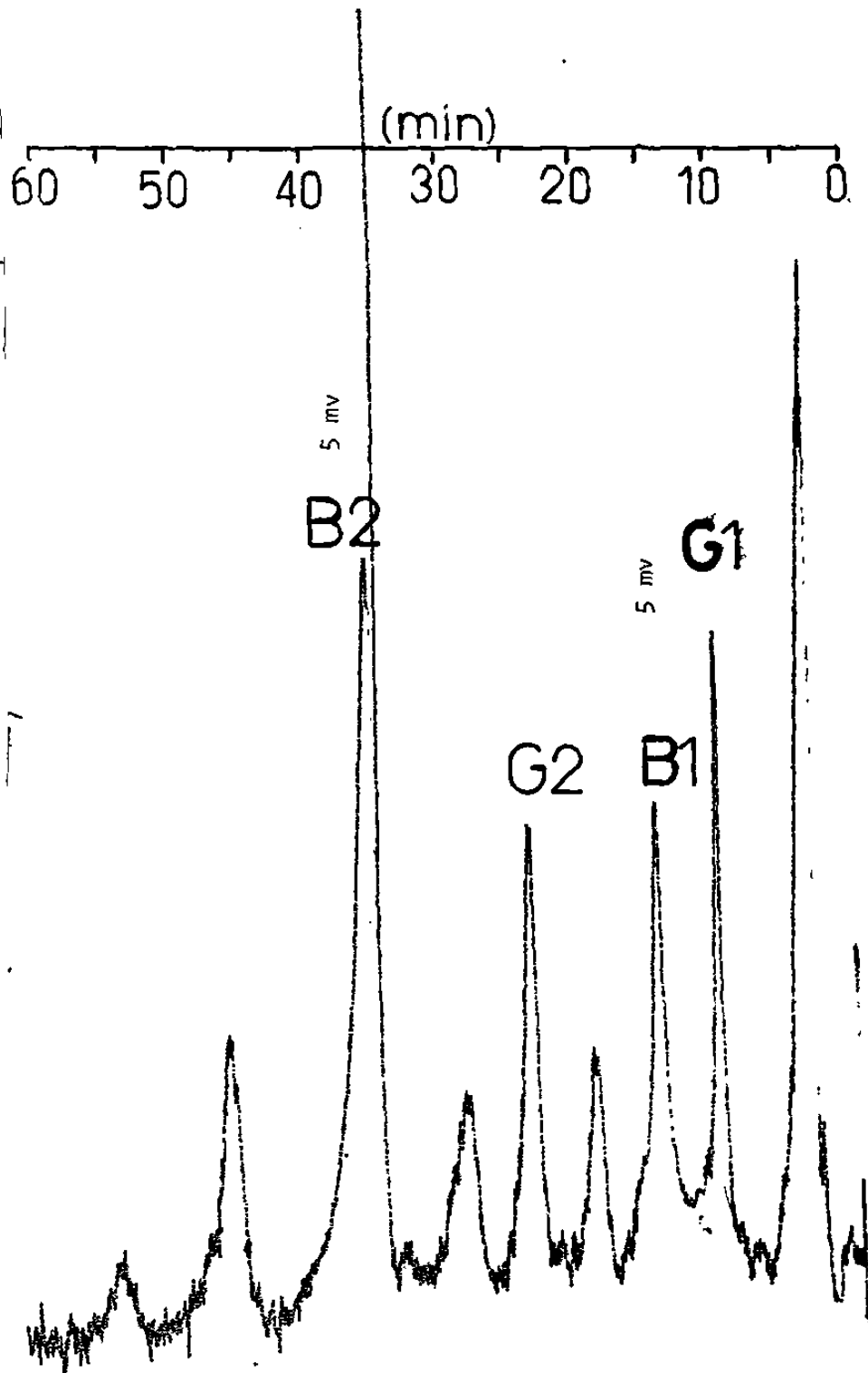
MUESTRA: MAIZ BLANCO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL
CON 72 NG/G DE B 1. MUESTRA USADA COMO CONTROL.
METODO DE EXTRACCION: DOS COLUMNAS.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 4 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 30 x 5 MV.

FIG. 19



MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS
 G 1: 12 NG/G
 B 1: 10 NG/G
 OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA UNA CONTAMINACION
 NATURAL DE 72 NG/G DE B 1.
 METODO DE EXTRACCION: DOS COLUMNAS.
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 2 ML.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: 30 x 5 MV.
 RECUPERACION: G 1: 91 %
 B 1: 85 %
 G 2: 25 NG/G
 B 2: 52 NG/G
 G 2: 85 %
 B 2: 92 %

FIG. 20



MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS

G 1: 60 NG/G

G 2: 120 NG/G.

B 1: 42 NG/G

B 2: 450 NG/G

OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA UNA CONTAMINACION

NATURAL DE 72 NG/G DE B 1. METODO: DOS COLUMNAS.

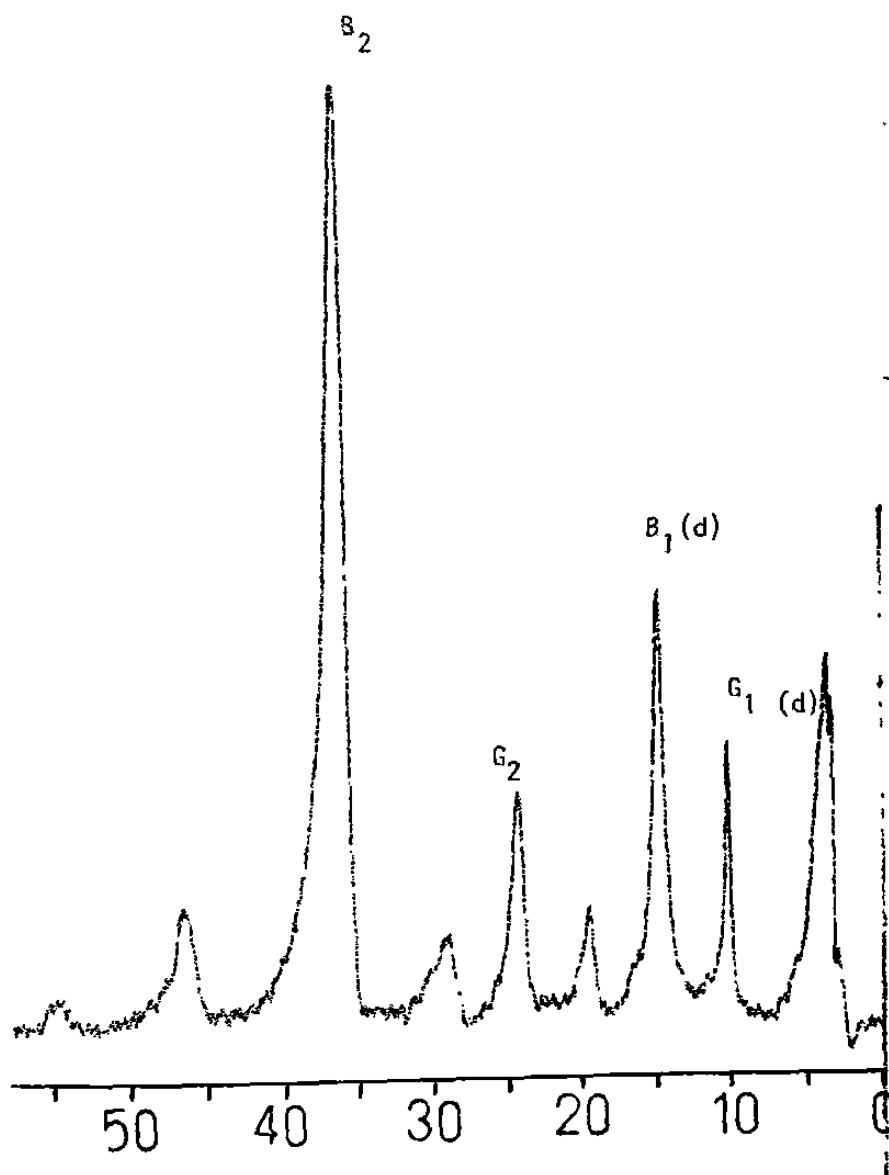
VOLUMEN DE RECUPERACION: 4 ML. DETECCION: FLUORESCENCIA.

SENSIBILIDAD: G 1, G 2: 30 x 2 MV; B 1, B 2: 30 x 5 MV.

RECUPERACION: G1: 96 %, B1: 85 %, G 2: 88 %, B 2: 92 %

111

FIG. 21



MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS
 G 1: 60 NG/G G 2: 130 NG/G
 B 1: 35 NG/G B 2: 500 NG/G
 OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA UNA CONTAMINACION
 NATURAL DE 72 NG/G PARA B 1.
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 4 ML. METODO: DOS COLUMNAS
 SENSIBILIDAD: 30 x 5 MV. DETECCION: FLUORESCENCIA
 RECUPERACION: G 1: 93%, B 1: 84%, G 2: 86%, B 2: 96%

FIG. 22

TABLA II.

PORCENTAJES DE RECUPERACION DEL METODO DE DOS COLUMNAS USADO
 PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MAIZ.

AFLATOXINA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	LIMITES DE CONFIABILIDAD* AL 95 %
G 1	92.0 %	3.36 %	92 + 5.34 %
B 1	85.0 %	0.13 %	85.1 + 0.21 %
G 2	86.5 %	1.29 %	86.5 + 2.05 %
B 2	93.5 %	1.91 %	93.5 + 3.03 %

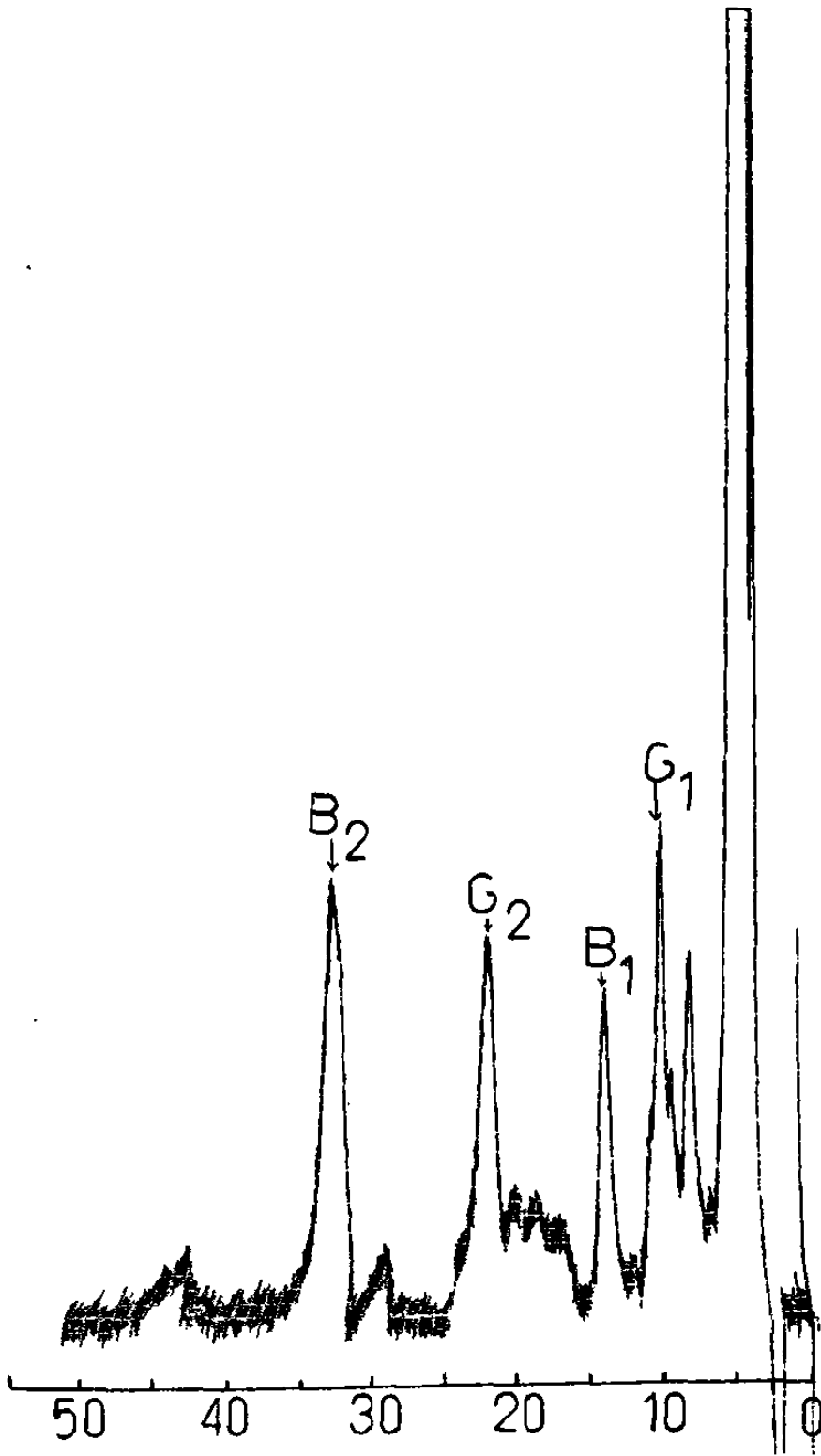
* EVALUACION A PARTIR DE CUATRO MUESTRAS.

CACAHUATE.

Aunque la selección del tamaño de la muestra de análisis no formó parte de los objetivos de la presente investigación, se hizo una revisión de la literatura al respecto, y se encontró que ciertos estudios estadísticos demostraron que la mayor variabilidad en la determinación de aflatoxinas en muestras de cacahuate ocurre en la selección del tamaño de la muestra de laboratorio sobre la cual se realiza el análisis (93). Otros estudios demostraron que el uso de muestras de laboratorio de 280 g producen un coeficiente de variación total de 118 % y que éste disminuye a medida que se incrementa el tamaño de la muestra de análisis (94). Sin embargo, la medida de la muestra se determina en función de los recursos disponibles y del error que se pueda tolerar.

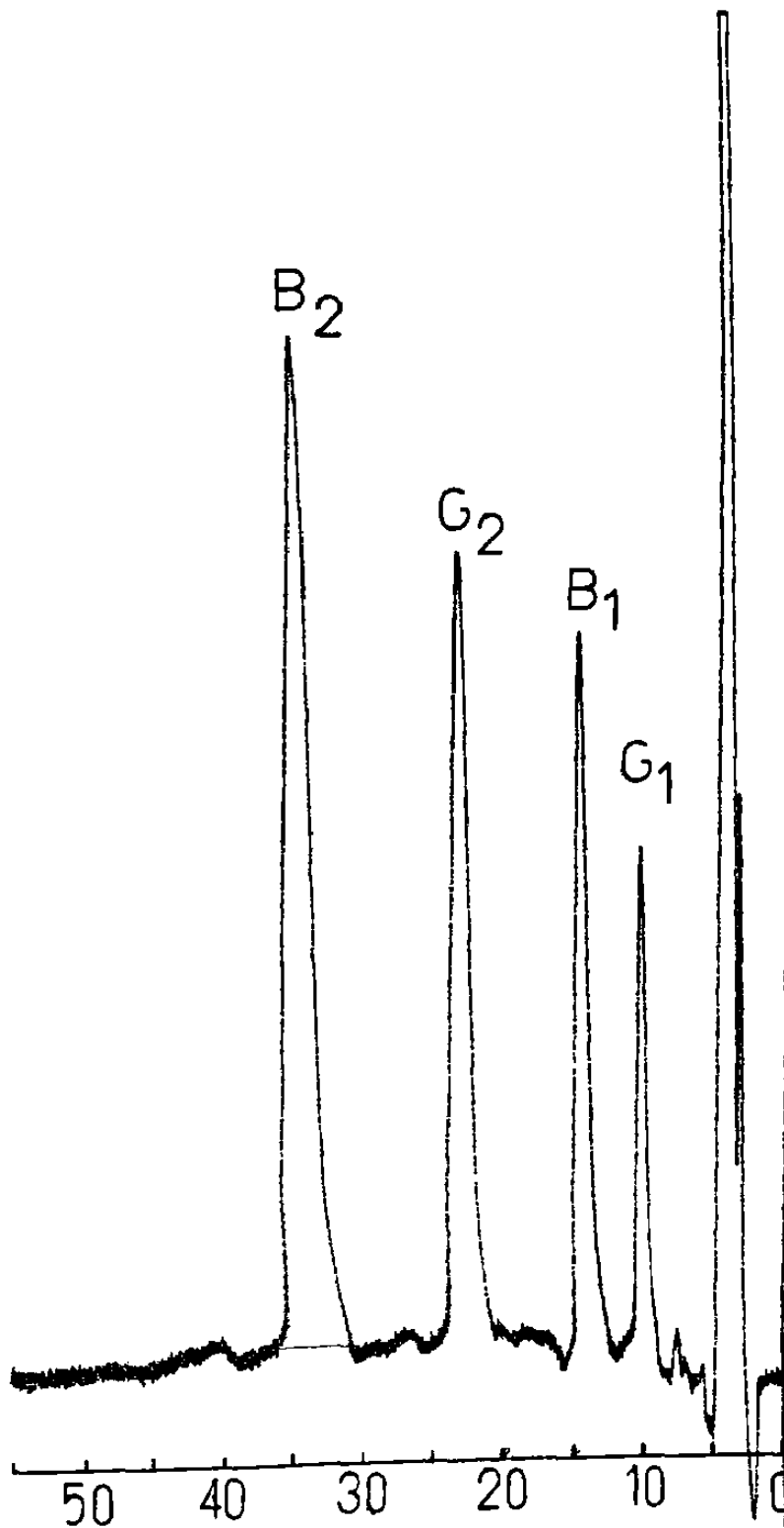
Aunque se usaron muestras de laboratorio de 10 g para la elaboración de los análisis, la combinación de metanol-agua y la relación solvente/cacahuate que se usaron fueron las mismas que se han reportado como óptimas (86,87). El cloroformo se usó como ha sido recomendado por el procedimiento BF (81). Los cromatogramas obtenidos mostraron reproducibilidad (Figs. 23-29).

Los porcentajes de recuperación variaron desde un 84.2 % hasta un 87.5 % y también mostraron que no sólo dependen del tipo de toxina sino de la cantidad presente en las muestras (Tabla III).



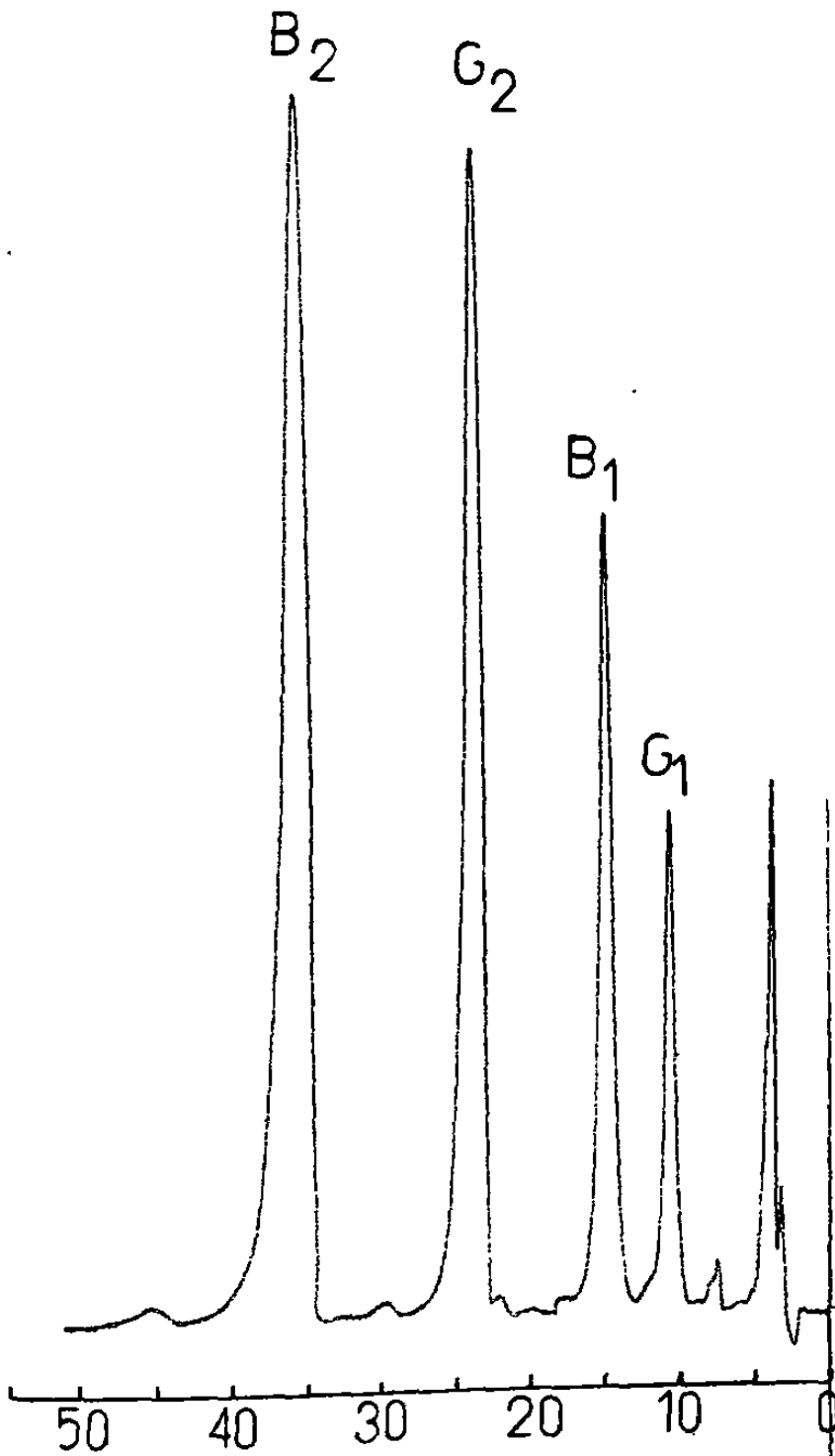
MUESTRA: CONTROL DE CACAHUATE.
 OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA CONTAMINACION NATURAL
 G 1: 1.3 NG/G G 2: 1 NG/G.
 B 1: 0.5 NG/G B 2: 0.8 NG/G
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: 0.05 x 2 MV.

