



**DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DE AFLATOXINAS M1 Y B1 EN FLUIDOS
BIOLOGICOS EMPLEANDO CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA RESOLUCION**

TESIS

**PRESENTADA A LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

POR

Q.C.B. RICARDO MONTOYA OLVERA

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

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

MONTERREY NUEVO LEON.

SEPTIEMBRE DE 1995.

TM

QP941

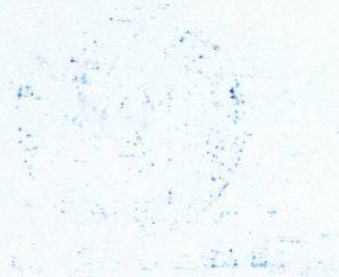
.A3

M6

c.1



1080071349





BIBLIOTECA

**DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DE AFLATOXINAS M1 Y B1 EN FLUIDOS
BIOLOGICOS EMPLEANDO CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA RESOLUCION**

TESIS

**PRESENTADA A LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

por

Q.C.B. RICARDO MONTOYA OLVERA

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

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



BIBLIOTECA

MONTERREY NUEVO LEON.

SEPTIEMBRE DE 1995.

TM
QP9
.A3



**DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DE AFLATOXINAS M1 Y B1 EN FLUIDOS
BIOLOGICOS EMPLEANDO CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA RESOLUCION**

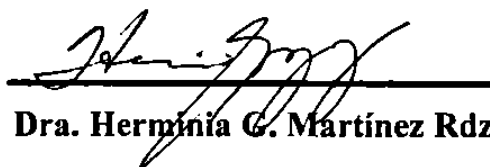
por

RICARDO MONTOYA OLVERA

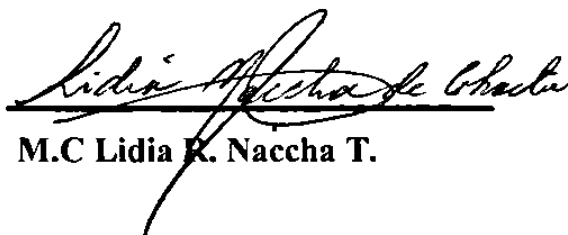
El comité de Tesis:



Dra. Noemí Waskman de T.





Dra. Herminia G. Martínez Rdz.



M.C Lidia R. Naccha T.



M.C. Ma. de la Luz Salazar C.


M.C. Enrique A. Alcorta G.
Dra. Herminia G. Martínez Rdz.
Secretario de Ciencias Básicas
Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado
Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Asesor de Tesis:

M.C. Lidia R. Naccha Torres

Este trabajo se realizó en el

**Departamento de Química Analítica de la
Facultad de Medicina
de la Universidad Autónoma de Nuevo León**

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por acompañarme y guiarme siempre.

A mis padres y maestros

**Por contribuir a mi superación académica
y que con sus enseñanzas me han permitido
pensar libremente.**

A la Dra. Nohemí Waskman y la M.C. Lidia R. Naccha

**Con mi mayor reconocimiento por su enseñanza,
desinteresada asesoría y orientación.**

A la maestra Esperanza Torres de Navarro

**Por las facilidades otorgadas durante la realización de
esta tesis.**

Al comité evaluador de tesis

Por sus consejos.

Al M.C. Enrique Alcorta

**Por su valiosa ayuda para la elaboración estadística
y de impresión de este trabajo.**

Al M.C. Karim Acuña Askar

**por sus palabras de orientación y estímulo
para seguir adelante.**

A mis compañeros de trabajo

**Por los ratos buenos y malos que compartimos
y por los consejos que me otorgaron.**

A la Secretaria Gloria Martínez

Por su disposición y ayuda en los trabajos de mecanografía.

**A MIS PADRES: Con todo cariño, mi admiración
y eterno respeto, porque a ellos les debo todo lo que soy.**

**A MIS HERMANOS: Aleida Azucena, Juan José, Juana,
Juan Leoncio, Jesús Fidencio y San Juana Maylen:
porque espero haber sido, ser y seguir
siendo ejemplo digno de Uds.**

**A todos mis familiares y amistades,
que de una forma u otra, me ayudaron
en la elaboración del presente trabajo.**

INDICE GENERAL

	pág.
INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE FIGURAS	II
ABREVIATURAS	III
CAPITULO 1. INTRODUCCION	1
CAPITULO 2. GENERALIDADES	4
2.1 MICOTOXINAS-MICOTOXICOSIS	4
2.1.1 IMPACTO ECONOMICO-SALUD	5
2.1.2 DETECCION	6
2.2 AFLATOXINAS	7
2.2.1 <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i>	10
2.2.2 EFECTOS BIOLOGICOS	12
2.2.2.1 TOXICIDAD	13
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	17
CAPITULO 3. MATERIAL Y METODOS	18
3.1 EQUIPOS	18
3.2 REACTIVOS	18

3.2.1 SEGURIDAD	19
3.3 MATERIAL BIOLÓGICO	20
3.4 PREPARACION Y NORMALIZACION DE SOLUCIONES DE AFLATOXINAS	20
3.4.1 CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO	20
3.4.2. CALCULO DE CONCENTRACIONES	21
3.4.3 DETERMINACION DE CRITERIOS DE PUREZA	21
3.4.3.1 PUREZA CROMATOGRÁFICA	21
3.4.3.2 RELACION DE PICOS MAYORES DE ABSORCION	22
3.4.3.3. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE SOLUCIONES PATRON	22
3.5 EVALUACION DE SISTEMAS DE EXTRACCION DE AFLATOXINAS	22
3.5.1 EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN SUERO	22
3.5.1.1 EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO	23
3.5.1.2 EXTRÁCCION EN FASE SOLIDA	25
3.5.2 EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN ORINA	25
3.5.2.1 EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO	27
3.5.2.2 EXTRACCION EN FASE SOLIDA	27
3.6 EVALUACION DE PORCENTAJES DE RECUPERACION	28

3.7 EVALUACION DEL METODO	28
3.8 SENSIBILIDAD DEL METODO	31
CAPITULO 4. RESULTADOS	32
4.1 PREPARACION Y NORMALIZACION DE SOLUCIONES DE AFLATOXINAS	32
4.2 EVALUACION DE SISTEMAS DE EXTRACCION	32
4.3 EVALUACION DEL METODO	33
4.4. ANALISIS CUALITATIVO	33
4.5 ANALISIS CUANTITATIVO	33
4.6 SENSIBILIDAD DEL METODO	33
CAPITULO 5. DISCUSION	55
CAPITULO 6. CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	60

**DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DE AFLATOXINAS M1 Y B1 EN FLUIDOS
BIOLOGICOS EMPLEANDO CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION**

INDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla I. DL ₅₀ para AFB1 en diferentes especies de animales	13
Tabla II. Calibración de espectrofotómetro UV-VIS	34
Tabla III. Absorbancia y concentración de soluciones de aflatoxinas	34
Tabla IV. Cromatografía en capa fina de soluciones patrón de aflatoxinas	35
Tabla V. Relación de picos mayores de absorbancia	35
Tabla VI. Recuperación de AFM1 en suero n = 4	40
Tabla VII. Recuperación de AFB1 en suero n=4	41
Tabla VIII. Recuperación de AFM1 en orina n= 4	42
Tabla IX. Recuperación de AFB1 en orina n = 4	43
Tabla X. Condiciones cromatográficas de análisis de aflatoxinas	44
Tabla XI. Recuperación de AFM1 en suero n = 18	45
Tabla XII. Recuperación de AFB1 en suero n = 18	46
Tabla XIII. Recuperación de AFM1 en orina n = 18	47
Tabla XIV. Recuperación de AFB1 en orina n = 18	48
Tabla XV. Parámetros cromatográficos de aflatoxinas	51
Tabla XVI. Sensibilidad del método	54

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Fig. 1. Estructura de aflatoxinas	9
Fig. 2. Cromatograma de solución patrón de AFM1	36
Fig. 3. Cromatograma de solución patrón de AFB1	37
Fig. 4. Cromatograma de AFM1 derivada con TFA	38
Fig. 5. Cromatograma de AFB1 derivada con TFA	39
Fig. 6. Cromatograma de muestra de suero contaminada con AFM1 y AFB1	49
Fig. 7. Cromatograma de muestra de orina contaminada con AFM1 y AFB1	50
Fig. 8. Curva de calibración de AFM1 derivada con TFA	52
Fig. 9. Curva de calibración de AFB1 derivada con TFA	53

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
ADN	Acido desoxirribonucleico
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
ARN	Acido ribonucleico
B/A	Factor de asimetría
cm	Centímetro
Conc	Concentración
CO₂	Dioxido de Carbono
C.V	Coefficiente de variación
DI	Diámetro interno
DS	Desviación estándar
ε	Coefficiente de extinción molar
ε'	Coefficiente de extinción molar promedio
etc	Etcétera
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FC	Factor de corrección
fig	Figura
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
Int. fluorescencia	Intensidad de fluorescencia
k'	Factor de capacidad

kg	Kilogramo
l	Longitud de trayecto óptico
LD₅₀	Dosis letal media
LIQ-LIQ	Líquido Líquido
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenindinucleótido reducido
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
ODS	Octadecilsilano
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
PQM	Productos Químicos Monterrey
PSI	Libra-pulgada-cuadrada
RFU	Unidad de fluorescencia relativa
r	Coefficiente de correlación
r²	Coefficiente de determinación
Rs	Resolución
SPE	Extracción en fase sólida
TFA	Acido trifluoracético
Tr	Tiempo de retención
UV-VIS	Ultravioleta - visible
\bar{X}	Promedio

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Los avances científicos y tecnológicos relacionan actualmente muchos padecimientos con la exposición ambiental, laboral y alimenticia a compuestos altamente tóxicos^(1,2,3,4,5).

La identificación de los cambios producidos en los individuos como consecuencia de su exposición a los compuestos referidos se hace a través de estudios de toxicología, con la intención de detectar marcadores específicos de exposición o de efectos tempranos en la salud. Aún considerando que existen estudios destinados a identificar la toxicidad de estas sustancias, es necesario el incremento de los mismos, sobre todo en los casos subagudos y crónicos. El conocimiento de estos tóxicos, así como de los factores condicionantes, posibilita la propuesta de acciones preventivas destinadas a evitar o disminuir la morbilidad y/o mortalidad que estas sustancias son capaces de producir.

Desde los inicios de la humanidad, los microorganismos han tenido un gran impacto sobre el bienestar y la salud humana, y en muchas formas de beneficio y daño. Las enfermedades causadas por microorganismos fungales pueden ser divididas en dos tipos: micosis y micotoxicosis. La micosis se refiere a la invasión de tejido(s) vivo por el crecimiento fungal y puede verse en enfermedades como: histoplasmosis, candidosis, coccidioidomicosis, mientras que la micotoxicosis es la acción en un organismo de los metabolitos, micotoxinas, producidos por hongos; algunos ejemplos de estas enfermedades son: Aleukia Tóxica Alimentaria, Aspergilosis, enfermedad del grano amarillo y aflatoxicosis, en la cual intervienen frecuentemente un gran número de órganos, principalmente el hígado, riñón, pulmón y sistema nervioso^(6,7,8).

El método de monitoreo de exposición a aflatoxina en estudios epidemiológicos de correlación fue establecida por la extrapolación de análisis de contaminación en muestras de alimentos y la presencia de AFM1 Y AFB1, en especímenes de hígado, suero y orina.

Las condiciones ambientales que prevalecen en nuestra región favorecen la contaminación de alimentos por aflatoxinas. En nuestro medio se han realizado estudios para determinar la posible contaminación por aflatoxinas en alimentos de alto consumo, encontrándose un alto índice de muestras contaminadas^(9,10,11,12,13), lo cual nos hace pensar en el peligro latente a la exposición a estas sustancias potencialmente carcinógenas.

Si bien se han realizado estudios para la detección de aflatoxinas en alimentos, en nuestro país no existen estudios epidemiológicos que involucren a las aflatoxinas con algunas de las enfermedades anteriormente citadas; esto se debe a la carencia de métodos para la detección y cuantificación de aflatoxinas y/o sus metabolitos dentro del organismo que se ha expuesto.

—

En nuestro medio consideramos que la disponibilidad de un procedimiento para cuantificar un agente tóxico, como lo son las aflatoxinas, en sangre y orina, es preferible al análisis de alimentos de la dieta o al análisis de biopsias para la estimación del papel de un compuesto particular en una enfermedad específica, principalmente en estudios epidemiológicos.

En la literatura existen pocos métodos reportados para el análisis de aflatoxinas en especímenes biológicos; estos métodos han hecho empleo de sistemas de extracción de aflatoxinas líquido-líquido y sistemas de extracción en fase sólida, y recientemente columnas de

inmunoafinidad acoplados a sistemas cromatográficos en sus diferentes variantes, con detectores de ultravioleta-visible y fluorescencia molecular^(14,15,16,17). Estos métodos, para ser aplicados, presentan grandes inconvenientes desde el uso de considerables cantidades de solventes, columnas de inmunoafinidad, y necesidades de equipo especial por la cual los hace difícil de reproducir en condiciones propias de un laboratorio común.

Sin embargo, la ausencia de métodos en nuestro medio para monitoreo de la exposición a aflatoxinas y metabolitos específicos como la AFM1, ha impedido la realización de estudios epidemiológicos en el área de aflatoxicosis, motivo por el cual nos propusimos realizar el presente trabajo, con el fin de desarrollar un método de análisis para detectar aflatoxinas en fluidos biológicos, evaluando los sistemas de extracción más frecuentemente utilizados para aflatoxinas: líquido-líquido y fase sólida, este último es un método que en los últimos años ha aumentado su aplicación para la extracción de muchos compuestos en diferentes tipos de muestras. Además, se usó ácido trifluoracético como agente derivatizante de aflatoxinas en muestras biológicas, y el posterior análisis en cromatografía de líquidos en fase reversa.

CAPITULO 2

GENERALIDADES

2.1 MICOTOXINAS-MICOTOXICOSIS

El termino micotoxina se deriva de las palabras griegas "MYKES" hongo y "TOKSICON" veneno y los síndromes de toxicidad resultantes de la absorción de las micotoxinas por el hombre y los animales se denominan "micotoxícosis"^(6,18).

