



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA
UAM Iztapalapa

**Montajes de técnicas rápidas para la determinación de
aflatoxinas**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO
PRESENTA:
ALAIN BUSTAMANTE GOMEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. GABRIELA MARIANA RODRÍGUEZ SERRANO

ASESORA DEL TRABAJO
DRA. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO



México, DF., 19 Abril del 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mis padres,

por apoyarme en todo hasta este punto de mi vida, a mi mamá que siempre ha creído en mí, me ha apoyado en cualquier proyecto, me ha entendido, escuchado y estado ahí no solo en los éxitos sino también en los fracasos, una madre que con ejemplo cariño e inteligencia me supo guiar de una forma adecuada, a mi papá que a pesar de no saber expresar muy bien sus sentimientos me dio mucho cariño y me dio todas las herramientas para superar cualquier problema y dificultad. A los dos porque siempre me han hecho hacer y vivir cosas felices, mejores padres no podría pedir y uno complemento al otro a su manera en mi enseñanza para lograr lo que soy y seré.

A mi abuelita,

Catalina ya que con ese cariño, forma de consentir y esas palabras de aliento me hizo pensar en un futuro más grande y genial, de igual manera agradezco su apoyo que me dio en un momento crucial de mi vida académica, el cual me motivó a seguir adelante.

A mis tíos y primos,

Edith, Arturo, Rubén, Ilse y Luis porque has sido importantes para impulsarme a seguir estudiando.

A mi hermano,

Martin porque realmente has sido un verdadero hermano apoyándome, platicando y divirtiéndonos.

A la niña de mis ojos

Gina, porque con su ánimo y su pensamiento, me alentó a ser más grande y cumplir cualquier sueño que me propusiera, me motivó a superarme, me hizo ver mis defectos y convertirlos en fortalezas, mis virtudes hacerlas más grandes, con ella experimente y viví toda mi carrera y muchas cosas más de la vida. Aquí no hay suficiente espacio para expresar lo inmensamente feliz que me ha hecho, porque a su lado soy mejor, saco lo mejor de mí y “me puedo comer al mundo entero”, porque con su apoyo y motivación todo los retos los he logrado superar, me hizo madurar y no sé qué nos depare el futuro pero al menos espero que sí es el no estar juntos, este sentir se lo lleve en el corazón por siempre.

A mis amigos de la Preparatoria 4 Vidal Castañeda Y. Nájera,

Fernando, Ximena, Alejandra y Leslie que siempre me apoyaron de una manera única que solo lo hace un verdadero amigo, con los que compartí juegos risas, preocupaciones, éxitos, lágrimas, crecer de niños a adultos y muchas más vivencias, porque ustedes siempre serán mis hermanos los que me cuidaron y por lo tanto llevaré en el corazón toda la vida. Pero especialmente a mi mejor amiga Stephany ya que ella fue una parte fundamental para que siguiera estudiando, diciéndome que haríamos un trato, que si continuaba con mis estudios ella los continuaría en la misma facultad y porque siempre ha estado conmigo a pesar de todo lo que pueda pasar y sé que lo estaremos en el futuro, que me ha apoyado en todas las formas y todos los ámbitos que existan, quizá no siempre de la forma adecuada, pero nunca me dejó atrás y fue una pieza muy importante del rompecabezas que me hace llegar al lugar donde estoy.

Ana kern Cevada Esparza

Por qué en cuanto a mitad es ala que más años llevo de conocer, 12 años para la mitad de este presente año

A mis amigas de la Universidad Fes Zaragoza,

Ely con la que viví y compartí toda la universidad, Gabriela a la primera que le hable en la universidad y que estuvo en esos ratos de desastres, con la que compartí todos los partidos por haber y conocidos, a mi amiga Itzel con la que platique de infinidad de cosas.

A los chicos de PERAJ,

Con los que tuve uno de mis años más divertidos, volviendo a ser unos niños con Alama, Rosa, Zaira y Toño.

A mis compañeras de la UAM,

Que me apoyaron y de los cuales he aprendido muchas cosas pero un abrazo principalmente para mis amigas Pamela, Haydee, Jazmín, Marieli y Lupita y aún más en especialmente a las dos últimas mencionadas por todo el apoyo y conocimientos brindados a mí y mi trabajo y por todos los buenos ratos locos que pasamos.

A mi luna,

Por ser genial, por siempre recordarme quien soy.

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano por brindarme este proyecto y darme la oportunidad de participar y así aprender los muchos conocimientos que he adquirido en este. Al igual por toda paciencia, tiempo y ayuda que me ha dado, con las que sin ellas no hubiera podido sacar este proyecto adelante. Una doctora la cual brinda las herramientas necesarias para realizar buen trabajo, una investigadora y maestra con la que es un placer trabajar y con la cual se puede llevar un ambiente muy ameno.

Al Dr. Sergio Alatorre Santamaría por todo el apoyo y asesoría brindada, no solo por ser un profesor, si no por ser alguien que te impulsa, apoya y motiva. El cual es en gran parte resultado de este proyecto por sus grandes aportaciones, conocimientos y tiempos a este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	2
<i>Hongos y micotoxinas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Aflatoxinas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Biosíntesis de las aflatoxinas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Efectos de las flatoxinas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Distribución de aflatoxinas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Límites permitidos</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Los aflatoxinas en los alimentos</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Aflatoxinas en México</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Control y destoxificación aflatoxinas</i>	¡Error! Marcador no definido.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	¡Error! Marcador no definido.
HIPÓTESIS	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVO	¡Error! Marcador no definido.
MATERIALES Y MÉTODOS	¡Error! Marcador no definido.
RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
ANÁLISIS DE RESULTADOS	28
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO	¡Error! Marcador no definido.
<i>Tablas y cálculos</i>	¡Error! Marcador no definido.
OTRO	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

Dentro de los alimentos de mayor consumo en México, se encuentra el maíz, ya que forma parte importante de la dieta. Por ende, es de gran importancia atender su mejoramiento referente a su producción y almacenamiento en óptimas condiciones para obtener un producto con una excelente calidad para el consumo humano.

En los alimentos hay muchos factores biológicos, químicos y físicos que contribuyen a su contaminación, entre los biológicos se encuentran los hongos microscópicos, que están dispersos en el ambiente en forma de esporas y pueden llegar a todas los lugares y desarrollarse bajo las condiciones ambientales adecuadas. Algunos de estos hongos son productores de aflatoxinas (AF), que son micotoxinas producidas por los hongos del género *Aspergillus*, ampliamente distribuidos en todo el mundo. Los hongos del género *Aspergillus* tienen un amplio rango de condiciones para su desarrollo y en consecuencia para la producción de estas toxinas las cuales están relacionadas con cáncer de hígado en el ser humano.

Las AF son metabolitos secundarios que se producen después de la etapa de crecimiento exponencial de los hongos. Las principales AF responsables de las enfermedades en ser humano son la aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2. Estas últimas son biotransformadas en el hígado de las vacas a partir de las aflatoxinas B1 y B2.

El objetivo del trabajo es el montaje de técnicas que permitan determinar y cuantificar AF con diferentes métodos, accesibles y rápidos. Para ello, se evaluó la presencia de AF en diferentes variedades de maíz que se encontraba visiblemente contaminado por la presencia de hongos por malas condiciones de almacenamiento. Este trabajo es solo un acercamiento al estudio de las AF cuya actividad puede afectar al ser humano y animales lo que permite vislumbrar su vulnerabilidad frente al consumo de leches o productos lácteos contaminados con AF, como consecuencia de una inadecuada e indiscriminada alimentación del ganado lechero con granos contaminados. Dada la relación de la presencia de estas micotoxinas en la incidencia de cáncer de hígado, es importante implementar técnicas simples que permitan identificar de manera rápida su presencia en alimentos de animales.

MARCO TEÓRICO

Hongos y micotoxinas

Las micotoxinas son un grupo diverso de compuestos producidos durante la germinación de esporas de algunos hongos microscópicos, estas sustancias causan efectos perjudiciales para la salud de los seres humanos y animales (Algul y Kara, 2014).

Dentro de las micotoxinas se encuentran las AF que son micotoxinas producidas por el género *Aspergillus*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, por lo que se puede aislar de una gran variedad de sustratos (Abarca, 2000). Los hongos del género *Aspergillus* adoptaron en la naturaleza un estilo de vida saprófito, que los hizo capaces de utilizar un rango muy amplio de materiales como fuente de nutrimentos, esto significa que deben de existir diferentes rutas bioquímicas para la asimilación de todas las fuentes de carbono y nitrógeno susceptibles de ser degradadas y en consecuencia, produce una variedad de productos de fermentación.

El género *Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios (Abarca, 2000). Sobre el conidióforo característico, presente en *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee cuatro partes bien diferenciadas:

- Vesícula (extremo apical hinchado).
- Fiálides (células conidiógenas): células que se disponen sobre la vesícula.
- Estipe (parte media): sección cilíndrica situada debajo de la vesícula.
- Célula pie (parte basal): sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio.

En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas o célula soporte. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (Abarca, 2000) (ver Figura 1).

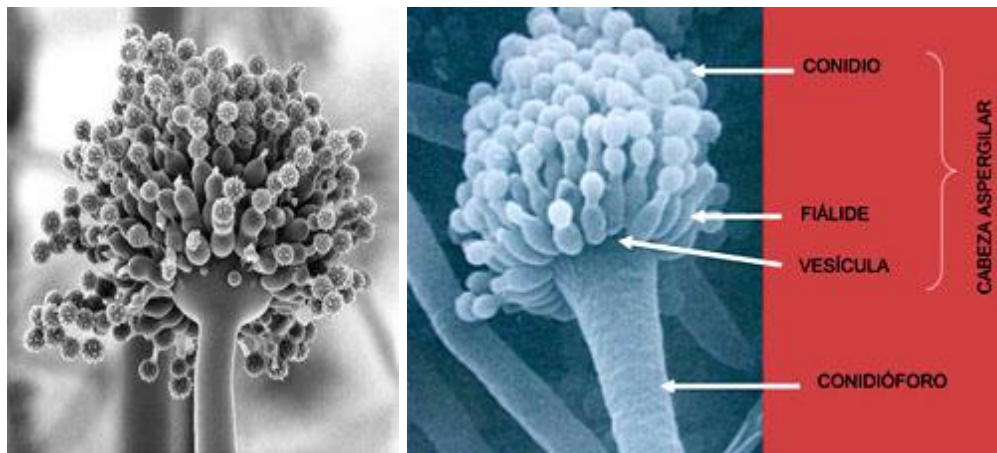


Figura 1. Micrografía de conidióforos de *Aspergillus* (Tomada de Olmedo-Obrero, 2010).

La mayor distinción que se usa actualmente para la separación de especies de *A. niger* de las otras especies de *Aspergillus*, es la producción de esporas color negro carbón o castaño muy oscuro, que presentan las fiálides biseriadas (Raper y Fennell, 1965). Otros rasgos incluyen conidióforos uniformes y generalmente descoloridos y esporas de $\leq 5 \mu\text{m}$, globosa, con crestas manifiestas o espinas no ordenadas en filas (Raper y Fennell, 1965; Olmedo-Obrero, 2010).