FIG. 23



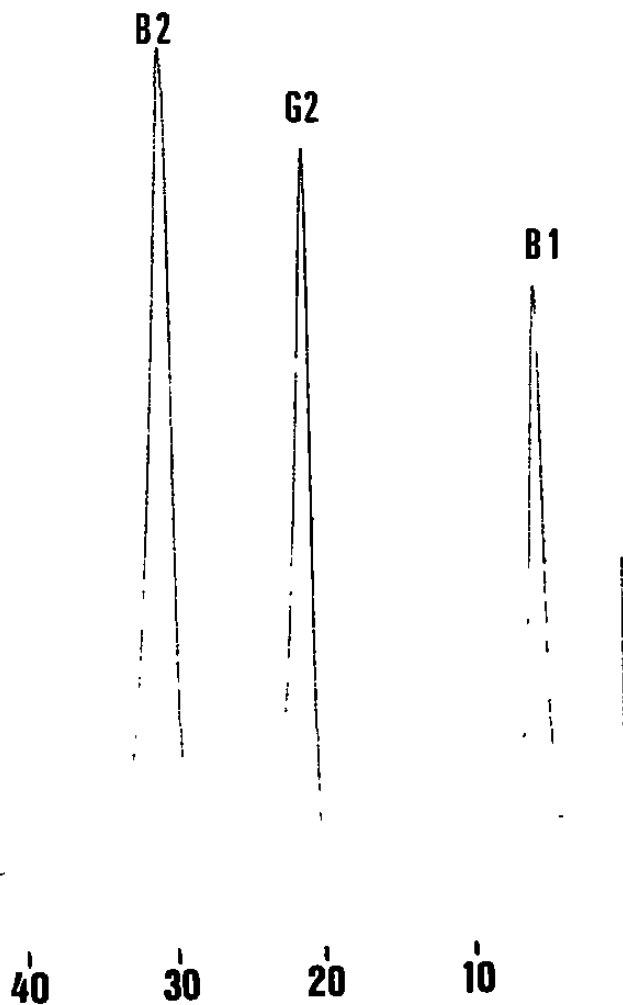
MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:
 G 1: 15 NG/G
 B 1: 10 NG/G
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: 0.05 x 5 MV.
 RECUPERACION: G 1: 85 %
 B 1: 88 %
 G 2: 20 NG/G
 B 2: 15 NG/G
 G 2: 90 %
 B 2: 83 %

FIG. 24



MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:
 G 1: 60 NG/G G 2: 120 NG/G
 B 1: 50 NG/G B 2: 70 NG/G
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV
 RECUPERACION: G 1: 89 % G 2: 92 %
 B 1: 80 % B 2: 90 %

FIG. 25



MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:

B 1 : 150 NG/G G 2: 250 NG/G B 2: 210 NG/G

VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

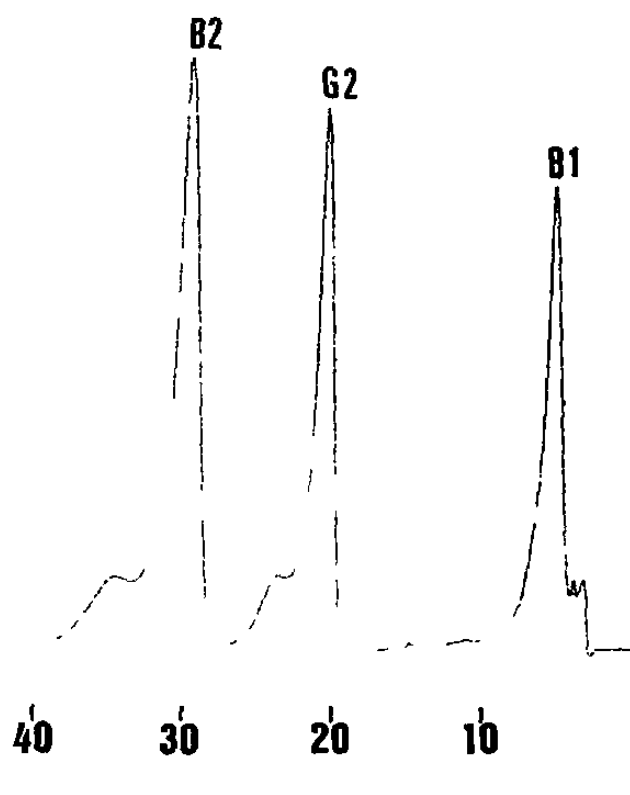
SENSIBILIDAD: 0.2×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: B 1: 84 % G 2: 86 % B 2: 96 %

FIG. 26



MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:

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

VOLUMEN DE RECUPERACION : 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

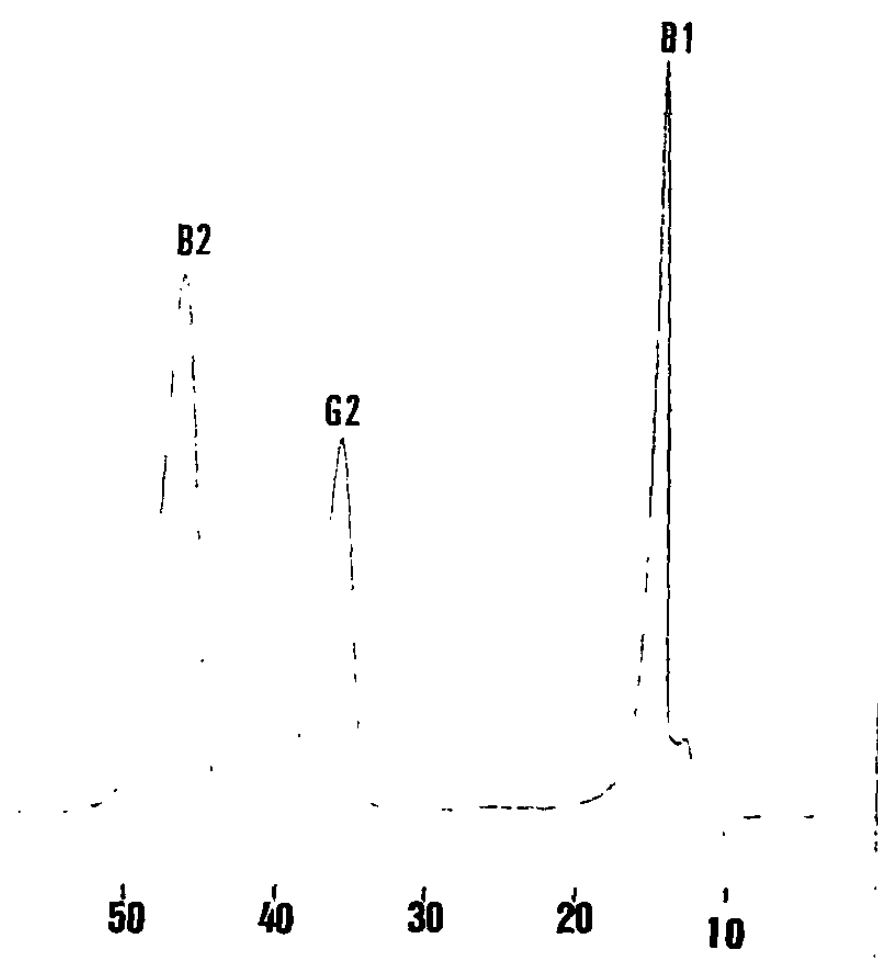
SENSIBILIDAD: 0.2 x 10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: B 1 : 89 % G 2: 87 % B 2: 92 %

FIG. 27



MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:

B 1: 32 NG/G G 2: 24 NG/G B 2: 20 NG/G

VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

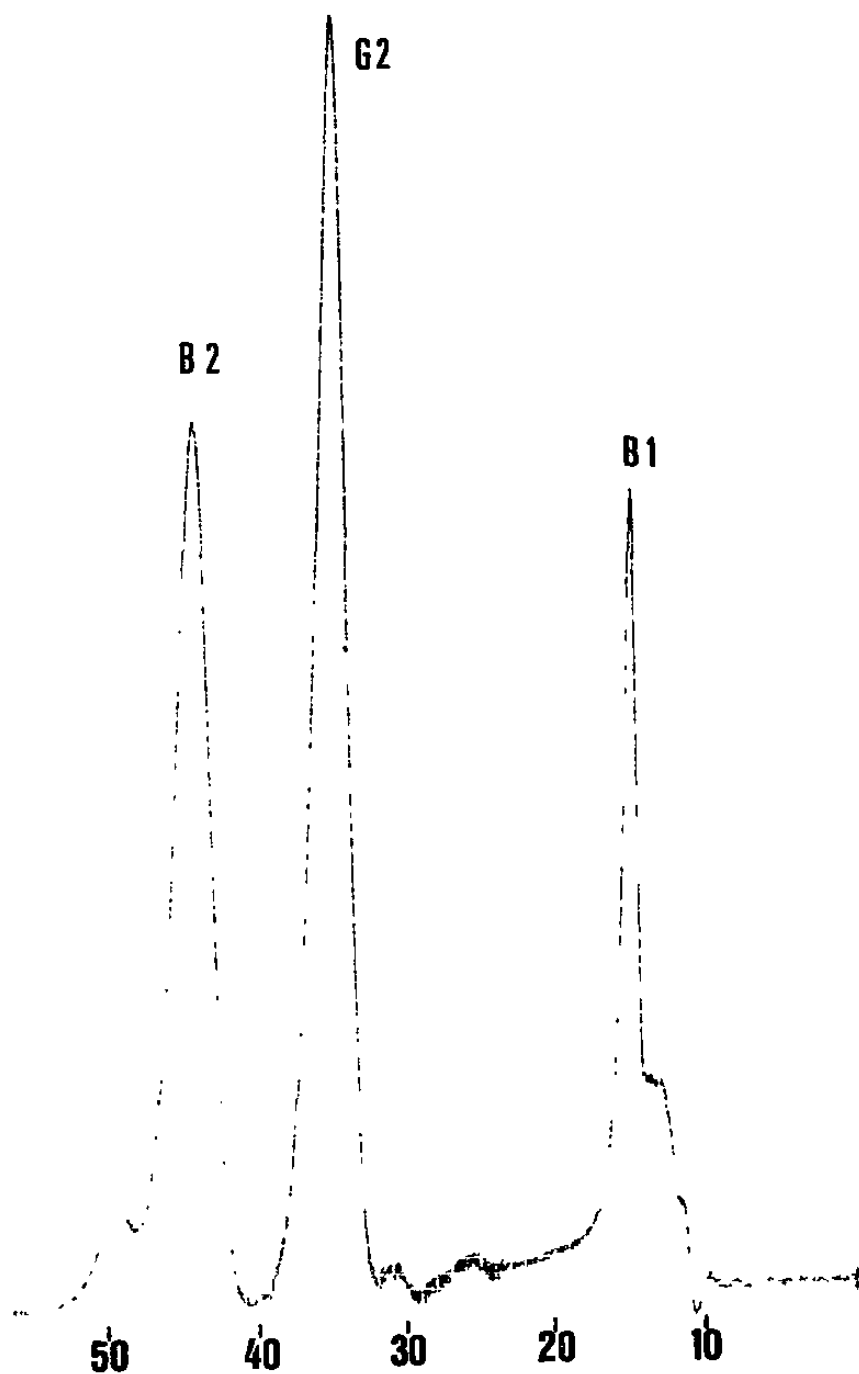
SENSIBILIDAD: 0.05 x 20 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (6) + 40)

RECUPERACION: B 1: 23 % G 2: 78 % B 2: 82 %

FIG. 28



MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:
 B 1: 15 NG/G G 2: 19 NG/G B 2: 15 NG/G
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: B 1, B 2: 0.05 x 10 MV; G 2: 0.05 x 5 MV
 FLUJO: 1.5 ML/MIN
 FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 +40)
 RECUPERACION: B 1: 81 % G 2: 82 % B 2: 85 %

FIG. 29

TABLA III.

PORCENTAJES DE RECUPERACION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MUESTRAS DE CACAHUATE.

AFLATOXINA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	LIMITES DE CONFIABILIDAD* AL 95 %
G 1	86.5 %	3.53 %	86.5 + 7.94 %
B 1	84.2 %	3.65 %	84.2 + 5.80 %
G 2	85.5 %	5.57 %	85.5 + 7.24 %
B 2	87.5 %	6.37 %	87.5 + 8.28 %

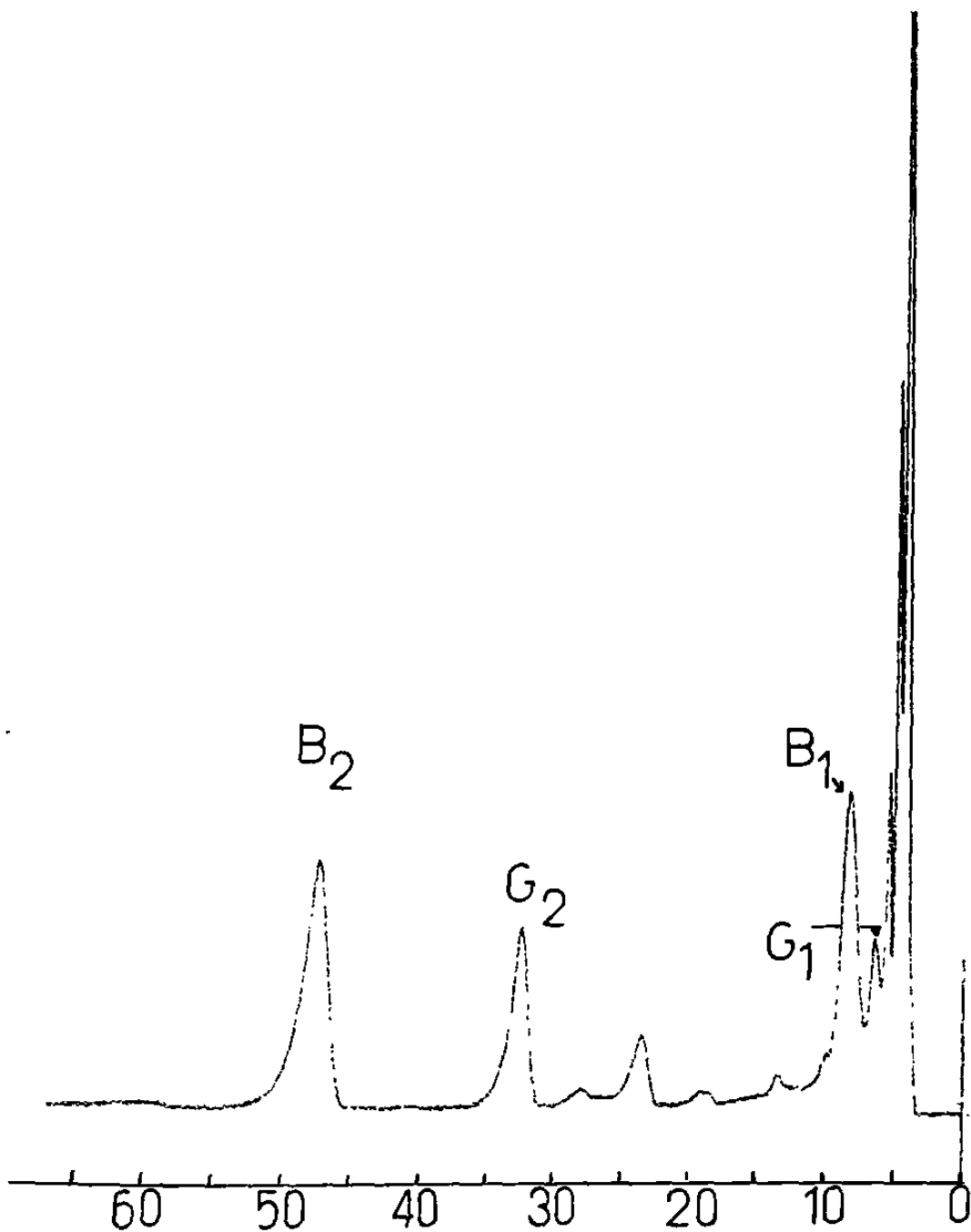
*EVALUACION A PARTIR DE SEIS MUESTRAS.

NUEZ.

Para el caso de la nuez, la elección del tamaño de la muestra de laboratorio tampoco constituyó parte de los objetivos. De hecho, la literatura que se encontró sobre análisis de aflatoxinas fue escasa; sin embargo algunos estudios han demostrado alta variabilidad en la determinación de las toxinas, la cual depende en mayor parte de la cantidad que se usa como muestra de laboratorio (94, 95). A pesar de ello, la cantidad que se usó para la realización del presente estudio fue de 10 g.

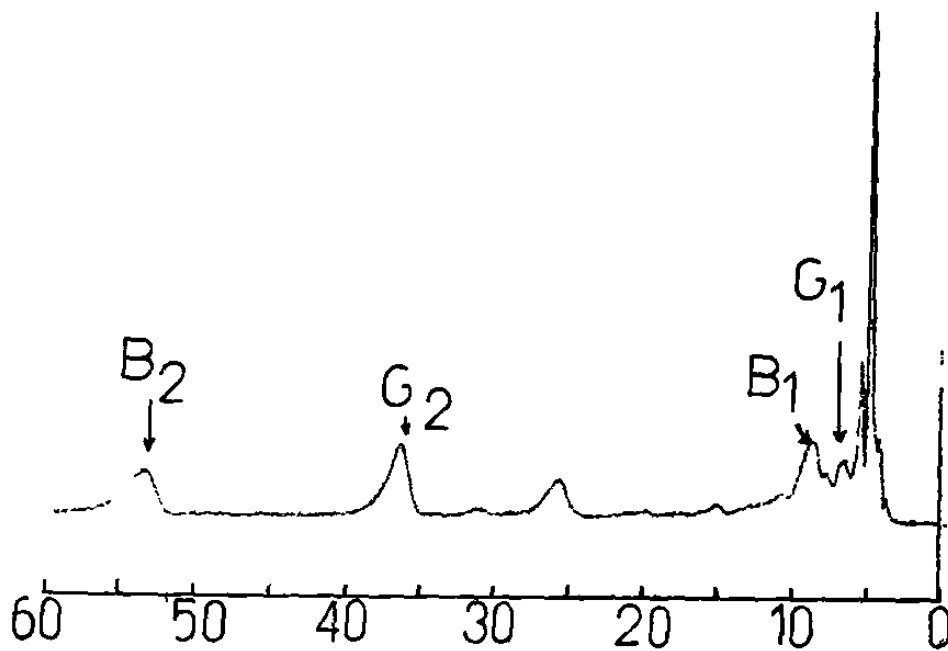
Dada su naturaleza, se consideró aplicar a la nuez el mismo procedimiento de extracción que el del cacahuate, pero haciendo dos cambios: se incrementó el volumen de hexano un 50 % (de 20 a 30 ml) dado el mayor contenido de compuestos oleosos y se incrementó un 50 % la concentración del electrolito (de 0.5 % a 1 % en la mezcla MeOH + H₂O) con la finalidad de lograr menor disolución de grasas en la mezcla de extracción MeOH + H₂O. Los cromatogramas obtenidos mostraron que no solamente las aflatoxinas se extrajeron, sino también otros compuestos fluorescentes que no son de interés (Fig. 30). Estos compuestos aparecieron en dos grupos: uno de ellos apareció entre B 1 derivatizada y G 2 y el otro grupo cerca de G 1 derivatizada. Al tomar en cuenta que el procedimiento de derivatización se realizó después de la extracción y purificación de la muestra, se supuso que esos dos grupos de compuestos fluorescentes superarían en polaridad a las cuatro aflatoxinas, puesto que G 2 es la más polar de todas ellas. Así pues, se consideró que aumentando ligeramente la concentración de agua en la solución de extracción (de 41 % a 50 %), los compuestos que no eran de interés permanecerían en esa mezcla de mayor polaridad al momento de efectuarse la extracción de las aflatoxinas mediante la adición de cloroformo. Sin embargo no se obtuvieron esos resultados, ya que los dos grupos de compuestos fueron extraídos en la capa clorofórmica junto con las aflatoxinas (Fig. 31).

La evidencia experimental de los dos procedimientos anteriores hizo suponer que la polaridad del cloroformo ejercía alta influencia para extraer los compuestos fluorescentes que no son de interés. Por ello mismo, se propuso disminuir la polaridad del solvente usado en la purificación; así, en lugar de emplear cloroformo, se utilizó una mezcla de cloroformo-tetracloruro de carbono (15+10), la cual es menos polar que el cloroformo solo. El volumen se mantuvo invariable en 25 ml. No obstante los cromatogramas mostraron la desaparición del grupo de compuestos más cercano a G 2, aquéllos



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON 90 NG/G DE AFLATOXINAS
TOTALES.
METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 mv.
PORCENTAJES DE RECUPERACION NO CALCULADOS SOBRE LA MUESTRA.

FIG. 30



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON 90 NG/G DE AFLATOXINAS
 TOTALES.
 METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO ADICIONANDO 20 ML
 MAS DE AGUA.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV.
 PORCENTAJES DE RECUPERACION NO CALCULADOS SOBRE LA MUESTRA.

FIG. 31

que estuvieron más cercanos a G 1 permanecieron aunque en menor cantidad (Fig. 32). Posteriores ensayos no mostraron extracción de compuestos diferentes a las aflatoxinas (Figs. 33-37).

Los porcentajes de recuperación variaron de un 88 % a un 91 % (Tabla IV). Aunque no se observó una diferencia muy marcada entre el tipo de aflatoxina y la recuperación de cada una de ellas, si se pudo notar que la recuperación depende de la cantidad presente en las muestras (Figs. 33-37).

Discusión de los métodos fisicoquímicos de detección.

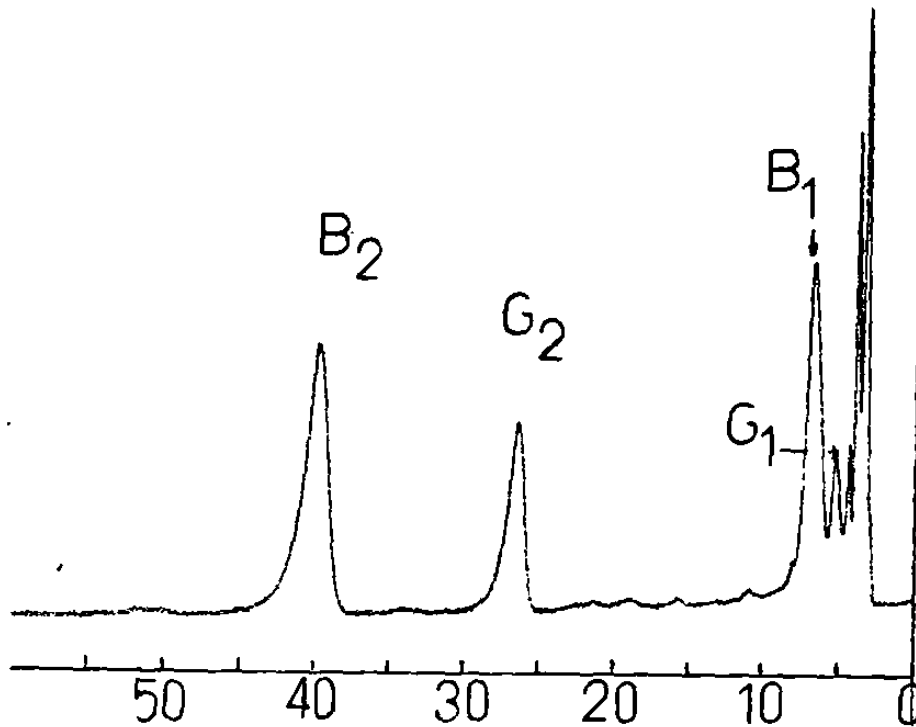
El principal objetivo de la presente investigación estuvo dirigido al estudio de la adaptabilidad de métodos directos para la cuantificación de aflatoxinas a niveles de partes por billón a partir de muestras contaminadas. Para ello se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (83), como técnica de soporte para supervisar los procedimientos de extracción y purificación y el efecto de la matriz de las muestras sobre las mediciones directas.

Ambos modos de detección fisicoquímica: absorción ultravioleta y fluorescencia molecular se usaron para comparar los límites de detección de las toxinas.

Debido a que la recuperación de las aflatoxinas depende de la cantidad con la que las muestras están contaminadas (Tablas II-IV), el criterio que se tomó para calcular los límites de detección se basó en la selección de las muestras cuya contaminación natural o enriquecimiento de aflatoxinas fuera la menor entre todas las ensayadas. Es decir, no se pretendió hacer regresiones lineales porque los rangos de contaminación o enriquecimiento fueron muy grandes.

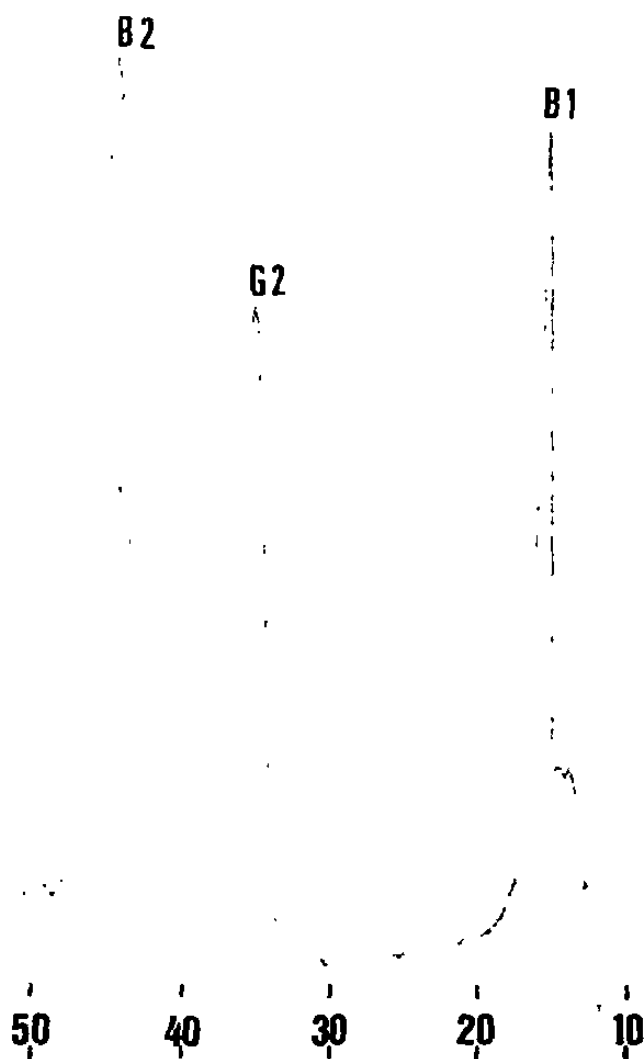
Métodos por HPLC.

Para el cálculo de los límites de detección se eligió el criterio de alturas y no el de áreas por dos razones: la primera, porque los cromatogramas ideales debieran carecer de anchos de banda, y segundo, porque el límite de detección sería menor para una analito que no tuviera ancho de banda en relación a uno que lo tuviera.



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON 90 NG/G DE AFLATOXINAS
TOTALES.
METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV.
PORCENTAJES DE RECUPERACION NO CALCULADOS SOBRE LA MUESTRA.