Existen tres hipótesis diferentes acerca de la posible función de las micotoxinas^(6,18):

- 1.- La formación de metabolitos secundarios mantiene activo al hongo cuando el substrato se agota.
- 2.- La formación de metabolitos secundarios impide la acumulación de compuestos anormales posiblemente nocivos.
- 3.- El metabolismo secundario tiene un valor selectivo en el sistema ecológico; es decir, que las micotoxinas pudieran producirse como un mecanismo de autodefensa contra otros organismos debido a que algunas de las micotoxinas son tóxicas para animales superiores, insectos y microorganismos.

Las micotoxinas, poseen algunas características muy especiales^(6,7,8,19,20,21) como ser :

- En contraste con las toxinas bacterianas las cuales son principalmente proteínas con propiedades antigénicas, las micotoxinas incluyen una gran variedad de metabolitos secundarios fungales con diversas estructuras químicas y actividad biológica.
- Son tóxicas en cantidades muy bajas, ya que la LD₅₀ en la mayoría de los animales es del orden de mg/kg de peso corporal.

- Producen efectos biológicos incluyendo efectos de toxicidad aguda y crónica, así como carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos e inmunosupresores, tanto en sistemas procariotes como eucariotes.
- Son contaminantes naturales de los alimentos, no habiéndose desarrollado aún suficientes medidas de prevención para controlar su aparición en los mismos.
- Son contaminantes de alimentos de consumo masivo por la población (trigo, maíz) y en la actualidad es difícil, costoso, y muchas veces imposible eliminarlas de los mismos.
- Producen pérdidas de alimentos de origen proteico, debido a la mortalidad y morbilidad que ocasiona en los animales intoxicados por micotoxinas.
- Ocasionan pérdidas económicas en la comercialización de materias primas contaminadas, tanto para los países exportadores como para los importadores.

2.1.1 IMPACTO ECONOMICO-SALUD

La contaminación por micotoxinas en los alimentos presenta dos aspectos: el cuidado de la salud de la población y las implicaciones económicas de la comercialización de los alimentos contaminados^(7,19).

a) Impacto Económico.

Una magnitud aproximada se perfila recordando que la FAO en 1985, estimó que el 25% de los cultivos que se producen en el mundo estaban contaminados por micotoxinas.

b) Aspectos Sanitarios

Las micotoxicosis como entidades nosológicas y clínicas están ligadas al sector productivo y poseen algunas características comunes:

- El cuadro clínico, no tiene una etiología infecciosa, ni contagiosa, y el tratamiento medicamentoso tiene escasa repercusión sobre el mismo.

- Los brotes epidémicos son estacionales, relacionados con las cosechas y las condiciones climáticas y/o con el manejo post-cosecha.
- El estudio minucioso de la enfermedad, puede permitir identificar el alimento sospechoso.
- El análisis del alimento detectado revela la presencia de una o más micotoxinas.
- Las investigaciones experimentales llevadas a cabo hasta el momento revelan que la mayoría de estas sustancias disminuyen la inmunidad celular y/o humoral.
- La sintomatología es bastante inespecífica.
- El diagnóstico de las micotoxicosis, se dificulta debido a que la detección de la mayoría de las micotoxinas o sus metabolitos tóxicos en fluidos orgánicos recién ha comenzado a desarrollarse a nivel internacional, por lo que se considera que aún está en etapa experimental.

Actualmente, las micotoxicosis se pueden agrupar en primarias, que son aquellas ocasionadas por la ingesta de alimentos de origen vegetal contaminado por micotoxinas; y las secundarias, desencadenadas por la ingestión de alimentos de origen animal, con residuos de micotoxinas en sus tejidos⁽⁷⁾.

2.1.2 DETECCION

Existen dos procedimientos posibles para la detección y la determinación de las micotoxinas en productos vegetales^(7,18): el biológico y el químico. Los métodos biológicos pueden ser útiles para separar las micotoxinas conocidas de las desconocidas. Como ejemplo, cabe decir que estos métodos han desempeñado un papel importante en el período del descubrimiento de las micotoxinas. Sin embargo, los bioensayos carecen generalmente de especificidad y de reproducibilidad, por lo cual deben preferirse los ensayos químicos para determinar las micotoxinas^(18,19,21).

Probablemente no hay ninguna sustancia comestible que pueda considerarse absolutamente segura contra una posible contaminación con micotoxinas, y hay que tener en cuenta, además, que la producción de micotoxinas puede ocurrir en el campo, durante la recolección, en el almacenamiento y durante el envío de un producto alimenticio determinado^(6,7,8,18,19,21).

2.2 AFLATOXINAS

Las micotoxicosis se conocen desde hace mucho tiempo^(6,7). La primera micotoxicosis reconocida fue probablemente el ergotismo, que es una enfermedad caracterizada por necrosis y gangrena, mejor conocida en la edad media en Europa con el nombre de "fuego sacro", ésta era ocasionada por la ingestión de granos de cereales contaminados con esclerocios de *Claviceps purpurea*. A pesar de que las micotoxicosis eran conocidas antiguamente, estas fueron "ENFERMEDADES DESCUIDADAS" hasta principio de la década de los sesenta^(6,20). Después, esta actitud cambió radicalmente a causa de la epidemia de "ENFERMEDAD X DE LOS PAVOS" que produjo en Gran Bretaña la muerte de más de 100 000 pavos en pocos meses. La "ENFERMEDAD X DE LOS PAVOS", se caracterizó por necrosis hepática aguda con hiperplasia de los conductos biliares. La sintomatología en estado agudo se caracterizó por pérdida del apetito, letargo y debilidad. En su estado avanzado la muerte era inevitable. La aparición de esta enfermedad condujo a un enfoque multidisciplinario para investigar la causa del problema. Estos esfuerzos tuvieron un buen resultado y la causa de la enfermedad se encontró en un factor tóxico existente en la harina de cacahuate, importada de Brasil que se utilizaba como fuente de proteínas en los piensos de las aves afectadas^(7,20). Al parecer, el factor tóxico era producido por dos hongos, *A. flavus* y *A. parasiticus*, de aquí que se le diera el nombre de "AFLATOXINA", acrónimo derivado del nombre del hongo mencionado en primer lugar^(18,20).

Estudios posteriores del factor tóxico demostraron que el material podía separarse cromatográficamente en cuatro manchas distintas^(13,14,15). Estos cuatro componentes han recibido el nombre de aflatoxinas: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂. Las letras B y G se refieren a los colores que emiten cuando son irradiados con longitud de onda cercana a 360 nm (las B emiten un color azul y las G un color verde); los subíndices se refieren a su posición relativa en las placas cromatográficas de capa fina^(22,23,24); la estructura de algunas aflatoxinas se presentan en la figura 1.

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos químicamente similares, bis-difuranocumarinas unido a una ciclopentanona (series B) o a un anillo de lactona (series G).

Los factores económicos, la interesante naturaleza del hongo productor del factor toxina y las implicaciones inmediatas para la salud humana como resultado de las investigaciones, establecieron la existencia de 13 o más aflatoxinas o compuestos estrechamente relacionados formados por biotransformación animal. Las aflatoxinas fueron aisladas primeramente de la leche y posteriormente se encontraron en orina de animales que habían consumido alimento contaminado con aflatoxinas^(8,20,21).

En los últimos 35 años quizá la micotoxicosis más estudiada haya sido la aflatoxicosis, que es ocasionada por el efecto de la aflatoxinas, además; ha resultado evidente que un gran número de especies fúngicas podrían formar aflatoxinas, encontrándose entre ellos^(6,8):

Aspergillus flavus LINK

Aspergillus parasiticus SPEARE

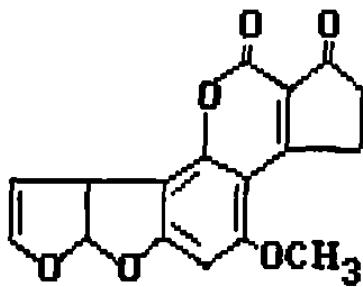
Aspergillus tamari KITA

Aspergillus niger TLEGEH

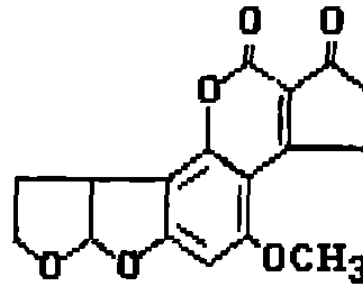
Aspergillus ostianus WEHMER

Aspergillus ruber T y C

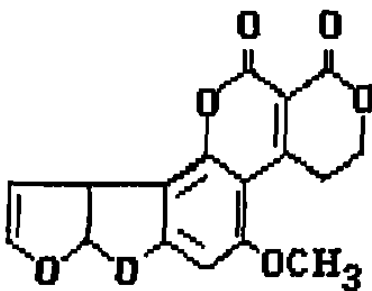
Penicillium citrinum THOM



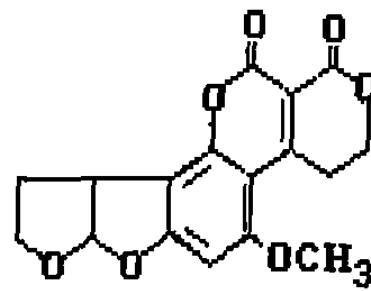
Aflatoxina B1



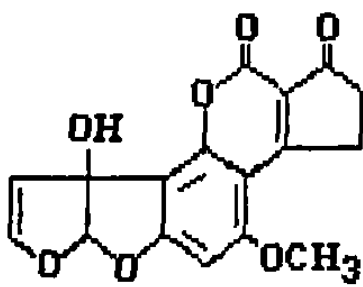
Aflatoxina B2



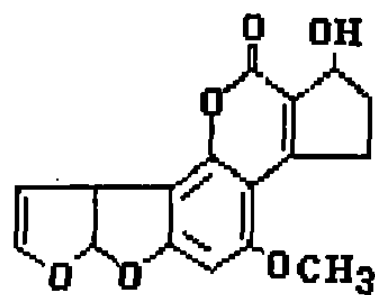
Aflatoxina G1



Aflatoxina G2



Aflatoxina M1



Aflatoxicol

Figura 1.- Estructura de algunas aflatoxinas⁽²⁰⁾.

Penicillium variabile SOPP

Penicillium frequentans WESTL

Actualmente se sabe que el hongo con mayor producción de aflatoxinas es *A. flavus*. La proliferación de *A. flavus* es ubicua en el suelo y aire. Por consiguiente, muchos alimentos y forrajes ya contienen esporas; y cuando las condiciones del medio ambiente (tiempo, temperatura, actividad hídrica, almacén, nutrientes, pH, etc.) son favorables, algunos hongos se desarrollan y producen aflatoxinas. Durante la fase de crecimiento exponencial el metabolismo es dirigido a satisfacer los requerimientos de energía para el crecimiento, división y el mantenimiento celular, y producción de los metabolitos primarios (CO₂, alcoholes, agua, etc.). Estos productos de fermentación pueden ser explicados por una o más vías bioquímicas conocidas y también como resultado de las degradaciones del metabolismo. El metabolismo fungal, continúa con la producción de metabolitos secundarios, que generalmente son moléculas complejas^(6,7,8,20).

2.2.1 *A. flavus* y *A. parasiticus*

A. flavus y *A. parasiticus* son contaminantes comunes en climas tropicales de una gran variedad de alimentos en condiciones naturales o bajo condiciones de mal almacenamiento. *A. flavus* ha sido aislado de alimentos tales como: maíz, cacahuate, nuez, frijol de soya, cacao, café, tabaco, sorgo, pulpa de betabel, habichuela, pistacho, mijo, pimienta roja, chícharo y girasol^(1,7,8,18,20,21).

La contaminación puede ocurrir en diferentes fases de la producción: en el desarrollo y maduración de las plantas cultivadas, en la elaboración de productos semiterminados y en los productos de consumo⁽²¹⁾. Por otra parte, la presencia de aflatoxinas no quiere decir siempre que los productos de que se trate estén mohecidos, ya que por calentamiento de los productos contaminados (tostado de los cacahuates y la reducción de los piensos a comprimidos), el

número de hongos puede disminuirse considerablemente, mientras que las aflatoxinas son termoestables. También puede ocurrir transferencia de las aflatoxinas de los piensos a los productos de origen animal, como carne, leche y huevos. Por lo tanto, estos productos pueden contener aflatoxinas sin estar mohosos. Mucha atención han prestado los científicos a la contaminación de productos lácteos, pues se había observado que la AFB1, es convertida por la vaca lechera en 4-hidroxi-derivado, o sea la AFM1⁽⁶⁾, que aparece en la leche, la cual presenta propiedades tóxicas muy semejantes a la AFB1 en especies animales de muy temprana edad. Experimentos hechos con vacas han mostrado que aproximadamente 1-4 % de la AFB1 ingerida puede recuperarse en la leche como AFM1^(7,18,21).

Las aflatoxinas son las micotoxinas mas abundantes y comúnmente presentes en los alimentos de origen agrícola. Después de la ingestión éstas son concentradas en el hígado donde pueden ser metabolizadas y excretadas sin ningún cambio, o como metabolitos, en la orina, evacuaciones y leche^(7,25,26).

Las aflatoxinas que más frecuentemente se presentan son: AFB1, AFG1, AFB2, AFG2; siendo la AFB1 la micotoxina más estudiada. Su molécula presenta una fracción difurano característica y un anillo lactónico. Se sospecha que ambas partes de la molécula desempeñan un papel en su carcinogenicidad^(5,6).

2.2.2 EFECTOS BIOLÓGICOS

Estudios realizados en animales de laboratorio, han demostrado que las aflatoxinas pueden causar toxicidad hepática aguda y hepatoma. En el envenenamiento agudo por aflatoxinas, ocurre un cambio grasoso en el hígado, a menudo con proliferación del ducto biliar que progresa a fibrosis. La severidad de daño al hígado depende de la edad del animal, (los jóvenes son particularmente vulnerables), especie, sexo, y período de administración. La aflatoxicosis en los mamíferos produce una amplia variedad de manifestaciones patológicas relacionadas con la capacidad que tiene la aflatoxina de obstaculizar la síntesis de proteínas y reaccionar con las macromoléculas y organelos celulares. El envenenamiento agudo con aflatoxina causa necrosis hepática, trastornos de la función hepática, coagulopatía y extensas lesiones hemorrágicas que a menudo conducen a la muerte^(6,7,20).

Estas toxinas actúan sobre las membranas celulares, inhibiendo la síntesis de ADN y ARN y la incorporación de aminoácidos y fosfolípidos y por lo tanto altera el metabolismo de los lípidos. Además el carcinógeno aflatoxina B1 parece ser metabolizado por el sistema enzimático microsomal dependiente de NADPH que incluye al citocromo P-450^(26,27,28,29,30).