Los mohos aflatoxigénicos crecen de 8 - 55 °C con temperaturas óptimas de 36 - 38 °C, mientras que la producción de AF se inicia de 11 - 14 °C y cesa a menos de 10 o más de 45 °C, la producción óptima de AF va de 25 - 35 °C y se favorece en función de diversos factores como el sustrato, factores bioquímicos, biológicos y ambientales, como una humedad de 10-20% y a una humedad relativa de 70-90%, equivalente a un contenido de humedad del grano de 16.5 a 18%. Las AF se pueden producir en

condiciones de campo o almacén al quinto día y disminuyen al octavo. La presencia de hongos aflatoxigénicos no implica la existencia de AF (OPS-OMS, 1983;Carvajal, 2013). Las especies productoras de AF de *Aspergillus* requieren estar en cultivos puros, pues *A. chevalieri*, *A. candidus* y *A. niger*, compiten e interfieren con ellos, de tal forma que se han usado como control biológico (OPS-OMS, 1983;Diener y Davis, 1986;Carvajal, 2013).

Aflatoxinas

Las AF, son metabolitos secundarios que corresponden químicamente a bis dihidro-furnano-cumarinas se encuentran en alimentos contaminados por hongos microscópicos, durante el crecimiento, cosecha y almacenamiento. Los más notables productores de AF son *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*, aunque cabe mencionar que cada día se descubren nuevos hongos que son causante de la producción de AF como *Aspergillus nonius* y producidas otras especies *Penicillium notatum* y otros del genero *Fusarium* (Naranjo, 2013) de igual manera que *Aspergillus flavus* que en la nueva clasificación gracias al descubrimiento de su teleomorfo (parte sexual), anamorfo (parte asexual), holoomorfo (ciclo vital del hongo completa) y por estudios moleculares ahora es *Petromyces flavus* (Horn *et al.*, 2009). Existe una variedad de AF generadas por estos hongos con propiedades diferentes y configuración química distinta. Todas las AF tienen la propiedad de ser fluorescentes, habiéndose aprovechado esta característica como base de los procedimientos analíticos (Burdaspal *et al.*, 1987).

Hartley *et al.* (1963) observaron que los extractos de la toxina presentaban fluorescencia y las clasificaron de acuerdo a esta propiedad, según el color de flurecencia que emana con luz de UV de onda larga en aflatoxina B (blue) con anillo de ciclopentano y G (green) con anillo de lactona, lo que permite detectarlas en cantidades de 0.5ng o menos (Carvajal, 2013). Posteriormente, se separaron por cromatografía en capa fina cuatro componentes a los que se denominaron aflatoxinas

B1, B2, G1, G2 de acuerdo a su fluorescencia y a su valor de RF (Factor de Retención) o bien distancia de la muestra desde el origen/distancia del eluyente desde el origen. Actualmente, el término AF engloba más de una docena de sustancias relacionadas que, químicamente, son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y configuraciones tipo lactona (Burdaspal *et al.*, 1987). En la figura 2 se presenta la configuración química de las principales AF que se encuentran en los alimentos. Las AF más comúnmente asociadas a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* son B1, B2, G1, G2 (Valecia *et al.*, 1984).

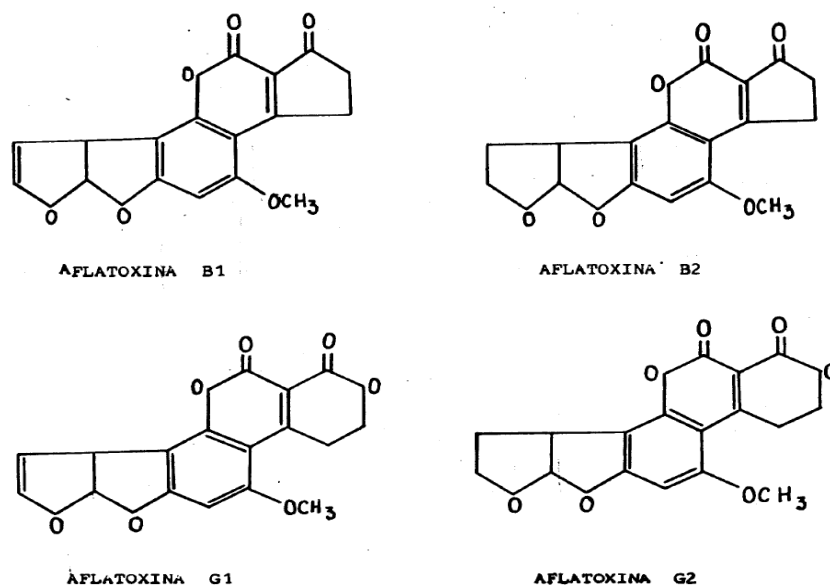


Figura 2. Estructura de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Tomada de Colorado, 1990).

La presencia de anillo lactónico en su estructura les confiere alta sensibilidad a la luz, aire, ácidos, y álcalis débiles, por lo que fácilmente pueden descomponerse en productos secundarios, algunos de ellos tóxicos, haciendo éstos más difícil la identificación de la AF B1, la cual es considerada como el principal elemento toxico además de presentarse en mayor concentración que las AF restantes en los alimentos contaminados (Stack *et al.*, 1975; Gutiérrez, 1982).

Todas las AF tienen la propiedad de ser fluorescentes, habiéndose aprovechado esta característica como base de los procedimientos analíticos. Sus pesos moleculares

oscilan entre 312 y 350; son ligeramente solubles en agua (10 a 20 µg/mL), solubles en solventes no polares (hexano y éter de petróleo) y solubles en solventes moderadamente polares o solventes orgánicos (cloroformo, metanol, dimetilsulfóxido, acetonitrilo y acetona) (Carvajal, 2013).

Las AF purificadas en forma cristalina son termo resistentes, estables en un pH entre 3 y 10 con puntos de fusión superiores a los 250°C (Burdaspal *et al.*, 1987). Cuando las AF están en cloroformo

Sin embargo a pesar de ser estas las AF más importantes y comunes hay algunos compuestos derivados de las anteriores, entre los cuales se encuentran las AFB2a, G2a, M1, M2, P1, H1, Q1, aflatoxicol, asperotoxina, esterigmatocistina (Valecia *et al.*, 1984). La aflatoxina B1 (AFB1) es la más toxica y peligrosa de todas (Carvajal, 2013).

Cuando las vacas lactantes consumen alimento contaminado con AFB1, esta es metabolizada para formar el derivado monohidroxilado, conocido como aflatoxina M1 (AFM1), que se expresa en la leche de la vaca.

De hecho, la contaminación de la leche y los productos lácteos con AFM1 puede variar de acuerdo a la geografía, el medio ambiente y condiciones climáticas así como el nivel de desarrollo tecnológico del país (Ghazani, 2009; Prandini *et al.*, 2009; Rahimi *et al.*, 2010). La presencia de AF en los alimentos utilizados para la dieta de las vacas es un factor muy importante que influye en el nivel de aflatoxina M1 en la leche y los productos lácteos.

La leche se considera que es un alimento natural ideal para el desarrollo óptimo de las crías pero que puede ser ingerido a cualquier edad debido a su alto valor nutritivo. Tiene un alto contenido en proteínas y una valiosa fuente de calcio,

vitaminas y antioxidantes (Zeluta *et al.*, 2009). Sin embargo, la leche tiene el mayor potencial demostrado para la introducción de AFM1 en la dieta humana. La alta frecuencia de AFM1 en la leche y los productos lácteos disponibles en el mercado, la alta ingesta de estos productos por la población humana, especialmente por parte de lactantes y niños de corta edad y su probable efecto carcinógeno, están en el origen del establecimiento de medidas para controlar la contaminación de AFM1. A la luz de estas preocupaciones, varios países han establecido límites reglamentarios de 0.5 µg/kg para AFM1 en la leche y sus productos derivados (Skrbicet *al.*, 2014).

Biosíntesis de las aflatoxinas

Se han identificado 18 tipos de AF siendo las más frecuentes en los alimentos: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 y AFM2. La AFM1 es la forma hidroxilada de AFB1, secretada en la leche y orina de animales que consumen alimentos contaminados con AFB1 (Velázquez *et al.*, 2009).

Los patrones de síntesis de AF y de lípidos son similares, vienen de un acetato que es el precursor común. Cuando la glucosa C14 se incorpora en posición uno en condiciones anaeróbicas, la vía catabólica de la glucosa Embden Meyerhof se interrumpe y favorece la producción de AF. Los precursores metabólicos de la biosíntesis de AFB1 tienen una estructura básica C₂₀ poli-β-quétido y pertenecen a diferentes grupos como: xantonas (esterigmatocistina, O-metil-esterigmatocistina, aspertoxina), poli-hidroxi-antraquinonas (averufina, O-dimetil nidurufina, ácidos solorínico y norsolorínico, averantina, 1-O-dimetilaverantina, averitrina y acetato versiconal), AF y parasiticol (Sweeney *et al.*, 1994; Carvajal, 2013).

Las AF se producen por hongos filamentosos cuando la reducción de grupos cetónicos se interrumpe y se favorecen las reacciones de condensación en la ruta metabólica de la producción de ácidos grasos. Este proceso favorece la síntesis de compuestos policetónicos (aflatoxinas) (Sweeney *et al.*, 1994, Torres *et al.*, 2014), como se muestra para la biosíntesis de AFB1 en la figura 3.