FIG. 32



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:

B 1: 15 NG/G G 2: 20 NG/G B 2: 16 NG/G

METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

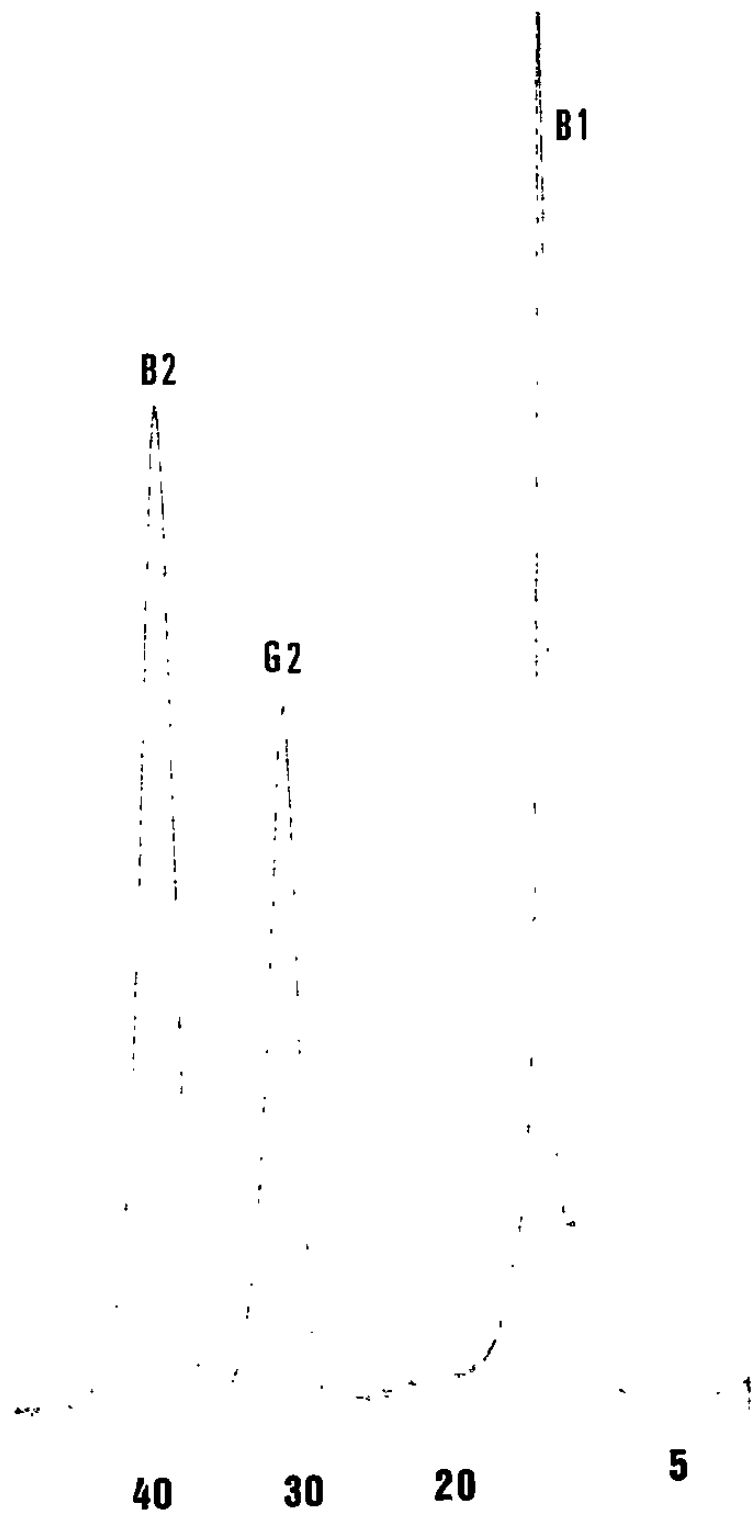
SENSIBILIDAD: 0.05×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

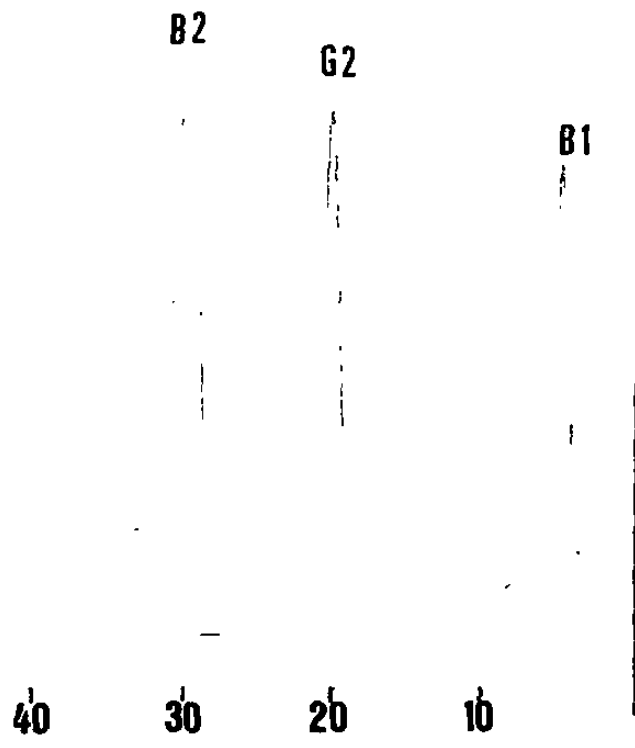
RECUPERACION: E 1: 90 % G 2: 88 % B 2: 90

FIG. 33



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:
 B 1: 30 NG/G G 2: 25 NG/G B 2: 20 NG/G
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML. METODO: LIQ-LIQ MOD.
 SENSIBILIDAD: 0.05×10 MV.
 FLUJO: 1.5 ML/MIN. DETECCION: FLUORESCENCIA.
 FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)
 RECUPERACION: B 1: 90 % G 2: 80 % B 2: 85 %

FIG. 34



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:

B 1: 110 NG/G G 2: 170 NG/G B 2: 150 NG/G

METODO DE EXTRACCION: LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

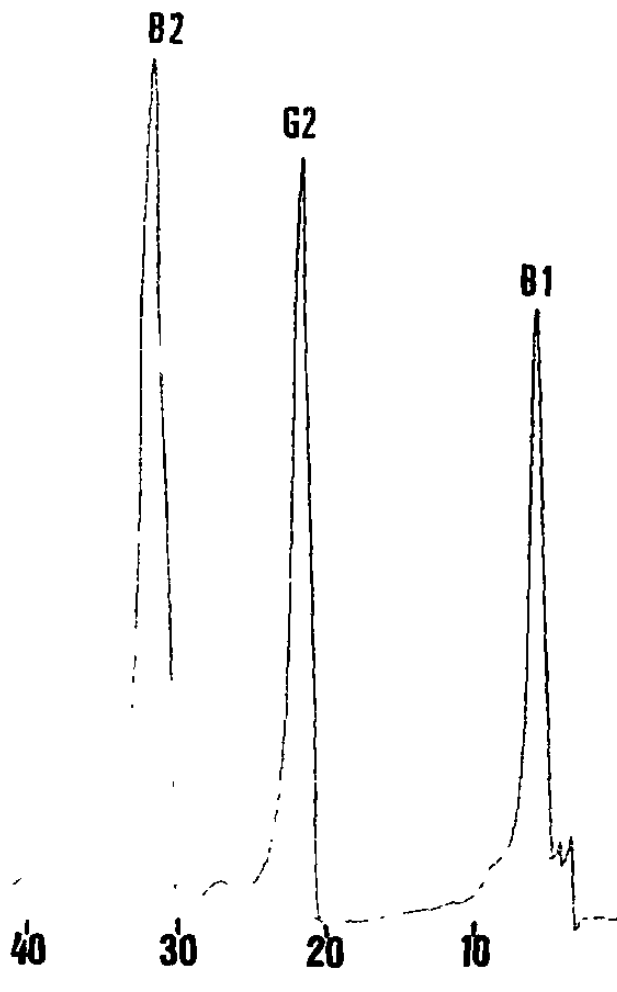
SENSIBILIDAD: 0.2×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂ (60 + 40)

RECUPERACION: B 1: 91 % G 2: 87 % B 2: 94 %

FIG. 35



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:

B 1: 160 NG/G G 2: 270 NG/G B 2: 240 NG/G

METODO DE EXTRACCION: LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

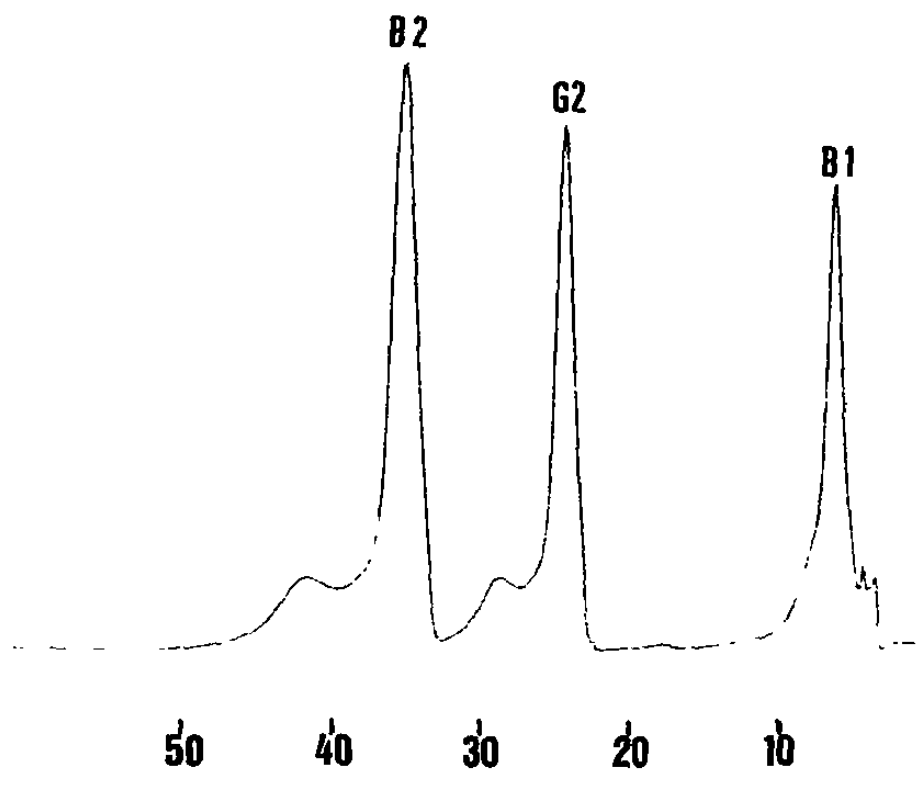
SENSIBILIDAD: 0.2×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: B 1: 88 % G 2: 89 % B 2: 95 %

FIG. 36



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:

B 1: 120 NG/G G 2: 170 NG/G B 2: 160 NG/G

METODO DE EXTRACCION: LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

SENSIBILIDAD: 0.2×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: B 1: 88 % G 2: 94 % B 2: 93 %

FIG. 37

TABLA IV.

PORCENTAJES DE RECUPERACION DEL METODO LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO
USADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE NUEZ.

AFLATOXINA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	LIMITES DE CONFIABILIDAD* AL 95 %
B 1	89.4 %	1.34 %	89.4 + 1.91 %
G 2	88.2 %	5.40 %	88.2 + 7.70 %
B 2	91.0 %	4.0 %	91.0 + 5.70 %

No se hicieron las mediciones para G 1.

*EVALUACION A PARTIR DE CINCO MUESTRAS.

Para el caso de los límites de detección de fluorescencia por HPLC, la relación de intensidades aquí reportada para las cuatro aflatoxinas ya había sido descrita previamente (89).

A pesar de que no se conoció el porcentaje de recuperación de la aflatoxina G 1 en la nuez, porque los estándares no cumplieron las especificaciones de la AOAC (81), sí se logró sugerir un criterio de medición para proponer su límite de detección. Se supuso que la relación de los límites de detección de B 1 y G 1 se conservaría igual tanto para el cacahuate como para la nuez. Así, se sugirió tomar como parámetro de referencia la relación de límites de detección obtenidas a partir del cacahuate y extrapolarla al caso de la nuez. Lo anterior puede considerarse como lo más cercano, ya que ambas aflatoxinas B 1 y G 1 fueron sometidas al proceso de derivatización, el cual las condujo a una polaridad semejante y además porque el proceso de extracción del cacahuate es el más parecido al de la nuez. Adicionalmente, porque en la relación de los límites de detección no solamente van implícitos los porcentajes de recuperación sino también la reproducibilidad de los cromatogramas. Los límites de detección por HPLC-fluorescencia pueden observarse en la tabla V.

Para el caso de los límites de detección de UV por HPLC, varios ensayos realizados previamente con estándares demostraron que esta técnica no permitiría cuantificar aflatoxinas dentro del rango de interés toxicológico. Por lo anterior, se decidió no practicar cromatogramas HPLC-UV a partir de muestras contaminadas. Los cromatogramas se hicieron únicamente para los estándares. A partir de ellos se sugirieron los límites de detección que podrían ser obtenidos para las muestras. Para los cálculos se consideraron los porcentajes de recuperación (Tabla VI).

Métodos directos.

En lo referente a los métodos directos por absorción ultravioleta, varios ensayos realizados sobre estándares demostraron que esta técnica tampoco permitiría cuantificar las aflatoxinas dentro de los rangos de interés. Las lecturas se hicieron solamente para estándares, a partir de los cuales se sugirieron los límites de detección que podrían ser obtenidos para las muestras (Tabla VI). Los estándares que se escogieron fueron los que presentaron la absorbancia más baja dentro de una recta de calibración que se hizo para cada aflatoxina.

TABLA V.

LIMITES DE DETECCION DE AFLATOXINAS USANDO HPLC CON DETECCION DE FLUORESCENCIA.

	MAIZ (PPB)	CACAHUATE (PPB)	NUEZ (PPB)
AFLATOXINAS			
B 1*	0.50	0.08	0.18
G 1*	0.40	0.15	0.36
B 2	0.80	0.08	0.14
G 2	1.0	0.15	0.24

* DERIVATIZADA CON ACIDO TRIFLUOROACETICO.

TABLA VI.

LIMITES DE DETECCION DE AFLATOXINAS DESPUES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION Y REFINACION.

MUESTRAS	LIMITES DE DETECCION (PPB)							
	DETECCION DIRECTA UV A 365 NM.				DETECCION UV CON SEPARACION HPLC.			
	B1	G1	B2	G2	B1	G1	B2	G2
MAIZ	113	125	96	126	68	44	25	29
CACAHUATE	118	130	100	130	72	45	26	30
NUEZ	127	140	108	140	73	46	28	32

Para el caso de los límites de detección de las lecturas directas por fluorescencia, se presentaron ciertas dificultades que dependieron del tipo de muestra; así, por ejemplo, el maíz presentó compuestos interferentes y fondo de fluorescencia (Figs. 38-46) que impidieron calcular los límites de detección a excepción de B 1. Pero no sucedió así con el cacahuate y la nuez en donde no se presentaron interferencias, o si las hubo, se pudieron eliminar.

En el caso específico del maíz, solamente se obtuvo el límite de detección de B 1 derivatizada (Tabla VII), lo cual fue posible debido a su alta intensidad de fluorescencia en relación a la de los metabolitos interferentes. Aunque no se obtuvieron experimentalmente los límites de detección para el resto de las aflatoxinas, sí se sugirieron los cálculos en función de los estándares y de los porcentajes de recuperación. Para ello se supuso que no existirían interferencias.

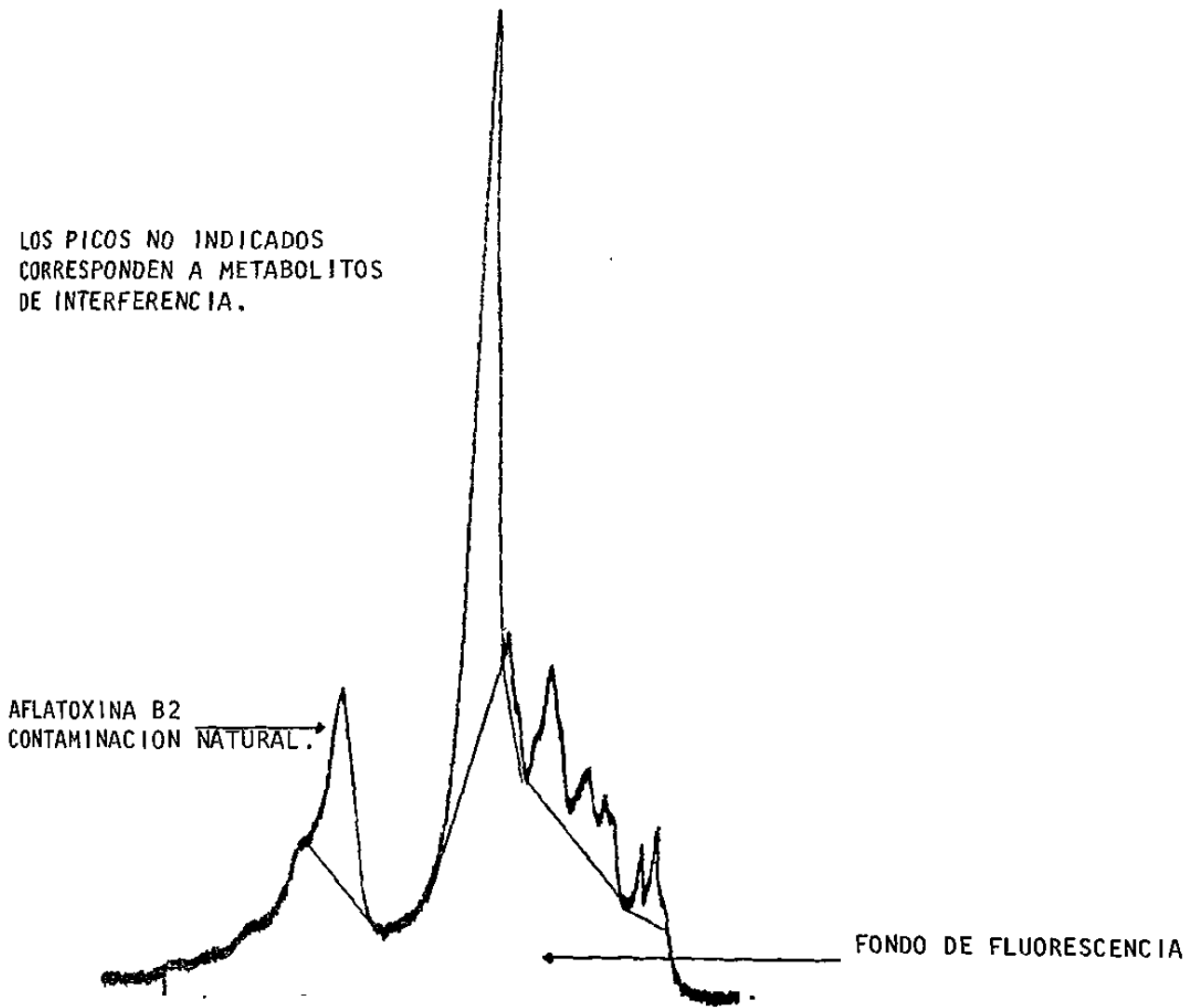
Ensayos hechos sobre fluorescencia directa del maíz revelaron que la intensidad emitida por los metabolitos interferentes y el fondo de fluorescencia fue significativa en relación a la emitida por las aflatoxinas (Tablas VIII-X). Mediante el uso de HPLC se pudo ver que el área de los cromatogramas se amplificó para cada aflatoxina de subíndice 1 cuando fueron derivatizadas; lo cual no solamente no ocurrió cuando las muestras se contaminaron con ellas sin derivatizar, sino que ni siquiera fueron detectadas. También se observó una reducción en la fluorescencia de fondo (Tablas XI-XIII).

Al evaluar la fluorescencia de fondo se encontró que ella depende del tipo de maíz y también que, cuando las muestras se enriquecieron con 5 ng/g de cada aflatoxina, la derivatización intensificó su fluorescencia por aproximadamente tres veces en relación a la de las muestras no derivatizadas (Tablas VIII-X).

En general, para todas las muestras analizadas, el método de separación por HPLC demostró ser más sensible que las determinaciones directas, tanto por fluorescencia molecular como por absorción ultravioleta.

Las determinaciones directas por fluorescencia resultaron ser más sensibles que las mismas por UV (Tablas VI y VII).

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.

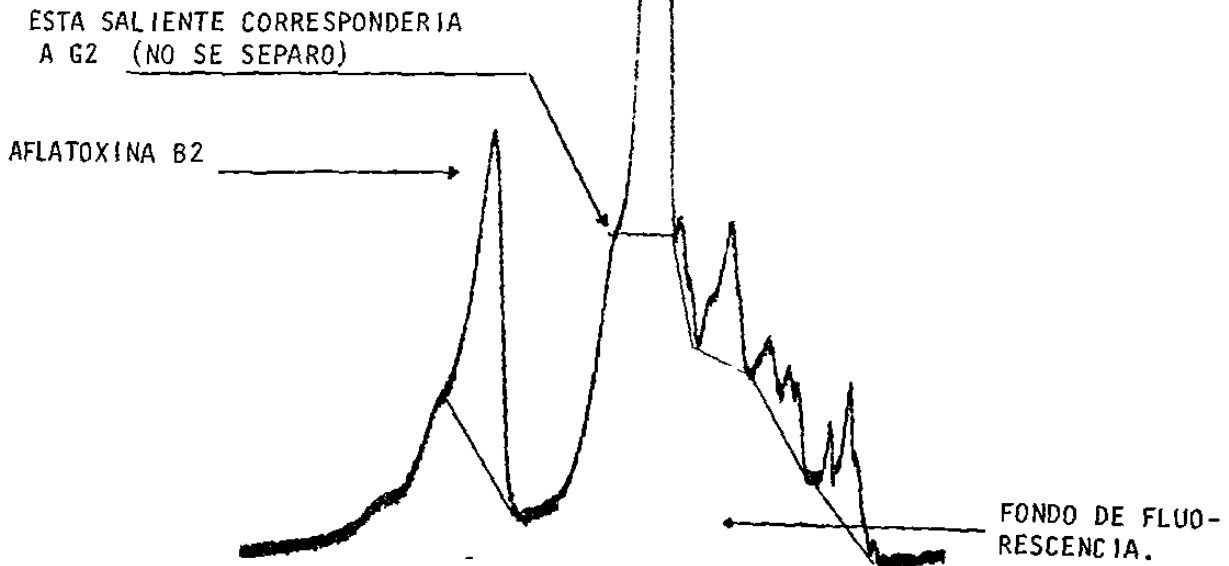


MUESTRA : MAIZ BLANCO No. 1 SOLO
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.150 G.
DETECTOR: BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION : 365 NM, EMISION 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 38

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA

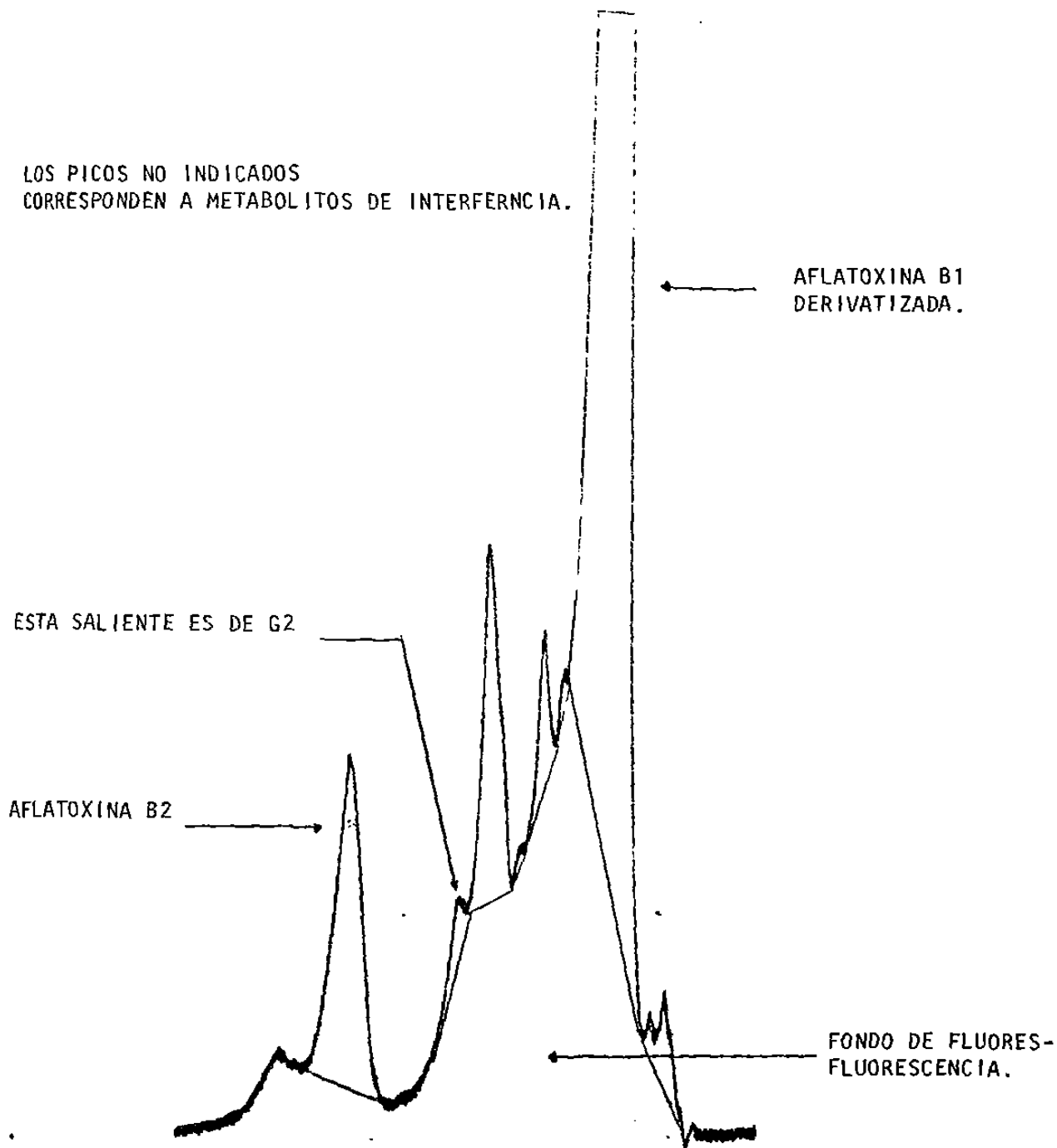
EL ENRIQUECIMIENTO DE B1
(5 ng/g) NO LLEGA A SER DETECTADO.