Mecanismos diferentes parecen conducir a la detoxificación, producción de un procarcinógeno o creación de un reservorio metabólico de aflatoxina y uno de ellos parece conducir directamente a un último carcinógeno^(27,30,31).

2.2.2.1 TOXICIDAD

Las aflatoxinas son consideradas tóxicas para todas las especies estudiadas. Algunos ejemplos de LD₅₀ para AFB1, se presentan en la tabla 1.

Tabla 1.- DL₅₀ PARA AFB1 EN DIFERENTES ESPECIES DE ANIMALES.

Animal	LD ₅₀
	mg/kg peso corporal
pato	0.3 - 0.5
cerdo	0.6
trucha	0.8
perro	1.0
guinea	1.4 - 2.0
oveja	2.0
mono	2.2
rata	5.5 - 17.9
pollo	6.3
ratón	9.0

Newberne and Butler, Cancer Research, 1969⁽³²⁾.

Con respecto a la toxicidad crónica, las dosis necesarias para ocasionar diversos efectos, también son diferentes. Ejemplo^(32,33):

- Ante una ingesta de 0.25 µg/kg de alimento las aves presentan inmunosupresión.
- Con una contaminación de 1.5 a 2.5 µg/kg de alimento presentan decaimiento y pérdida de peso.
- Los terneros necesitan 0.08 µg/kg y los cerdos de 1 a 2 µg/kg, para manifestar estos síntomas.
- En las aves la producción de huevos disminuye con una ingesta de 0.07 ng/kg de peso corporal.
- Las vacas disminuyen su producción de leche de 0.8 ng/kg de peso corporal.

Los seres humanos pueden estar expuestos a las micotoxinas no sólo por la ingestión de alimentos contaminados con toxinas, sino también por la inhalación o por contacto cutáneo^(2,5,7,8,19,21).

Es conveniente resaltar que los animales que no mueren, pero están intoxicados, conservan en sus músculos, vísceras o subproductos como el huevo y la leche, residuos tóxicos (en diferentes concentraciones según la o las micotoxinas a que estuvieron expuestos) que son ingeridos por el hombre^(34,35,36).

Debido a su gran toxicidad y carcinogenicidad en animales de laboratorio y a la incertidumbre referente a su posible carcinogenicidad de la AFM1 y AFB1, hace que su presencia se considere indeseable en los alimentos^(19,21). En consecuencia, varios países han promulgado medidas de índole legal para controlar la contaminación con AFB1 en la leche y sus derivados^(18,19,37).

Hasta la fecha, las normas reguladoras se han basado más en consideraciones legales que en información experimental. Las cifras existentes son fundamentalmente el resultado de experimentos diseñados para demostrar un efecto y no para establecer un nivel de seguridad.

Existen asociaciones epidemiológicas entre patologías en humanos y niveles elevados de aflatoxina en algunas regiones del mundo. En humanos hay evidencia epidemiológica de asociación de alimentos contaminados con aflatoxinas y hepatoma en Uganda⁽³⁸⁾, Kenia⁽³⁹⁾ y Tailandia^(40,41), hepatitis tóxica en Kenia^(42,43). Además las aflatoxinas han sido relacionadas en la etiología de síndrome de Reye's^(14,44,45,46). Investigaciones recientes han implicado a las aflatoxinas con el Kwashiorkor^(47,48). La evidencia de la correlación de aflatoxinas y otros factores de riesgo, en la etiología del carcinoma hepatocelular ha sido recientemente estudiada^(49,50,51).

Los estudios anteriormente citados apuntan a una mayor incidencia de los tumores de hígado y enfermedades hepáticas en quienes comen regularmente alimentos contaminados con aflatoxinas; la mayoría muestran una correlación positiva entre la exposición a aflatoxinas y el desarrollo de estas enfermedades.

OBJETIVO GENERAL

**DESARROLLAR UN METODO ANALITICO UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION CON
DETECTOR DE FLUORESCENCIA PARA LA DETERMINACION DE
AFB1 Y AFM1 EN FLUIDOS BIOLOGICOS: SUERO Y ORINA**

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) PREPARAR Y NORMALIZAR LAS SOLUCIONES PATRON DE AFLATOXINAS.**
- 2) EVALUAR LOS SISTEMAS DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO Y EXTRACCION EN FASE SOLIDA PARA AFLATOXINAS EN SUERO Y ORINA.**
- 3) EVALUAR LOS PORCENTAJES DE RECUPERACION.**
- 4) ESTABLECER LAS CONDICIONES DE ANALISIS CROMATOGRAFICO DE AFLATOXINAS EN SUERO Y ORINA.**
- 5) DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE LA METODOLOGIA DESARROLLADA.**

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

3.1 EQUIPOS

Cromatógrafo de Líquidos Beckman System Gold Programable Solvent Modelo 126

Interfase Modelo 406

Bomba Modelo 166

Detector de fluorescencia Beckman 157

Filtro de excitación a 365 nm

Filtro de emisión a 436 nm

Columna de fase inversa ultrasphere ODS 5 μ m 4.6 mm D.I X 25 cm de longitud Beckman

Espectrofotómetro Beckman DU 7500, con detector de arreglo de diodos

Celdas Cuarzo 1 cm.

Agitador Vortex Mixer Termolyne modelo 37600

Cromatofolios AL de sílica gel 60 F254 para cromatografía en capa fina de espesor de capa 0.2 mm

Centrífuga

Lámpara de Luz Ultravioleta SPECTROLINE modelo E-14

Columna Sep-Pak C-18, 3 mL de 500 mg.

3.2 REACTIVOS

Estándares de Aflatoxinas B1 y M1 (SIGMA)

Acido trifluoroacético (SIGMA)

Acetonitrilo (PIERCE)

Metanol grado cromatográfico (MALLINCKRODT)

Metanol (PQM)

Agua filtrada con el sistema Milli-Q

Cloroformo (PQM)

Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ (MALLINCKRODT)

Ácido sulfúrico (PQM)

Agua destilada (PQM)

Hipoclorito de sodio (ALLEN)

Dextran (MERK)

Sistema A: Eter etílico/metanol/agua (96/3/1)

Sistema B: Cloroformo/acetona/metanol (90/10/2)

3.2.1 SEGURIDAD

La agencia internacional de investigación en cáncer (IARC) otorgó a las aflatoxinas el grupo 2 (probable carcinógeno humano) Subgrupo A (alto grado de evidencia) por lo cual para el manejo de esta clase de compuestos se requiere experiencia y ser manipulados de acuerdo a procedimientos y medidas de seguridad de la AOAC ⁽⁵²⁾.

Los patrones de aflatoxinas son reconstituidos empleando metanol y se realiza la preparación de soluciones estándares mediante dilución. Se recomienda una mínima protección como uso de: campana de extracción, lentes de seguridad, cubreboca, bata de laboratorio guantes de látex y de hule.

3.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de suero y orina de origen humano. Las muestras fueron donadas voluntariamente por 7 individuos, a los cuales se les extrajo 100 mL de sangre venosa a partir de la cual se obtuvo el suero; la orina, 100 mL fue recolectada en recipientes de 150 mL.

Se utilizaron 100 mL de sangre venosa y 100 mL de orina para evaluar los sistemas de extracción de AF.

Para la evaluación del método se utilizaron muestras de suero y orina de 6 individuos.

3.4 PREPARACION Y NORMALIZACION DE LAS SOLUCIONES PATRON DE AFLATOXINAS

La preparación de las soluciones patrón de aflatoxinas constituye una parte esencial en la presente investigación, por ello se describe a continuación el procedimiento. Previamente a la normalización se procedió a determinar los criterios de pureza que deben cumplir las soluciones de aflatoxinas de acuerdo con los procedimientos de la AOAC⁽⁵²⁾.

3.4.1 CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO:

La calibración del espectrofotómetro fue realizado de acuerdo a procedimiento de la AOAC:

a).- Determinación de factor de corrección (FC) del espectrofotómetro y celdas utilizadas, mediante los coeficientes de extinción molar y las lecturas de absorbancias de soluciones de $K_2Cr_2O_7$ (0.0625 mM, 0.125 mM, 0.250 mM) a 350 nm usando como blanco H_2SO_4 0.01 N.

b).- Cálculo de coeficientes de extinción molar (ϵ) para cada solución de $K_2Cr_2O_7$

$$\epsilon = (Abs)/[Conc \times l]$$

c).- A partir del coeficiente de extinción molar promedio se calculó el factor de corrección:

$$FC = (3160/\epsilon')$$

3.4.2 CALCULO DE CONCENTRACIONES DE SOLUCIONES PATRON DE AFLATOXINAS

$$\mu g \text{ de aflatoxina/mL} = [(Abs)(PM)(FC)]/(l)(\epsilon)$$

Abs= Absorbancia

FC=Factor de corrección

PM= Peso Molecular

l= longitud de trayecto óptico.

ϵ = coeficiente de extinción molar de aflatoxina a 350 nm.

3.4.3 DETERMINACION DE LOS CRITERIOS DE PUREZA^(19,52)

Una vez preparadas las soluciones de aflatoxinas se procedió a determinar los criterios de pureza :

3.4.3.1 PUREZA CROMATOGRAFICA

La pureza cromatográfica de las soluciones patrón de AF se realizó mediante cromatografía en capa fina con los sistemas de elución A y B^(16,19), una vez realizada la cromatografía se procedió a la detección de las aflatoxinas por irradiación con luz ultravioleta.

3.4.3.2. RELACION DE PICOS MAYORES DE ABSORCION EN EL ULTRAVIOLETA DENTRO DEL LIMITE DE CONFIANZA DE 95%.

Se midieron las intensidades de absorbancia de los picos de las soluciones patrón de AF a dos diferentes longitudes de onda:

AFM1: 266 nm y 357 nm

AFB1: 223 nm y 265 nm

3.4.3.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE LAS SOLUCIONES PATRON DE AFLATOXINAS EN CONDICIONES CROMATOGRAFICAS YA ESTABLECIDAS EN EL LABORATORIO ⁽¹²⁾.

Condiciones cromatográficas:

Fase móvil: MeOH/Agua (45/55)

Flujo 0.7 mL/min

Volumen de inyección 20µL

Detector : fluorescencia 0.05 RFU

3.5 EVALUACION DE LOS SISTEMAS DE EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.5.1 SUERO

Para la determinación de aflatoxinas en muestra de suero se evaluaron los sistemas de extracción líquido-líquido (cloroformo) y fase sólida (columnas de Sep-Pak C-18) para la extracción de AFM1 y AFB1, siguiendo la metodología señalada en el esquema 1:

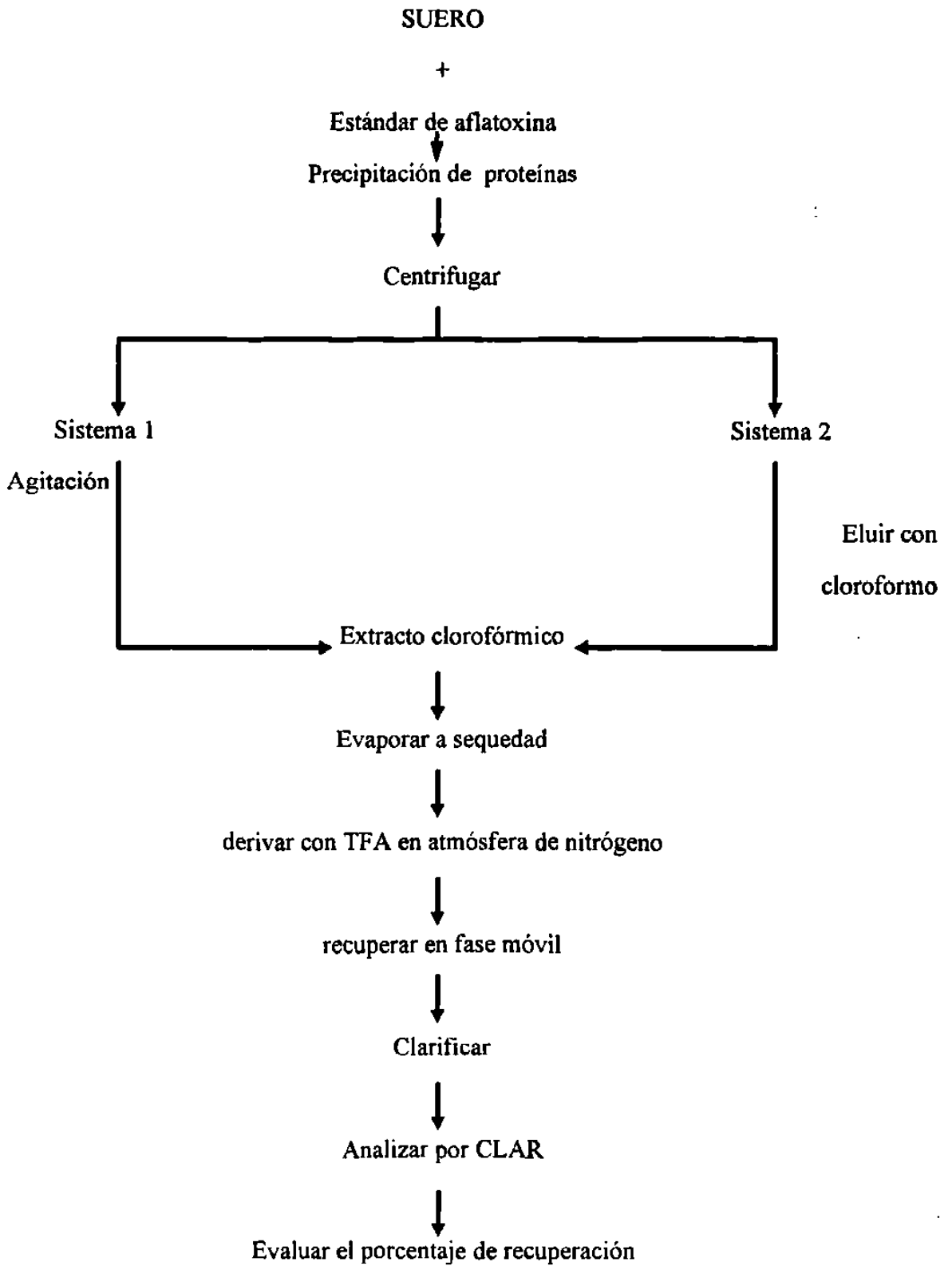
Sistema 1: Extracción con cloroformo

Sistema 2: Extracción con fase sólida C-18

La metodología empleada fue la siguiente: Las muestras de suero, 1 mL, fueron contaminadas intencionalmente con AFM1 y AFB1 en un rango de concentraciones de 1 a 23 ng/mL y 1 a 16 ng/mL, respectivamente; cada muestra de suero fue desproteinizada utilizando 1.5 mL de acetonitrilo, posteriormente centrifugada durante 5 min a 3500 r.p.m y el sobrenadante fue separado, para la extracción de aflatoxinas.