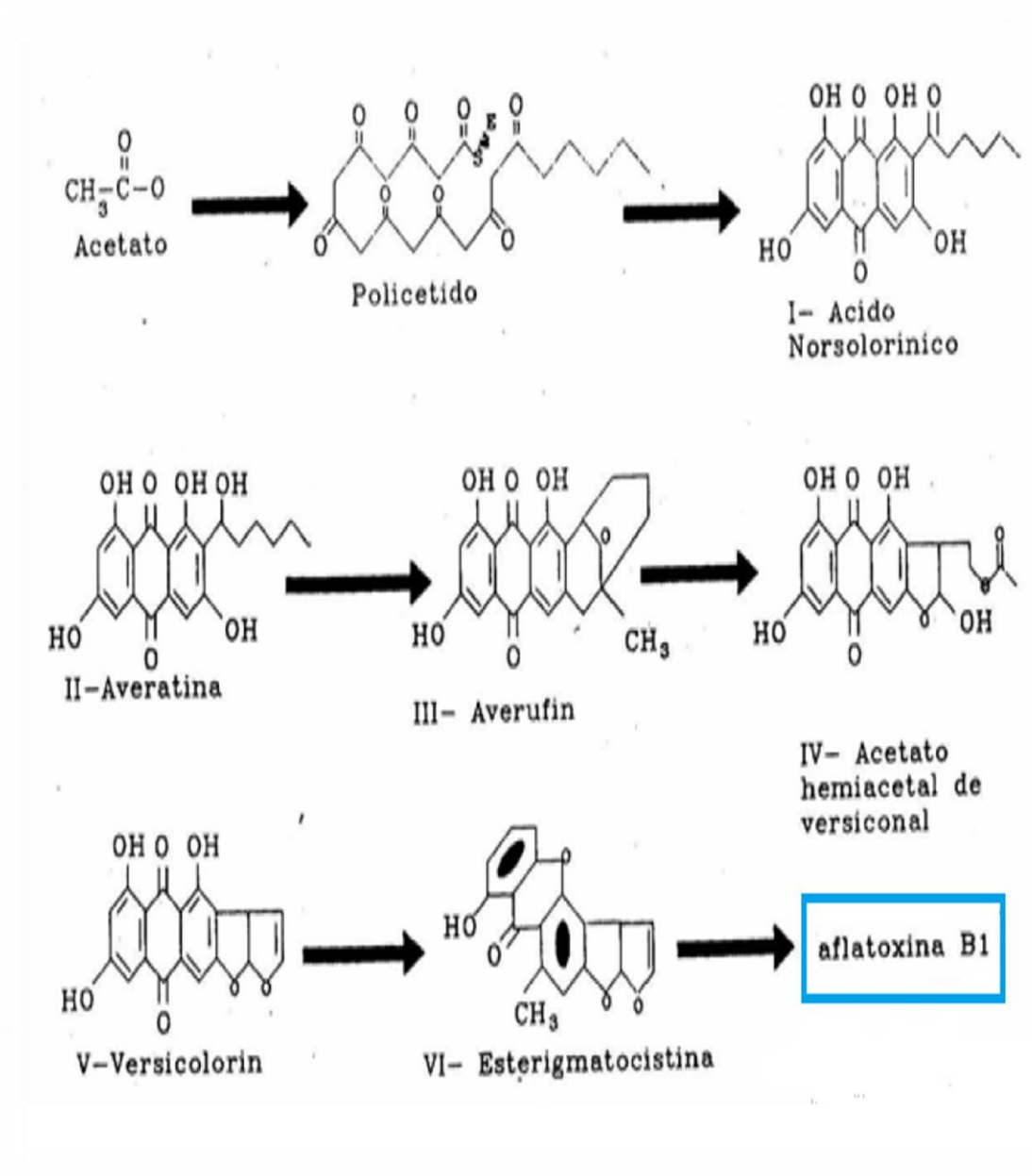


Figura 3. Ruta de la biosíntesis de la aflatoxina B1 (Tomado y modificado de Torres *et al.*, 2014).

La ruta bioquímica para la síntesis de AF comprende alrededor de 23 reacciones enzimáticas, y la mayoría de los genes responsables se han caracterizado y aislado (Figura4) (Eaton *et al.*, 1994; Carvajal, 2013).

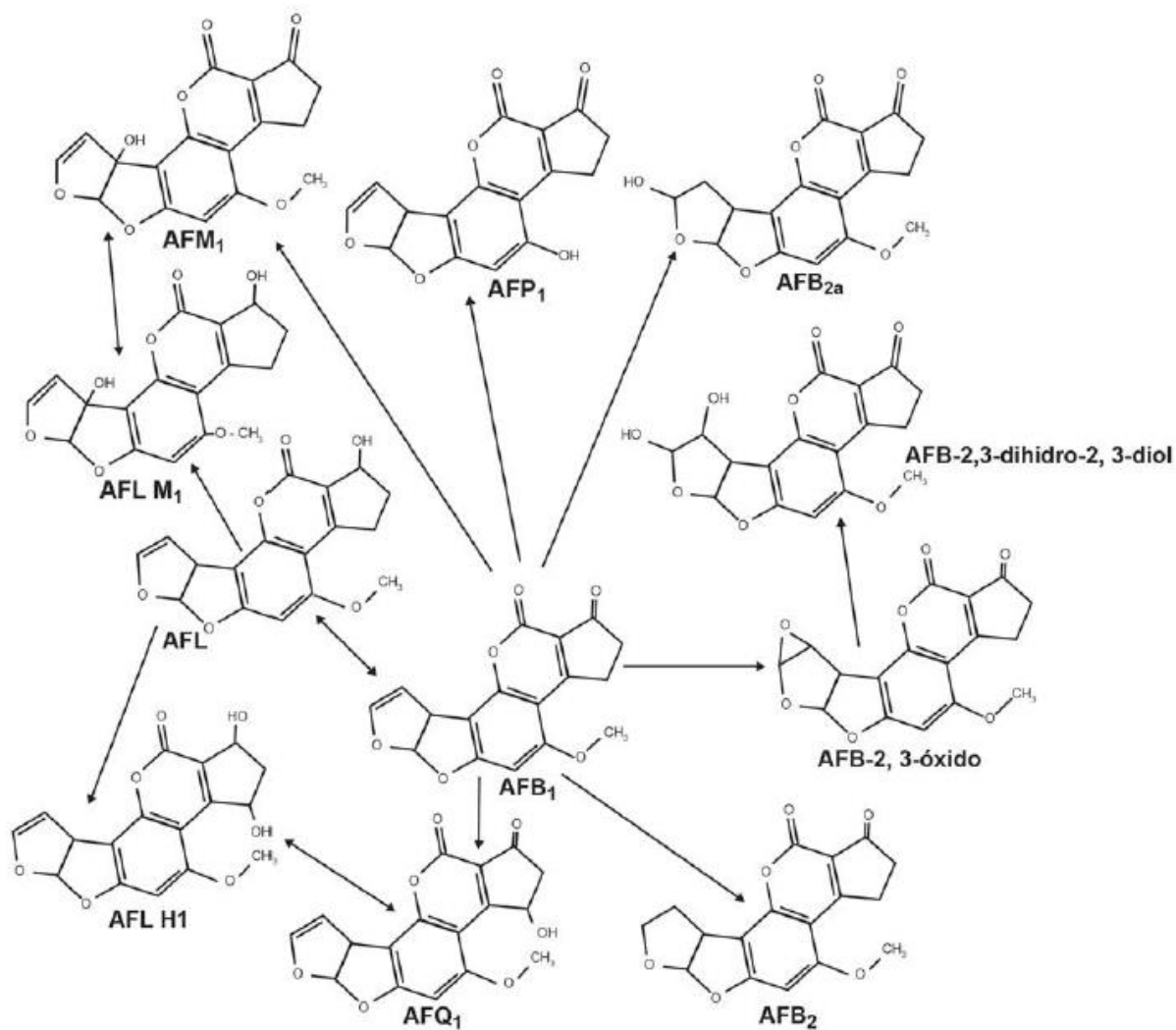


Figura 4. Esquema de los precursores de aflatoxina B1 (Tomado deCarvajal, 2013).

Efectos de las aflatoxinas

Las AF son compuestos letales para animales y células en cultivo de tejidos cuando se administran en dosis agudas y causan daños histológicos en dosis subletales.

Una exposición prolongada a estos compuestos da como resultados un estado de toxicidad crónica incluyendo una inducción tumoral en varias especies. La intoxicación aguda por dosis elevada de AF va acompañada por necrosis hepática y

hemorrágica que aparecen después de un tiempo corto de la administración aguda (Stack *et al.*, 1975).

El mayor efecto tardío de las AF es el desarrollo de hepatocarcinomas, los cuales se encuentran ocasionalmente en riñones y colon (Valecia *et al.*, 1984). Las lesiones primarias causadas por la presencia de esta toxina se encuentran en el hígado, siendo la hiperplasia del ducto biliar la lesión que se desarrolla con más frecuencia (Vaqueiro *et al.*, 1975).

Aparentemente existe una correlación entre la configuración de la molécula y la letalidad. La presencia de oxígeno adicional en las AF tipo G disminuye la letalidad en un factor aproximadamente de dos veces, mientras que los compuestos insaturados resultaron 4.5 veces más potentes que sus derivados dehidro (Valecia *et al.*, 1984). La toxicidad y otros efectos biológicos causados por las AF se atribuyen a las alteraciones bioquímicas. Algunas de las rutas metabólicas en donde intervienen las AF son:

- a) Síntesis de ADN
- b) Metabolismo de RNA
- c) Síntesis de proteínas
- d) Metabolismo mitocondrial
- e) Síntesis de lípidos
- f) Composición sanguínea y de tejidos
- g) Actividad enzimática (Colorado, 1990)

Otras dos enfermedades hepáticas que se han relacionado con la ingestión de la AFB1 son Kwashiorkor y Síndrome de Reye. Los síntomas de la primera son hipoalbuminemia, hígado graso e inmunosupresión, en la segunda se presenta encefalopatía con degeneración grasa de las vísceras (Guzmán de Peña, 2007).

La AFB1 puede sufrir una oxidación a nivel hepático y renal, y ser transformada en AFM1, que se excreta en la leche al atravesar la barrera del epitelio alveolar. La AFB1 está entre los más potentes carcinógenos conocidos. Su acción carcinogénica se basa en la biotransformación por el sistema hepático microsomal P450 a AFB1-8,9-epóxido, un metabolito altamente reactivo capaz de unirse a las proteínas, al ADN y al ARN; formando un compuesto estable con el N7 de los residuos guanil que puede causar mutaciones en el codón 249 del gen p53 supresor de tumores. Esta alteración es característica de varios carcinomas, especialmente del carcinoma hepático en el hombre. AFB1-8,9-epóxido forma uniones covalentes con los residuos de guanina del ADN, que se excretan por vía urinaria y pueden utilizarse como biomarcadores de exposición en los grupos con riesgo de cáncer de hígado (Novoa *et al.*, 2006). Sin embargo, la AFB1-8,9-óxido también puede ser sustrato de las glutatión S-transferasas, produciéndose una detoxificación que da lugar a productos no tóxicos excretados en bilis y orina (Kensler *et al.*, 1986; Kensler *et al.*, 2003), como el conjugado aflatoxina-glutatión y la aflatoxina-N-acetilcisteína (Rubio, 2011).

Límites permitidos

Las AF están reportadas en todo el mundo y de igual manera cada país tiene sus límites en alimentos como se muestra en el cuadro 1, incluyendo a México. La AFM1 al igual que la AFB1 se ha incluido en la lista de los principales carcinógenos humanos por el efecto que estos provocan en la salud humana y animal (IARC, 2002), lo que ha conllevado a que organismos internacionales como la Unión Europea hayan establecido el límite máximo de residuos para la AFM1 en leche y productos lácteos de 0.05 µg/kg (Reglamento de la UE, 2010), mientras el Codex Alimentarias y la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de Norteamérica establecen el valor de 0.5 µg/kg (Vega y León *et al.*, 2009; CODEX, 2010), límite establecido también por los organismos reguladores mexicanos (NOM. 2002).

Los primeros estudios realizados en México que determinaron AFM1 en leche entera, pasteurizada y ultrapasteurizadas se realizaron en la década de los 90's (Carvajal *et al.*, 2003) y posteriormente entre 2007-2009 se efectuaron otros trabajos en leche y derivados consumidos en la Ciudad de México, encontrándose alta incidencia de AFM1 en las muestras analizadas (Pérez *et al.*, 2008; Urbán *et al.*, 2010). Recientemente un estudio realizado en Guadalajara en leche convencional de diferentes marcas (0.051 -0.49 µg/kg) encontraron que 18.6 % de las muestras (superaron el índice establecido por la Unión Europea (0.05 µg/kg) (Gutiérrez *et al.*, 2013) y para México en la NOM-243-SSA1-2010 el índice máximo permitido es de 0.5 µg/kg (Landeros *et al.* 2012) como se muestra en el cuadro I, en cuanto al maíz el índice permitido es de 20 µg/kg para seres humanos y de 300 µg/kg para ganado (Vallejo, 2012).