MUESTRA : MAIZ BLANCO NO.1 + AFLATOXINAS
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.155 G
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
DETECTOR: BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION : 365 NM, EMISION 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 39

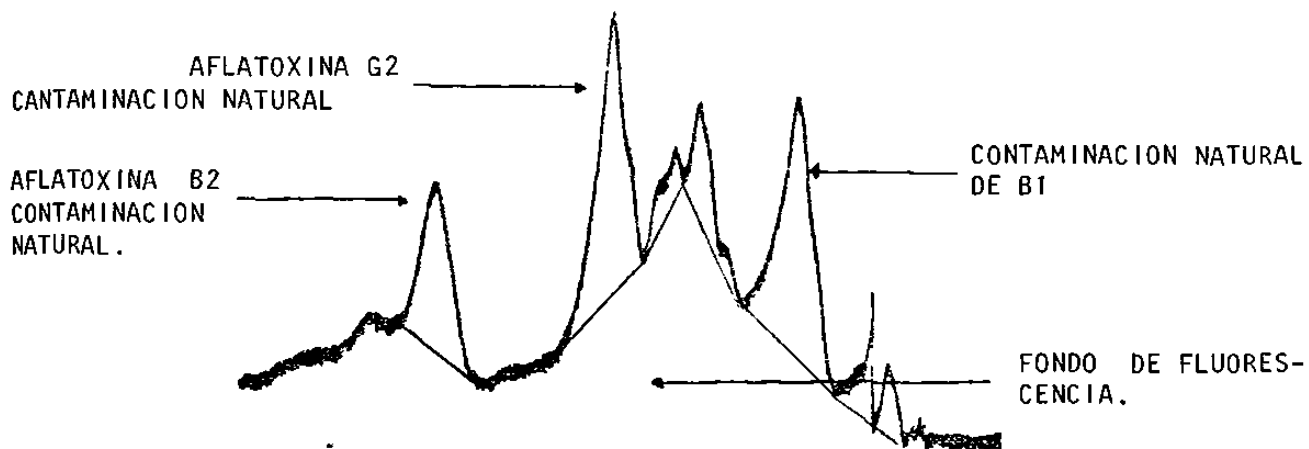
LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS DE INTERFERENCIA.



MUESTRA : MAIZ BLANCO No. 1 + AFLATOXINAS + TFA
MUESTRA DERIVATIZADA
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.279 G.
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION: 365, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 40

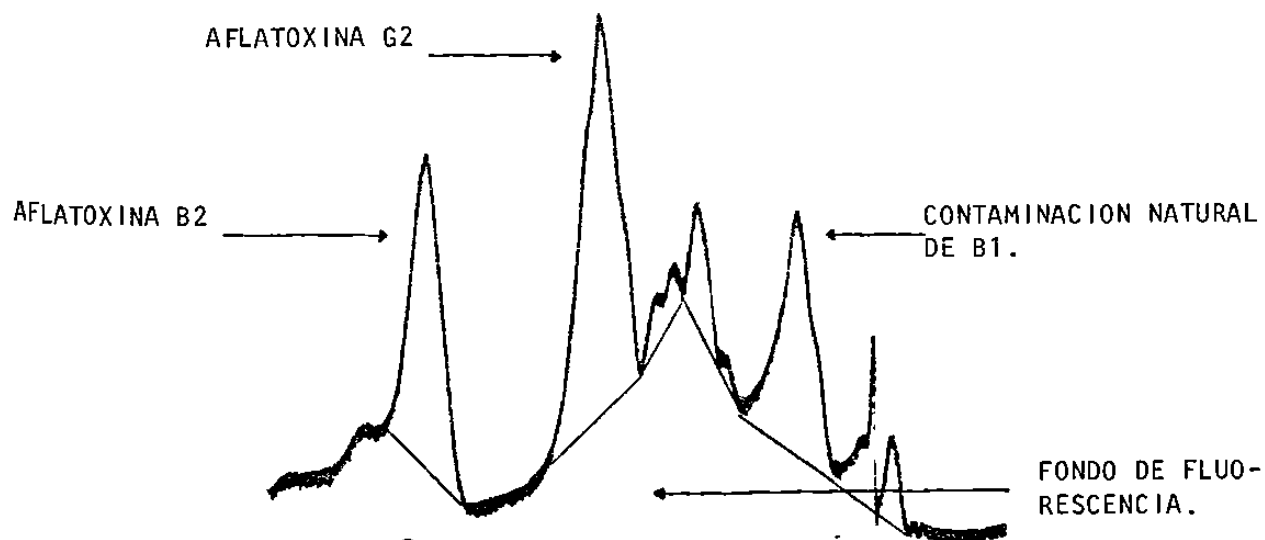
LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.



MUESTRA : MAIZ BLANCO No. 2 SOLO
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.138 G
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION 365 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 41

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.



MUESTRA : MAIZ BLANCO No. 2 + AFLATOXINAS
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.143 G
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION 365 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 42

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.

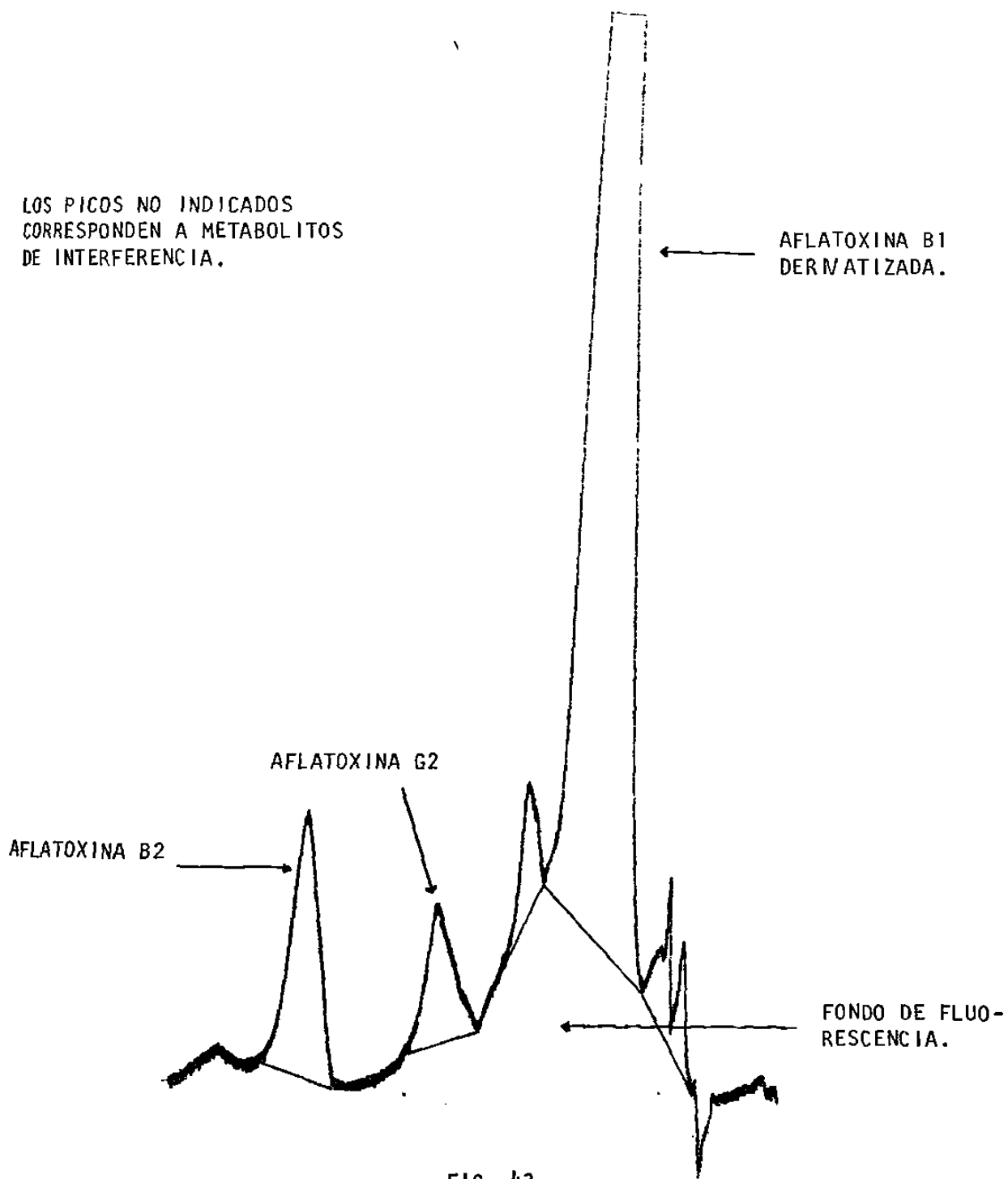
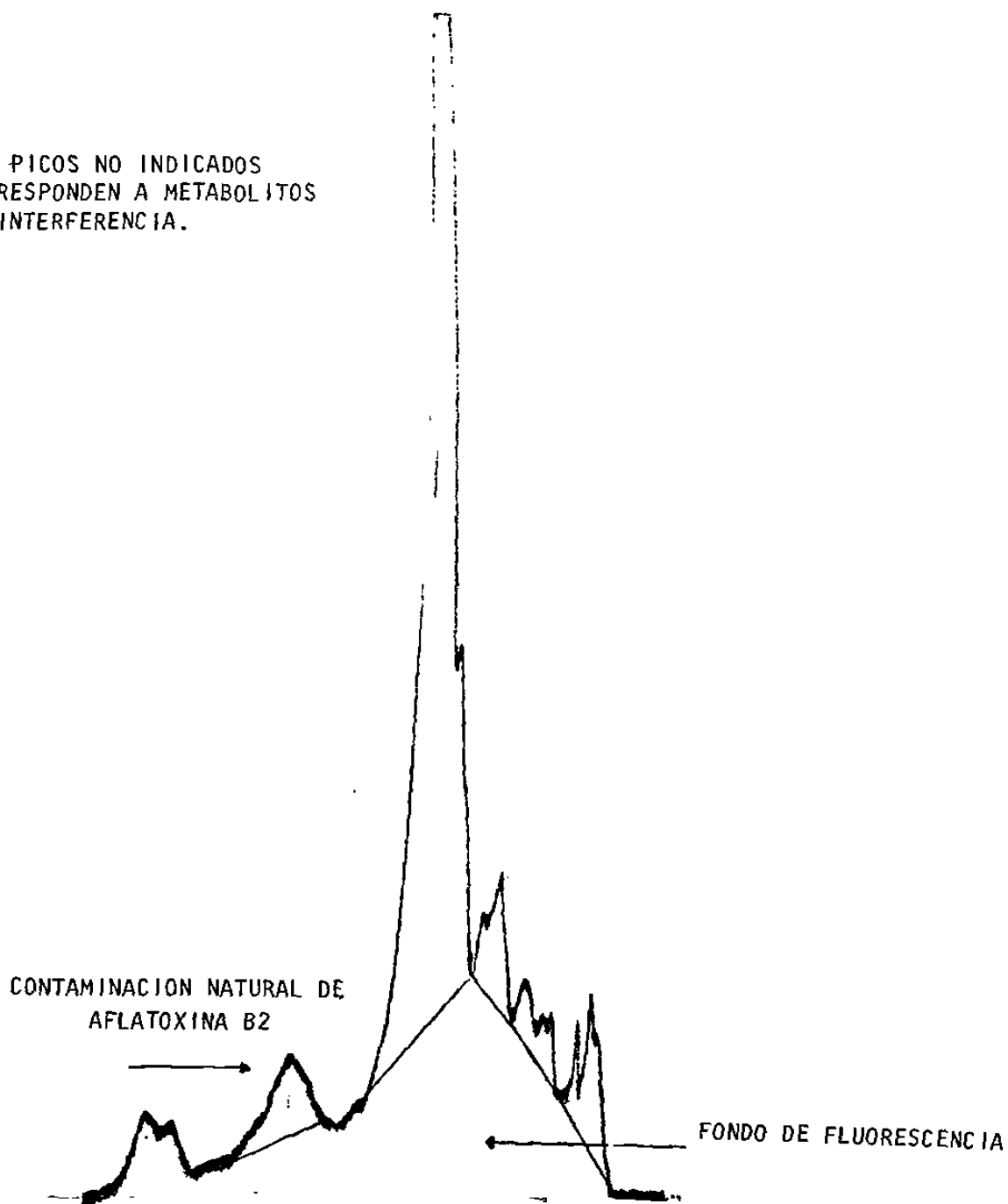


FIG. 43

MUESTRA : MAIZ BLANCO No.2 + AFLATOXINAS + TFA
MUESTRA DERIVATIZADA
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.211 G
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION : 365 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.

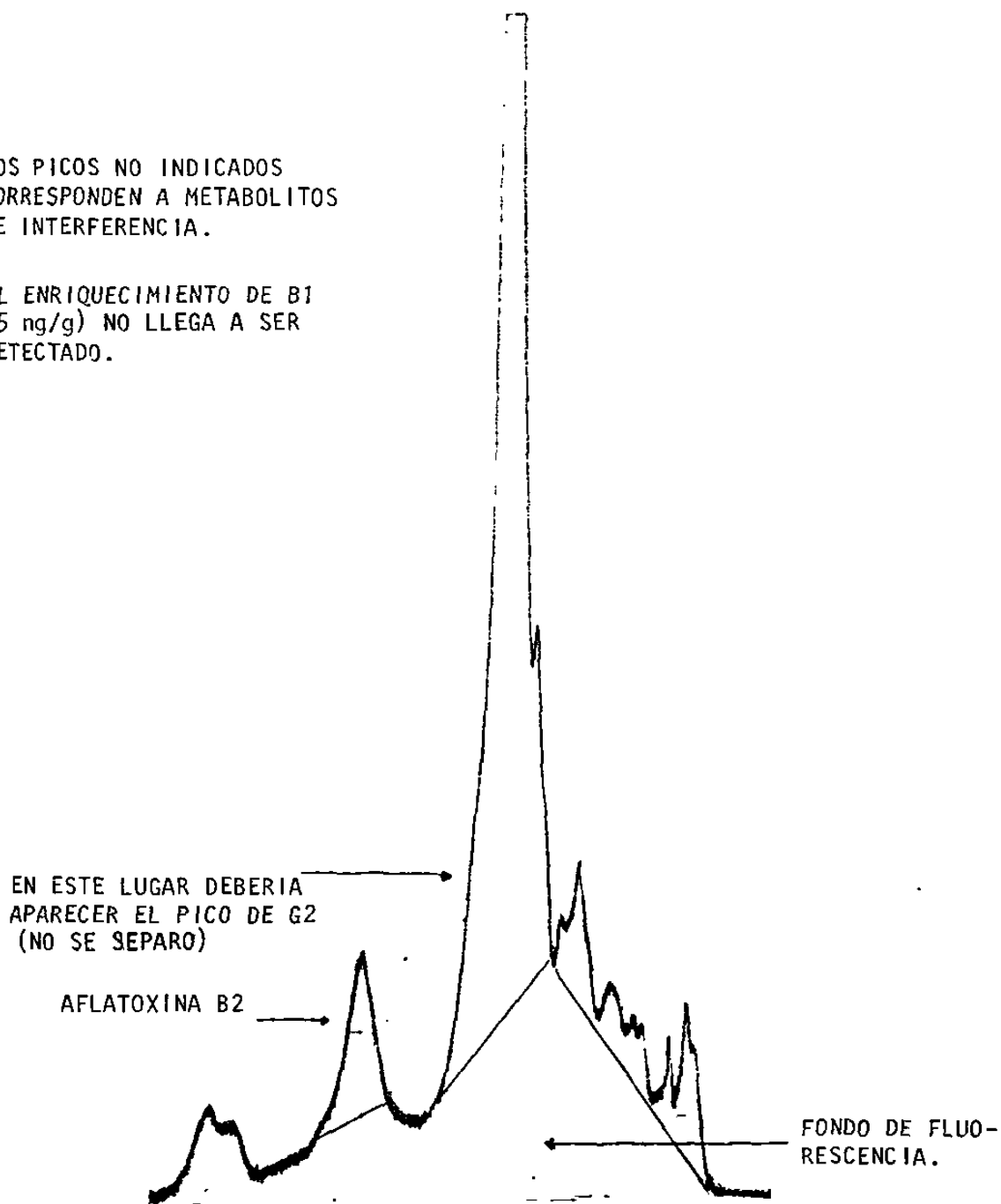


MUESTRA : MAIZ AMARILLO SOLO
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.309 GR.
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION 365 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 44

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.

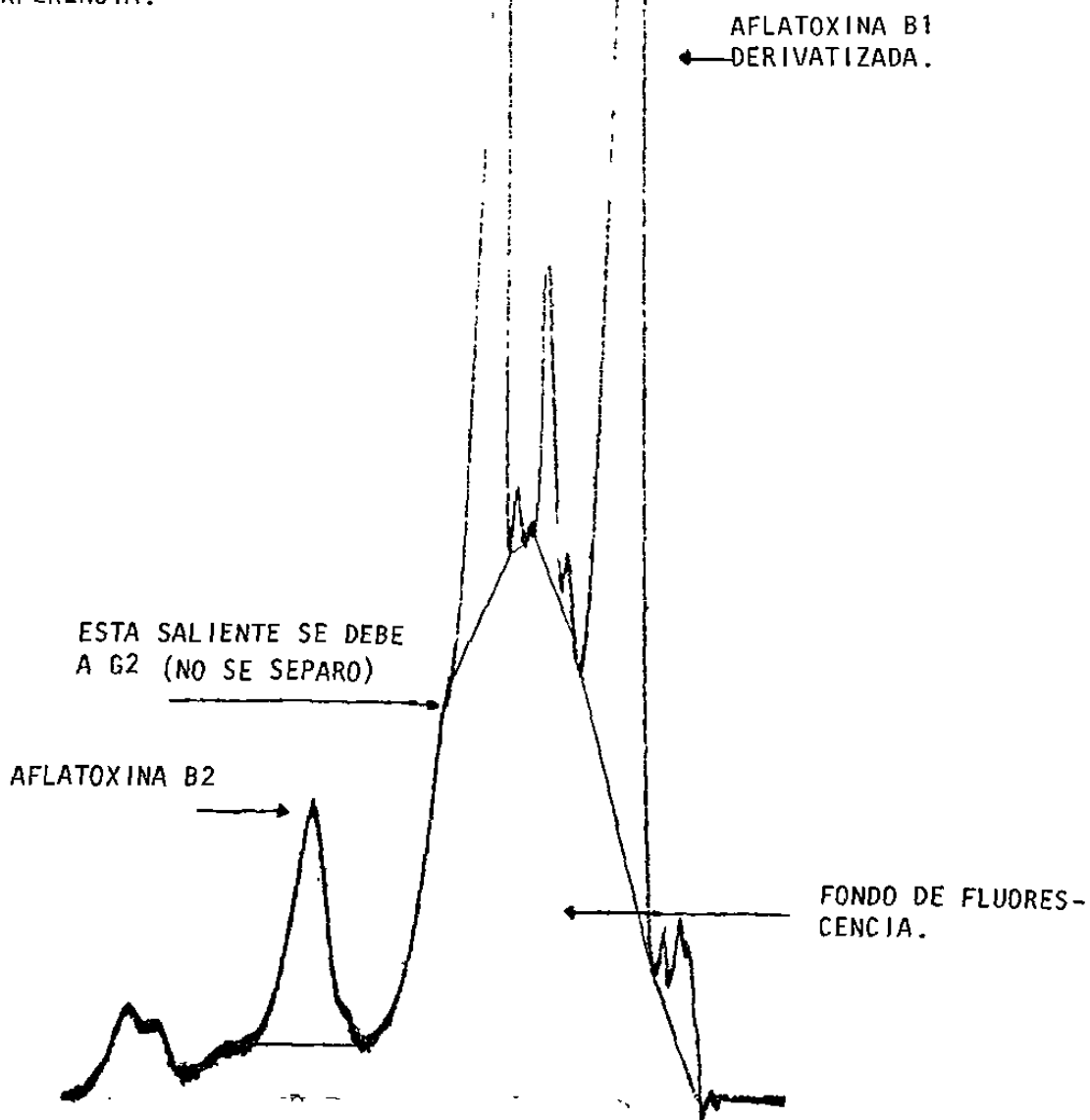
EL ENRIQUECIMIENTO DE B1
(5 ng/g) NO LLEGA A SER
DETECTADO.



MUESTRA : MAIZ AMARILLO + AFLATOXINAS
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.337
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION : 385 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 45

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.



MUESTRA : MAIZ AMARILLO + AFLATOXINAS + TFA
MUESTRA DERIVATIZADA
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.515 G
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION : 365 NM, EMISION : 450 NM)

SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 46

TABLA VII.

LIMITES DE DETECCION DE AFLATOXINA B 1* USANDO DETECCION POR FLUORESCENCIA DESPUES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION Y REFINACION.

LIMITES DE DETECCION (PPB)

TIPO DE MUESTRA	DETECCION DIRECTA	DETECCION CON SEPARACION HPLC
MAIZ	0.82	0.50
CACAHUATE	0.87	0.08
NUEZ	0.94	0.18

* DERIVATIZADA CON ACIDO TRIFLUOROACETICO.

EVALUACION DE LA CONTRIBUCION DEL FONDO DE FLUORESCENCIA EN LAS DETERMINACIONES DIRECTAS A PARTIR DE MUESTRAS DE MAIZ.

Las siguientes abreviaturas se han utilizado en las tablas de las contribuciones que se muestran enseguida.

- T : Fluorescencia total.
- M : Fluorescencia o en su caso àrea de los metabolitos.
- F.F. : Fluorescencia o en su caso àrea del fondo fluorescente.
- I.T. : Interferencia total.
- A.P.M. : Fluorescencia o en su caso àrea de las aflatoxinas propias de la muestra (contaminaci3n natural que present3 el maiz).
- A. E. : Concentraci3n de aflatoxinas con la que se enriqueci3 el maiz (5 ng/g de cada una).
- M.E. : Maiz enriquecido con 5 ng/g de cada aflatoxina.
- M.E.D. : Maiz enriquecido derivatizado.

TABLA VIII

CONTRIBUCION DEL FONDO DE FLUORESCENCIA EN LAS MEDICIONES DIRECTAS
DESPUES DE LA EXTRACCION Y REFINACION.

UNIDADES DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

MUESTRA	T	M	F.F	I.T.	A.P.M.			A.E.		
					B1	G2	B2	5 NG/G C/U		
					B1	G2	B2	B1	G2	B2
MAIZ BLANCO No. 1										
Maiz SOLO	27	9.9	15.4	25.3	0	0	1.7	0	*	0
M.E.	28	11.4	13.5	24.9	0	0	1.8	0	*	1.3
M.E.D.	83	8	38	46	0	0	3.3	29.4	ND	3.8

* Se desconoce porque no se separò en el cromatograma.

ND : No se detecta a la cantidad en la que està presente.

TABLA IX.

CONTRIBUCION DEL FONDO DE FLUORESCENCIA EN LAS MEDICIONES DIRECTAS
DESPUES DE LA EXTRACCION Y REFINACION.

UNIDADES DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

MUESTRA	T	M	F.F	I.T	A.P.M.			A.E		
					B1	G2	B2	5 NG/G		C/U
								B1	G2	B2
MAIZ BLANCO No. 2										
MAIZ SOLO	23	2.1	15.1	17.2	2.3	2.1	1.3	0	0	0
M.E.	32	3	17.6	20.6	2.8	2.2	1.8	0	2.8	1.7
M.E.D.	103	7.7	34.6	42.3	6.8	4.8	3.9	41	0	3.9

TABLA X.

CONTRIBUCION DEL FONDO DE FLUORESCENCIA EN LAS MEDICIONES DIRECTAS
DESPUES DE LA EXTRACCION Y REFINACION.

UNIDADES DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

MUESTRA	T	M	F.F	I.T	A.P.M.			A. E.		
					B1	G2	B2	B1	G2	B2
MAIZ AMARILLO										
MAIZ SOLO	19	9.6	8.7	18.3	0	0	ND	0	0	0
M.E.	24	11.8	11	22.8	0	0	ND	0	*	0
M.E.D.	46	8	25.4	33.4	0	0	1.6	10	*	0

* Se desconoce porque no se separò en el cromatograma.

ND : no se detecta a la cantidad en la que està presente.

TABLA XI.

PORCENTAJES DE AREAS EN LAS MEDICIONES DE FLUORESCENCIA POR HPLC.

MUESTRA	M	F.F.	I.T.	A.P.M.						A.E.		
										5 NG/G C/U		
				B1	G2	B2	B1	G2	B2			
MAIZ BLANCO No. 1												
MAIZ SOLD	36.7	57.1	93.8	0	0	6.2	0	*	0			
M.E.	40.6	48.4	89	0	0	6.5	0	*	4.5			
M.E.D.	9.6	45.9	55.5	0	0	3.9	35.3	0.7	4.6			

* Se desconoce porque no se separó en el cromatograma.

TABLA XII.

PORCENTAJES DE AREAS EN LAS MEDICIONES DE FLUORESCENCIA POR HPLC.

MUESTRA	M	F.F.	I.T.	A.P.M.			A.E.		
				B1	G2	B2	B1	G2	B2
MAIZ BLANCO No.2				B1	G2	B2	B1	G2	B2
MAIZ SOLD	9.4	66	75.4	10	9	5.6	0	0	0
M.E.	9.6	55	64.6	8.7	7.0	5.6	0	8.8	5.3
M.E.D.	7.5	33.6	41.1	6.6	4.7	3.8	39.8	0	3.8

TABLA XIII.

PORCENTAJE DE AREAS EN LAS MEDICIONES DE FLUORESCENCIA POR HPLC.

MUESTRA	M	F.F	I.T.	A.P.M.			A.E.		
				B1	G2	B2	5 NG/G C/U		
				B1	G2	B2	B1	G2	B2
MAIZ AMARILLO									
MAIZ SOLO	50.5	45.6	96.1	0	0	3.9	0	0	0
M.E.	49.3	46.0	95.3	0	0	3.8	0	*	0.9
M.E.D.	17.6	55.3	73.1	0	0	3.3	21.7	*	2

CONCLUSIONES

A partir de los experimentos realizados y de los resultados obtenidos en el transcurso de la presente investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los métodos directos de absorción ultravioleta carecen de la suficiente sensibilidad para llevar a cabo análisis de aflatoxinas dentro de los rangos de interés toxicológico en todas las muestras ensayadas.
2. Los métodos de fluorescencia directa tienen apropiada sensibilidad para la cuantificación de aflatoxinas en maíz, cacahuate y nuez. Sin embargo, cuando se aplica al maíz, los resultados muestran que los análisis son altamente influidos por los efectos de matriz.
3. Debido a que la fluorescencia de la aflatoxina B 1 es baja y comparativamente menor en relación a las otras aflatoxinas, es necesario llevar a cabo el procedimiento de derivatización a fin de incrementar la señal.