3.5.1.1 EXTRACCION LIQUIDO- LIQUIDO

Las aflatoxinas en el sobrenadante fueron extraídas con 3 porciones de cloroformo (2, 2 y 1 mL), agitándose durante un minuto, cada porción, para posteriormente centrifugarse y juntarse los extractos clorofórmicos en un vaso de 10 mL. El extracto clorofórmico fue llevado a sequedad empleando nitrógeno. El extracto seco fue derivado con 200µL de ácido trifluoroacético en atmósfera de nitrógeno. El residuo fue disuelto en 1 mL de solución metanol/agua (40/60) el cual fue filtrado con filtro de 0.22µm y analizado por CLAR.



ESQUEMA 1

3.5.1.2 EXTRACCION EN FASE SOLIDA

El sobrenadante fue diluido 1:10 con agua, posteriormente esta solución fue pasada a través de la columna Sep-Pak C-18, a una velocidad de 5 a 7 mL/min, la cual previamente fue acondicionada con 5 mL de metanol y 5 mL de agua. Después de pasar la muestra la columna fue lavada con 5 mL de agua y 2 mL de hexano. La columna fue secada empleando vacío durante 5 min. Las aflatoxinas retenidas en la columna fueron eluidas con 5 mL de cloroformo, recibiendo el eluato en un vaso de 10 mL; esta solución clorofórmica fue llevada a sequedad empleando nitrógeno, el extracto seco fue derivado con 200 µL de ácido trifluoroacético en atmósfera de nitrógeno. El residuo fue disuelto en 1 mL de solución metanol/agua (40/60) el cual fue filtrado empleando filtro de 0.22µm y analizado por CLAR.

Ambos procedimientos fueron repetidos 4 veces para cada sistema de extracción.

3.5.2 ORINA

Para la determinación de aflatoxinas en muestra de orina se evaluaron los mismos sistemas de extracción utilizados en las muestras de suero; se siguió el esquema 2:

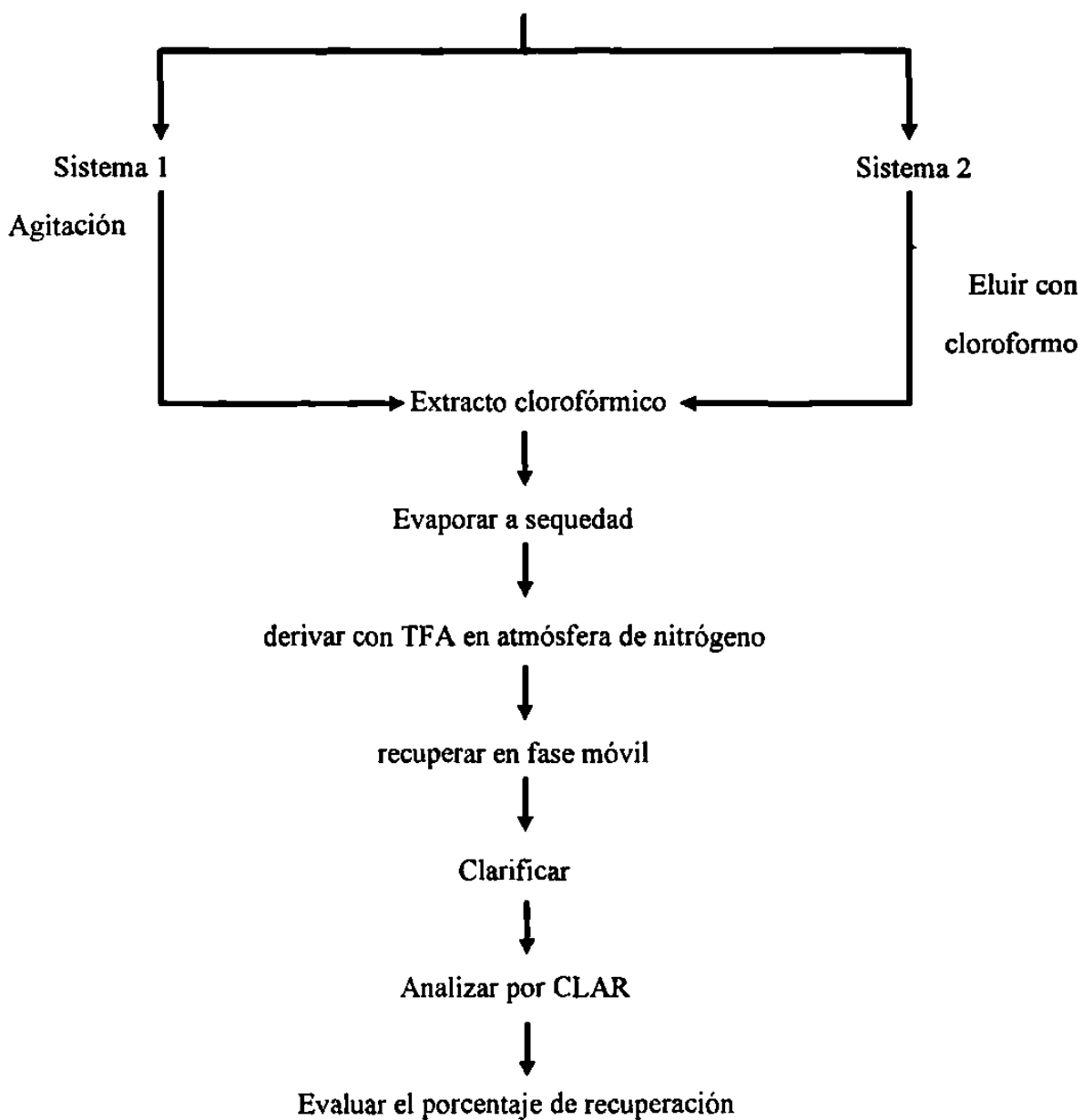
Sistema 1: Extracción con cloroformo

Sistema 2: Extracción con fase sólida C-18

ORINA

+

Estándar de Aflatoxina



ESQUEMA 2

3.5.2.1 EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO

La muestra de orina, 20 mL, fue contaminada intencionalmente con estándares de AFM1 y AFB1 en un rango de concentraciones de 1 a 23 ng/mL y 1 a 16 ng/mL, respectivamente. Las aflatoxinas en la muestra fueron extraídas con 3 porciones del sistema 1 (2, 2 y 1 mL), agitándose durante un minuto, cada porción, para posteriormente centrifugarse y recolectarse los extractos clorofórmicos en un vaso de 10 mL. El extracto fue llevado a sequedad empleando nitrógeno; el extracto seco fue derivado con 200µL de ácido trifluoroacético en atmósfera de nitrógeno. El residuo fue disuelto en 1 mL de solución metanol/agua (40/60) el cual fue filtrado con filtro de 0.22µm y analizado por CLAR.

3.5.2.2 EXTRACCION EN FASE SOLIDA

La muestra de orina, contaminada, con AFM1 y AFB1, fue pasada directamente a través de la columna Sep-Pak C-18, a una velocidad de 5-7 mL/min, la cual previamente fue acondicionada con 5 mL de metanol y 5 mL de agua. Después de pasar la muestra la columna fue lavada con 5 mL de agua y 2 mL de hexano. La columna fue secada empleando vacío durante 5 min. Las aflatoxinas retenidas en la columna fueron eluidas con 5 mL de cloroformo, recibiendo el eluato en un vaso de 10 mL; esta solución clorofórmica fue llevada a sequedad empleando nitrógeno, el extracto seco fue derivado con 200 µL de ácido trifluoroacético en atmósfera de nitrógeno. El residuo fue disuelto en 1 mL de solución metanol/agua (40/60) el cual fue filtrado empleando filtro de 0.22µm y analizado por CLAR.

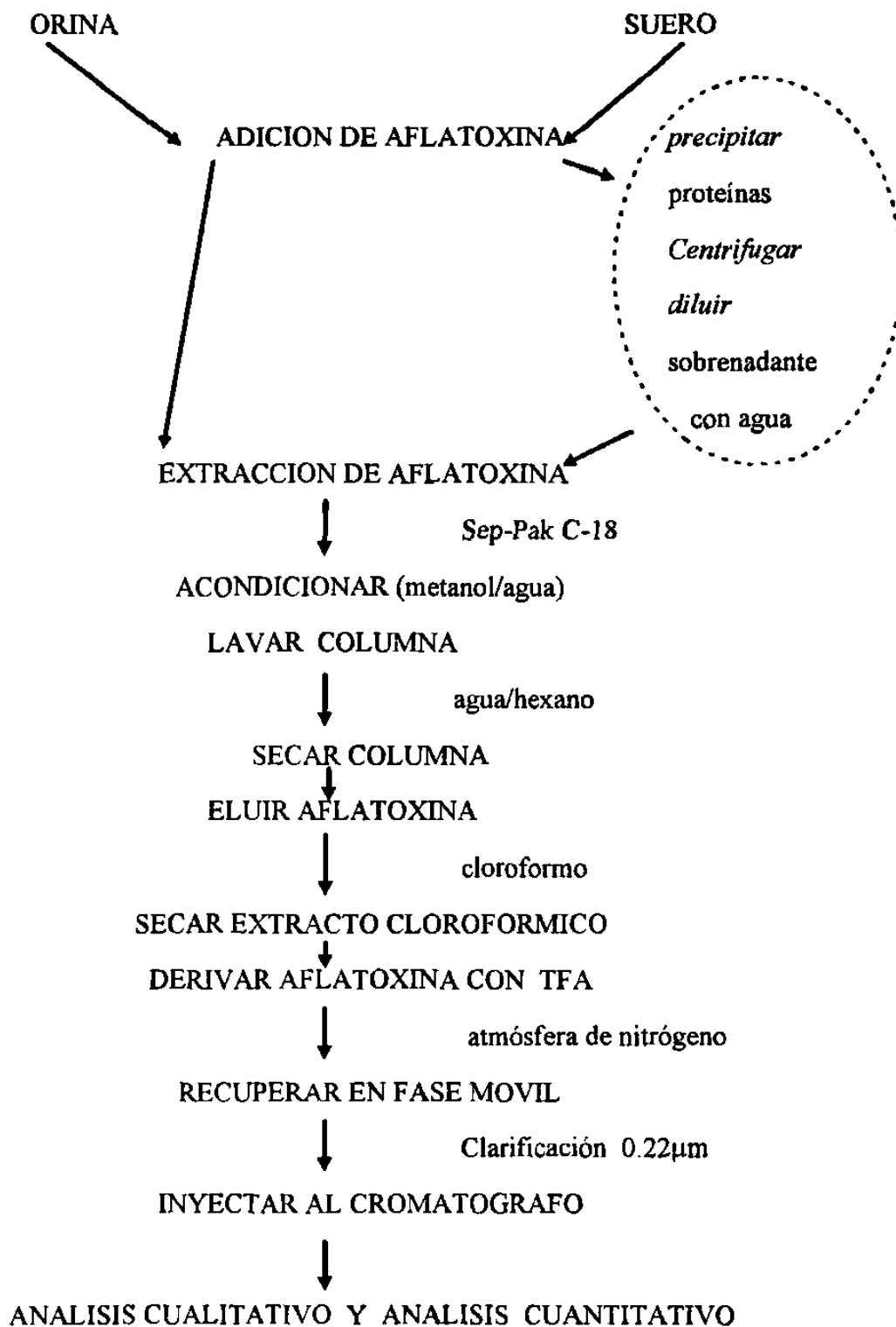
Ambos procedimientos fueron repetidos 4 veces para cada sistema de extracción.

3.6 EVALUACION DE LOS PORCENTAJES DE RECUPERACION DE AFLATOXINAS EN SUERO Y ORINA PARA EL ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS CON DETECCION POR FLUORESCENCIA

Una vez realizado los experimentos, se obtuvieron las estadísticas descriptivas de las muestras, bases para la prueba de hipótesis de la comparación de medias de muestras con distribución "t" de Student con varianzas ponderadas, utilizando un nivel de confianza del 95% (53,54)

3.7 CONDICIONES PARA EL ANALISIS CROMATOGRAFICOS DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Para establecer las condiciones de la extracción y análisis de AFMI Y AFB1 en suero y orina, se procedió a la evaluación del método, recomendado en la literatura^(55,56), siguiendo el esquema 3:



ESQUEMA 3

Las muestras de orina y suero fueron contaminadas intencionalmente con AFB1 y AFB1. Las muestras de orina se pasaron directamente a través de la columna de extracción en fase sólida. Las muestras de suero fueron desproteinizadas y centrifugadas a 3500 r.p.m. durante 5 min obteniéndose el sobrenadante, el cual fue diluido 1:10 con agua, esta solución fue pasada a través de la columna Sep-Pak C-18.

Para ambos tipos de muestras se procedió de manera similar a partir del paso de cargar la muestra en la columna, a una velocidad de 5-7 mL/min, la cual previamente fue acondicionada con 5 mL de metanol y 5 mL de agua. Después de pasar la muestra la columna fue lavada con 5 mL de agua y 2 mL de hexano. La columna fue secada empleando vacío durante 5 min. Las aflatoxinas retenidas en la columna fueron eluidas con 5 mL de cloroformo, recibiendo el eluato en un vaso de 10 mL; esta solución clorofórmica fue llevada a sequedad empleando nitrógeno, el extracto seco fue derivado con 200 µL de ácido trifluoroacético en atmósfera de nitrógeno. El residuo fue disuelto en 1 mL de solución metanol/agua (40/60) el cual fue filtrado empleando filtro de 0.22µm y analizado por CLAR.

La extracción y análisis de aflatoxinas se realizó por triplicado en cada una de las seis muestras de suero y orina.