Cuadro I. Límites permitibles de aflatoxinas en diferentes alimentos a nivel mundial.

País	Alimentos			
	Leche	Queso	Mantequilla	Referencia
Unión Europea	0.05µg/kg 0.025 µg/kg(lactantes)	-	-	Reglamentos 2174/2003 y 683/2004
Holanda	0.05µg/kg	0.2µg/kg	0.02µg/kg	Finoli & Vecchio (2003)
Suiza	0.05µg/kg	0.25µg/kg	0.02	Kaniou-Grigoriadou <i>et al.</i> (2005)
Austria	0.05 µg/kg	0.25µg/kg	0.02	
Italia	0.05µg/kg	0.45µg/kg	-	Ministerio de Salud Italiano (2004)

Turquía	0.05µg/kg	0.25µg/kg	-	Código Alimentario Turco (2002)
EEUU	0.5µg/kg	-	-	-
Argentina Brasil Paraguay Uruguay	0.5µg/kg	-	-	U.S. FDA (2000) Codex Alimentarius
México	0.5µg/kg	-	-	Landeros <i>et al.</i> 2012

(Tomado y modificado de Rubio-Martínez, 2011).

Los aflatoxinas en los alimentos

Las AF fueron identificadas como agente causal de la enfermedad X de los pavos que causó la muerte a más de 100,000 pavos en Inglaterra en 1960. Como ya se había mencionado las condiciones óptimas para que los hongos produzcan metabolitos como las AF son: actividad de agua a 0.85, temperatura entre 20 y 30 °C y el pH entre 3.5 y 5.5. Estas mismas condiciones son las requeridas para el desarrollo y crecimiento del maíz, es por esto que es uno de los productos de mayor preocupación mundial. Se ha reportado la presencia de AFB1 en alimentos a nivel mundial tanto de consumo animal como humano.

En un total de 200 muestras de materias primas y alimentos terminados empleados en nutrición animal se encontró una incidencia del 29.0% con niveles en muestras positivas que oscilaron entre 1.0 y 66.1 ppb. En 280 muestras de alimentos de consumo humano se determinó una 26 incidencia menor a la anterior (8.9%) pero con niveles más altos a los encontrados en alimentos para animales puesto que las

muestras positivas oscilaron entre 1.0 y 103.3 ppb. Los problemas principales que plantean estas moléculas son su potente efecto a muy bajas concentraciones y su elevada resistencia al calor de esterilización de los alimentos (Naranjo, 2013).

Aflatoxinas en México

Por ser México un país de clima templado (Trejo, 1999) ideal para el crecimiento de hongos productores de AF, por lo tanto es muy común la contaminación de los alimentos por estas toxinas (Naranjo, 2013). Entre los alimentos reportados con AF se encuentran maíz (Colorado, 1990), forraje (Florencia *et al.*, 2013) cacahuete, pistaches, semillas del algodón, nueces, copra (médula del coco) (Méndez *et al.*, 2009), leche (Reyes *et al.*, 2009).

La Comunidad Europea establece que la concentración límite de AFB1 en alimento destinado para animales y AFM1 en leche no debe ser superior a 10 µg/kg y 0.05 µg/L, respectivamente (Comunidad Europea 466/2001). En México, la NOM-188-SSA1-2002 establece el límite máximo permisible de AF en los cereales destinados para el consumo humano y animal en 20 µg/kg, así como los lineamientos y requisitos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos. Respecto al nivel de AFM1 en leche, la NOM-184-SSA1-2002 especifica que el máximo permitido es de 0.5 µg/L (Reyes *et al.*, 2009).

Control y destoxicación aflatoxinas

Las AF no se rompen con la ultrapasteurización, cocción, freído o hervido, fermentación, ni nixtamalización, pero se pueden destruir si se calientan en autoclave con amonio o sodio (Carvajal, 2013).

A. Prevención de la contaminación y el crecimiento fúngico:

La prevención de la contaminación por hongos toxigénicos y su crecimiento, puede ser manejada por algunos de los siguientes métodos:

1. Mejora de las prácticas agrícolas.

El ataque fúngico a los alimentos puede comenzar en el campo, mediante la contaminación de las cosechas por los hongos productores de micotoxinas (Mallmann *et al.*, 2006).

Muchas micotoxinas, en particular las AF, zearalenonas, tricotcenos y alcaloides de ergotaminas, pueden formarse durante el período de crecimiento de las plantas en el campo. Para prevenir esta contaminación, es necesario que se mejoren las prácticas agrícolas, entre otras, usando semillas de calidad y libres de hongos, impidiendo el ataque de los insectos y las enfermedades de las plantas (Mallmann *et al.*, 2006).

Durante el proceso de cosecha es importante que se evite al máximo lesionar físicamente el cereal, pues el daño mecánico está invariablemente asociado con una rápida invasión de hongos. Otro factor importante en el proceso de cosecha es la limpieza de los cereales, pues los residuos que quedan adheridos, pueden ser portadores de especies fúngicas micotoxigénicas. También, para prevenir la contaminación fúngica es importante implantar buenas prácticas de almacenamiento y buenas condiciones ambientales que impidan el ataque de los hongos (Mallmann *et al.*, 2006).

2. Agentes antifúngicos.

La contaminación de las cosechas puede ser prevenida o disminuida usando ácidos como el benzoico, sórbico, propiónico, fórmico y acético. Pequeñas concentraciones de estos fungicidas en los alimentos deben ser efectivas a un pH levemente superior al

del producto. A un mayor pH, gran parte de este ácido se encontrará sin disociar, sin presentar ningún efecto sobre el crecimiento fúngico (Mallmann *et al.*, 2006).

Por otra parte, la cantidad de ácido adicionada al producto almacenado debe estar relacionada con la cantidad de agua del mismo, y debe estar distribuido de una manera uniforme a en todo el volumen a tratar. Por el contrario, la utilización de estos ácidos en bajas concentraciones puede llevar al riesgo de que se produzca un incremento en la capacidad toxigénica de determinados hongos (Mallmann *et al.*, 2006).

3. Ingeniería genética

El genoma de las plantas tiene influencia notable sobre las contaminaciones fúngicas y en la subsecuente biosíntesis de micotoxinas, por eso la importancia de desarrollar nuevas variedades, mediante la ingeniería genética, capaces de resistir el ataque de los hongos o inhibir la producción de toxinas. Diversos investigadores han encontrado variedades de semillas que presentan diferencias significativas en relación a la contaminación por *Aspergillus flavus* y su consecuente producción de AF. Estas diferencias pueden ser por diversos factores y el genoma de la planta puede influir en la expresión de la biosíntesis de la micotoxina. Esto puede ser debido a la síntesis de metabolitos específicos por parte de la planta, de igual forma se ha demostrado que algunos productos naturales pueden reducir la biosíntesis de las micotoxinas en mayor proporción que la de inhibir el crecimiento fúngico (Mallmann *et al.*, 2006).

4. Control de las condiciones de almacenamiento

El almacenamiento de las cosechas tiene un papel importante en la calidad físicoquímica y microbiológica de las mismas. Las especies fúngicas que se desarrollan en un ambiente dado dependen de la humedad, la temperatura, la presencia de microorganismos competidores y de la naturaleza y el estado fisiológico del producto.

Estos y otros factores influyen decisivamente en el metabolismo fúngico y en la capacidad para que los hongos utilicen los alimentos para el crecimiento y producción de sus metabolitos (Mallmann *et al.*, 2006).

B. Descontaminación de micotoxinas en los alimentos.

El mejor método para controlar la contaminación de los alimentos por micotoxinas es la prevención, pero cuando el producto ya está contaminado y va a ser usado como alimento, es necesario eliminar o disminuir esta contaminación (Mallmann *et al.*, 2006).

Un programa para evitar la producción de micotoxinas incluye la prevención de biosíntesis y metabolismo de toxinas en el campo y en el almacenamiento; la descontaminación después de la producción de micotoxinas se refiere al tratamiento poscosecha para remover, destruir o reducir el efecto tóxico. Es difícil impedir la formación de micotoxinas en el campo o en las bodegas, mientras que el monitoreo puede impedir que las micotoxinas se vuelvan una fuente significativa de riesgos para la salud, pues el conocimiento de la contaminación permite la adopción de medidas estratégicas para minimizar el riesgo (Mallmann *et al.*, 2006).

Las estrategias adoptadas en pre o poscosecha serán apropiadas y dependerán principalmente de las condiciones climáticas de cada año en particular. El comprender los factores ambientales que promueven la infección, crecimiento y producción de la toxina es un paso importante para proponer un plan efectivo que busque minimizar la ocurrencia de micotoxinas en alimentos.

La FAO estableció una serie de criterios para determinar si el proceso de descontaminación es apropiado o no; dentro de estos se deben tener en cuenta:

- Destruir, inactivar o eliminar la toxina.
- No producir residuos tóxicos o carcinogénicos en los productos finales o en alimentos obtenidos a partir de animales.

- Mantener el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto.
- No alterar las propiedades tecnológicas importantes de forma significativa.
- Destruir todas las esporas y micelios fúngicos para que no puedan, en condiciones favorables, proliferar y producir nuevas micotoxinas (Mallmann *et al.*, 2006).

Los tres métodos más utilizados son físico, químicos y biológicos. En cuanto a los biológicos tenemos a los microorganismos como las levaduras, concretamente su pared celular (Santin *et al.*, 2003;), y las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacteria* (El-Nezami *et al.*, 2000, 1998; Gratz *et al.*, 2007), han sido estudiados por su capacidad de unirse a las AF y limitar su biodisponibilidad en la dieta, actuando como adsorbentes biológicos (Rubio-Martínez, 2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 son micotoxinas producidas por diferentes hongos que llegan al ser humano por medio de la leche y otros productos lácteos que ingerimos, cuando los animales productores de la leche (vacas) consumen el maíz y otros productos contaminados estos son metabolizados en AFM1 causantes del desarrollo de hepatocarcinomas, por ello es importante su análisis, determinación y su posible eliminación por la fermentación de la leche con bacterias lácticas.

HIPÓTESIS

La cromatografía en placa fina nos permitirá evaluar cualitativamente y cuantitativamente la presencia de aflatoxinas. Dado que la prevalencia de estos metabolitos secundarios en los alimentos y su gran toxicidad hace importante el desarrollo de nuevas técnicas más eficaces para su detección y control.

OBJETIVO GENERAL

Montaje de técnicas rápidas para la determinación e identificación diferentes tipos de aflatoxinas (B1, B2, M1, G1, G2).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Montaje de técnicas a partir de estándares de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2
2. Extracción de aflatoxinas con diferentes solventes a partir de diferentes variedades de maíz criollo.
3. Evaluación de diferentes mezclas de solventes en la resolución de la cromatografía en placa fina.