C A P I T U L O 4

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Betina, V. Mycotoxins, Production, Isolation, Separation and Purification. Developments in Food Science No. 8, Elsevier, Amsterdam, 1984, 89-130.
- 2.- Nesbitt, B.F.; O'Kelly, J.; Sargeant, K.; Sheridan, A. Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 1962, 195 (4846) 1062-1063.
- 3.- Hartley, P.D.; Nesbitt, B.P.; O'Kelly, J. Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 1963, 198 (4885), 1056-1058.
- 4.- Anderson, H.W.; Nehring, E.W.; Wichse, W.R. Aflatoxin Contamination of Corn in the Field. *J. Agric. Food Chem.* 1975, 23, 775-782.
- 5.- Park, D.L.; Njapau, H. Contamination Issue, Technology. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1989, 66 (10) 1402-1408.
- 6.- Plattner, R.D. Identification of Aflatoxins by Quadrupole Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (6) 734-738.
- 7.- Velasco, J. Fluorometric Measurement of Aflatoxins Adsorbed on Florisil in Minicolumns. 1975, 58 (4) 757-763.
- 8.- Panalaks, T.; Scott, P.M. Sensitive Silica Gel-Packed Flowcell for Fluorometric Detection of Aflatoxins by High Pressure Liquid Chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1977, 60 (3) 583-589.
- 9.- Cohen, H.; Lapointe, M. High Pressure Liquid Chromatographic Determination and Fluorescence Detection of Aflatoxins in Corn and Dairy Feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1981, 64 (6) 1372-1376.
- 10.- Francis, O.J. Jr.; Lipinski, L.J.; Gaul, J.A.; Campbell, A.D. High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Peanut Butter by Using a Silica Gel-Packed Flowcell for Fluorescence Detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1982, 65 (3) 685-689.

- 11.- Francis, O.J. B-Cyclodextrin Post-Column Fluorescence Enhancement of Aflatoxins for Reverse Phase Liquid Chromatographic Determination in Corn. 1988, 71 (4) 725-728.
- 12.- Stoloff, L; Dalrymple, B. Aflatoxin and Zearalenone Occurrence in Dry-Milled Corn Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977 60 (3) 579-582.
- 13.- Asao, T.; Buchi, G.; Abdel-Kader M.; Chang, S.P.; Wick, E.L.; Wogan, G.M. Aflatoxins B and G. J. Amer. Chem. Soc. 1963, 85, 1706-1707.
- 14.- Chang, S.P.; Abdel-Kader, M.M.; Wick, E.L.; Wogan, G.M. Aflatoxin B 2. Chemical Identity and Biological Activity Science 1963, 142, 1191-1192.
- 15.- van der Merwe, K.J.; Fourie, L.; Scott, B. The Structure of The Aflatoxins. Chem. Ind. 1963, 41, 1660-1661.
- 16.- van Dorp, D.A.; van der Beerthius, A.S.M.; Sparrebom, S.; Ord, W.O.; de Jong, K.; Keuning, R. Dihydroaflatoxin B 1 a metabolite of *Aspergillus flavus*, Remarks on The Structure of Aflatoxin B. Rec. Trav. Chim. 1963, 82, 587-592; cit. pos CA 59, 11803 d.
- 17.- Wogan, G.N. Experimental Toxicity and Carcinogenicity of Aflatoxins. Mycotoxins in Foodstuffs. 1965, 163-173.
- 18.- Bauer, D.; Lee, D.J.; Sinnhuber, R.O. Acute Toxicity of Aflatoxins B1 and G1 in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Toxicol. Appl. Pharmacol. 1969, 15, 415-419.
- 19.- Pohland, A.E.; Yin, L; Dantzman, J.G. Rapid Chemical Confirmatory Method for Aflatoxin B1 I. Development of The Method. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1970, 53, (1) 101-102.
- 20.- Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.L.; Shannon, G.M. Aflatoxins: Improved Resolution By Thin Layer Chromatography. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 1969, 52, 669-672.
- 21.- Lafont P.; Frayssinet, C. Isolement d'une nouvelle aflatoxine: l'aflatoxine 3 B Cah. Nutr. Diét. 1970, 5, 78.
- 22.- Detroy, R.W.; Hesseltine, C.W. Secondary Biosynthesis of Aflatoxin B 1 in *Aspergillus parasiticus*. Can. J. Microbiol. 1970, 14, 959-963.

- 23.- Wogan, G.N.; Newberne, P.M. Dose-Response Characteristics of Aflatoxin B Carcinogenesis in The Rat. *Cancer Res.* 1967, 27, 2370-2376.
- 24.- Dalezios, J.; Wogan, G.N.; Weinreb, S.M. Aflatoxin P 1: A New Aflatoxin Metabolite in Monkeys *Science.* 1971, 171, 584-585.
- 25.- Lee, L.S.; Stanley, J.B.; Cucullu, A.E.; Pons, W.A. Jr. Ammoniation of Aflatoxin B 1. Isolation and Identification of the Major Reaction Product. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1974, 57 (3) 626-631.
- 26.- Jackson, C.R. Peanut Pod Microflora and Kernel Infection. *Plant and Soil.* 1965, 23, 203-212.
- 27.- Austwick, P.K.C.; Ayerst, G. Toxic Products in Groundnuts: Groundnut Microflora and Toxicity. *Chemistry and Industry.* 1963, 2, 55-61.
- 28.- Lee, E.G.H.; Townsley P.M.; Walden C.C. Effect of bivalent Metals on The Production of Aflatoxins in Submerged Cultures. *Food. Sci.* 1966, 31, 432-436.
- 29.- Davis, N.D.; Diener, U.L.; Agnihotri, V.P. Production of Aflatoxins B 1 and G 1 in Chemically Defined Medium (by *Aspergillus flavus*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 1967, 31, 251-256.
- 30.- Carnaghan, R.B.A.; Hartley, R.O.; O'Kelly, J. Toxicity and Fluorescence Properties of The Aflatoxins. *Nature.* 1963, 200, 1101.
- 31.- Butler, W.H. Acute Toxicity of Aflatoxin B 1 in Rats. *Brit. J. Cancer.* 1964, 18, 756-762.
- 32.- Portman, R.S.; Plowman, K.M.; Campbell, T.C. Aflatoxin Metabolism by Liver Microsomal Preparations of Two Different Species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968, 33, 711-715.
- 33.- Delage, J. Contribution A L' Etude Des Rêpercussions De La Présence D'Aflatoxine Dans Des Rêgimes D'Animaux Domestiques. *Colloque Aflatoxines Villejuif*, 1966, 7

- 34.- Fehr, P.M.; Delage, J.; Richir, C. Répercussions De L'Ingestion D'Aflatoxine Sur Le Lapin en Croissance. Cah. Nutr. Diét. 1970, 5, 62-64.
- 35.- Gedek, B.; Hofmann, H. Tierexperimentelle Untersuchungen Zur Hepatotoxischen Wirkung Von Schimmelpilzgiften I. Mitteilung; Akute Veränderungen Beim Meeresschweinchen. Zentralbl. Veterinärmed. 1970, 17, 658-666.
- 36.- Elis, J.; Dipaolo, J.A. Aflatoxin B1: Induction of malformations. Arch. Pathol. 1967, 83, 53-57.
- 37.- Armbrrecht, B.H.; Shalkop, W.T.; Wiseman, H.G.; Jackson, J.E.; Zimmerman, H.E. The Effects Produced in Brood Sows by Feeding Aflatoxin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1969, 14, 649-650.
- 38.- Harding, J.D.J.; Done, J.T.; Lewis, G.; Allcroft, R. Experimental Groundnut Poisoning in Pigs. Res. Vet. Sci. 1963, 4, 217-229.
- 39.- Clegg, F.G.; Bryson, H. An Outbreak of Poisoning in Store Cattle Attributed To Brazilian Groundnut Meal. Vet. Rec. 1962, 74, 992-994.
- 40.- Allcroft, R.; Lewis, G. Groundnut (Meal) Toxicity in Cattle: Experimental Poisoning of Calves and A Report on Clinical Effects in Older Cattle. Vet. Rec. 1963, 75, 487-494.
- 41.- Butler, W.H.; Wigglesworth, J.S. The effects of Aflatoxin B 1 on The Pregnant Rat. Brit. J. Exp. Pathol. 1966, 47, 242-247.
- 42.- Sargeant, K.; Sheridan, A.; O'Kelly, J.; Carnaghan, R.B.A. Toxicity Associated With Certain Samples of Groundnuts. Nature, 1961, 192, 1096-1097.
- 43.- Asplin, F.D.; Carnaghan, R.B.A.; The Toxicity of Certain Groundnut Meals for Poultry, With Special Reference to Their Effect on Ducklings and Chickens. Vet. Rec. 1961, 73, 1215-1219.
- 44.- Gardiner, M.R.; Oldroy, B. Avian Aflatoxicosis. Austral. Veter. J., 1965, 41, 272-276.
- 45.- Carnaghan, R.B.A. (Observaciones no publicadas) 1960-1962.

- 46.- Solomon, G.; Jensen, R.; Tanner, H. Hepatic Changes in Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*) Fed Diets Containing Peanut, Cottonseed, and Soybean Meals. *Amer. J. Vet. Res.* 1965, 26, 764-770.
- 47.- Legator, M.S. Biological Assay for Aflatoxins in Goldblatt, L.A. *Aflatoxin*, Academic Press. 1969, 107-149.
- 48.- Frayssinet, C.; Lafont, P. Les Mycotoxines: Un Nouvel Aspect De L'Hygiène Des Aliments. *Cahiers de Nutrition et De Diététique*. 1966, 1, 21-29.
- 49.- Philip, J.M. Eurotox Symposium on Natural Products. Aflatoxin-Mammalian Toxicity. *Food Cosmet. Toxicol.* 1964, 2, 674-675.
- 50.- Sysk, D.B.; Carlton, W.W.; Curtin, T.M. Experimental Aflatoxicosis in Young Swine. *Amer. J. Vet. Res.* 1968, 29, 1591-1602.
- 51.- Garret, W.N.; Heitman, H.; Booth, A.N. Aflatoxin Toxicity in Beef Cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968, 29, 1591-1602.
- 52.- Ferrando, R.; Henry, N. Les Conséquences Pathologiques Des Aliments Infestés par *Aspergillus flavus*. *Bull. Acad. Nat. Méd.* 1965, 149, 94-103.
- 53.- Siller, W.G.; Ostler, D.C. The histopathology of an Enterohepatic Syndrome of Turkey Poults. *Vet. Rec.* 1961, 72, 134-138.
- 54.- Kratzer, F.H.; Bandy, D.; Wiley, M.; Booth, A.N. Aflatoxin Effects in Poultry. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1969, 131, 1281-1284.
- 55.- Joffe, A.Z. Feeding Tests With Ducklings, Turkey, Chicks, and Rabbits and The Effects of Aflatoxin on These Animals. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 1970, 40, 49-61.
- 56.- Butler, W.H.; Barnes, J.M. Toxic Effects of Groundnut Meal Containing Aflatoxin to Rats and Guinea Pigs. *Brit. J. Cancer.* 1964, 17, 699-710.
- 57.- Butler, W.H.; Lijinsky, W. Acute Toxicity of Aflatoxin G 1 To The Rat. *J. Pathol.* 1970, 102, 209-212.

- 58.- Butler, W.H. Further Ultrastructural Observations on Injury of Rat Hepatic Parenchymal Cells Induced by Aflatoxin B 1. *Chem-Biol. Interactions*. 1971, 4, 49-65.
- 59.- Mietkiewski, K.; Janicki, J.; Malenowicz, L.; Urbanowicz, M; Filipiak, B. Histochemical Studies On The Action of Aflatoxins. I. A Cytological and Cytochemical Study of The Liver of Rats Fed A Diet Contaminated With *Aspergillus flavus*. *Folio Histochem. Cytochem.* 1969, 7, 379-405.
- 60.- Jayraj, A.P.; Shanka-Murti, A.; Sreenivasamurthy, V.; Parpia, H.A.B. Toxic Effects of Aflatoxin on The Testis of Albino Rats. *J. Anat. Soc. India*. 1968, 17, 101-104.
- 61.- Tulpule, P.G.; Madhavan, T.V.; Gopalan, C. Effect of Feeding Aflatoxin to Young Monkeys. *Lancet*. 1964, 1, 962-963.
- 62.- Alpert, E.; Serck-Hanssen, A.; Rajagopalan, B. Aflatoxin-Induced Hepatic Injury in the African Monkey. *Arch. Environ. Health*. 1970, 20, 723-728.
- 63.- Cuthbertson, W.F.J.; Laursen, A.C.; Pratt, D.A.H.; Effect on Groundnut Meal Containing Aflatoxin on *Cynomolgus* Monkeys. *Brit. J. Nutr.* 1967, 21, 893-908.
- 64.- Newberne, P.M.; Carcinogenicity of Aflatoxin-Contaminated Peanut Meals. *Mycotoxins in Foodstuffs*. 1965, 187-208.
- 65.- Newberne, P.M.; Carlton, W.W., Wogan, G.N. Hepatomas in Rats and Hepatorenal Injury in Ducklings Fed Peanut Meal or *Aspergillus flavus* extract. *Pathologia Veterinaria*. 1964, 1, 105-132.
- 66.- Denoix. Le Cancer; Quelques-uns de Ses Aspects. *Bull. M. G.E.N.* 1966, 19 (6), 10-11.
- 67.- Butler, W.H. Liver Injury and Aflatoxin. *Mycotoxins in Foodstuffs*. 1965, 175-186.
- 68.- Frayssinet, C. Recherches Concernant le pouvoir Carcinogène des Toxines de l'*Aspergillus flavus* Link. Rapport d'activité du C.N.R.S. Oct. 1962-Oct 1963. 1963, 460.
- 69.- Frayssinet C.; Lafarge, C. Action de l'aflatoxine Sur La Cellule Hépatique du Rat. *Cah. Nutr. Diét.* 1970, 5, 67-69.

- 70.- Clifford, J.I.; Rees, K.R. Aflatoxin: A Site of Action in the Rat Liver Cell. *Nature*, G.B. 1966, 209, 312-313.
- 71.- Balis, M.E. Antagonists and Nucleic Acid. *Frontiers of Biology*, 10) North Holland Publ. Co, Amsterdam, 1968.
- 72.- Frayssinet, C.; Laferge, C. Etude Du Pouvoir Carcinogène De L'Aflatoxine Rapport D'Activité Du C.N.R.S. Oct.1963-Oct. 1964, 1964, 544-545.
- 73.- Roy, A.K. Effects of Aflatoxin B 1 on Polysomal Profiles and RNA Synthesis in Rat Liver. *Biochim. Biophys. Acta*. 1968, 169, 206-211.
- 74.- Wragg, J.B; Ross, V.C.; Legator, M.S.; Effect of Aflatoxin B 1 on The Deoxyribonucleic Acid Polymerase of *Escherichia Coli* (32274). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967, 125, 1052-1055.
- 75.- King, A.M.Q.; Nicholson, B.H. The interaction of Aflatoxin B 1 With Polynucleotides and Its Effect on Ribonucleic Acid Polymerase. *Biochem. J.* 1969, 114, 679-687.
- 76.- Pong, R.S.; Wogan, G.N. Time Course and Dose Response Characteristics of Aflatoxin B 1 Effects on Rat Liver RNA Polymerase and Ultrastructure. *Cancer Res.* 1970, 30, 294-304.
- 77.- Lillehoj, H.B.; Ciegler, A. Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in *Flavobacterium aurantiacum* by Aflatoxin B 1. *J. Bacter.* 1967, 94, 787-788.
- 78.- Campbell, T.C.; Salamat, L. Aflatoxin Ingestion And Excretion by Humans. In Purchase I.F.K. *Mycotoxins in Human Health.* 1971, 271-280.
- 79.- Lopez, L.C.; Christensen, C.M. Effect of Moisture Content and Temperature on Invasion of Stored Corn by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 1967, 57, 588-590.
- 80.- van Egmond, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food activities and contaminants*, 1989, 6 (2) 139-188.

- 81.- Official Methods of Analysis 1990, 15th Ed., AOAC, Arlington, VA, secs. 970.43-989.06.
- 82.- Beckman, Liquid Chromatographic Course. Beckman Instruments, Inc. 2500 Harbor Blvd. Fullerton, CA 92634-3100.
- 83.- Fernández-Alonso, M.; Rebolledo-Castillo, R.; Montemayor-Gaytán, C. Determinación de Aflatoxinas en Maíz y Productos Derivados por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. *Ars. Pharmaceutica* 1986, 27 (4) 493-500.
- 84.- Francis, D.J. Jr.; Ware, G.M.; Carman, A.S.; Kirschenheuter, G.P.; Kuan, S.S. Use of Ten Gram Samples of Corn for Determination of Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1988, 71 (1) 41-43.
- 85.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Optimización de Parámetros en la Metodología de Preparación de Muestras de Maíz para el Análisis de Aflatoxinas por HPLC. *Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica.* 1990, UANL Monterrey, N.L. 267.
- 86.- Whitaker, T.B.; Dickens, J.W.; Giesbrecht, F.G. Effects of Methanol Concentration and Solvent:Peanut Ratio on Extraction of Aflatoxin from Raw Peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (1) 35-36.
- 87.- Whitaker, T.B.; Dickens, J.W.; Giesbrecht, F.G. Optimum Methanol Concentration and Solvent/Peanut Ratio for Extraction of Aflatoxin from Raw Peanut by Modified AOAC Method II. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1986, 69 (3) 508-510.
- 88.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Balderas-Mireles, A. Desarrollo de un Método Analítico Para la Determinación de Aflatoxinas en Nuez Mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Detección por Fluorescencia Molecular. *Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica.* 1990, UANL Monterrey, N.L. 265.
- 89.- Acuña-Askar, K.; Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E. Comparación de la Intensidad de Fluorescencia de las Aflatoxinas de Dos Detectores Distintos Acoplados a Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución. *Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica.* 1990, UANL Monterrey, N.L. 290.

- 90.- Acuña-Askar, K.; Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E. Comparación de los Límites de Detección de Aflatoxinas por Absorción Ultravioleta y Fluorescencia Molecular. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 291.
- 91.- Trucksess, M.W.; Brumley, W.C.; Nesheim, S. Rapid Quantitation and Confirmation of Aflatoxins in Corn and Peanut Butter Using a Disposable Silica Gel Column, Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67 (5) 973-978.
- 92.- Thean, J.E.; Lorenz, D.R.; Wilson, D.M.; Rodgers, K.; Guedner, R.C. Extraction, Cleanup and Quantitative Determination of Aflatoxins in Corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1980, 63 (3) 631-633.
- 93.- Whitaker, T.B.; Dickens, J.W.; Monroe, R.J. Variability of Aflatoxin Test Results. J. Am. Oil Chem. Soc. 1974, 51 214-218.
- 94.- Campbell, A.D.; Whitaker, T.B.; Pohland, A.E.; Dickens, J.W.; Park, D.L. Sampling, Sample Preparation and Sampling Plans for Foodstuffs for Mycotoxin Analysis. Pure and Appl. Chem. 1986, 58 (2) 305-314.
- 95.- Fuller, G.; Spooner, W.W.; King, A.D., Jr.; Schade, J.; Mackey, B. Survey of Aflatoxins in California Tree Nuts. J. Am. Oil Chem. Soc. 1977, 54, 231A-234A
- 96.- Beebe, R.M. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1978, 61, 1347-1352.
- 97.- Hutchins, J.E.; Hagler, W.M., Jr. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1986, 66, 1458-1465.
- 98.- Takahashi, D.M. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60, 799-804.
- 99.- Fernández-Alonso, M.; Acuña-Askar, K. Evaluation of Physicochemical Methods for Quantitation of Aflatoxins in Foodstuffs. (Manuscrito en preparación). 58

LECTURAS SUGERIDAS

- 1.- Moureau, C. Moulds, Toxins and Food, 1979, 2nd. Ed., John Wiley and Sons, Surrey, 27-143.
- 2.- Lederer, M.; Chromatographic Reviews, J. Chromatogr. 1981, 220, 1-28.
- 3.- Ettre, L.S. The Nomenclature of Chromatography. I. Gas Chromatography . J. Chromatogr. 1979, 165, 235-256.
- 4.- Zuber, M.S.; Lillehoj, E.B.; Renfro, B.L. Aflatoxin in Maize: A Proceeding of the Workshop, 1987, CIMMYT, Mexico, D.F.
- 5.- Ettre, L.S. The Nomenclature of Chromatography, II. Liquid Chromatography . J. Chromatogra. 1981, 220, 29-63.
- 6.- Ettre, L.S. The Nomenclature of Chromatography, III. General Rules for Future Revisions 1981, 220, 65-69.
- 7.- Giddings, J. C. Physico-chemical Basis of Chromatography . J. Chem. Educ. 1967, 44, (12) 704-709.
- 8.- Fischbach, B.; Campbell, A.D. Detoxification of The Aflatoxins . J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 1965, 48 (1), 23.
- 9.- de Jongh, H.; van Pelt, J.G.; Ord, W.O.; Barret, C.B. A Semiquantitative Determination of Aflatoxin B₁ in Peanut Meal and Peanut Butter. Vet. Record 1964, 76 (34) 901-903; cit. pos CA 62, 4531 d.
- 10.- Rodricks, J.V.; Stoloff, L. Determination of Concentration and Purity of Aflatoxin Standards . J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1970, 53 (1) 92-95.
- 11.- Rodricks, J.V.; Stoloff, L.; Pons, W.A.; Robertson, J.A.; Goldblatt, L.A. Molar Absorptivity Values for Aflatoxins and Justification for their use as Criterial Purity of Analytical Standards . J. Assoc. Off. Anal Chem. 1970, 53 (1) 96-101.
- 12.- Waliking, A.E. Collaborative Study of Three Methods for Determination of Aflatoxin in Peanuts and Peanut Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1970, 53 (1) 104-113.

- 13.- Lillard, D.A.; Lantin, R.S. Some Chemical Characteristics and Biological Effects of Photomodified Aflatoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1970, 53 (5) 1060-1063.
- 14.- Liem, D.H.; Beljaars, P.R. Note on a Rapid Determination of Aflatoxins on Peanuts and Peanut Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1970, 53 (5) 1064-1066.
- 15.- Stoloff, L.; Nesheim, S.; Yin, L.; Rodricks, J.V.; Stack, M.; Campbell, A.D. A Multimycotoxin Detection Method for Aflatoxins, Ochratoxins, Zearalenone, Sterigmatocystin and Patulin. 1971, 54 (1) 91-97.
- 16.- Stoloff, L. Report on Mycotoxins *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1971, 54 (2) 305-309.
- 17.- Walkling, A.E. Fate of Aflatoxin During Roasting and Storage of Contaminated Peanut Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1971, 54 (3) 533-539.
- 18.- Dantzman, J.; Stoloff, L. Screening Method for Aflatoxin in Corn and Various Corn Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1972, 55 (1) 139-141.
- 19.- Stack, M.E.; Pohland, A.E.; Dantzman, J.G.; Neheim, S.; Derivative Method for Chemical Conformation of Identity of Aflatoxin M₁. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1972, 55 (2) 313-314.
- 20.- Coon, F.B.; Bauer, F.J.; Symmes, L.R.L. International Aflatoxin Chek Sample Program: 1971 Study. 1972, 55 (2) 315-327.
- 21.- Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.L.; Shannm, G.M. Aflatoxins M₁ and M₂ and Parasiticol: Thin Layer Chromatography and Physical and Chemical Properties. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1972, 55 (4) 762-767.
- 22.- Pons, W.A.; Cucullu, A.F.; Franz, A.O. Rapid Quantitative TLC Method for Determining Aflatoxins in Cottonseed Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1972, 55 (4) 768-774.
- 23.- Schoenhard, G.L.; Sinnhuber, R.D.; Lee, D.J. Preparation of 14 C - Labeled Aflatoxin B. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1973, 56 (3) 643-646.

- 24.- Pons, W.A.; Cucullu, A.F.; Franz, A.D.; Lee, L.S.; Goldblatt, L.A. Rapid Detection of Aflatoxin Contamination in Agricultural Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1973, 56 (4) 803-807.
- 25.- Shotwell, O.L.; Stubblefield, R.D. Collaborative Study of Three Screening Methods for Aflatoxins in Corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1973, 56 (4) 808-812.
- 26.- Seiber, J.N.; Hsieh, D.P.H.; Application of High-Speed Liquid Chromatography To The Analysis of Aflatoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1973, 56 (4) 827-830.
- 27.- Romer, T.R. Determination of Aflatoxins in Mixed Feeds *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1973, 56 (5) 1111-1114.
- 28.- Beljaars, P.R.; Verhúlsdonk, C.A.H.; Paulseh, W.E.; Liem, D.H.; Collaborative Study of Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Analysis of Aflatoxin B₁ in Peanut Butter Extracts Using The Antidiagonal Spot Application Technique. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1973, 56 (6) 1444-1451.
- 29.- Di Prossimo, U.P. Scale-Up of AOAC Method III for Quantitation and Isolation of Aflatoxins in Nuts and Nut Products for Chemical and Biological Confirmation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1974, 57 (2) 349-352.
- 30.- Stack, M. E. Collaborative Study of AOAC Methods II and III for The Determination of Aflatoxins in Peanut Butter. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1974, 57 (4) 871-874.
- 31.- Di Prossimo, U.P. Collaborative Study Comparing Two Methods for The Determination of Aflatoxins in Pistachio Nuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1974, 57 (5) 1114-1120.
- 32.- Stack, M.E.; Pohland, A.E. Collaborative Study of A Method for Chemical Confirmation of The Identity of Aflatoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1974, 58 (1) 110-113.
- 33.- Thomas F.; Eppley, R.M.; Trucksess, M.W.; Rapid Screening Method for Aflatoxins and Zearalenone in Corn. 1975, 58 (1) 114-116.
- 34.- Stoloff, L. Report on Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1975, 58 (2) 213-217.