3.8 DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL METODO .

Para evaluar la sensibilidad del método se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación^(19,16,57).

a).- El límite de detección, se evaluó inyectando por triplicado soluciones estándares de baja concentración y se comparó la respuesta contra un blanco.

b).- El límite de cuantificación, se determinó evaluando la concentración más baja de aflatoxina en la muestra que podía detectarse, y cuantificarse con precisión y exactitud razonable en las condiciones establecidas del método.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 PREPARACION Y NORMALIZACION DE SOLUCIONES DE AFLATOXINAS

Se prepararon y se normalizaron soluciones patrón de aflatoxinas, a las que se verificó la pureza, y a partir de las cuales se prepararon por dilución estándares en el rango de concentraciones estudiadas para ambas toxinas, los resultados se muestran en las tablas II, III, IV, y V. Las figuras 2 y 3 muestran los cromatogramas de soluciones patrón de aflatoxinas inyectadas al cromatógrafo de líquidos con detector de fluorescencia. Las figuras 4 y 5 señalan los cromatogramas de estándares de aflatoxinas derivatizados con ácido trifluoroacético.

4.2 EVALUACION DE LOS SISTEMAS DE EXTRACCION

La extracción y análisis de aflatoxinas, en muestras de suero y orina fue realizado de acuerdo a los esquemas 1 y 2, respectivamente; las tablas VI y VII muestran la recuperación de aflatoxinas en muestras de suero, las tablas VIII y IX muestran la recuperación de aflatoxinas en muestras de orina.

Las condiciones establecidas del análisis cromatográfico se muestran en la tabla X.

4.3 EVALUACION DEL METODO

Los resultados de la evaluación del método se presentan en las tablas XI, XII , XIII y XIV; las figuras 6 y 7 muestran los cromatogramas de muestras de suero y orina contaminadas.

Los parámetros cromatográficos para ambas toxinas se presentan en la tabla XV.

4.4 ANALISIS CUALITATIVO

El análisis cualitativo de las aflatoxinas en las muestras se realizó con la técnica de co-inyección de estándar y por los tiempos de retención.

4.5 ANALISIS CUANTITATIVO

La curva de calibración para el análisis cuantitativo de cada AF se obtuvo midiendo la altura de las señales en función de la concentración del compuesto: figuras 8 y 9.

4.6 SENSIBILIDAD DEL METODO

El límite de detección y el límite de cuantificación, así como los valores obtenidos de la curva de calibración se presentan en la tabla XVI.

**Tabla II.- CALIBRACION DE ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN UV-VIS
SOLUCIONES DE K₂Cr₂O₇**

Conc. (mM)	Abs (350 nm)	ϵ'	FC*
0.06	0.20		
0.12	0.41	3266.93	0.97
0.25	0.83		

*1.05>FC>0.95 (AOAC. 1990)

**Tabla III.- ABSORBANCIA Y CONCENTRACION DE SOLUCIONES PATRON DE
AF.**

Aflatoxina	Abs (350 nm)	Conc.(μ g/mL) *
AFM1	0.03	0.51
AFB1	0.04	0.61

*(AOAC. 1990)

Tabla IV.- RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE PATRONES DE AF.

Sistema de elución	Factor de retardo	
	AFM1	AFB1
A	0.73	0.89
B	0.85	0.74

Tabla V.- RELACION DE PICOS MAYORES DE ABSORBANCIA. LIMITE DE CONFIANZA 95 %.

	Picos mayores comparados	Relación	Referencia*
AFM1	357/266	1.53	**
AFB1	223/265	1.80	1.77 +/- 0.04

* FAO 1991.

** No reportado

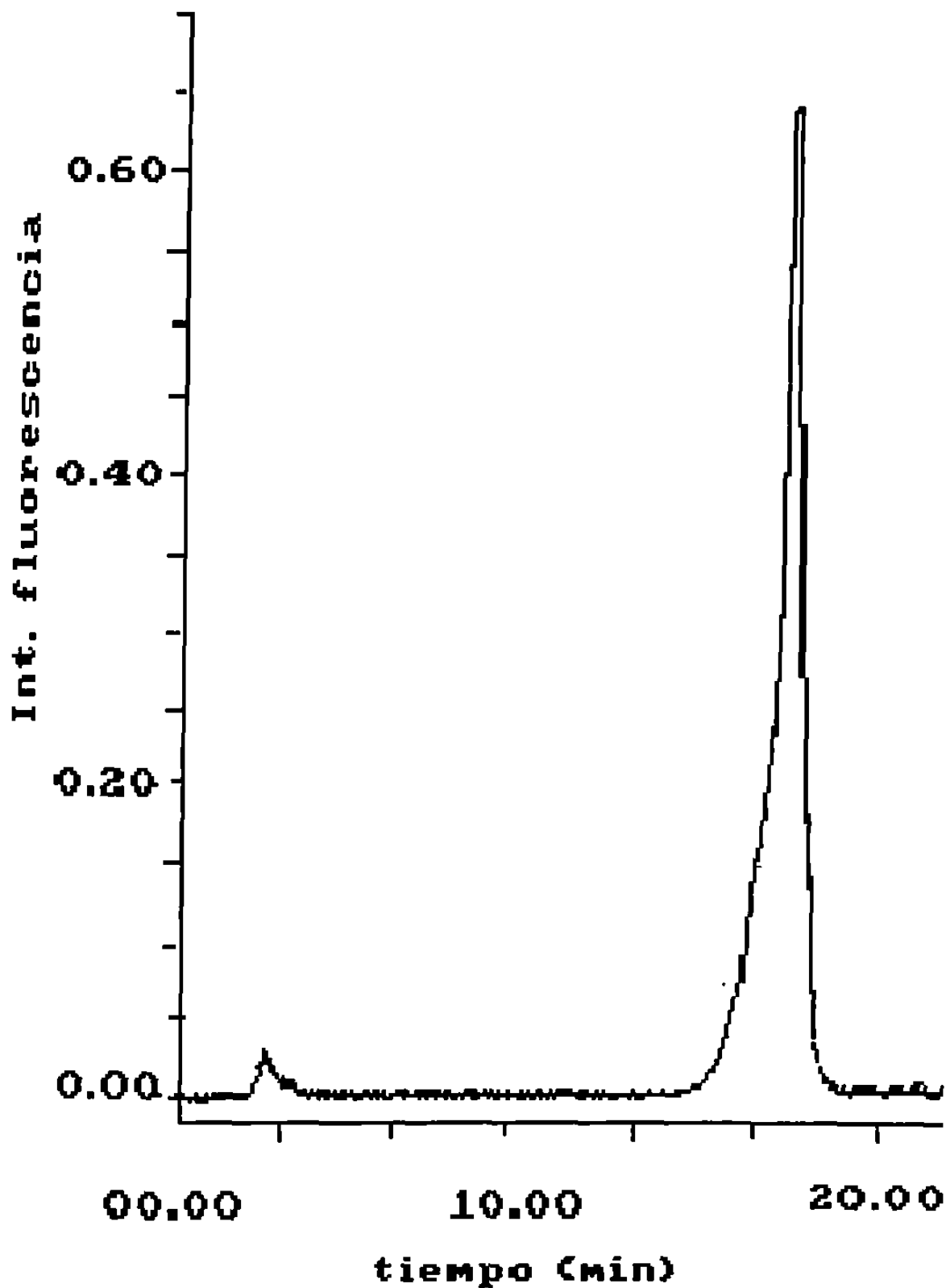


Figura 2.- Cromatograma de AFM1 (0.51 $\mu\text{g/mL}$), $T_r=18.2$ min, fase móvil MeOH/H₂O(45/55), Flujo 0.7 mL/min, RFU 0.5.

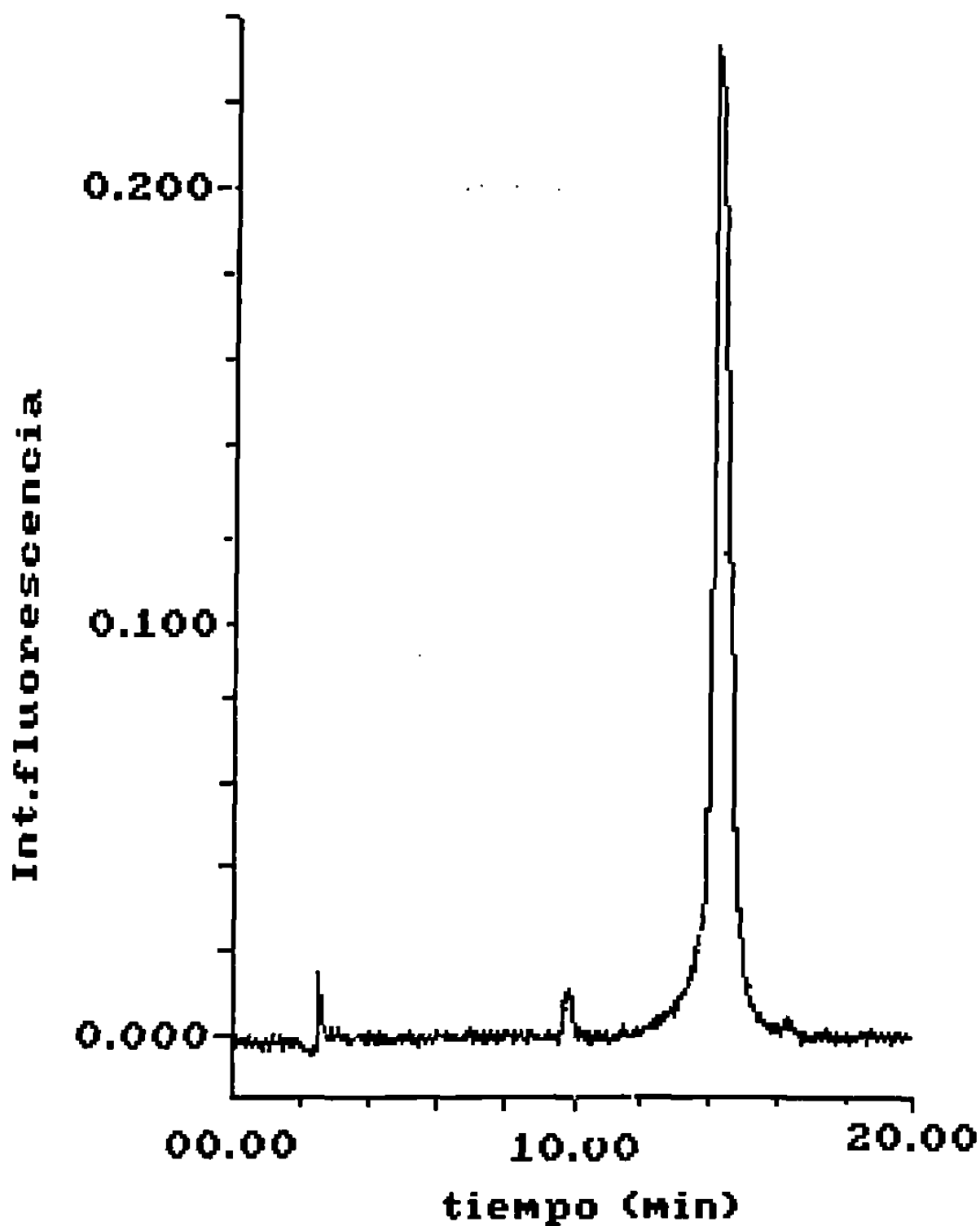


Figura 3.- Cromatograma de AFB1 (0.31 $\mu\text{g/mL}$), $T_r = 14.7$ min, fase móvil MeOH/H₂O(45/55), Flujo 0.7 mL/min, RFU 0.5.

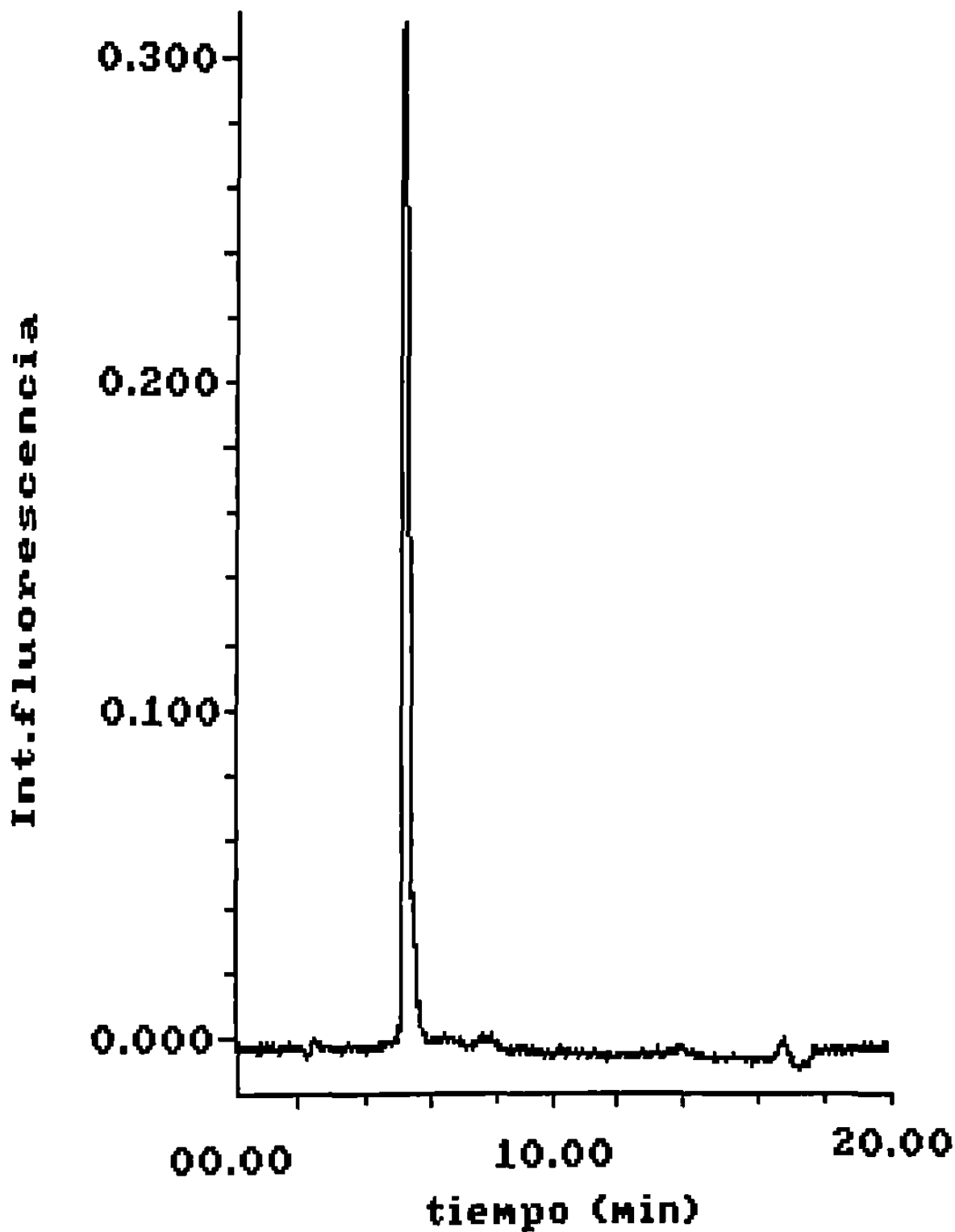


Figura 4.- Cromatograma de AFM1 (25.4 ng/mL) derivada con TFA, Tr= 4.7 min, fase móvil MeOH/H₂O (40/60), Flujo 0.9 mL/min, RFU 0.02.