MATERIALES Y MÉTODO

1. Cromatografía en capa fina en aflatoxinas estándar

Se prepararon cuatro diferentes tipos de AF para ser comparadas con las extraídas del maíz.

A la aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1 que fueron compradas a Sigma en U.S.A en 1mg se le agrego 1mL de acetonitrilo, del cual se tomaron 0.5 mL para agregarle 3mL de acetonitrilo para llegar a una concentración final de 0.16mg/mL a cada una de las AF. El esquema se muestra en el anexo 4.

2. Cromatografía en capa fina en maíz

El análisis de las muestras fue realizado por el método modificado de Barrios *et al.*, (1990). La extracción de las aflatoxinas se hizo a partir de cinco muestras de maíz criollo diferente, proporcionado amablemente por el Dr. Gerardo Ramírez Romero. De cada uno se utilizaron 10 g y con cada muestra fue empleado el método modificado de Thomas *et al.* (1975) para maíz. Las aflatoxinas fueron extraídas al moler 10 g de maíz con 70 mL de metanol/agua (6:4) en un mortero y puestas posteriormente en una parrilla de agitación durante 15 min. Se desgrasó con 30 mL de hexano y 15 mL de solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) en un embudo de separación, de la mezcla resultante, se recuperó la fase acuosa y se dividió en dos para hacer dos extracciones una con 30 mL de cloroformo (CHCl₃) y la otra con 30 mL de diclorometano CH₂Cl₂; se recuperó la fase orgánica y fue filtrado a través de 3 g de carbonato de cobre (CuCO₃) a través de un embudo de filtración rápida. Al filtrado se le agregaron 3 g de sulfato de sodio (Na₂SO₄) para quitar el exceso de agua y se dejó decanto para recuperar la muestra.

La determinación de aflatoxinas se realizó por cromatografía de capa fina (TLC), cada muestra se dejó evaporar por completo y se recuperó con 1 mL de acetonitrilo para posteriormente ser eluída cada muestra en 6 diferentes mezclas de solventes (10 mL por cada uno): cloroformo/acetona/isoporpanol (85:10:5); cloroformo/acetona (70:30); hexano/acetona/cloroformo (15:50:35); dicloro/metanol (80:20); cloroformo/metanol (90:10); eter/metanol/agua (95:4:1).

Las placas fueron reveladas con una luz ultravioleta a 365 nm y 264 nm; posteriormente a cada muestra se le midió el RF. El esquema se muestra en el anexo 4.

3. Extracción de aflatoxina B1 por bacterias

Se realizó una nueva preparación de AFB1 mas diluida para realizarla extracción por bacterias a partir de la concentración de 0.16mg/mL de AF, del cual se tomaron 0.135mL de esta en 3mL de acetonitrilo teniendo así una concentración final de 0.0072 de AF estándar.

Se propagaron las bacterias a partir de cepa *lactobacillus sp* de una medio en estado de latencia. La activación y conteo de las unidades formadoras de las baterías se encuentra en el anexo 1.

Se prepararon 1 tubo con 9mL de agar MRS Broth cada uno afín para este tipo de bacterias, agregándole a cada uno 1mL de las bacterias, las cuales fueron incubadas a 24hrs a 37°C. Posteriormente para la separación de las bacterias del medio se centrifugaron a 5000rpm a 10°C por 10min y se lavaron con solución salina llevado a cabo con dos repeticiones y se recuperaron las bacterias. A las bacterias recuperadas se les agrego directamente 5µL de la AFB1 y 4mL de solución salina para unir las AF a la pared celular delas bacterias por enlaces hidrofóbicos, se dejaron 12hrs en contacto a temperatura ambiente. Para separar las (bacterias conAF) del sobrenadante se centrifugo a 5000rpm, 10 min, 10°C. Después se llevaron dos procesos.

- a) Para separar las AF de las bacterias; A las bacterias se le agregaron 2mL de solución salina y después se pusieron en agitación en frio durante media hora

posteriormente se centrifugo a 5000rpm, 10 min, 10°C para separar las bacterias del sobrenadante que contenía AF, en seguida en un embudo de separación se colocaron el sobrenadante más 10mL de diclorometano el cual se recuperó ya que contenía las AF, se dejó secar y se recuperó con acetonitrilo para hacer una placa con 7.5µL para correrla en cloroformo/metanol (9:1) y revelada con una lámpara de luz ultravioleta a 365nm.

- b) Para separar las bacterias que se pudieron a ver quedado en el sobrenadante; En un embudo de separación se colocó el sobrenadante más 10mL de diclorometano, el cual se recuperó y se dejó secar, después de la extracción se recuperó con acetonitrilo en seguida se hizo una placa con 7.5µL para correrla en cloroformo/metanol (9:1) siendo revelada con una lámpara de luz ultravioleta a 365nm.

Se volvió a repetir el método, pero en esta ocasión mejorando el tiempo de unión de las AF con las bacterias a temperatura ambiente de 12hrs a 24hrs y en la parte de la separación en la agitación en frio de 12hrs a 24hrs.

También se realizó esta técnica con óptimas condiciones para extraer AF en maíz, dejando en contacto las bacterias con el maíz. El esquema del método se muestra en el anexo 4.

4. Identificación de aflatoxinas por HPLC

Para la identificación de AF se usó un equipo de HPLC, fabricante KNAUER de Alemania.

- HPLC cuaternario que consta de un detector de cuatro salidas. Con un volumen de inyección a 10mL, con un flujo de 0.4 mL/min
- Se usó una fase acetonitrilo/agua en una proporción 40:60
- A una longitud de onda de 365nm
- Se usó una columna júpiter5u C18 300A

Las AFB1 fue preparada a diferentes concentraciones: 3 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.025 µg/mL. La preparación de la muestra se indica en el anexo 2.

RESULTADOS***Cromatografía en capa fina en maíz***

Se probó la eficacia de seis diferentes mezclas de disolventes para eluir los estándares de AF de mayor incidencia en alimentos (B1, B2, G1 y G2). Para ello se corrieron los cuatro estándares de AF en seis diferentes mezclas y reveladas con luz UV como se muestran en la figura 5. Las mejores mezclas fueron cloroformo/metanol y éter/metanol/agua, siendo usada la primera por tener mayor eficacia ya que en la segunda el éter es muy volátil y es difícil trabajar con él. En el Anexo 5 se muestra la placa de éter/metanol/agua.

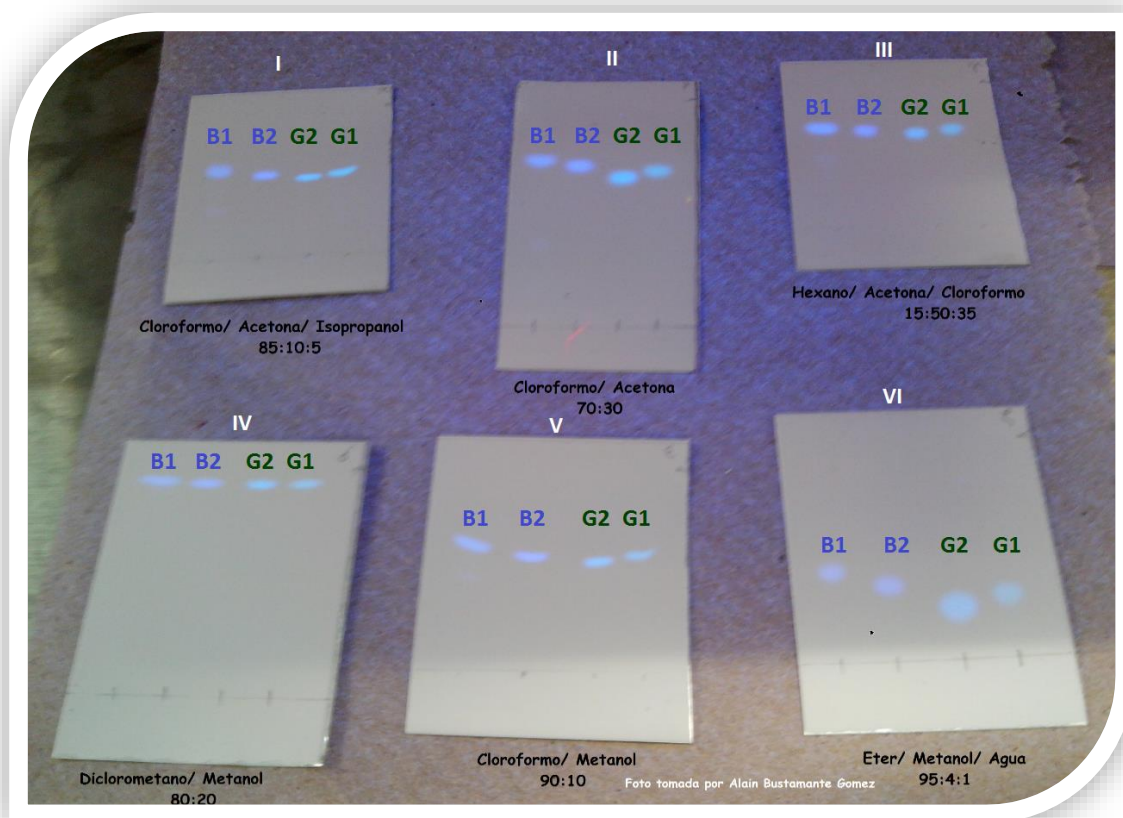


Figura 5. Aflatoxinas corridas en diferentes mezclas de solventes orgánicos.

Se realizó una placa extraídas con diclorometano y cloroformo para maíz 1(m1) para probar cual compuesto tiene mayor afinidad hacia las AF, y se corrió con una mezcla de cloroformo/metanol (9:1), para revelarse bajo luz ultravioleta de 365nm, como se puede observar en la figura 6. Siendo el diclorometano mejor, tiene una mayor afinidad por la polaridad, su estructura le brinda esta propiedad por los dos cloros y metanol los cuales interactúan más con las aflatoxinas formando enlaces hacia las AF.

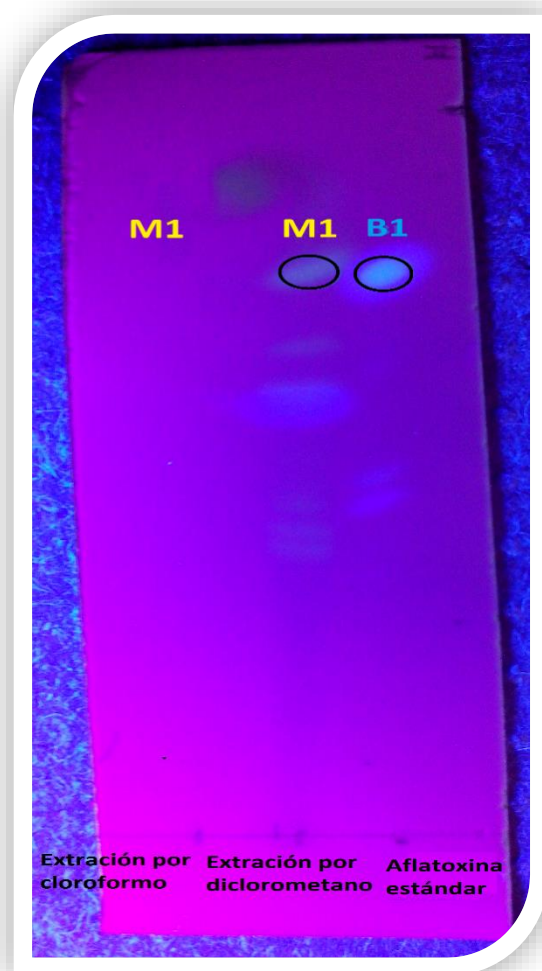


Figura 6. Extracciones de aflatoxinas en la muestra de maíz 1 con dos diferentes disolventes comparados con estándar de aflatoxina B1.