- 35.- Ashoor, S.H.; Chu, F.S. Reduction of Aflatoxins B1 and B2 with Sodium Borohydride. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1975 58 (3) 492-496.
- 36.- Romer, T.R. Screening Method for The Detection of Aflatoxins in Mixed Feeds and Other Agricultural Commodities With Subsequent Confirmation And Quantitative Measurement of Aflatoxins in Positive Samples. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1975, 58 (3) 500-506.
- 37.- Ashoor, S.H.; Chu, F.S. New Confirmatory Test for Aflatoxins B 1 and B 2 . J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1975, 58 (3) 617-618.
- 38.- Sphon, J.A.; Dreifuss, P.A.; Schulten, H.R. Field Desorption Mass Spectrometry of Mycotoxins and Mycotoxin Mixtures And Its Application as a Screening Technique for Foodstuffs. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60 (1) 73-82.
- 39.- Shotwell, O.L.; Goulden, M.L. Aflatoxin: Comparison of Analysis of Corn by Various Methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem, 1977, 60 (1) 83-88.
- 40.- Stoloff, L. Report On Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60 (2) 348-353.
- 41.- Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.L. Reverse Phase Analytical and Preparative High Pressure Liquid Chromatography of Aflatoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60 (4) 784-790.
- 42.- Shotwell, O.L.; Goulden, M.L.; Kwolek, W.F., Aflatoxin in Corn: Evaluation of Filter Fluorometer Reading of Minicolumns. J. Assoc. Off. Anal. Chem.
- 43.- Stoloff, L. Report on Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1978, 61 (2) 340-346.
- 44.- Shotwell, O.L.; Burg, W.R.; Diller, T. Thin Layer Chromatographic Determination of Aflatoxin in Corn Dust. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (5) 1060--1063.
- 45.- Davis, N.D.; Guy, M.L.; Diener, U. L. Improved Fluorometric -Iodin Method for Determination of Aflatoxin in Corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (5) 1074-1076.

- 46.- Holaday, C.E.; Shotwell, O.L. Minicolumn Detection Methods for Aflatoxin in Raw Peanuts: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (3) 674-677.
- 47.- Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.L. Determination Of Aflatoxins in Animal Tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (4) 964-968.
- 48.- Gregory, J.F. III.; Manley, D. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Animal Tissues and Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (1) 144-151.
- 49.- Shantha, T.; Sreenivasa, M.V. Use of Sunlight to Partially Detoxify Groundnut (Peanut) Cake Flour and Casein contaminated with Aflatoxin B 1. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (2) 291-293.
- 50.- Friesen, M.D.; Garren, L. International Mycotoxin Check Sample Program: Part I: Report On Laboratory Performance for Determination of Aflatoxins B 1, B 2, G 1 and G 2 in Raw Peanut Meal. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1982, 65 (4) 855-863.
- 51.- Friesen, M.D.; Garren, L. International Mycotoxin Check Sample Program. Part II. Report On Laboratory Performance for Determination of Aflatoxin M 1 in Milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1982, 65 (4) 864-868.
- 52.- de Vries, J.W.; Chang, H.L. Comparison of Rapid High Pressure Liquid Chromatography and C.B. Methods for Determination of Aflatoxins in Corn and Peanuts. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1982, 65 (2) 206-209.
- 53.- Hutchins, J.E.; Hagler, W. H. Jr. Rapid Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Heavily Contaminated Corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1983, 66 (6) 1458-1465.
- 54.- Shannon, G.M.; Shotwell, O.L.; Kwolek, W.F. Extraction and Thin Layer Chromatography of Aflatoxin B 1 in Mixed Feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1983, 66 (3) 582-586.
- 55.- Stoloff, L. Report On Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1983, 66 (2) 355-362.
- 56.- Shepherd, E.C.; Phillips, T.D.; Heidelbaugh, N.D.;

- Mayes, A.W. High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins by Using Radial Compression Separation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1982, 65 (3) 665-671.
- 57.- Scott, P.M. Report on Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (2) 366-368.
- 58.- Tarter, E.J.; Hanchay, J.P.; Scott, P.M. Improved Liquid Chromatographic Method for Determination of Aflatoxins in Peanut Butter and Other Commodities. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (3) 597-600.
- 59.- Chang-Yen, I.; Stoute, V.A.; Felmine, J.B. Effect of Solvent Composition on Aflatoxin Fluorescence. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (2) 306-308.
- 60.- Campbell, A.D.; Francis, O.J.; Beebe, P.A.; Stoloff, L. Determination of Aflatoxins in Peanut Butter, Using Two Liquid Chromatographic Methods: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (2) 312-316.
- 61.- Park, D.L. Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometric Method for Confirmation of Identity of Aflatoxin B₁: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985, 68 (4) 636-639.
- 62.- Framy, J.M.; Chu, F.S. Direct ELISA for Determining Aflatoxin B₁ at picogram levels in Dairy Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (6) 1098-1101.
- 63.- Scott, P.M. Report on Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985, 68 (2) 242-248.
- 64.- Morad, M.M.; Choto, C.E.; Rooney, L.W. The Quality of Tortillas Containing Whole Sorghum and Pearled Sorghum Alone and Blended With Yellow Maize. *Cereal Chem.* 1985, 62 (1) 51-54.
- 65.- Davis, N.D.; Currier, C.G.; Diener, U.L. Aflatoxin Contamination of Corn Hybrids in Alabama. *Cereal Chem.* 1986, 63 (6) 467-470.
- 66.- Scott, P.M. Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1986, 69 (2) 240-245.
- 67.- Spilmann, J.R.Jr. Modification of The Rapid Screening Method for Aflatoxin in Corn for Quantitative Use. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985, 68 (3) 453-455.

- 68.- Ram, B.P.; Hart, P.L.; Shotwell, O.L.; Pestka, J.J. ELISA of Aflatoxina B 1 in Naturally Contaminated Corn and Cottonseed. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1986, 69 (5) 904-907.
- 69.- Chu, S.F.; Fan, T.S.L.; Zhang, G.S. Improve ELISA for Aflatoxin B 1 in Agricultural Commodities. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1987, 70 (5) 854-857.
- 70.- Scott, P.M. Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989, 72 (1) 75-80.
- 71.- Park, D.L.; Miller, B.M.; Hart, P.; Yang, G.; Mc Vey, J.; Page, S.W.; Pestka, J.; Brown, L.M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Screening Aflatoxin B 1 in Cottonseed Products and Mixed Feed: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989, 72 (1) 326-331.
- 72.- Chu, F.S.; Lee, R.C.; Trucksess, M.W.; Park, D.L. Evaluation by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Cleanup for TLC of Aflatoxin B 1 in Corn, Peanuts, and Peanut Butter. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988, 71 (5) 953-956.
- 73.- Schroeder, T.; Zweifel, U.; Sagelsdorff, P.; Friederich, U.; Luthy, J.; Schlatter, C. Ammoniation of Aflatoxin-Containing Corn: Distribution, in vivo Covalent Deoxyribonucleic Acid Binding and Mutagenicity of Ration Products. J. Agric. Food Chem. 1985, (33) 311-316.
- 74.- Dutton, M.F. Enzymes and Aflatoxin Biosynthesis, Microbiol. Rev. 1988, 52, 274-295.
- 75.- Lee, L.S. Aflatoxin. New Approaches to Research at The SRRC; a Discussion of Analytical Instrumentation; and Perspectives on the Recent Toughening of Permissible Levels in European Imports. J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989, 66 (10) 1398-1402.
- 76.- U.K. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. European Perspective on aflatoxin. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 1989, 66 (10) 1408-1409.
- 77.- Cappuccio, M. Effects of New Rules on EEC Trade. J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989, 66 (10) 1410-1413.
- 78.- Fernández-Alonso, M.; Rebolledo-Castillo, R. Determinación

de Aflatoxinas en Maiz por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Memorias del IV Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1985, UANL Monterrey, N.L. 262-263.

- 79.- Fernández-Alonso M.; Acuña-Askar, K. Determinación de Aflatoxinas en Alimentos Balanceados Mediante Extracción en Fase Sólida y Cuantificación por Cromatografía de Líquidos. Memorias del VI Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1988, UANL Monterrey, N.L. 9
- 80.- Fernández-Alonso, M.; Acuña-Askar, K. Evaluación de Fases Sólidas Estacionarias Utilizadas en la Limpieza y Extracción de Aflatoxinas Procedentes de Muestras Alimenticias. Memorias del VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1989, UANL Monterrey, N.L. 113.
- 81.- Fernández-Alonso, M.; Heyer-Rodríguez, L.; Acuña-Askar, K. Determinación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Detección por Fluorescencia de Aflatoxinas en Maiz y Alimentos Balanceados. Memorias del VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1989, UANL Monterrey, N.L. 260.
- 82.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Evaluación de Parámetros Cromatográficos del Empaque Micropak MCH-5 Para su Uso en el Análisis de Aflatoxinas. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 289.
- 83.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Comparación de los Límites de Detección de Aflatoxinas en Muestras de Maiz, Cacahuete y Nuez Detectadas por Fluorescencia Molecular con Previa Separación Cromatográfica. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 378.
- 84.- Acuña-Askar, K.; Fernández-Alonso, M. Torres de-Navarro, E. Aflatoxinas en Sorgo: Su Extracción en Fase Inversa y Su Análisis por Cromatografía de Alta Resolución. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 377.
- 85.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Heyer-Rodríguez, L. Acuña-Askar, K. Desarrollo de un Método Analítico Para la Determinación de Aflatoxinas en Muestras de Cacahuete por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Detección por Fluorescencia Molecular. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 267.

- 86.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Análisis de Aflatoxinas en Cáscara de Algodón por CLAR. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 270.
- 87.- Borrego-López, C.; Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E. Acuña-Askar, K. Análisis de Aflatoxinas en Muestras de Maíz de la Región Norte de México. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 268.
- 88.- Martínez-Burnes, J.; Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E. Acuña-Askar, K. Análisis de Aflatoxinas en Muestras de Maíz Procedentes de la Región Noreste de México. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 269.
- 89.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Castrellón Santa-Anna, J.P. Aflatoxinas en Harina de Maíz Nixtamalizado Para Hacer Tortillas: Su Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 226.

C A P I T U L O 5

A P E N D I C E A

G L O S A R I O

- ANOREXIA.** Falta de apetito.
- ATAXIA.** Falta o irregularidad de la coordinación, especialmente de los movimientos musculares sin debilidad o espasmo de éstos.
- CANCER.** Tumor maligno en general y especialmente el formado por células epiteliales.
- CIRROSIS.** Inflamación intersticial de un órgano, particularmente el hígado.
- COLANGIOMA.** Tumor de las vías biliares.
- COLANGITIS.** Inflamación de los conductos biliares.
- EDEMA PULMONAR.** Infiltración de serosidad en el tejido pulmonar con expectoración espumosa rosada, hipotensión acusada y asistolia aguda.
- FIBROSIS.** Formación de tejido fibroso. Degeneración fibroide.
- GLOMERULO RENAL.** Apelotonamiento de capilares arteriales en el extremo dilatado de cada tubo urinífero.
- HEPATITIS.** Inflamación del hígado.
- HEPATOCITO.** Célula del hígado.
- HEPATOMA.** Tumor del hígado.
- HEPATOMEGALIA.** Aumento de volumen del hígado.
- HEPATOTOXICO.** Agente venenoso al hígado.
- HIPERPLASIA.** Hipergénesis. Multiplicación anormal de los elementos histiósicos; hipertrofia numérica.

LETARGO.	Sueño morbosos profundo y continuado con anestesia y exaltación de los reflejos.
METASTASIS.	Aparición de unos o más focos morbosos secundarios a otro primitivo, con o sin desaparición de éste, en regiones o partes no contiguas al foco primitivo.
MICROSOMA.	Elemento granuloso muy pequeño del protoplasma celular.
NECROSIS.	Mortificación de un tejido en general, gangrena. La parte necrosada se llama secuestro.
NECROSIS. DIFUSA.	Necrosis ampliamente extendida.
NEFRITIS.	Inflamación del tejido renal.
NEFRITIS GLOMERULAR.	La nefritis aguda que afecta primordialmente los glomérulos o éstos y las cápsulas de Bowman.
NODULO.	Pequeña eminencia, nudosidad o vegetación.
PARENQUIMA.	Elemento esencial específico o funcional de un órgano, generalmente glandular.
PROTROMBINA.	Trombinógeno. Factor del plasma sanguíneo, precursor de la trombina, llamado también serocima y trombógeno.
TENESMO.	Deseo continuo, doloroso e ineficaz de orinar o defecar producido por un estado irritativo del cuello vesical o del ano o recto.
TERATOMA.	Tumor complejo de tejido que contiene a veces restos fetales, dientes, cabellos, etc., debido a la inclusión de un feto abortivo en otro que se desarrolla normalmente.
VENA PORTA.	Sistema venoso especial constituido por ramas de origen, tronco y ramos venosos terminales. Se origina de la unión de la vena esplénica con las mesentéricas a nivel de la cabeza del páncreas. Termina en el hígado por dos ramas, derecha e izquierda, que se distribuyen a modo de las arterias.

A P E N D I C E B

METODOLOGIA DE ANALISIS USANDO ESTANDAR INTERNO COMO UN METODO PARA OBTENER MAYOR PRECISION EN ANALISIS POR HPLC.

Conociendo en forma aproximada la concentración del analito, se podrían preparar tres estándares: el primero de ellos 10 % menor a la concentración del analito, el segundo a la concentración más aproximada de éste, y el tercero 10 % mayor.

Si los cromatogramas se hicieran con un registrador y no un integrador y el método se hiciera sólo en base a alturas, se podría hacer lo siguiente:

Sea:

- H St In : altura del estándar interno.
- H St : altura del estándar.
- At St In: atenuación del registrador a la que se obtuvo la altura del estándar interno.
- At St : Atenuación del registrador a la que se obtuvo la altura del estándar.
- Hc : Relación de altura corregida.
- Hc₁* : Promedio de las alturas corregidas para el estándar de menor concentración.
- Hc₂* : Promedio de las alturas corregidas para el estándar de mediana concentración.
- Hc₃* : Promedio de las alturas corregidas para el estándar de mayor concentración.
- [St₁] : Concentración del primer estándar usada para obtener el factor de respuesta del primer estándar.
- [St₂] : Concentración del segundo estándar usada para obtener el factor de respuesta del segundo estándar.
- [St₃] : Concentración del tercer estándar usada para obtener el factor de respuesta del tercer estándar.
- D₁ : Factor de respuesta del primer estándar.
- D₂ : Factor de respuesta del segundo estándar.
- D₃ : Factor de respuesta del tercer estándar.
- D* : Factor de respuesta promedio en el rango de concentraciones.
- HCa* : Altura corregida promedio para el analito.
- S : Masa (por lo general gramos) de la muestra en la cual el analito se desea determinar.
- 100 : Factor de conversión al porcentaje en el cual, el analito se encuentra en la muestra.

Cálculos para obtener los promedios de alturas corregidas, considerando que cada estándar se hiciese por triplicado.

$$\begin{aligned}
 \text{1er. St.} & : \frac{H \text{ St}_1}{H \text{ St In}_1} \times \frac{At \text{ St}_1}{At \text{ St In}_1} = HC_1 \\
 & + \\
 & : \frac{H \text{ St}'_1}{H \text{ St In}'_1} \times \frac{At \text{ St}'_1}{At \text{ St In}'_1} = HC'_1 \\
 & + \\
 & : \frac{H \text{ St}''_1}{H \text{ St In}''_1} \times \frac{At \text{ St}''_1}{At \text{ St In}''_1} = HC''_1 \\
 & \text{-----} \\
 & HC*_1
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{2o. St.} & : \frac{H \text{ St}_2}{H \text{ St In}_2} \times \frac{At \text{ St}_2}{At \text{ St In}_2} = HC_2 \\
 & + \\
 & : \frac{H \text{ St}'_2}{H \text{ St In}'_2} \times \frac{At \text{ St}'_2}{At \text{ St In}'_2} = HC'_2 \\
 & + \\
 & : \frac{H \text{ St}''_2}{H \text{ St In}''_2} \times \frac{At \text{ St}''_2}{At \text{ St In}''_2} = HC''_2 \\
 & \text{-----} \\
 & HC*_2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{3er. St.} & : \frac{H \text{ St}_3}{H \text{ St In}_3} \times \frac{At \text{ St}_3}{At \text{ St In}_3} = HC_3 \\
 & + \\
 & : \frac{H \text{ St}'_3}{H \text{ St In}'_3} \times \frac{At \text{ St}'_3}{At \text{ St In}'_3} = HC'_3 \\
 & + \\
 & : \frac{H \text{ St}''_3}{H \text{ St In}''_3} \times \frac{At \text{ St}''_3}{At \text{ St In}''_3} = HC''_3 \\
 & \text{-----} \\
 & HC*_3
 \end{aligned}$$

Cálculos para encontrar el factor de respuesta promedio:

$$\text{1er St: } \frac{[St_1]}{HC*_1} = D_1$$

+

$$\text{2o. St: } \frac{[St_2]}{HC*_2} = D_2$$

+

$$\text{3er St: } \frac{[St_3]}{HC*_3} = \frac{D_3}{\text{-----}}$$

D^*

Para calcular la concentración del analito a partir de las muestras:

$$(D^*) (HCa^*) / S \times 100 = \% \text{ en la muestra.}$$

A P E N D I C E C

EVALUACION DE PARAMETROS CROMATOGRAFICOS DEL EMPAQUE MICROPAK MCH-5 PARA SU USO EN EL ANALISIS DE AFLATOXINAS.

La selección apropiada de las columnas analíticas para uso en HPLC depende de una serie de parámetros cromatográficos que están en función de la fase estacionaria, la fase móvil y de la naturaleza de los solutos.

Las condiciones de trabajo fueron las mismas que han sido reportadas en la sección de metodología de esta investigación.

Los resultados mostraron lo siguiente:

AFLATOXINA	k'	K	N	H (cm)
G 1 *	5.6	2.2	4624	6.5×10^{-3}
B 1 *	9.0	3.6	2410	1.2×10^{-2}
G 2	16.3	6.5	11856	2.5×10^{-3}
B 2	25.3	10.1	36100	8.3×10^{-4}

AFLATOXINAS	ALFA	Rs.
G 1* - B 1*	1.6	6.2
B 1* - G 2	1.8	11.0
G 2 - B 2	1.5	15.8

* Derivatizada.

Donde: k': Factor de capacidad. Alfa: Factor de selectividad.
 K : Coeficiente de Rs: Resolución.
 partición.
 N: Número efectivo de platos teóricos.
 H: Altura equivalente a un plato teórico.

A P E N D I C E D

VERSION EN ESPANOL DE LAS CONDICIONES DE SEGURIDAD SUGERIDAS POR EL FABRICANTE (SIGMA) PARA EL MANEJO DE LAS AFLATOXINAS.

La bibliografía en la que se basan las recomendaciones aparece al final de ellas.

A. Peligrosidad.

Las toxinas fungales usadas en esta investigación son extremadamente peligrosas por ingestión, inhalación o absorción por piel (1,2,3).

B. Manejo.

Estos compuestos debieran ser manejados en sistemas cerrados. Todas las operaciones debieran llevarse a cabo con guantes para evitar contacto accidental. Todo trabajador debiera vestir en su totalidad con ropa desechable, incluyendo cubiertas para zapatos, guantes y máscara con un aprovisionamiento independiente de aire. En todo momento se debe recordar que la ingestión, absorción por piel o inyección o aún una cantidad traza podría ser fatal.

C).Descontaminación y desecho.

Cualquier derrame debiera ser absorbido con tierra de diatomeas, cuidadosamente colectado y localizado en un balde. El área después se limpia cuidadosamente.

El sistema hipoclorito de sodio/acetona ha sido empleado exitosamente como un método de destrucción (4,5).

Al material que se va a descontaminar se le adiciona solución de hipoclorito al 5 % por volumen y se le mantiene cubierto en esa postura por 30 minutos. El pH de la solución se ajusta a 7.8 u 8.0 por la adición en gota de HCl 2 N seguido por la adición de acetona hasta que la concentración de acetona en la solución es de 5 % por volumen. Esta mezcla se deja descansar cubierta por otros 30

minutos después de los cuales, lo carcinógeno debió haberse convertido al derivado dihidroxi que no es carcinogénico (5). Revisar que la reacción se haya llevado a cabo completamente mediante el depósito de gotas sobre papel filtro y examinándolas después de haberse secado, bajo luz ultravioleta. Las manchas no debieran ser fluorescentes.

Deseche el material contaminado de acuerdo a regulaciones locales.

NOTAS.

1. El pH de las soluciones de hipoclorito de sodio comercial es alrededor de 11.5 y el descenso de su pH a 7.4 mediante la adición de ácido puede conducir a la emisión de cloro. O de otra manera, la adición de acetona a una solución fuerte de hipoclorito de sodio puede conducir a una reacción violenta de haloformo (5).

2. Castegnaro, et al. (5) indican que la destoxificación de la aflatoxina B 1 con hipoclorito de sodio conduce a la formación de productos que incluye el carcinogénico y mutagénico 2,3-dicloro-derivado. También se hace notar que el hipoclorito de sodio podría reaccionar con otros componentes de los residuos.

A la luz de esta información, SIGMA recomienda que se duplique la cantidad de hipoclorito (sobre la cantidad estimada como necesaria) para asegurar la degradación efectiva de los residuos de las aflatoxinas.

D).EXPOSICION. En caso de derrame accidental o exposición, lave con agua y jabón y obtenga auxilio médico de inmediato. Informe al médico de la toxina que se estuvo manejando.

Bibliografía de las recomendaciones.

1. Ceigler, A., et al. (Eds.) Microbial toxins. Vol VI y VII. Academic Press. N.Y.
2. Rodrick, J.V., et al. (Eds.) Mycotoxins Human and Animal Health Proceedings Conference 1977. Pathotox Publisher. Park Forest South, IL.

3. International Agency for Research on Cancer Monographs. Vol I 1972, Vol 10 1975.
4. IARC Scientific Publication No. 37 p. 9, 1980. Laboratory Decontamination and Destruction of Aflatoxins B 1, B 2, G 1 G 2 in Laboratory Wastes. International Agency for Research on Cancer, 1979, 150 cours Albert-Thomas, 69372 Lyon Cedex 2, France.
5. Castegnaro, M., Friesen, M., Michelon, J., Waler, E.A., American Industrial Hygiene Association 42, pp. 398-401 1981.
6. January, 1981 Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. Center for disease Control. National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH 45226.

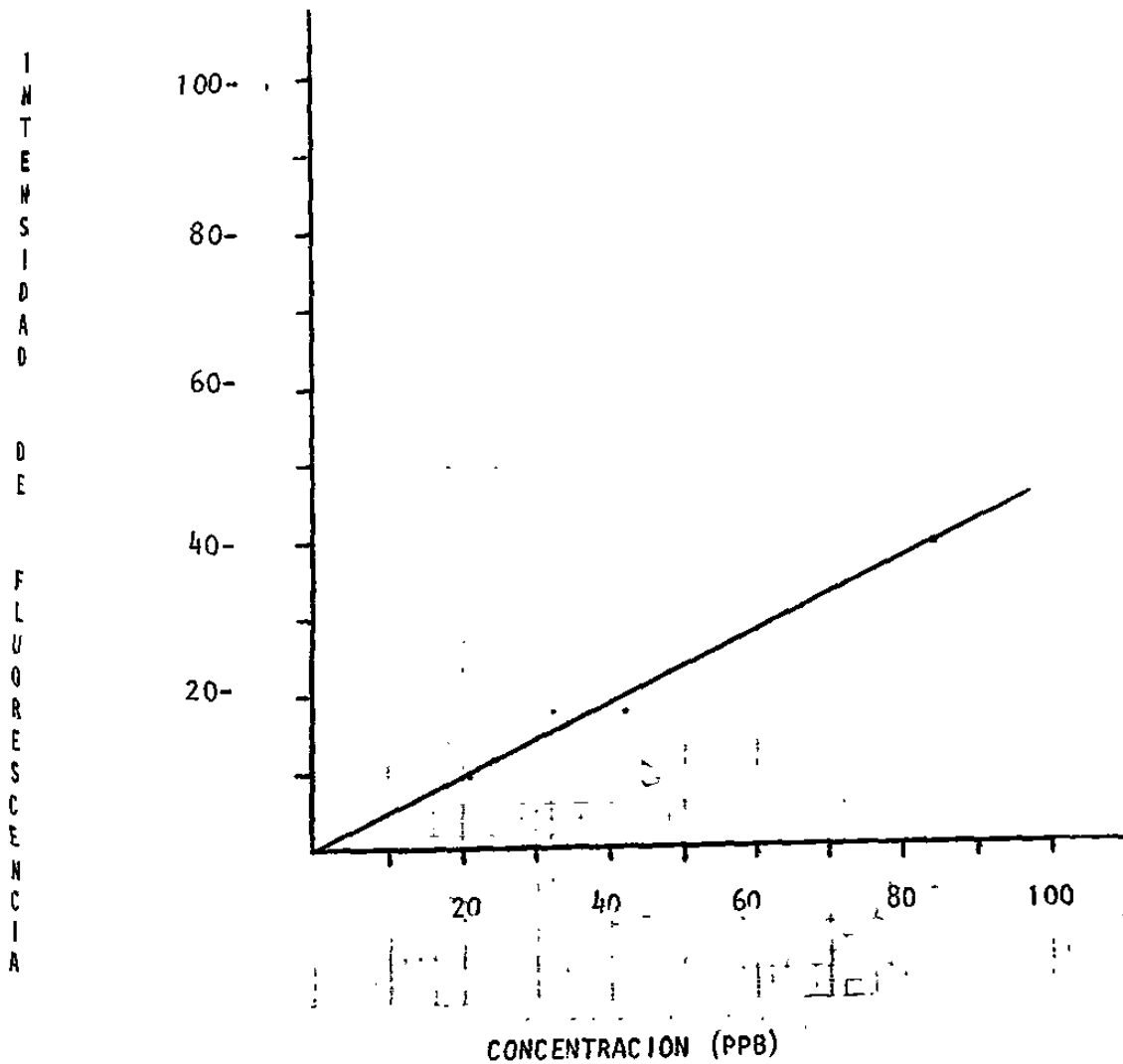
A P E N D I C E E

Este apéndice contiene en el siguiente orden,
para los estándares de aflatoxinas:

Curvas de calibración por fluorescencia directa.