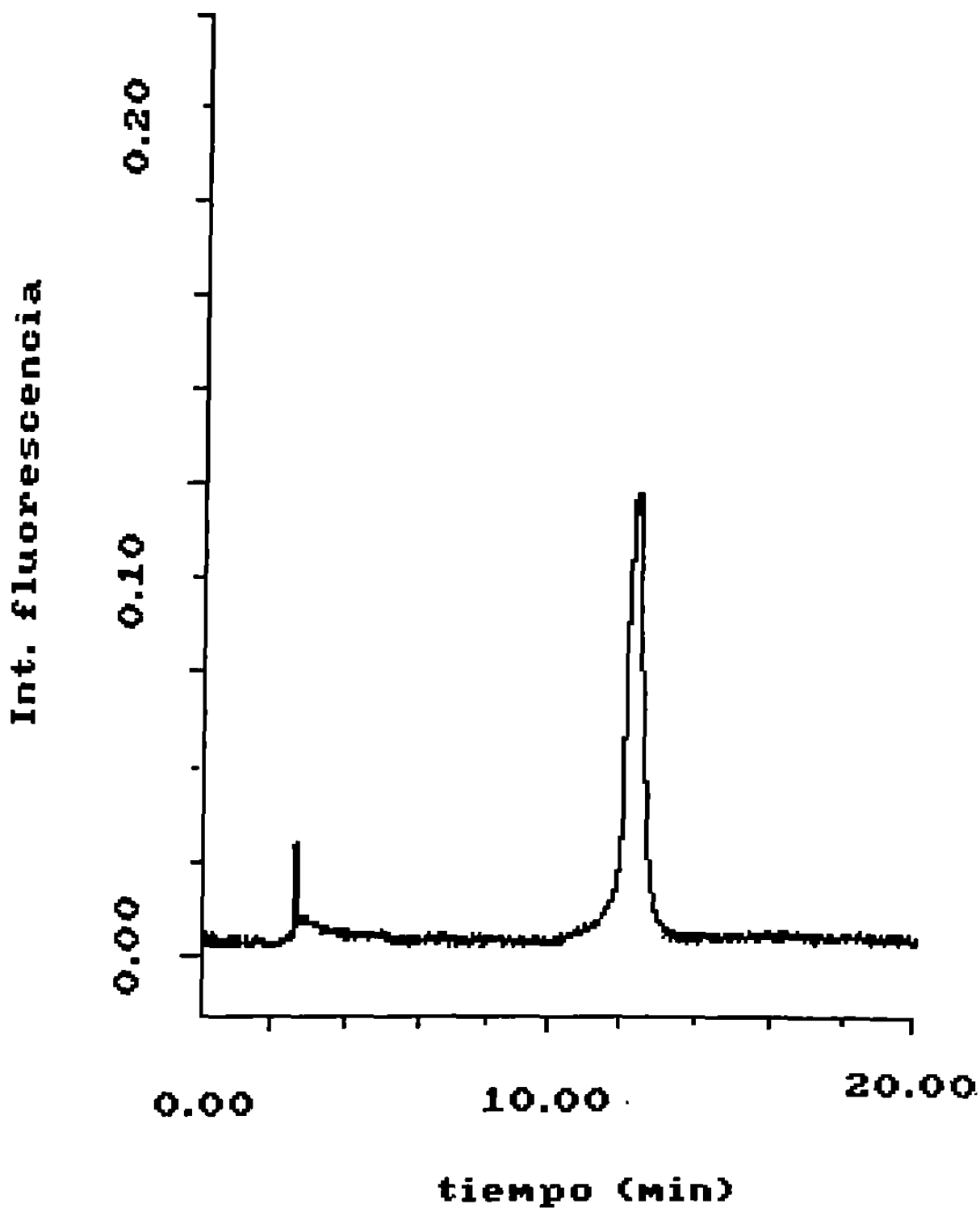


Figura 5.- Cromatograma de AFB1 (14.7 ng/mL), derivada con TFA, $T_r = 12.2$ min, fase móvil MeOH/H₂O (40/60), Flujo 0.9 mL/min, RFU 0.02.

Tabla VI.- RECUPERACION (%) DE AFM1 EN SUERO. N=4

Conc(ng/mL)	$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$	
	SPE	% C. V.	LIQ - LIQ	% C. V.
1	65 +/- 11	17	63 +/- 21	33
2	66 +/- 12	18	61 +/- 16	26
5	71 +/- 12	17	58 +/- 10	17
9	66 +/- 3	5	39 +/- 19	49
14	81 +/- 9	11	63 +/- 30	48
23	70 +/- 7	10	57 +/- 12	21

Tabla VII.- RECUPERACION (%) DE AFB1 EN SUERO. N=4

Conc (ng/mL)	$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$	
	SPE	% C. V.	LIQ-LIQ	% C. V.
1	78 +/- 15	32	74 +/- 14	18
3	83 +/- 7	8	63 +/- 10	16
5	73 +/- 11	15	46 +/- 12	26
11	72 +/- 4	6	55 +/- 7	13
16	78 +/- 5	6	58 +/- 16	28

Tabla VIII.- RECUPERACION DE AFM1 EN ORINA. N=4

Conc (ng/mL)	$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$	
	SPE	% C. V.	LIQ - LIQ	% C. V.
2	65 +/- 7	11	59 +/- 9	15
5	64 +/- 5	8	57 +/- 7	12
9	73 +/- 3	4	65 +/- 18	28
14	76 +/- 4	5	54 +/- 11	20
23	86 +/- 4	5	86 +/- 13	15

Tabla IX .- RECUPERACION DE AFB1 EN ORINA. N=4

Conc (ng/mL)	$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$	
	SPE	% C. V.	LIQ - LIQ	% C. V.
2	53 +/- 5	9	52 +/- 10	19
5	55 +/- 5	9	43 +/- 7	16
10	57 +/- 6	11	48 +/- 11	23
16	71 +/- 3	4	55 +/- 7	13
27	81 +/- 3	4	80 +/- 6	8

Tabla X.- CONDICIONES CROMATOGRAFICAS DE AF EN MUESTRAS DE SUERO Y ORINA.

Fase Móvil	MeOH/H ₂ O (40/60)
Flujo	0.9 mL/min
Presión	3000 psi
Volumen de inyección.	20 µL
Detector	0.02 R. F. U.
Registro	0.5 cm/min
Temperatura	24 - 26 °C

Tabla XI.- RECUPERACION DE AFM1 EN SUERO.

Conc(ng/mL)	\bar{X}	+/-	DS	% C. V.	
1	81	+/-	10	13	n = 18
3	88	+/-	13	15	n = 18
5	68	+/-	13	19	n = 18
10	79	+/-	8	10	n = 18
15	72	+/-	9	13	n = 18
24	72	+/-	11	15	n = 18

Tabla XII.- RECUPERACION DE AFB1 EN SUERO.

Conc (ng/mL)	\bar{X}	+/-	DS	% C. V.	
2	64	+/-	8	8	n = 18
4	85	+/-	8	8	n = 18
8	67	+/-	15	22	n = 18
16	69	+/-	14	20	n = 18
24	74	+/-	12	16	n = 18

Tabla XIII.- RECUPERACION DE AFM1 EN ORINA.

Conc(ng/mL)	\bar{X}	+/-	DS	% C. V.	
1	85	+/-	11	14	n = 18
3	71	+/-	11	16	n = 18
5	76	+/-	15	19	n = 18
10	66	+/-	14	29	n = 18
15	82	+/-	10	12	n = 18
24	74	+/-	12	16	n = 18

Tabla XIV .- RECUPERACION DE AFB1 EN ORINA.

Conc(ng/mL)	\bar{X}	+/-	DS	% C. V.	
1	75	+/-	20	27	n = 18
4	73	+/-	17	23	n = 18
8	69	+/-	14	21	n = 18
15	70	+/-	12	18	n = 18
24	74	+/-	9	12	n = 18

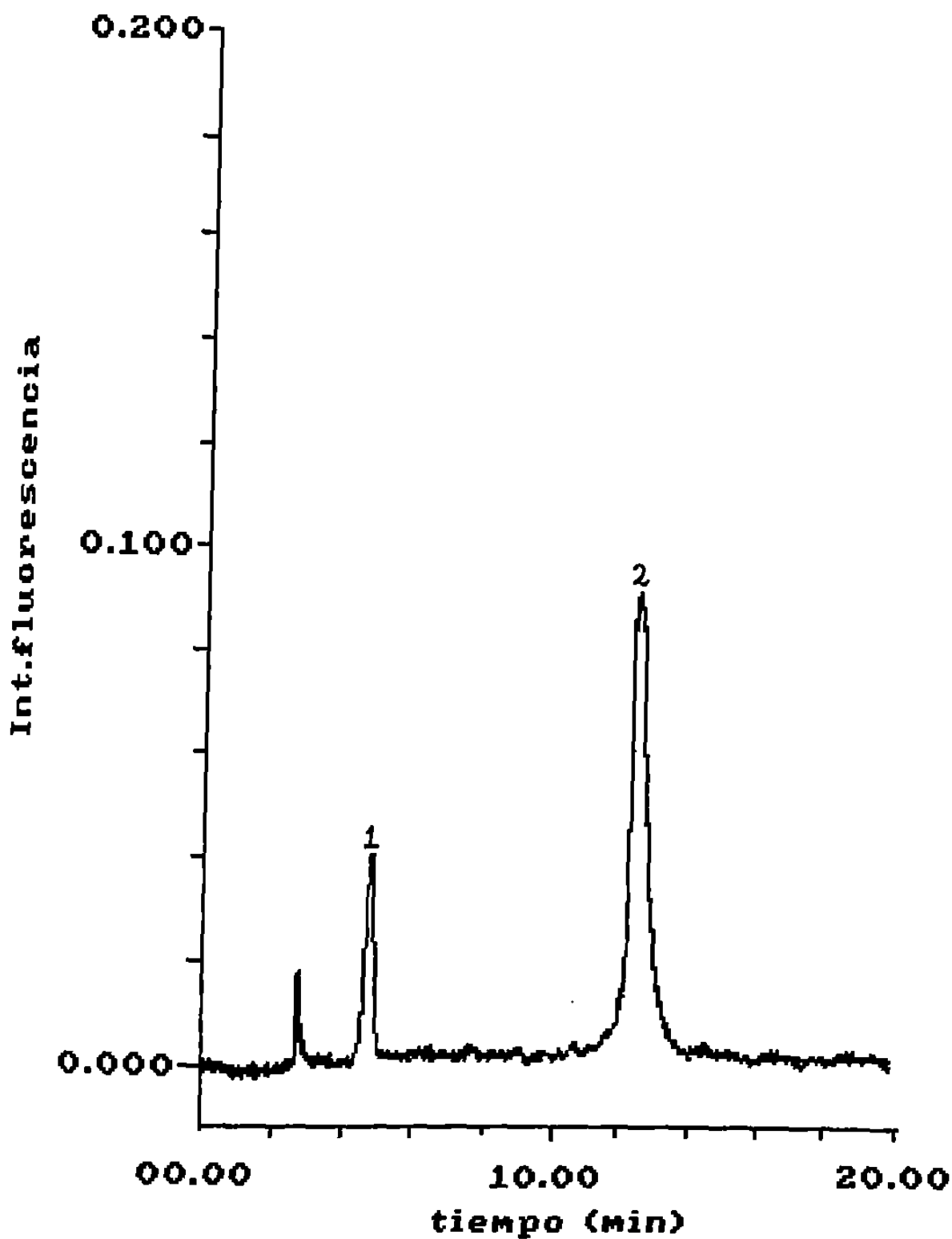


Figura 6. Cromatograma de muestra de suero contaminada con 1) AFM1, 2) AFB1, derivada con TFA, fase móvil MeOH/H₂O (40/60), Flujo 0.9 mL/min, RFU 0.02.