Se hicieron extracciones de AF en m1, maíz 2 (m2) y maíz 4 (m4) con diclorometano, las muestras fueron analizadas por TLC, eluidas en 10 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (9:1) para saber qué tipo de AF se tenía en las diferentes muestras de maíz. Se midió el Rf de las AF y el valor fue el mismo que el de la AFB1. La muestra de m2 estaba muy contaminada y fue imposible extraer AF puras.

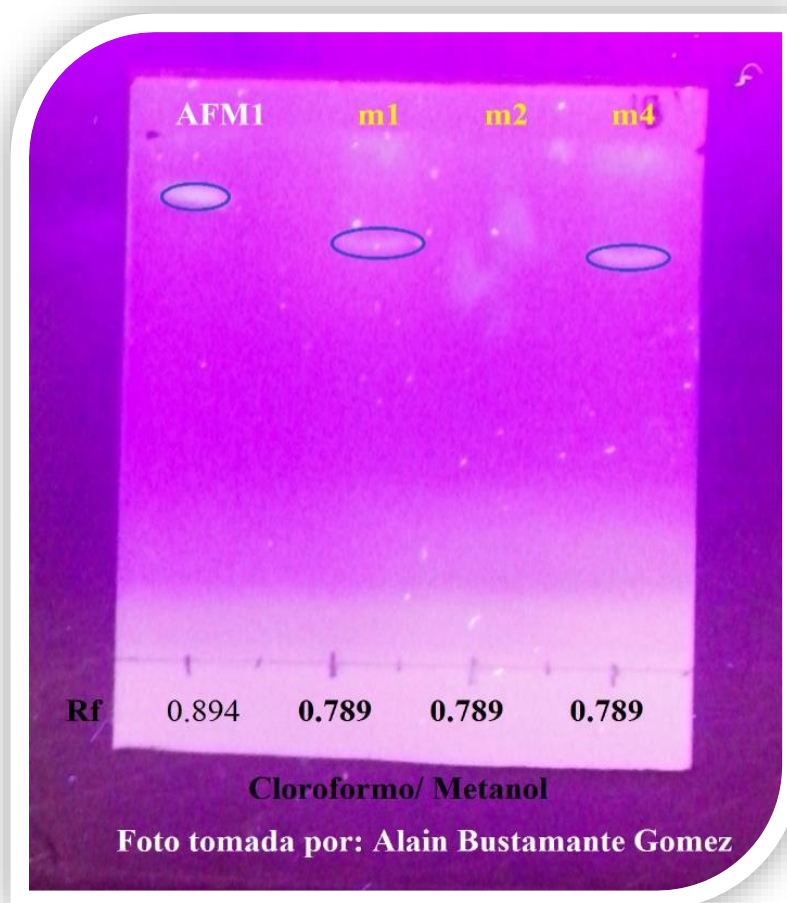


Figura 7. Muestras de maíz en TLC.

Se hicieron repeticiones de las extracciones del maíz en las mismas condiciones pero en esta ocasión igual al maíz 3 (m3), la TLC se eluyó con cloroformo/metanol (9:1) para corroborar el RF de la aflatoxinas extraídas las cuales fueron iguales al de la AFB1, figura 8.

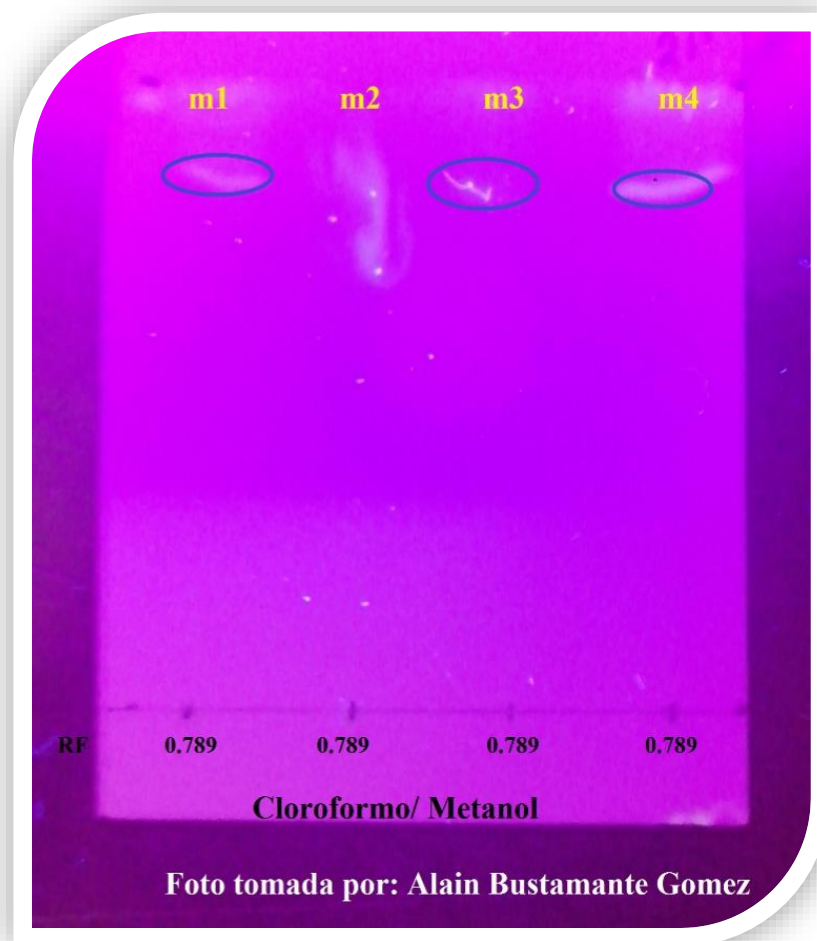


Figura8. Muestras de maíz.

Extracción de aflatoxinas por bacterias lácticas

Este método se llevó a cabo para comprobar que las AF son extraídas de manera más eficientemente con el uso de bacterias lácticas.

En la figura 9, en la placa A, se muestra la extracción del estándar de AFB1 por bacterias lácticas a temperatura ambiente con lapsos de contacto de 12 horas entre las AF y la pared celular bacteriana; la liberación de las AFB1 se hizo durante media hora a temperatura ambiente.

En la placa B, se muestran los extractos con BAL del estándar AFB1 con lapsos de unión de 24 horas y de liberación en frío (5°) durante 24 horas. Los resultados muestran una mejor extracción con la técnica en base al aumento del tiempo de contacto de las bacterias con las AFB1 y con la disminución de la temperatura en el momento de su liberación a menor temperatura.

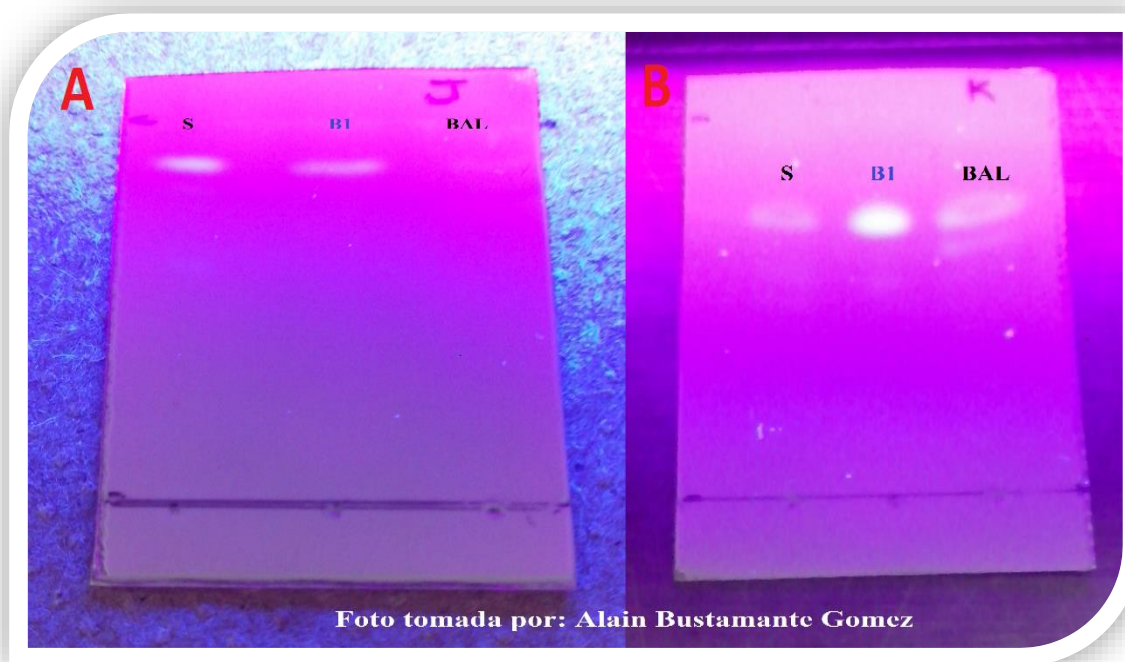


Figura9. Extracción de aflatoxinas B1 estándar usando bacterias ácido lácticas. La extracción B con la técnica mejorada.

En la figura 10, se muestra la extracción de AFB1 a partir de la muestra m1 con BAL a temperatura ambiente, usando los parámetros óptimos para la extracción (5°C). Al comparar este método de extracción con el de solventes, se encontró que con las BAL es posible extraer una mayor cantidad de AF y de una manera más pura, ya que usando solventes las AF pueden perderse en alguna etapa de extracción o bien provocar reacciones que no permitan su detección de forma nítida en las placas de TCL, dando otras coloraciones o dejando impurezas que causen una mancha no definida, barrida a lo largo del carril en las placas.