Espectros de fluorescencia.

Curvas de calibración por ultravioleta directa.



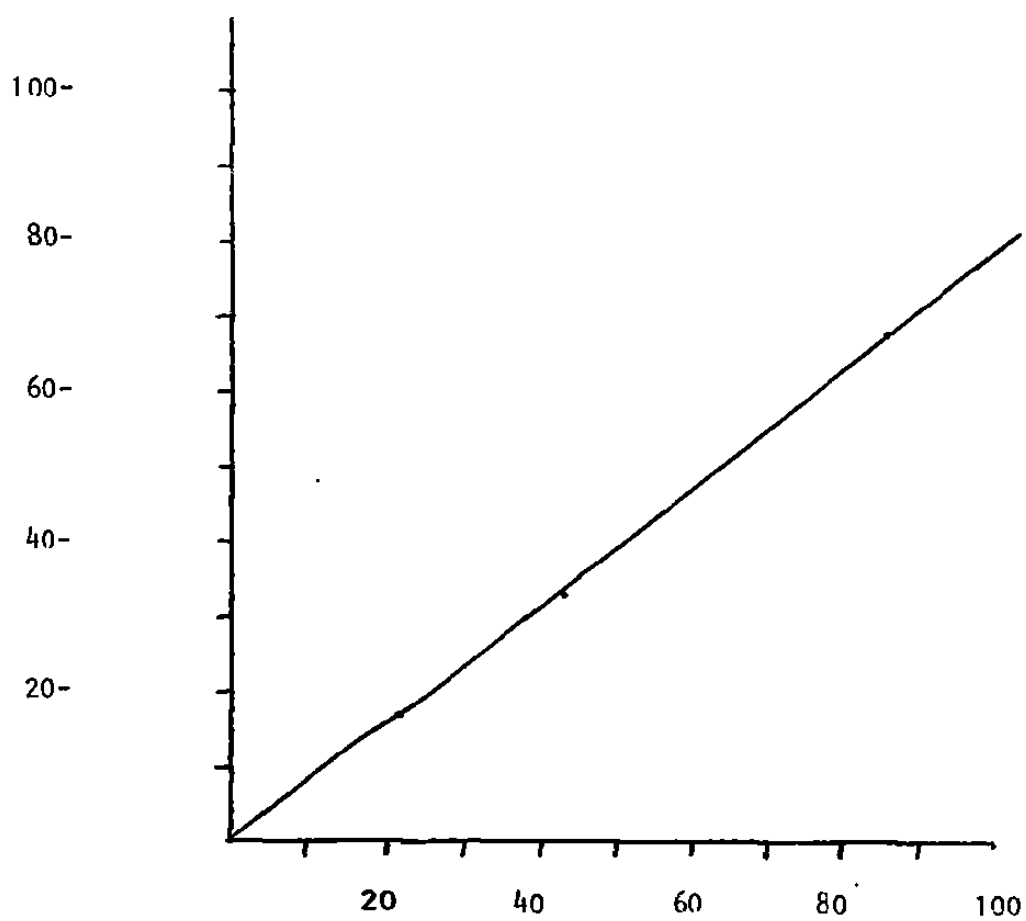
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B1 NO DERIVATIZADA.
DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PM03
LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : 436 NM
SENSIBILIDAD : 100 X 10
METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. 1

I
N
T
E
N
S
I
D
A
D

D
E

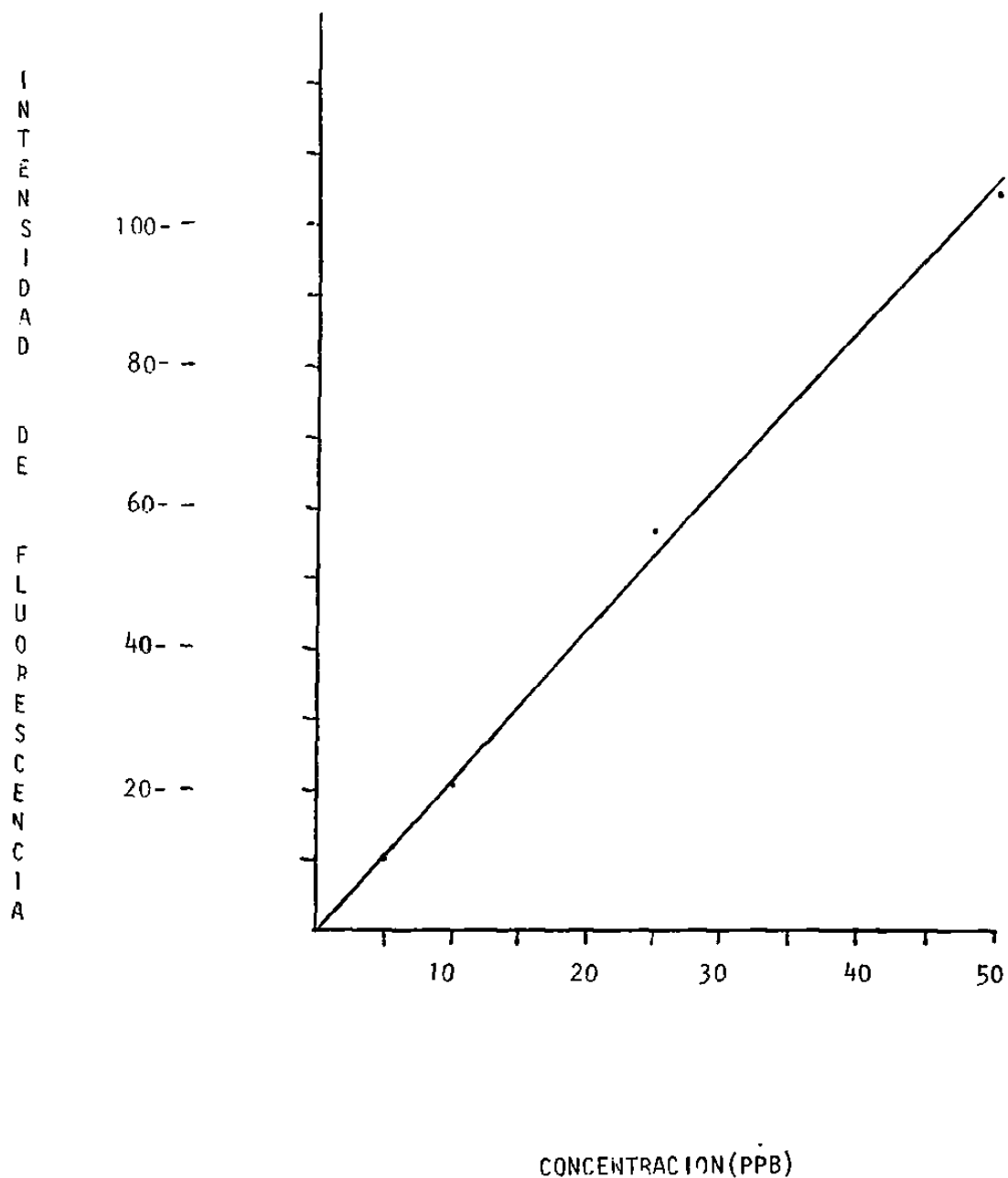
F
L
U
O
R
E
S
C
E
N
C
I
A



CONCENTRACION (PPB)

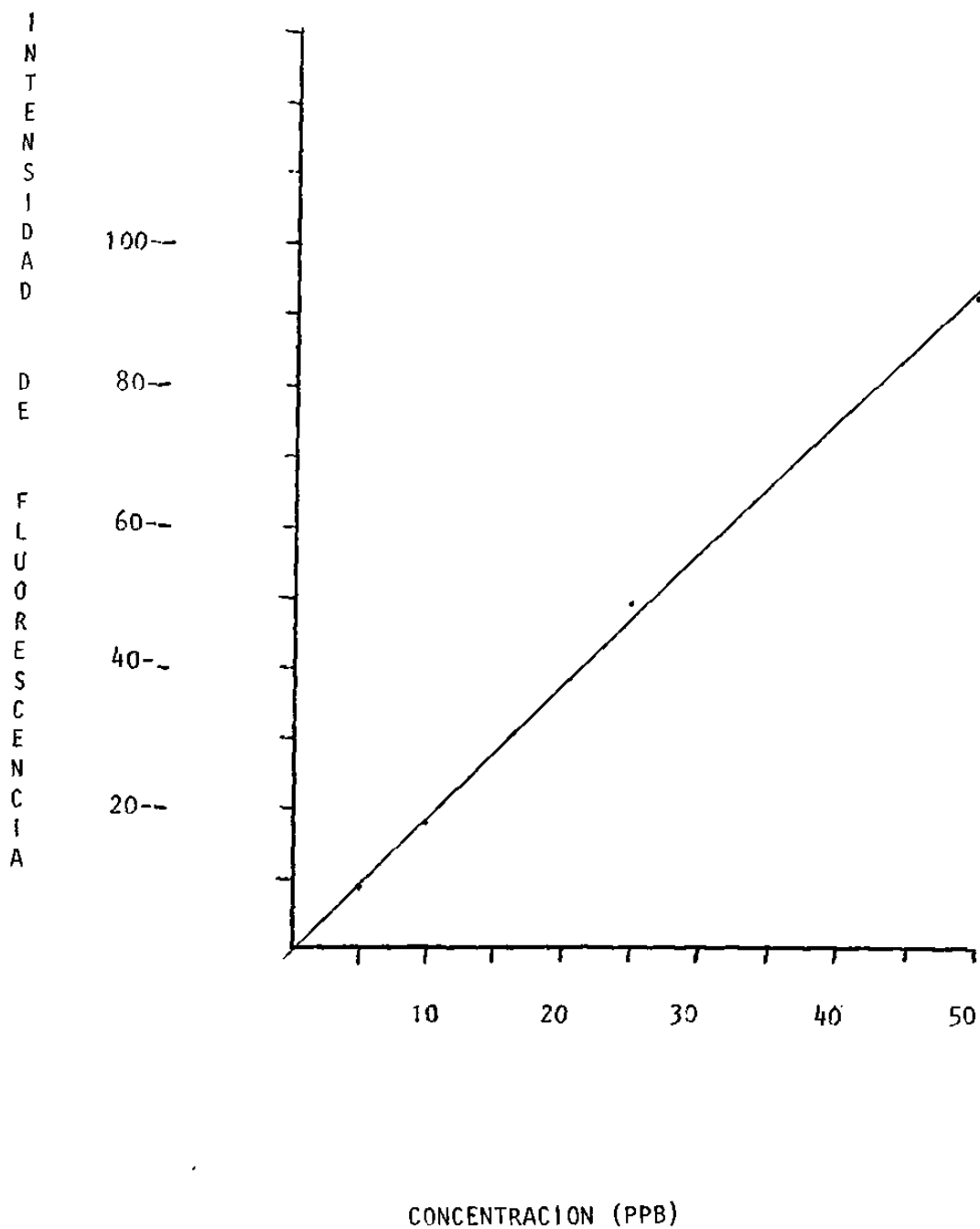
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G1 NO DERIVATIZADA.
DETECTOR : FLUORESCENCIA PMQ3
LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : 436 NM
SENSIBILIDAD : 100 X 10
METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. II



CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B1 DERIVATIZADA
DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PM03
LAMBDA : EXCITACION 365 NM
 EMISION : 436 NM
SENSIBILIDAD : 100 X 10
METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. 111



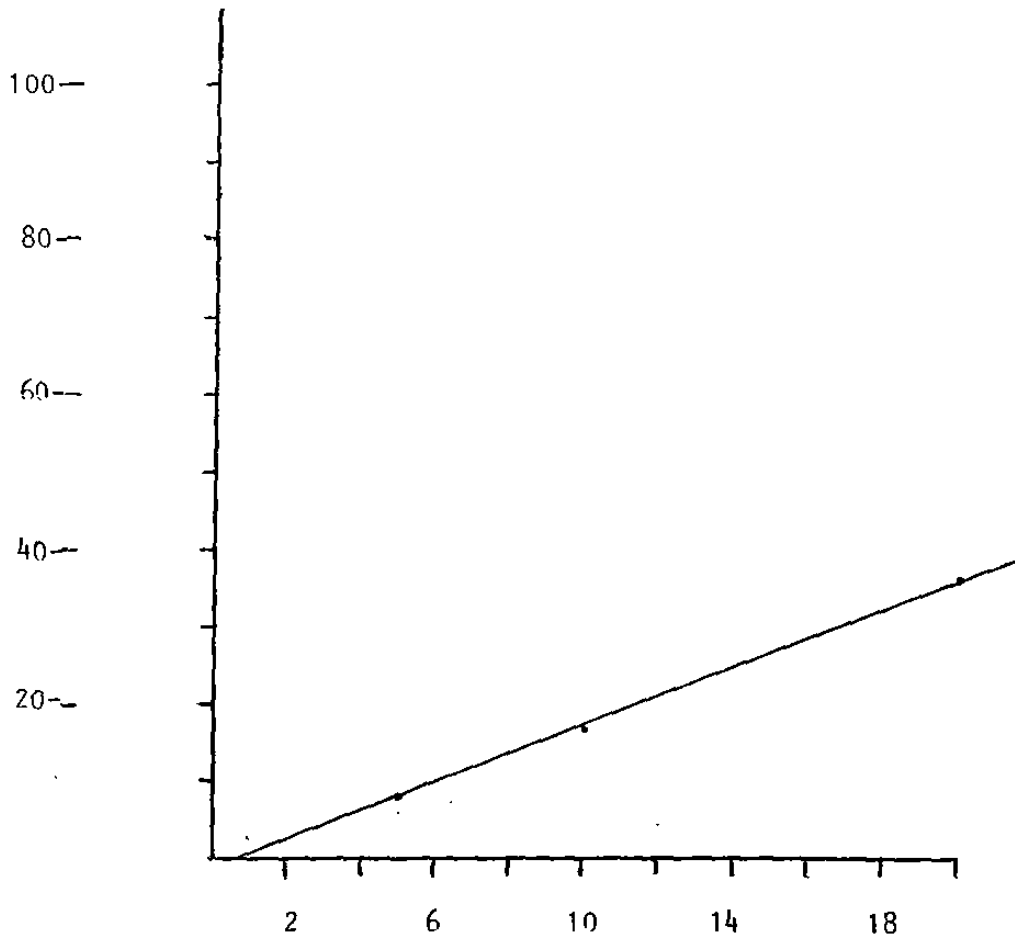
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G1 DERIVATIZADA
DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PMQ3
LAMBDA : EXCITACION 365 NM
 EMISION : 436 NM.
SENSIBILIDAD : 100 X 10
METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. IV

I
N
T
E
N
S
I
D
A
D

D
E

F
L
U
O
R
E
S
C
E
N
C
I
A



CONCENTRACION (PPB)

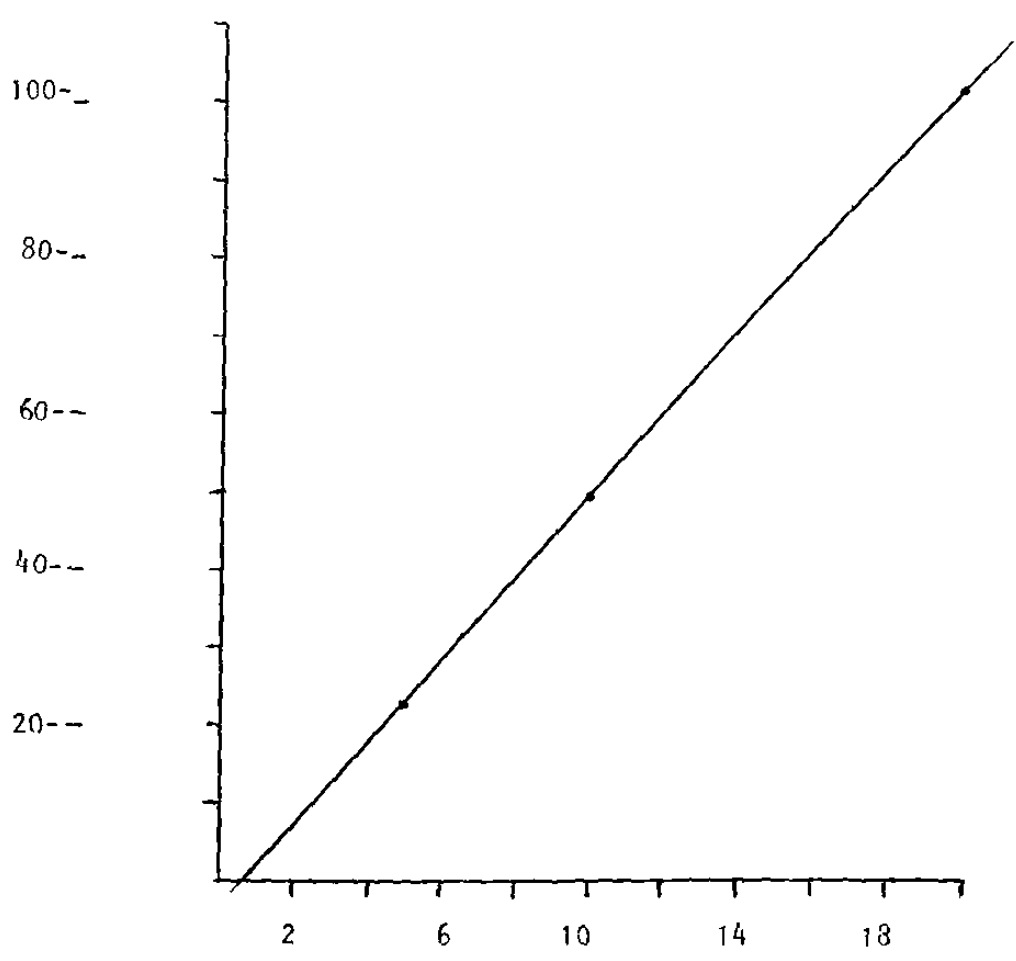
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G2
DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PMQ3
LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : 436 NM
SENSIBILIDAD : 100 X 10
METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. V

I
N
T
E
N
S
I
D
A
D

D
E

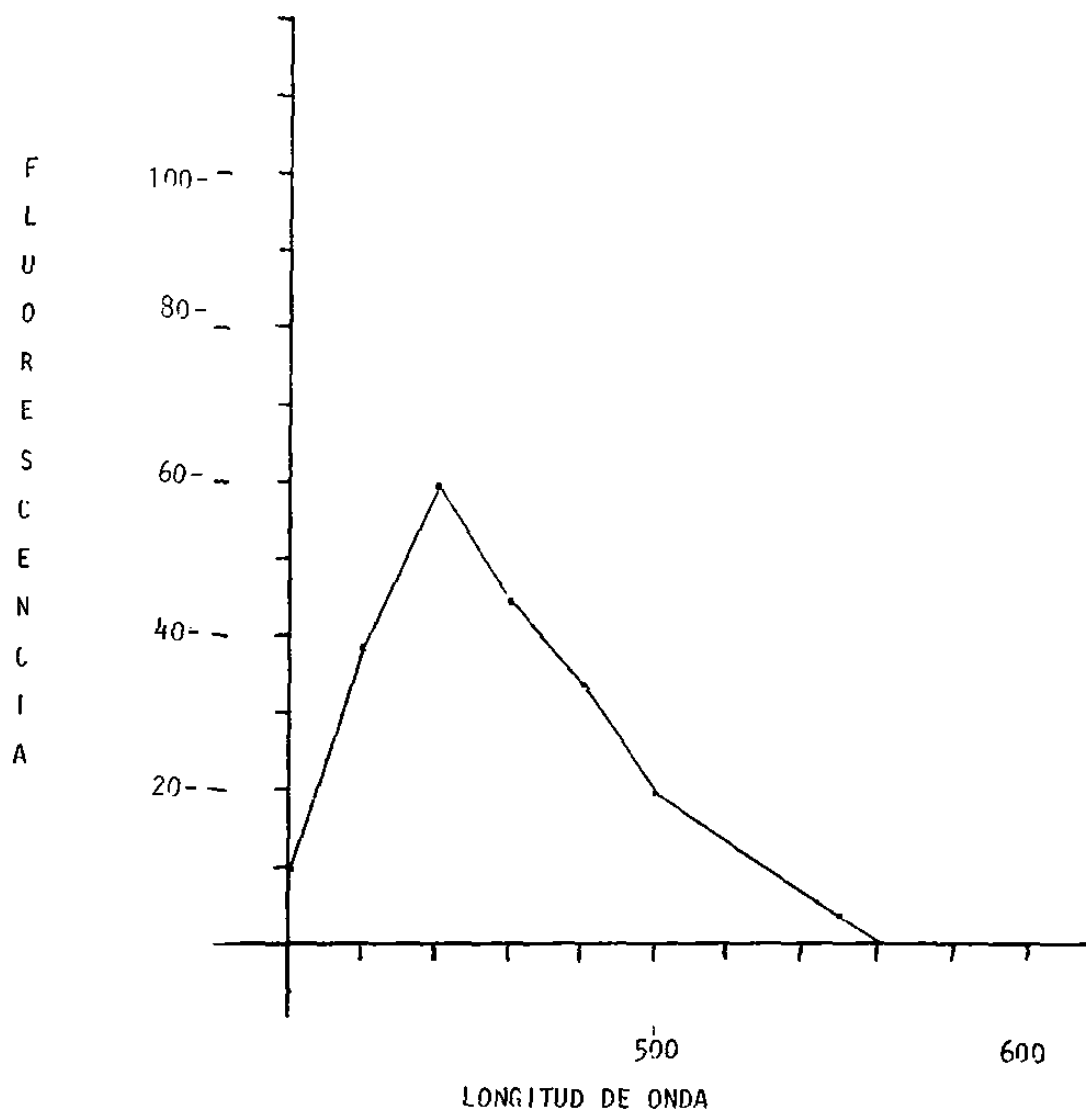
F
L
U
O
R
E
S
C
E
N
C
I
A



CONCENTRACION (PPB)

CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B2
DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PM03
LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : 436 NM
SENSIBILIDAD : 100 X 10
METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. VI



ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE B1 DERIVATIZADA

LAMBDA : EXCITACION : 365 NM

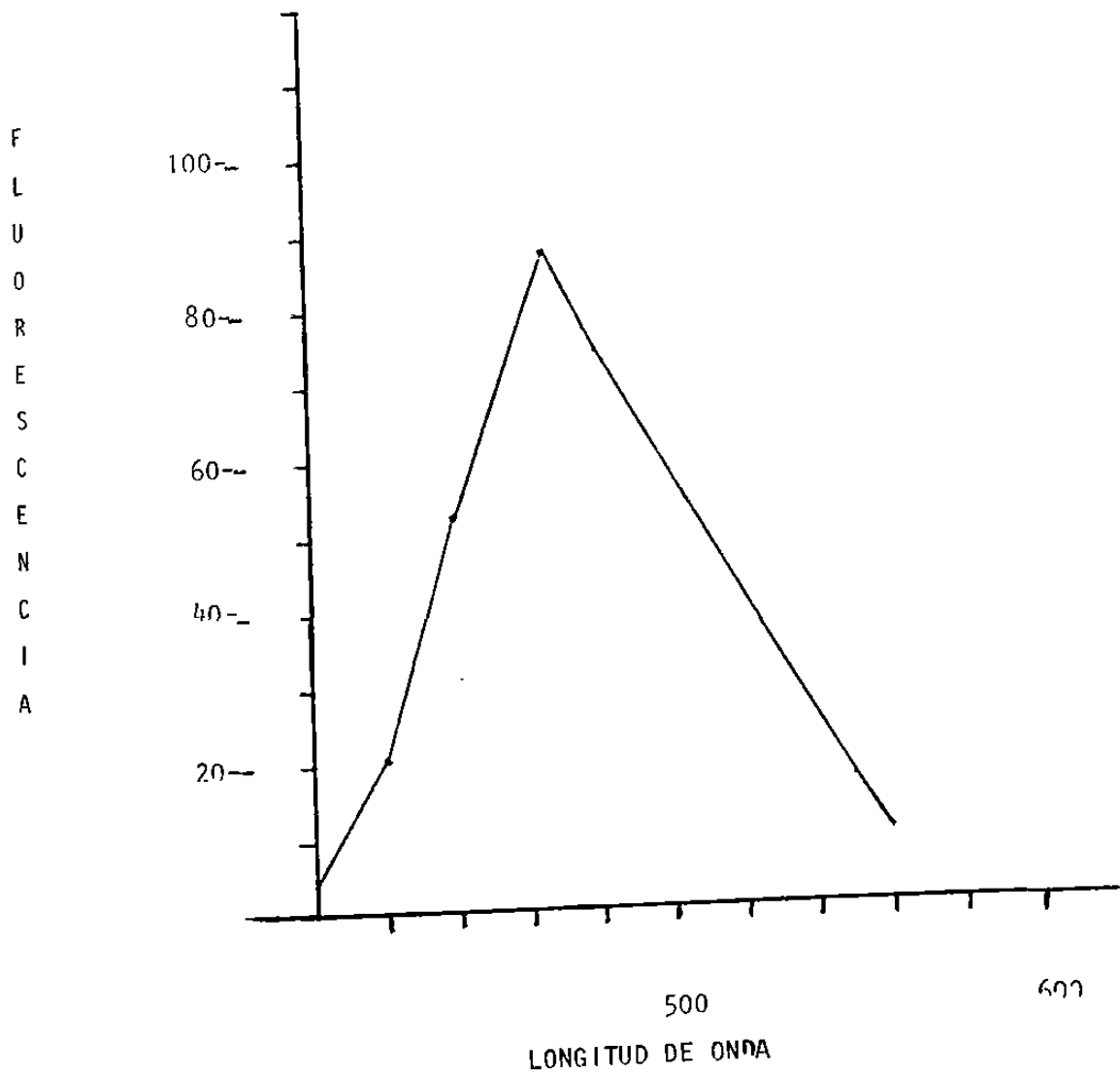
EMISION : VARIABLE

DETECTOR : KARL ZEISS : PMQ3

SENSIBILIDAD : 100 X 10 SLIT 0.5

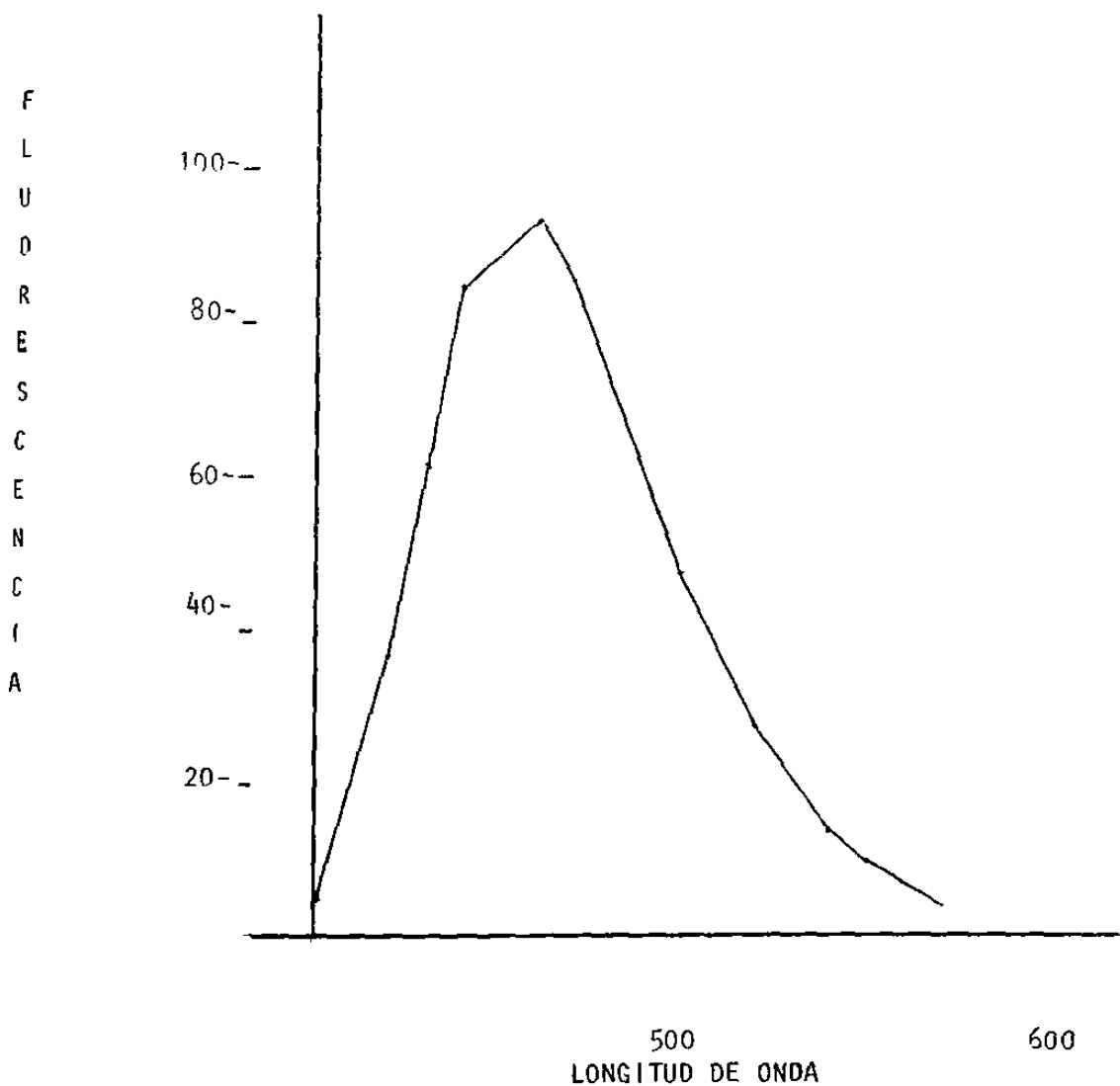
LAMBDA MAX. EMIS. 440 NM

FIG.VII



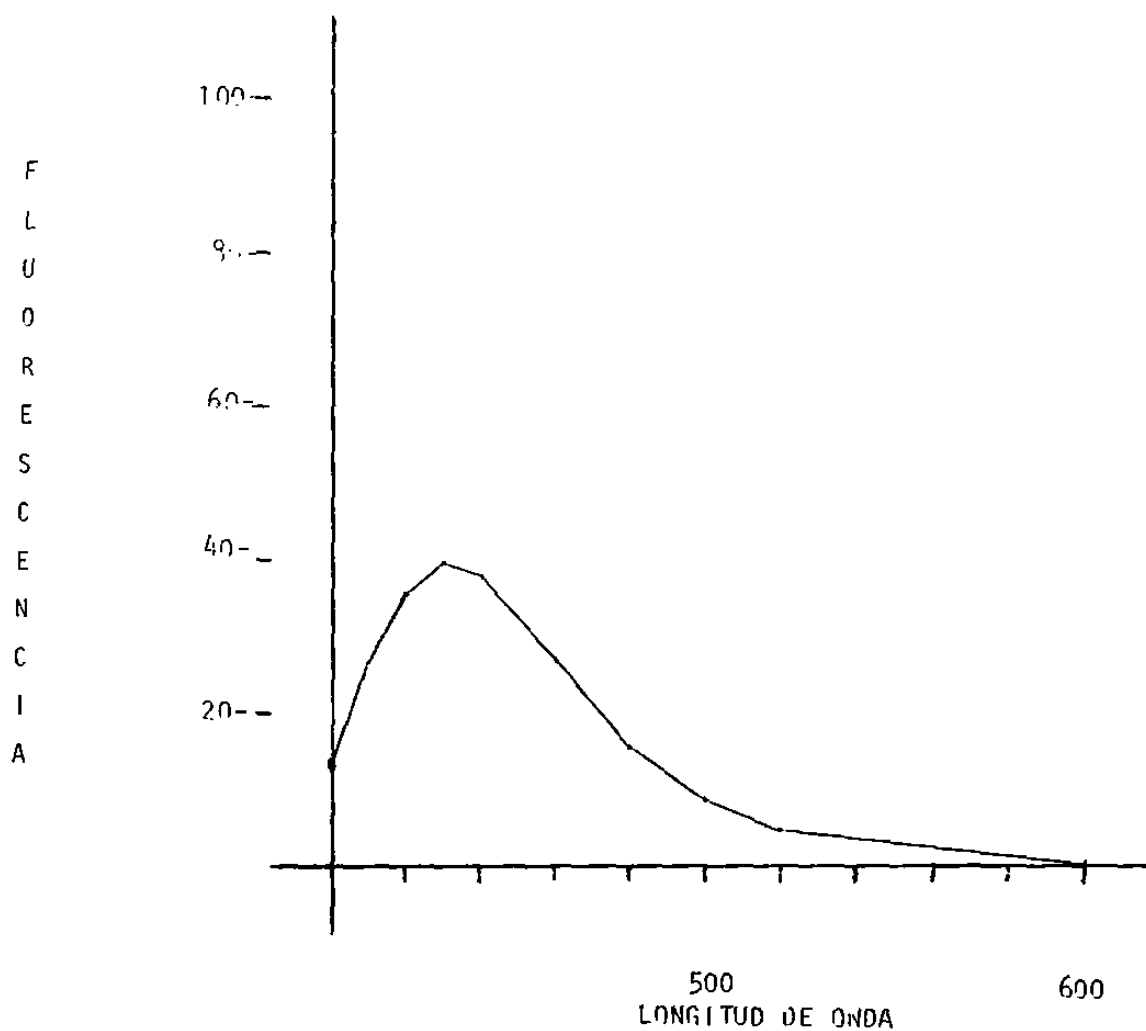
ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE G1 DERIVATIZADA
 LAMBA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : VARIABLE
 DETECTOR : KARL ZEISS PMQ 3
 SENSIBILIDAD : 100 X 10 SLIT. 0.5
 LAMBDA : MAX. EMISION : 466 NM

FIG. VIII



ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE G2
 LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : VARIABLE
 DETECTOR : KARL ZEISS PMQ3
 SENSIBILIDAD : 100 X 6 SLIT 0.3
 LAMBDA : MAX. EMIS. : 456

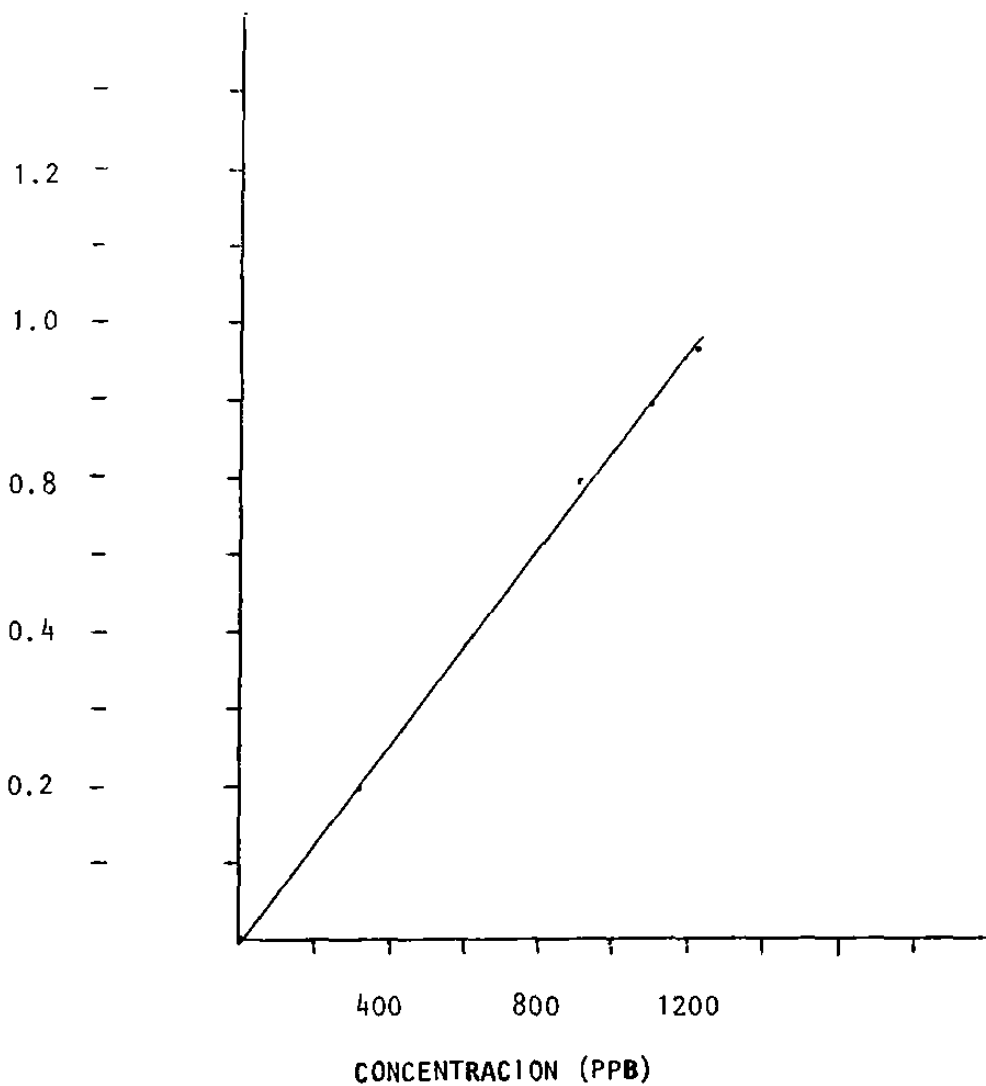
FIG. IX



ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE B2
 LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : VARIABLE
 DETECTOR : KARL ZEISS PMQ3
 SENSIBILIDAD : 100 X 6 SLIT 0.3
 LAMBDA MAX. EMISION : 432 NM

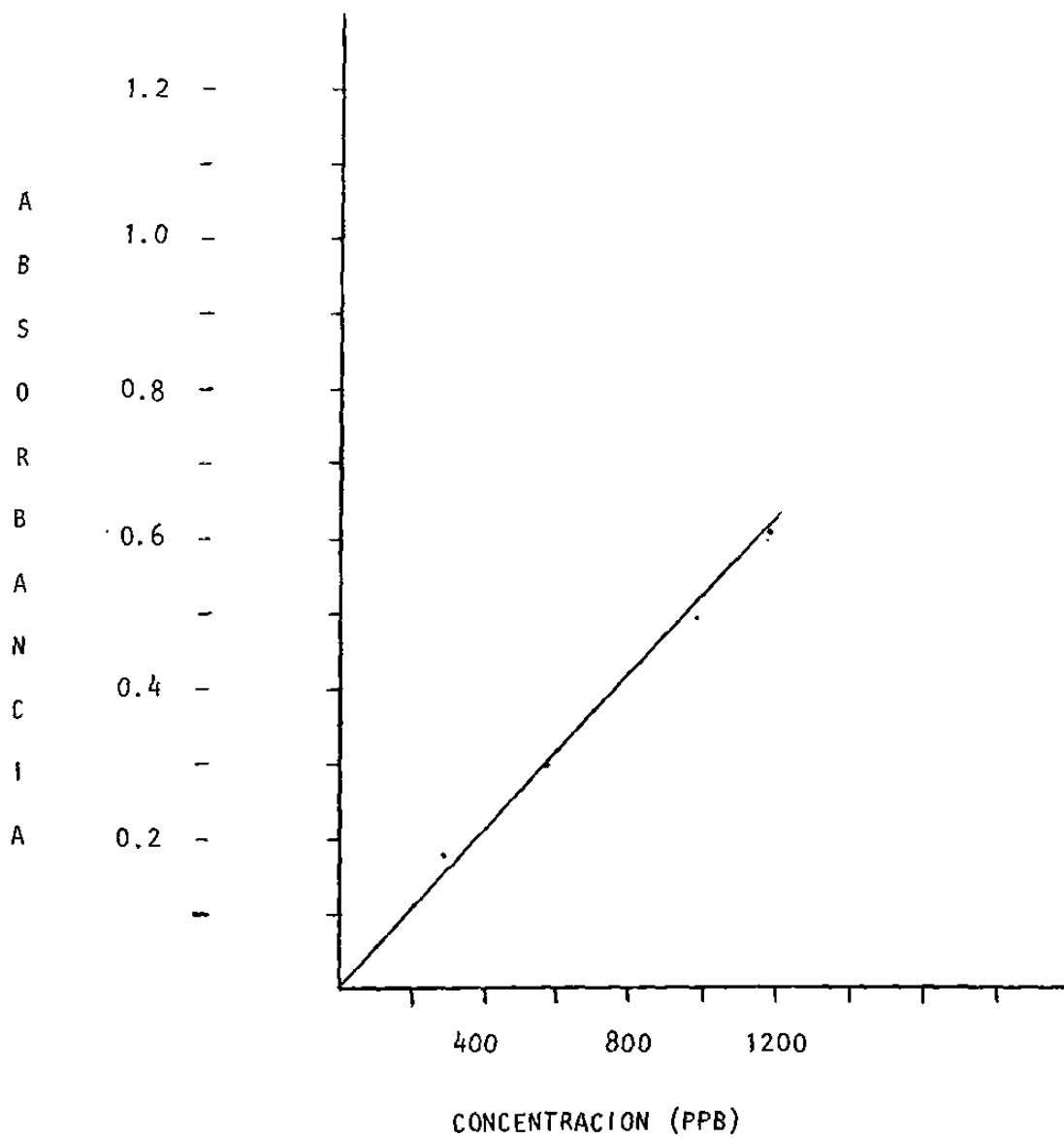
FIG. X

A
B
S
O
R
B
A
N
C
I
A



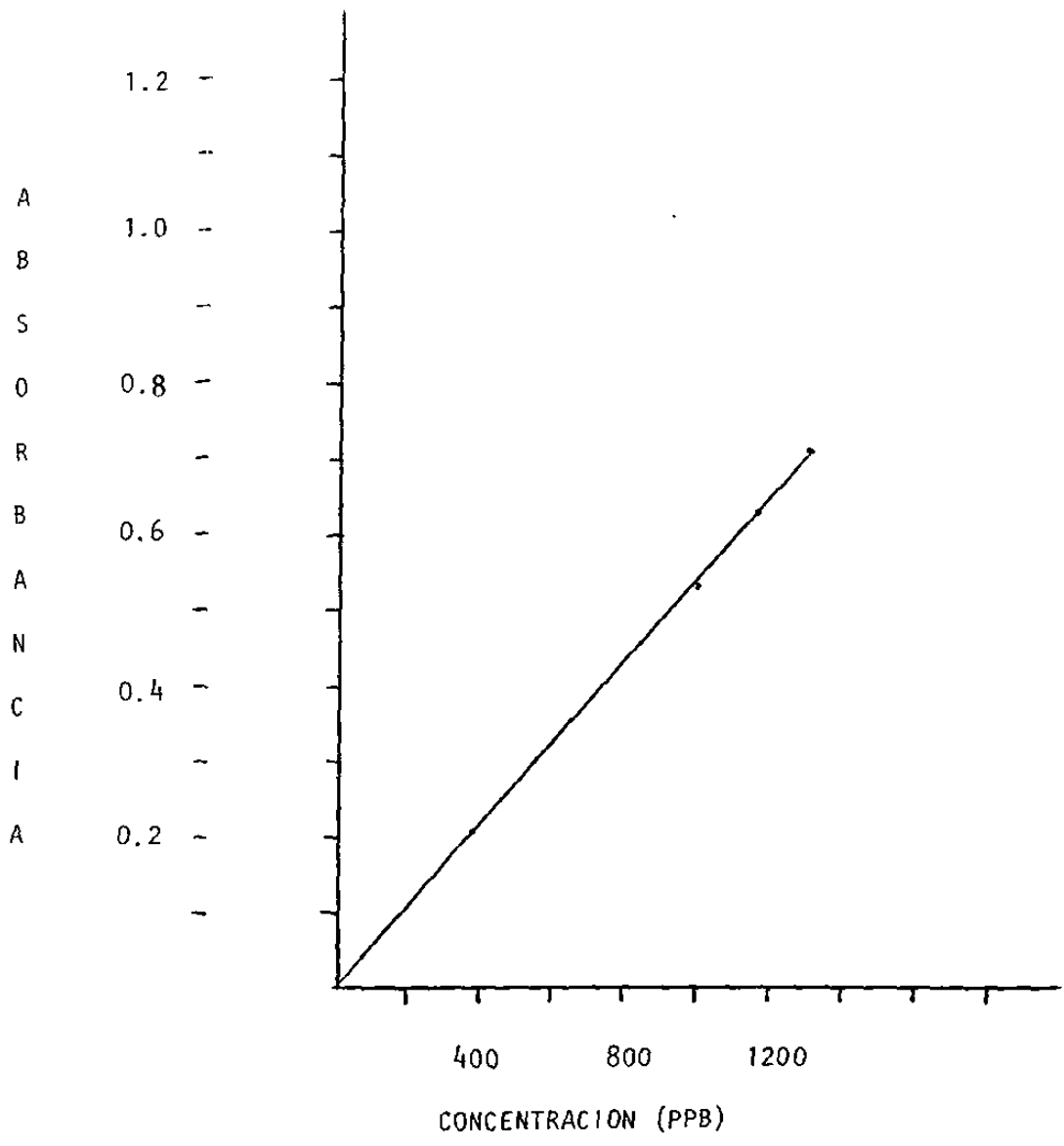
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B 1
SIN DERIVATIZACION
DETECTOR: ULTRAVIOLETA BECKMAN MODELO 35
LAMBDA: 365 nm.
SENSIBILIDAD: SLIT DE 0.1 mm.
METODO DE LECTURA: DIRECTO.

FIG. XI



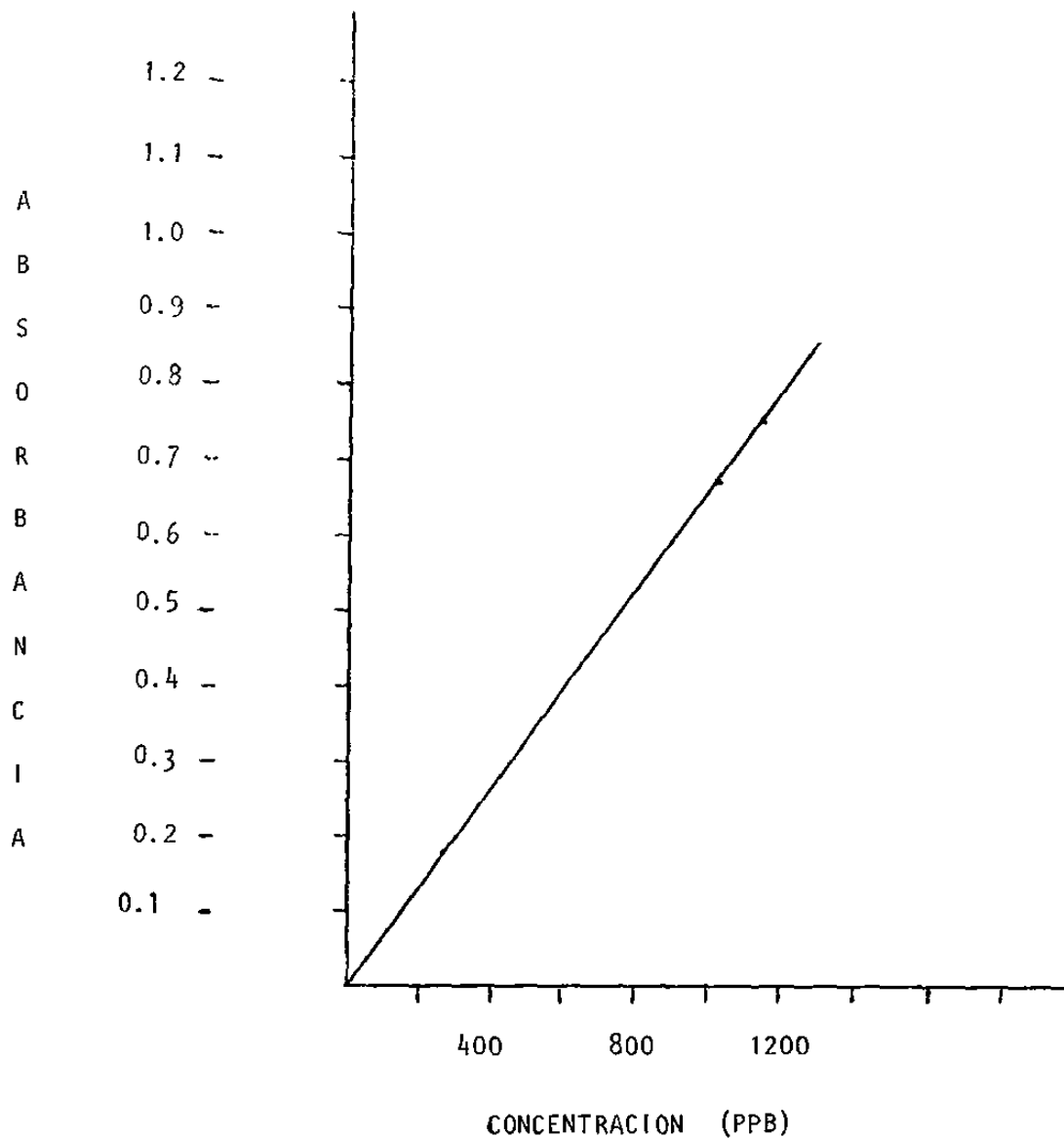
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G 1
 SIN DERIVATIZACION.
 DETECTOR: ULTRAVIOLETA BECKMAN MODELO 35.
 LAMBDA: 365 nm.
 SENSIBILIDAD: SLIT DE 0.1 mm.
 METODO DE LECTURA: DIRECTO.

FIG. XII



CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G 2
 DETECTOR: ULTRAVIOLETA BECKMAN MODELO 35.
 LAMBDA: 365 nm.
 SENSIBILIDAD: SLIT DE 0.1 mm.
 METODO DE LECTURA: DIRECTO.

FIG. XIII



CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B 2
DETECTOR: ULTRAVIOLETA BECKMAN MODELO 35
LAMBDA: 365 nm
SENSIBILIDAD: SLIT DE 0.1 mm
METODO DE LECTURA: DIRECTO.

FIG. XIV