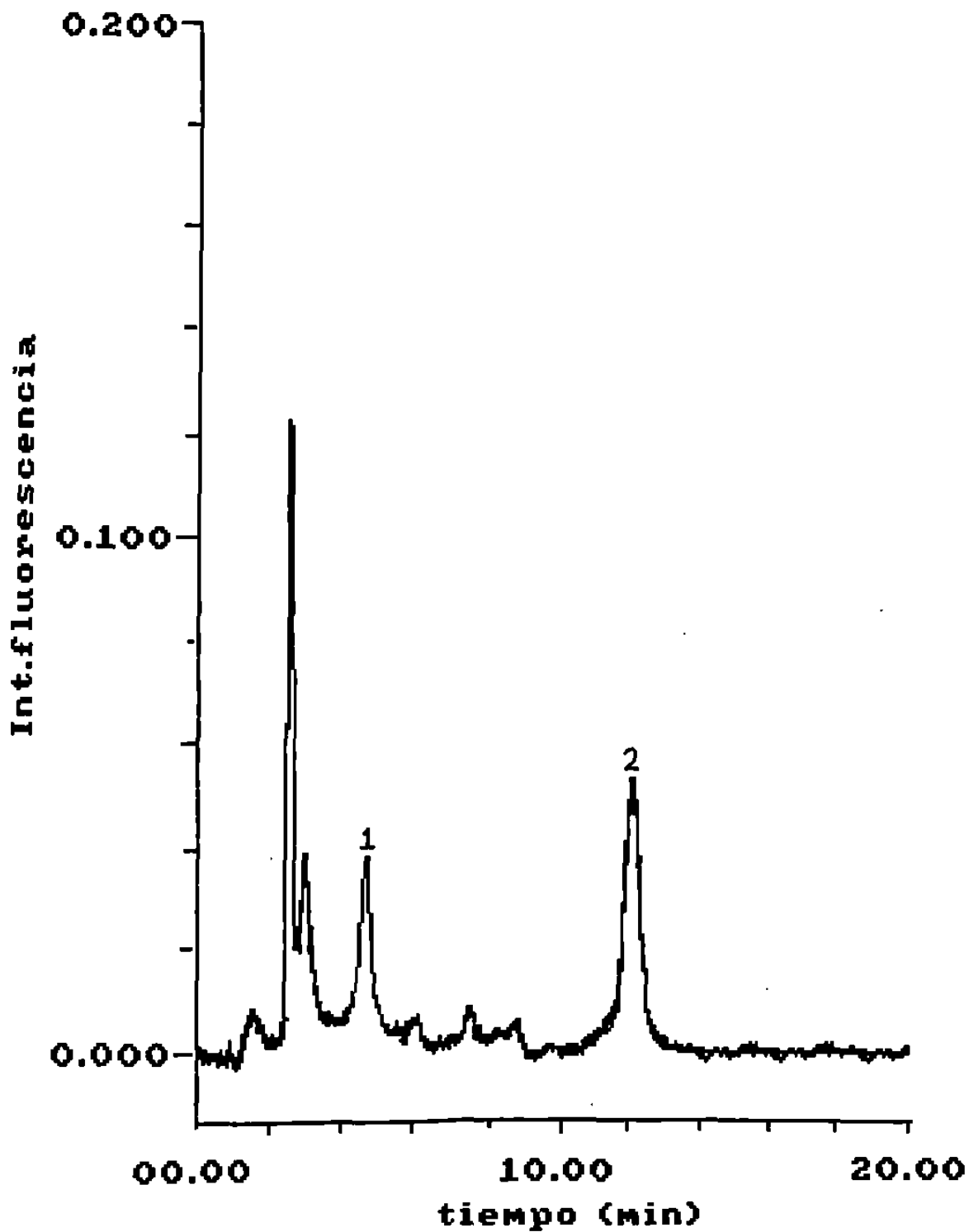


Figura 7.- Cromatograma de muestra de orina contaminada con 1) AFM1, 2) AFB1, derivada con TFA, fase móvil MeOH/H₂O (40/60), Flujo 0.9 mL/min, RFU 0.02.

Tabla XV.- PARAMETROS CROMATOGRAFICOS DE AF.

Parámetro	AFM1	AFB1
Tr (min)	4.56	12.27
Asimetría(B/A)	1.17	0.98
Factor de capacidad (K')	0.92	4.04
Selectividad	4.42	4.42
Resolución(Rs)	24.50	24.50

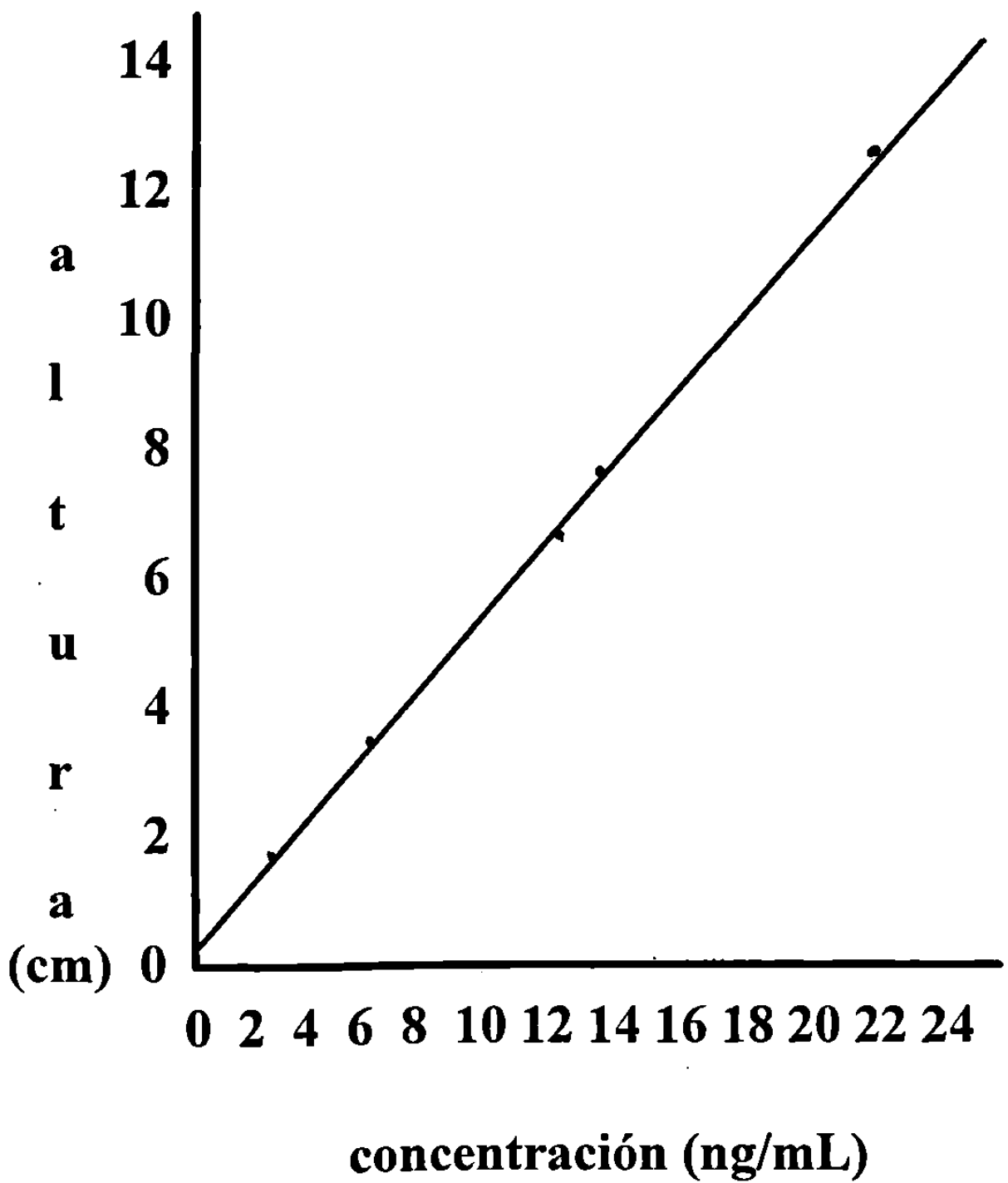


Figura 8.- Curva de calibración de AFM1 derivada con TFA.

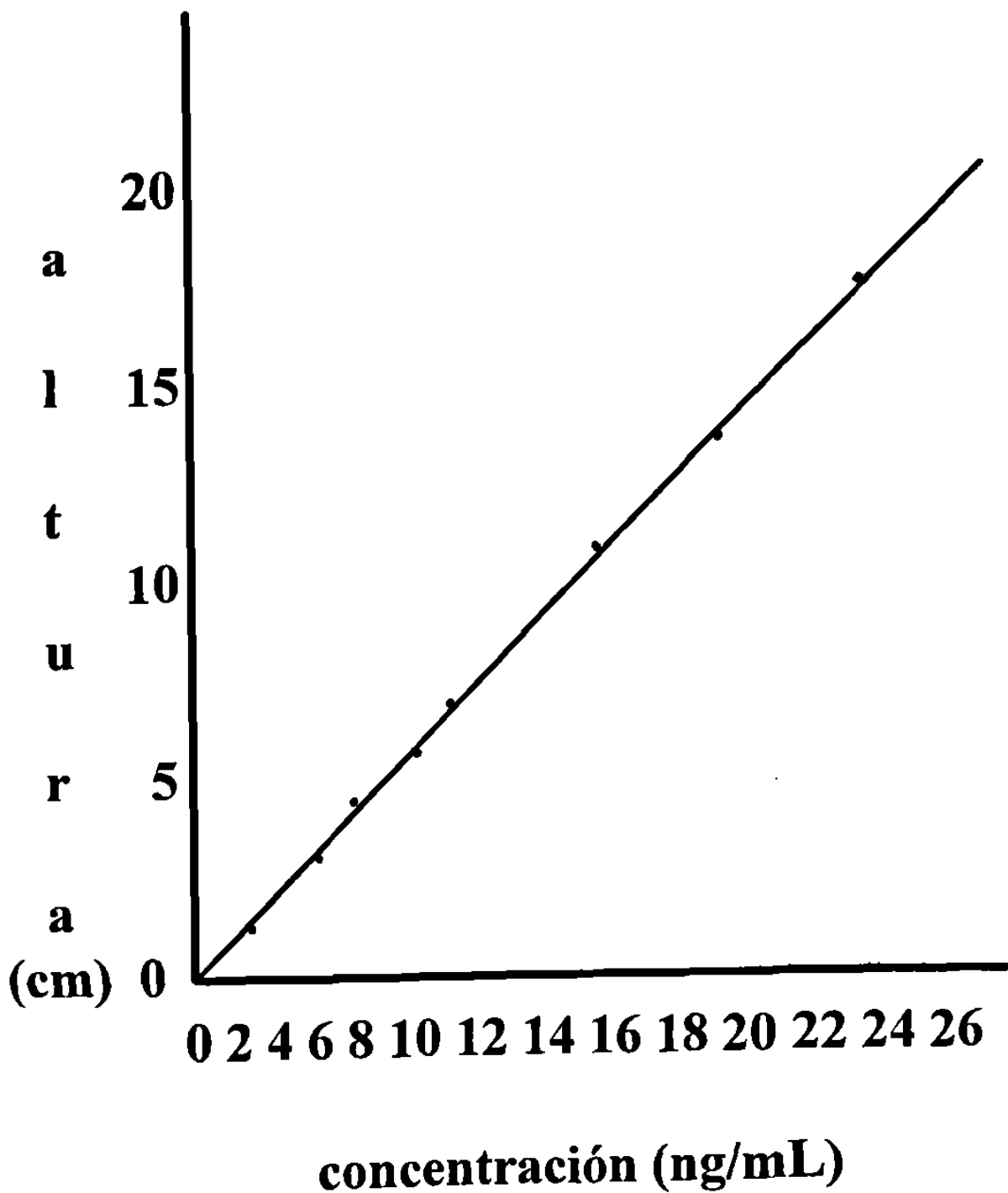


Figura 9.- Curva de calibración de AFB1 derivada con TFA.

Tabla XVI.- SENSIBILIDAD DEL METODO Y ECUACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE AF.

	AFM1	AFB1
Límite de detección (ng/mL)	0.53	0.80
Límite de cuantificación(ng/mL)	1.00	2.00
Ecuación de regresión	$Y= 0.60X + 0.03$	$Y= 0.67X + 0.09$
Coeficiente de correlación (r)	0.998	0.999
Factor de determinación (r^2)	0.996	0.998

DISCUSION

Se desarrolló un método de cromatografía de líquidos en fase reversa para cuantificar AFM1 y AFB1, en muestras de suero y orina. Para obtener una buena resolución de los compuestos en estudio, fue necesario variar la concentración de agente modificante (metanol) de la fase móvil. Los compuestos fueron bien resueltos utilizando un sistema isocrático de Fase Móvil MeOH/H₂O (40/60), esto fue debido a que la solución patrón de AFM1 al derivatizarse e inyectarse al cromatógrafo de líquidos, con las condiciones cromatográficas establecidas en el laboratorio, presentaba dos picos cromatográficos uno de los cuales interfería en la resolución de la AFB1 derivatizada, lo cual impedía realizar el análisis con esas condiciones. Además, como es la primera vez que se trabaja en nuestro laboratorio con este compuesto, se continuó trabajando con otros lotes, los cuales presentaban un problema similar; para la solución de este problema en su totalidad, además de modificar las condiciones cromatográficas, se procedió a derivar este compuesto en condiciones estrictas de atmósfera de nitrógeno y variando la cantidad de agente derivatizante. Las soluciones de AFB1 no presentaron este problema.

Si bien, existen en la literatura reportes de análisis de AF por cromatografía de líquidos, el uso de TFA como reactivo derivatizante no ha sido reportado en el análisis de AF muestras biológicas, ya que este reactivo es empleado comúnmente en muestras de origen agrícola. Nosotros desarrollamos una metodología para la cuantificación de AF en muestras de origen biológico empleando TFA como agente derivatizante para aumentar la intensidad de fluorescencia de las AF en las muestras, y así aumentar la sensibilidad del método. Las figuras 6 y 7 muestran los cromatogramas de muestras de suero y orina contaminadas intencionalmente y analizadas con la metodología desarrollada, como se puede apreciar los compuestos no presentan interferencias para su análisis.

Inicialmente la evaluación de estos sistemas de extracción se realizarían mediante la medición de la fluorescencia empleando un fluorómetro, sin embargo debido a que el volumen de la celda de este instrumento es de 3 mL, lo cual implica trabajar con concentraciones altas de aflatoxinas, se modificó la estrategia para evitar riesgos en el manejo de estas sustancias. y se prefirió realizar el análisis empleando CLAR y detector de fluorescencia.

Como se puede observar, las matrices no presentan interferencias para la resolución de ambas toxinas. Los parámetros cromatográficos, tiempo de retención, asimetría de pico, factor capacidad, selectividad y resolución, para ambas toxinas fueron buenos (tabla XV).

La reproducibilidad del tiempo de retención del pico fue excelente lo cual facilitó la identificación de cada aflatoxina. Los picos de aflatoxinas fueron confirmados por co-inyección de estándar en las muestras.

La determinación del rango lineal del método fue esencial para que las muestras fueran diluidas adecuadamente y que el rango de análisis estudiado fuera cubierto. Cinco soluciones estándares de 1-25 ng/mL fueron usadas para evaluar la linealidad del método. Se realizó la inyección por duplicado de cada estándar. Se calculó la regresión lineal, coeficiente de determinación y coeficiente de correlación de la altura de las señales contra concentraciones de compuesto; el método es lineal en el rango de concentraciones estudiados y la forma de la línea recta es buena como lo muestra el coeficiente de correlación. Se calculó la concentración de cada aflatoxina en las muestras usando curva de calibración y el factor de dilución.

La linealidad del método permite el uso de la ecuación de la línea recta para resolver las concentraciones de las muestras.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambos sistemas de extracción en la mayoría de los rangos de concentración; además como puede apreciarse en los resultados, los coeficientes de variación fueron muy superiores para la extracción líquido líquido, y en algunos casos se obtuvieron coeficientes de variación por encima del valor teórico (45%), para el manejo de sustancias en este rango de concentraciones⁽⁵⁷⁾; además por ser un método laborioso que requiere más manipulación de la muestra, la extracción líquido líquido fue descartado para el desarrollo y evaluación del método cromatográfico.