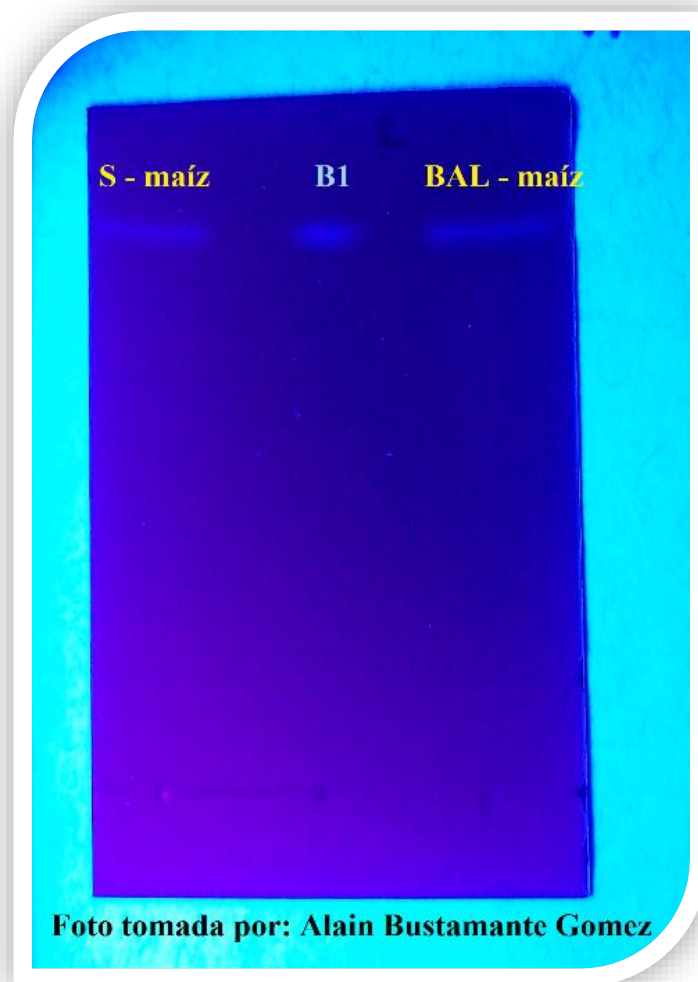


Figura10. Extracción de aflatoxina B1 en maíz con bacterias ácido lácticas comparadas con estándar de aflatoxina B1.

Identificación de aflatoxina por HPLC

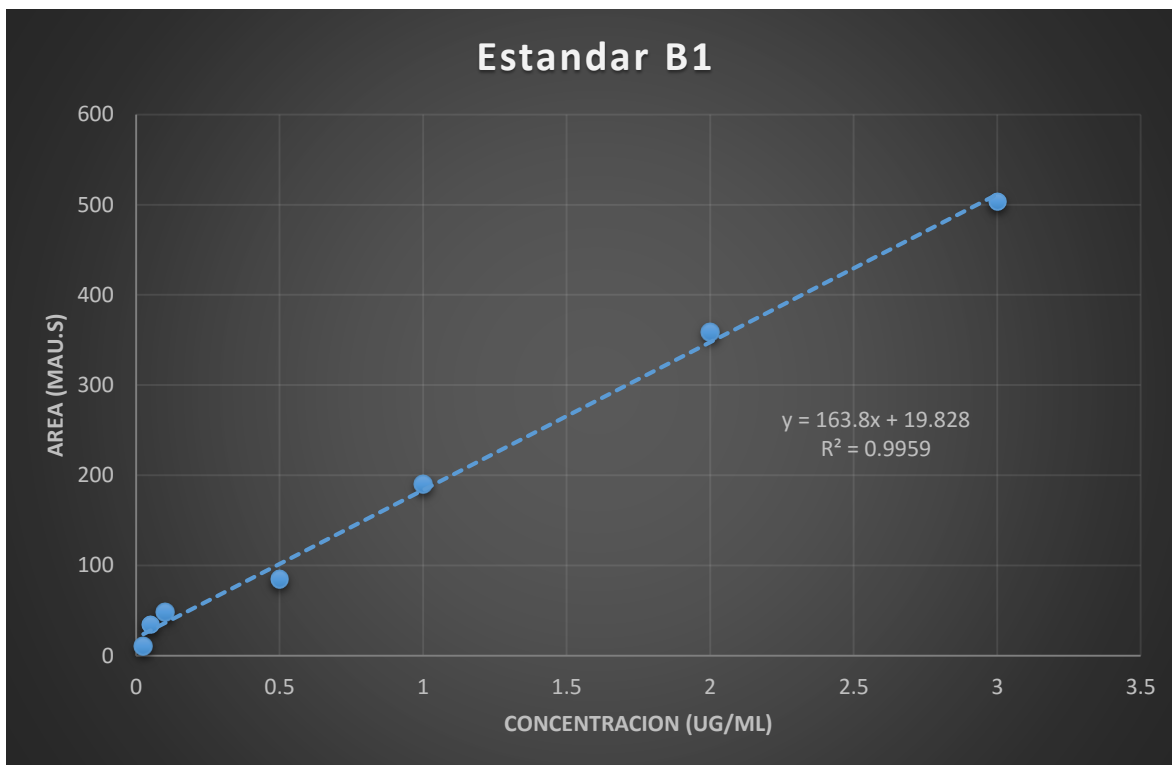
Se hizo una curva patrón de AF B1 a 365 nm para identificar y cuantificar la concentración de AF. Se demostró que la AF B1 tiene un tiempo de retención de 12 minutos (tabla 1).

Se analizó un extracto del maíz contaminado con AFB1 por HPLC en las mismas condiciones, pero no se pudo observar ningún pico en el cromatograma, lo que quiere decir que la cantidad de AFB1 fue poca para ser detectada por este método. Al contrario de la técnica de TLC, donde, con pequeñas cantidades de muestra se pudo observar la presencia de AFB1 y donde no se requiere un instrumental complejo ni muestras totalmente puras. El análisis por el método de HPLC es un análisis de alta sensibilidad y cuantitativo, el cual al no estar la muestra totalmente pura o en muy bajas concentraciones nos puede arrojar resultados parciales y poco claros. El análisis del estándar AFB1 en HPLC permitió la obtención de la curva patrón sin problema. Fue solo con el análisis de los extractos del maíz en TLC y con los cromatogramas de las mismas muestras, donde se demostró que se tenían muchas impurezas. En el anexo 6 se muestra los cromatogramas con la cual fue realizada la tabla 1.

Tabla I. Datos de la curva patrón de aflatoxina B1 a 365nm

Concentracion (ug/mL)	Area (mAU.s)	Tiempo (min.)
3	503.592	12.617
2	359.007	12.617
1	190.395	12.6
0.5	85.186	12.583
0.1	48.497	12.533
0.05	34.677	12.65

0.025	10.799	12.867
-------	--------	--------



Curva patrón de aflatoxina B1 a 365 nm a diferentes concentraciones.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Extracción con solventes de aflatoxinas y su análisis por TCL

De acuerdo con Trombete (2013), la TCL es una de las técnicas que tienen la ventaja de ser simple y de bajo costo, con la visualización directa de los perfiles cromatográficos basados en el color, fluorescencia y aspectos de la corrida. Por lo tanto, es una técnica que se ha utilizado en estudios recientes para determinar AF en trigo, y con el montaje de esta técnica se obtuvieron los parámetros adecuado para la extracción con solventes o con BAL de AFB1 en maíz y cualquier otro tipo de AF.

Los parámetros adecuados para la identificación de AF en TLC fueron: solvente de elución cloroformo/metanol (90:10) recién preparado y dejar correr la muestra hasta 4.5 cm desde el borde inferior de la placa. El cloroformo, quien se encuentra en mayor proporción, tiene un índice de polaridad bajo, como menciona Días Peña (2011), afín a las AF.

Ahondando más, se muestra en la figura 5 que las AF se separan mejor cuando las mezclas son menos polares que el gel de sílice que por sus redes de enlaces coordinados de silicatos, como se muestra en la figura 11 le brindan una propiedad más polar que las disoluciones de placa V y VI de cloroformo/metanol y éter/metanol/agua respectivamente y permiten que las AF interactúen más con la sílice de la placa. Para eluir las aflatoxinas las disoluciones de la placa VI es mejor ya que las logra obtener una mayor distancia entre AF (distintos Rf), pero pese a su volatilidad la idónea es la disolución de la placa IV que no solo eluye con la misma eficacia también es menos volátil.

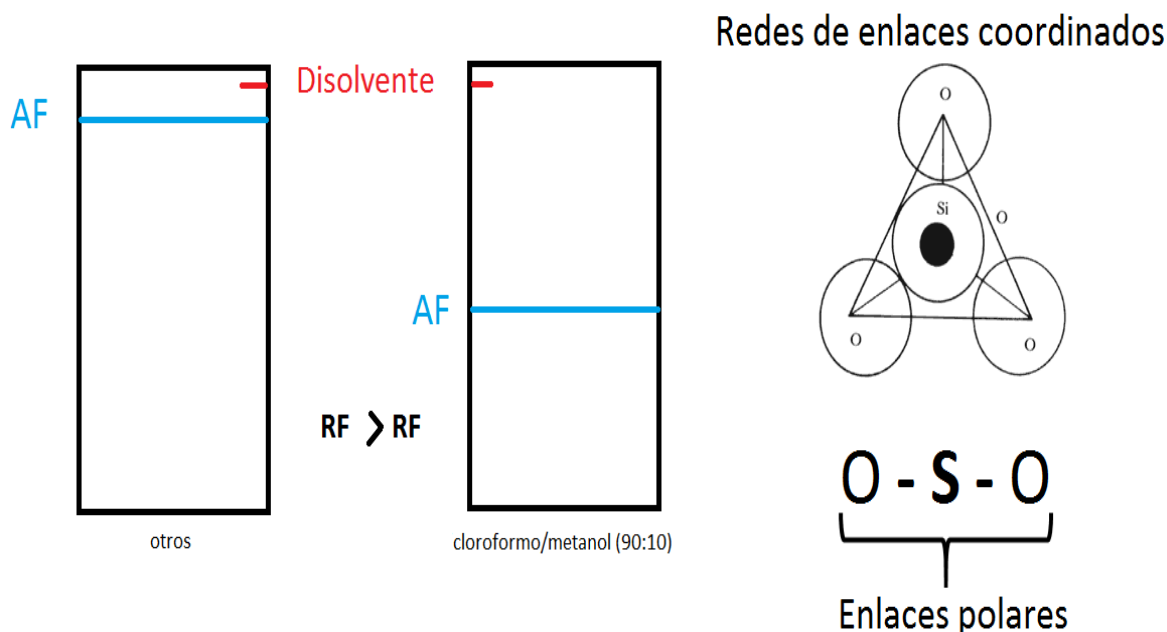


Figura 11. Comparación de mezclas de disolventes atrapando aflatoxinas y enlaces coordinados de silicatos.

Extracción de aflatoxinas por bacterias lácticas

En esta técnica se pudo confirmar que las lactobacilos o bacterias ácido lácticas son capaces de atrapar a las aflatoxinas y son una opción para la extracción y el análisis de las AF, de acuerdo con Tapia-Salazar *et al.* (2010). Las bacterias retienen micotoxinas mediante enlaces hidrofóbicos donde las micotoxinas se unen a la superficie bacteriana. La pared bacteriana interactúa (péptido glicanos, ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos) con las AF por medio de enlaces hidrofóbicos o puentes de hidrógeno, que no son enlaces muy fuertes. Con esta técnica se requirieron condiciones de refrigeración para separar las AF de las bacterias, ya que los enlaces hidrofóbicos son endotérmicos y necesitan calor para poder formarse. Para mayor detalle sería necesario estudiar la estructura de la pared celular bacteriana y la estructura química de las AF para determinar los diferentes tipos de enlaces capaces de formarse.