El análisis cualitativo^(57,58), fue realizado por tiempos de retención y por la co-inyección de estándar de AF en las muestras ; además la derivación de las AF con TFA ha sido reportada como una prueba confirmatoria de AF en CCF de muestras de origen biológico⁽¹⁴⁾.

Se trabajó inicialmente, con la técnica de estándar interno utilizando para tal efecto la AFGI, por ser una toxina con características muy similares a las AF en estudio, sin embargo, al realizar la evaluación del método una muestra de orina presentaba un compuesto que interfería en la resolución de AFGI, por revisión bibliográfica encontramos que este compuesto puede ser aislado de los fluidos biológicos^(42,46,48) como los estudiados, por lo cual no cumplía con las características de un estándar interno y se dejó de trabajar con esta técnica. Por no contar con otra sustancia idónea para ser usada como estándar interno, la cuantificación de las aflatoxinas se realizó con la técnica de estándar externo^(57,58) midiendo la altura de los picos de las AF en función de la concentración; se prefirió medir la altura de los picos por presentar mejor linealidad y coeficiente de determinación (r^2) que el área correspondiente.

Para la evaluación del método, se aplicó la estadística descriptiva^(53,54) para el análisis e interpretación de los resultados de las muestras; además esto permitió uniformizar los parámetros de precisión y exactitud de la metodología, para la aplicación como técnica de rutina.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método de cromatografía de líquidos para la determinación de AFM1 y AFB1, en suero y orina de origen humano.

El método está basado en la extracción de aflatoxinas empleando columnas de extracción en fase sólida C-18, en la derivatización se empleó ácido trifluoroacético, 100 µL para soluciones estándar y 200 µL para muestras, y el análisis cromatográfico isocrático con detección por fluorescencia molecular.

La identificación de las aflatoxinas se realizó por comparación de tiempos de retención y co-inyección de estándar; la cuantificación se realizó utilizando la técnica de estándar externo.

El método es lineal para el rango de concentraciones de 1 a 24 ng/mL para AFM1 y 2 a 24 ng/mL para AFB1. La precisión del método es buena y la recuperación para ambas toxinas fue de 60 - 80 % en el rango de concentraciones en estudio.

El método es útil para monitoreo de exposición de aflatoxinas laboral o la ingesta de AF. Con la metodología desarrollada se puede cuantificar AFM1 y AFB1 en concentraciones de ng/mL.

REFERENCIAS

1. Report of an IARC Working Group. "An evaluation of chemicals and industrial processes associated with cancer in humans based on human and animal data: IARC Monographs volumenes 1 to 20." *Cancer Research*, 40, (1980), pp. 1-12.
2. William R. Burg, Odette L. Shotwell and Bernard E. Saltzman.. "Measurements of airborne aflatoxins during the handling of contaminated corn." *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 42/1, (1981), pp. 1-11.
3. F.G. Peers, G.A. Gilman and C.A. Linsell. "Dietary and human liver cancer.A study in swaziland". *Int. J. Cancer*, 17, (1976), pp. 167-176.
4. William R. Burg and Odette L. Shotwell. "Aflatoxin levels in airborne dust generated from contaminated corn during harvest and at an elevator in 1980. *J.ASSOC. OFF. ANAL. CHEM.*, 67/2, (1984), pp. 309-312.
5. Badui Dergal V. y Valle Vega P. "Efectos mutagénicos y carcinogénicos provocados por algunos compuestos contenidos en los alimentos". *Rev. Soc. Quím. Mex.*, 35/4, (1991), pp. 182-192.
6. K, Uraguchi and M, Yamazaki. Chapter 5. Carcinogenicity of Micotoxins. Toxicology, biochemistry and Pathology of micotoxins. Halsted Press. U.S.A., (1978), pp. 239-262.
7. Council for agricultural science and technology." Mycotoxins, economic and healt risks". 116, (1989), pp.29-33.

8. C. Moreau, M. Moss. Chapter 3." Aflatoxicosis. Moulds, Toxins and Food". John Wiley and Sons Ltd. 2nd Edition. Great Britain, (1979), pp. 129-134.
9. Fernández, Manahén; Acuña, Karim; Torres, Esperanza. "Aflatoxinas en harina de maíz nixtamalizada para hacer tortillas: su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución". **VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica**. Facultad de Medicina. Monterrey, Nuevo León, México, (1990).
10. Borrego, Carmen; Fernández Manahén; Acuña Askar, Karim; Esperanza Tореes. "Análisis de aflatoxinas en muestras de maíz de la región norte de México ".**VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica**. Facultad de Medicina. Monterrey, Nuevo León, México, (1990).
11. Martínez, Julio; Fernández, Manahén; Acuña Askar, Karim; Esperanza Torres. "Evaluación del contenido de aflatoxinas en muestras de maíz de a región noreste de México". **VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica**. Facultad de Medicina Monterrey, Nuevo León, México, (1990).
12. Acuña Askar. "Aflatoxinas en alimentos: Su detección y cuantificación por métodos fisicoquímicos". **Tesis de maestría**. U.A.N.L. Monterrey, Nuevo León, México, (1991).
13. Torres, Esperanza; Naccha, Lidia; Montoya Ricardo; Acuña, Askar, Castellon, Juan Pedro. "Quantification of aflatoxins in corn distributed in the city of Monterrey, Mexico". **Food Additives and Contaminants**, 12/3, (1995), pp.383-386.

14. R.H. Mohamed Y. Siraj, A. Wallace Hayes, Peter D. Unger, Gwendolyn Wogan, Nell J. Ryan and Betty B. Wray. "Analysis of aflatoxins B1 in human tissues with High-Pressure Liquid Chromatography". **Toxicology and applied pharmacology** ,58 ,(1981), pp. 422-430.
15. Phillips, D.L., Yourtee, D.M. and Searles. "Presence of aflatoxin B1 in human liver in the United States". **Toxicology and applied pharmacology** , 36 (1976), pp.346.
16. Touchstone, Joseph.. "Thin layer chromatography: Quantitative environmental and clinical applications". Copyright John Wiley & Sons. Printed in USA, (1980).
17. Hiroki Okumura, Osamu Kawamura, Seishi Kishimoto, Akihiro Hasegawa, Santosh M. Shrestha, Kunio Okuda, Hiroshi Obata. "Aflatoxin M1 in Nepalese sera, quantified by combination of monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay". **Carcinogenesis -Short Communication**, 14/6, (1993), pp.1233-1235.
18. FAO. "Manuales para el control de calidad de alimentos: Capacitación en análisis de micotoxinas". Organización de Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. ROMA 1991.
19. FAO. "Taller conjunto FAO/OPS sobre la prevención y control de micotoxinas en América Latina y el Caribe". San Jose Costa Rica. Febrero 1991.
20. Heathcote J.G. and J.R. Hibbert. "Aflatoxinas: Chemical and biological aspects". Elsevier Scientific publishing company. New York. 1978.
21. OPS. Criterios de salud ambiental II, Micotoxinas, Publicacion científica No. 453. (1989).

22. Nesbitt, B.F.; O'Kelly, J.; Sargeant, K." Toxic Metabolites of A. FLAVUS. **Nature**, 195/4846, (1962), pp. 1062-1063.,
23. Hartley, P.D.; Nesbitt, B.F.; O' Kelly, J. "Toxic Metabolites of A. FLAVUS". **Nature**, 198/4885, (1963), pp. 1056-1058.
24. Austwick, P. K. C.; Ayerst, G."Toxic Products in Groundnuts: Groundnut..Microflora and toxicity". **Chemistry and Industry**, 2, (1963), pp.55-61.
25. C.P. Wild, R.C. Garner, R. Montesano and F. Tursi. "Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats." **Carcinogenesis** 7/6 (1986), pp.853-858.
26. Peter D. Unger, Harihara M. Mehendale, and Wallace Hayes". Hepatic Uptake and Disposition of aflatoxin B1 in isolated perfused rat liver". **Toxicology and applied pharmacology**, 41, (1977.), pp. 523-534.
27. Sieber Susan M. Pelayo Correa, Delgard Dan and Adamson Richard. "Induction of osteogenic sarcomas and tumors of the hepatobiliary system in non human primates with aflatoxin B1". **Cancer Research**, 39, (1979), pp. 4545-4554.
28. Forrester, Lesley; Neal, Gordon; Judah, David; Glance, Michael and Wolf, Roland." Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver". **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 87, (1990), pp. 8306-8310.

29. Groopman, John; Busby William and Wogan, Gerald. "Nuclear distribution of aflatoxin B1 and its interaction with histones in rats liver in vivo". **Cancer Research**, 40, (1980), pp. 4343-4351.
30. Cole, Katharine; Hsu, Ih-Chang and Trump Benjamin. "Comparative effects of aflatoxin B1 on Mouse, Rat, and human hepatocytes in primary culture". **Cancer Research**, 46, (1986), pp. 1290-1296.
31. Larsson, Pia and Tjalve, Hans. "Distribution of aflatoxin B1 in the marmoset monkey (callitrix Jacchis)". **Carcinogenesis**, 4 (1993), pp. 1-6.
32. Newberne, Paul and Butler, William. "Acute and Chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: A review". **Cancer Research**, 29, (1969), pp. 236-250.
33. Appleton, Scott; Goetchius, M, and Campbell. "Linear dose-response curve for the hepatic macromolecular binding of aflatoxin B1 in rats at very low exposures". **Cancer Research**, 42, (1982), pp. 3659-3662.
34. Trucksess M.N., Stoloff L. and Young K. "Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming Aflatoxin-feed Poultry". **Science**, 62, (1983), pp. 2176-2182.
35. Hans P. Van Hegmond; Walter E. Paulsch; Eric A. Sizoo and Pieter L. Schuller. "Two dimensional Chromatographic method for determination of aflatoxins in liver; Occurrence of aflatoxins in animal liver". **JEPTO** may-june, 103, (1990), pp.120-123.

36. Coulter J.B.S; Lamplugh S.M; Suliman G.I, Omer M.I.A and Hendrickse, R.G. "Aflatoxins in human breast milk". **Ann. Trop. Paediatr**, 4, (1984), pp.61-66.
37. H.P, Van Egmon. "Current situation on regulation for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis". **Food additives and Contaminants**, 6/2, (1989), pp.139-188.
38. Alpert M; Hutt M.S.R; Wogan G; Davidson C.S. "Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda". **Cáncer**, 28, (1971), pp.253-260.
39. Peers FG, Linsell CA. "Dietary aflatoxins and liver cáncer-a population based study in Kenya". **Br. J. Cáncer**, 27, (1976), pp.473-484.
40. Shank RC, Gordon JE, Wogan GN, Nondasuta A, Subhamani B. "Dietary aflatoxins and human liver cáncer, III. Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxins". **Food Cosmetic Toxicology**, 10, (1972), pp.71-84.
41. R.C, Shank; N, Bhamarapravati; J.E.M, Gordon and G.N. Wogan. "Dietary aflatoxins and human liver cancer: IV incidence of primary liver cancer in two municipal populations of Thailand". **Fd. Cosmet. Toxicol.**, 10, (1972), pp.171-179.
42. Ngindu A, Johnson BK, Kenya PA, Ngira JA, Ochen DM, and Cols. "Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxins poisoning in Kenya". **The Lancet**, (1982), pp. 1346-1348.
43. Krishnamachari DAVR, Bhat V, Nagarajan V, Tilak TBG. "Investigation into an outbreak of hepatitis in parts of Western India". **Ind. J. Med Res.**, 63, (1975), pp. 1036-1049.

- 44.D.M.O. Becroft, D.R. Webster. "Aflatoxins and reye's disease". **Brithish medical journal**, (1972), pp. 117.
- 45.Olsen LC, Bourgeois CH, Cotton RB, Harikul S, Grossman RA, Smith TJ." Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera in north eastern Thailand Clinical syndrome and epidemiology". **Pediatrics**, 47, (1971), pp.707-716.
- 46.W.J, Rogan; G.C,Yang and R.D, Kimbrough. Aflatoxin and Reye's Syndrome: A study of livers from deceased Cases". **Archives of Envirommental Health**, 40/2 ,(1985), pp. 91-95.
- 47.F.Apeageyi, S.M.Lamplugh,R.G.Hendrickse,K.Affram and S.Lucas."Aflatoxins in the livers of children with Kwashiorkor in Ghana".**Tropical and Geographical Medicine**, 38, (1986),pp.273-276.
- 48.J.B.Hendrickse; J.B.S Coulter; S.B.J Lamplugh. "Aflatoxins and kwashiorkor: Epidemiology and clinical studies in Sudanese children and fildings in autopsy liver samples from Nigeria and South Africa". **Bull. Soc. Path. Ex.**,76, (1983), pp.559-566.
- 49.Ronald K.Ross, Jian-Min Yuan, Mimi C. Yu, Gerald N. Wogan, Geng-Sun Qian, Ji-TaoTu, John D.Groopman, Yu-Tang Gao Ian , E .Henderson. "Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma".**The lancet**, 339/8799, (1992), pp.943-946.
- 50.Fu-Sung Yeh, Mimi C. Yu and Brian Henderson. "Hepatitis B virus, Aflatoxin and Hepatocellular Carcinoma Southeren Guangxi". **Cancer Research**, 4 ,(1989), pp. 2506 - 2509.

51. Mehmet Ozturk and Collaborators. "p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure". **The Lancet**, 338, (1991), pp.1356-1359.
52. AOAC. "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist". 15th Edition. Arlington, Virginia 22201, USA, (1990).
53. Grant T. Wernimont. "Use of statistics to develop and evaluate analytical methods". AOAC. Arlington, Virginia, USA, (1987).
54. Steel Robert and Torrie, Jones. " Principles and procedures os statistics:with special reference to the biological sciences". Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York, USA (1969).
55. Vinad P. "Analytical methods validation: Bioavailability, Bioequivalence and pharmacokinetic studies". **J.AOAC International**, 75/1, (1992).
56. Shah, Kamal K. Midhas. AOAC prepares to expand methods validation programs, AOAC, **J.AOAC International**, 75/1, (1992).
57. Quattrocchi, Oscar. Abelara, Sara y Laba Raúl. "Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica". Merk Impreso en Argentina, (1992).
58. Katz, Elena. "Quantitative analysis using Chromatographic techniques". Copyright. By John Wiley & Sons Ltd. Great Britain (1987).



BIBLIOTECA