Identificación de aflatoxina por HPLC

El método de TLC no es un método muy exacto, por lo cual no nos arroja resultados de la concentración exacta para conocer la dimensión de la contaminación por aflatoxinas pero si nos da una idea de que tipo e intensidad aproximada hay de AF. Además es un método muy rápido, con el cual se pudo saber con qué tipo de AF estaba contaminada la muestra de maíz y darnos un estimado de la concentración de contaminación por aflatoxinas que contenía la muestra analizada. Cabe mencionar que el método para extraer aflatoxinas por bacterias resulto ser más lento aunque se consiguió extraer mayor cantidad de AF.

El método de análisis por TLC no es exacto para una investigación rigurosa; es mejor complementar con un análisis en HPLC, método cuantitativo y con mayor exactitud. Esta técnica nos mostró que, a partir del cromatograma realizado con el estándar de la AFB1, es una técnica rápida para la identificación, práctica y exacta, para saber que AF se tiene. Se debe considerar que los resultados pueden variar en función de variantes como disolventes y concentración de estos mismos el tiempo de retención puede variar así que lo más recomendable es usar las mismas condiciones al hacer un análisis. Para las aflatoxinas extraídas del maíz no se pudo observar ningún pico por que la muestra no estaba totalmente pura y este método, como ya se mencionó, es muy sensible.

CONCLUSIONES

El montaje de técnicas rápidas para la determinación e identificación diferentes tipos de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) es posible con la combinación de diferentes técnicas de extracción, solventes y bacterias lácticas-solventes, para analizar los extractos obtenidos por TLC, y HPLC.

La comparación de la extracción de las AF de diferentes muestras de maíz criollo contaminado, con diferentes combinaciones de solventes, nos permitió saber que el diclorometano es mejor disolvente para la extracción.

Se logró la evaluación de diferentes mezclas de solventes en la resolución de la cromatografía en placa fina, el cual fue cloroformo/metanol (90:10) la mejor combinación de solventes.

El método de TLC no es un método muy exacto, por lo cual no nos arroja resultados de la concentración exacta de contaminación por aflatoxinas pero si nos da una aproximación de que tanta aflatoxina puede haber en la muestra analizada y de forma rápida y fácil de realizar. Este método nos permitió conocer que la principal AF presente en la muestra de maíz fue la B1.

Aunque cabe mencionar que el método para extraer aflatoxinas por bacterias resultó ser más lento, pero más práctico al disminuir la cantidad de solventes y las etapas de extracción, para lograr una adecuada extracción de aflatoxina.

Los resultados arrojados por la técnica de cromatografía en capa fina y por HPLC, permiten el análisis de AF presentes en una muestra, pero con diferente sensibilidad. La comparación de dos métodos de extracción de las AF nos permitió determinar que las AF presentes en la muestra dependerán también de las condiciones de preparación de la muestra a analizar.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca M.L.** 2000. Taxonomy y identification of the species involved in nosocomial aspergillosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 17(3): S79-S84.
- Barrios-González J., Rodríguez G.M., Tomasini A.** 1990. Environmental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid-state fermentation. *J. Ferm. Bioeng.* 70 (5), 329-333.
- Burdaspal P.A. y Gorostidi A.**1987. Prospección, sobre contaminación por aflatoxinas. *Alimentaria.* XXIV (186): 21-24
- Carvajal M, Bolanos A, Rojo F, Mendez I.** 2003 Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J Food Prot.;* 66 (10): 1885-1892.
- Carvajal Magda.** 2013. Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 16, núm. 2, -diciembre. pp. 109- 120
- CODEX. Codex Alimentarius. General Standard for Contaminants and Toxins in Foods. Codex Standard 193-195.** 2010. Annex IV-B (Rome: Food and Agriculture Organization and World Health Organization of the United Nations). (CODEX STAN 2005; 193-195): p. 45.
- Díaz Peña E. M., Sacristán San Cristóbal M., Borja Alarcón A., Carlos Vicente C., Legaz González M. E.** 2011. Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. *Reduca (Biología).* Rev. Serie Técnicas y Métodos. ISSN: 1989-3620. Pp4 (3): 48-78.

-
-
- Diener, U.L. & Davis, N.D.** 1986. Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop (eds. Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. & Renfro, B.L.). 298-307
- Eaton, D.I., Ramsdell, H.S., & Neal, G.E.** 1994. The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. (ed. Eaton, D.L. & Groopman J.J.) 45-72 (Academic Press, Inc., San Diego, USA).
- El-Nezami H., Kankaanpaa P., Salminen S., Ahokas J.** 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem. Toxicol.* 36: 321-326.
- El-Nezami H., Mykkänen H., Kankaanpaa P., Salminen S., Ahokas J.** 2000. Ability of Lactobacillus and Propionibacterium strains to remove aflatoxina B1 from the chicken duodenum. *J Food Protect.* 63: 549-552.
- Florencia G. Segura, Villarreal E. B. Oscar Agustín, Franco G. F. Javier, Jorge H. Hernández, Avelar Karina, Correa M. David.** 2013. Detección de aflatoxina b1 en alimentos balanceados para conejos. *Rev. REDVET Electrón. vet.* Volumen 15 N° 01. Pp. 1-7
- Ghazani M.H.M.** 2009. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). *Food Chem. Toxicol.* 47: 1624e1625.
- Gimeno A.** 2002. Los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal; conceptos, problemas, control y recomendaciones. <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/los-hongosmicotoxinas-alimentacion-t362/p0.htm>.
- Giorni P., Battilani P., Pietri A., Magan N.** 2008. Effect of aw and CO2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *Int. J. Food Microbiol.* 122 (1-2): 109-113.
- Gqaleni N., Smith J.E., Lacey J., Gettinby G.** 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(3): 1048-1053.

- Gratz S., Wu Q.K., El-Nezami H., Juvonen R.O., Mykkänen H., Turner P.C.** 2007. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3958-3964.
- Graybill T.L., Casillas E.G., Pal K., Townsend C.A.** 1999. Silyl triflate mediated ring-closure and rearrangement in the synthesis of potential bisfuran-containing intermediates of aflatoxin biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (34): 7729-7746.
- Gutiérrez A.** 1982. Prueba de eficiencia del propionato de amonio y propionato de calcio como inhibidores del crecimiento de *Aspergillus Flavus* y de la producción de su alfatoxina B1 en alimento concentrado para cerdos. Tesis. México, D.F. UNAM.
- Gutiérrez R., S. VegaI, J.J. Pérez, J.L. Ruiz, A. Yamazaki, J.G. Rivera, Georgina UrbánI, A. Escobar.** 2013. Evaluación de aflatoxina M1 en leche orgánica producida en Tecpatán, Chiapas, México. *Rev. Salud Anim.* 35 (1): 33-37.
- Guzmán de Peña D.** 2007. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud pública de México.* vol.49, no. 3. Pag233.
- Guzmán de Peña Doralinda.** 2007. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Rev. Salud pública de México /* vol.49, no. 3, Pp. 227-235.
- Hartley R. D., Nesbitt B. F. and O'Kellv J.** 1963. Toxic metabolite of *A.flavus*. *Nature.* 198: 1056-1058.
- Horn W. Bruce, Moore G. Geromy.** 2009. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. The Mycological Society of America, Lawrence Pp. 423-429
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>.
- IARC. ARC** 2002. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. International Agency for Research on Cancer. World Health

Organization International Agency For Research On Cancer: ARCPress Lyon-France. Available from:

Isil Algul, Derya Kara. 2014. Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxina B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey. *Food Chem.* 157, 70–76.

Kensler T.W., Egner P.A., Davidson N.E., Roebuck B.D., Pikul A., Groopman J.D. 1986. Modulation of aflatoxin metabolism, aflatoxin-N7-guanine formation, and hepatic tumorigenesis in rats fed ethoxyquin: role of induction of glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 46: 3924-3931.

Kensler, T.W., Qian, G.-S., Chen, J.-G., Groopman, J.D. 2003. Molecular pathway of aflatoxin detoxification. *Nature Reviews Cancer*, 3, 321-329.

Landeros P., M. Noa, Y. López, D.G. González, E. Noa, M. Real, C. Juárez, M.S. Medina. 2012. Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Rev Salud Anim.* 34 (1):40-45.

López-Colorado Lopez A.L.1990. Evaluación del grado de contaminación por aflatoxinas en maíz y sus productos. México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana. 1990. 100 p.

Mallmann A. Carlos, Hummes R. Ricardo, Leandro Giacomini.2006. Factores de formación de las micotoxinas y sus formas de control. Laboratorio de análisis micotoxicológicos. Departamento de medicina veterinaria preventiva. Universidade Federal de Santa. Brasil. *Rev. LAMIC*

Méndez Albores Abraham y Moreno Martínez Ernesto.2009. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Ciencia.* Pp. 1-7

Minto R.E., Townsend C.A. 1997. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Chem. Rev.* 97 (7): 2537-2555.

Naranjo L. L. María. 2013. Principales micotoxicosis asociadas al consumo de maíz y sus subproductos. Tesis. MSc Biotecnología-Bióloga. 58 pp.

NOM. Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1- 2002. Productos y Servicios. Leche, Fórmula Láctea y Producto Lácteo Combinado. Especificaciones Sanitarias Prefacio. 2002.

Novoa Urrego R. J., Díaz G. J. 2006 Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. Rev Fac Med Univ Nac Colomb. Vol. 54 No. 2 Pp. 10

Olmedo-Obrero G.2010. Optimización de un medio de cultivo para la producción de fitasa por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. Maestría en Biotecnología. México. Universidad Autónoma Metropolitana. 2010. 87 p.

OPS-OMS. 1983. Micotoxinas. Criterios de la salud ambiental 11: Micotoxinas (Organización Mundial de la Salud. Washington, USA). Publicación Científica 453.

Pérez J, Gutiérrez R, Vega S, Díaz G, Urbán G, Coronado M, et al. 2008. Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches crudas, ultrapasteurizado y orgánicas producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano. *Rev Salud Anim.*; 30 (2): 103-109.

Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M. & Piva G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.* 47, 984e991.

Rahimi E., Bonyadian M., Rafei M. & Kazemeini, H. R. 2010. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food Chem. Toxicol.* 48, 129e131.

Raper K.B. and Fennell D.I. 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins Company. 686.

Reglamento (UE) No. 165/2010 de la COMISIÓN de 26 de febrero de 2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE)

no.1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, 27.2.2010 (2010).

Reyes V. Waldina, Patricio M. Severiano, Isaías E. Víctor H., Nathal Vera M. Adriana, De Lucas Palacios Ernesto, Rojo Federico. 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Rev. Tec Pecu Méx* 2009; 47(2):223-230

Ribeiro J.M.M., Cavaglieri L.R., Fraga M.E., Direito G.M., Dalcero A.M., Rosa C.A.R. 2006. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. *Lett. Appl. Microbiol.*42: 179-184.

Rubio-Martínez R. 2011. Incidencia de aflatoxinas en leche de oveja y derivados en Castilla-La Mancha, Tesis doctoral., España, Universidad De Castilla-La Mancha, 256p.

Santin, E., Paulillo, A.C., Krabbe, E.L., Alessi, A.C., Polveiro, W.J.C., Maiorka, A. (2003). Low level of aflatoxin in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeast as adsorbent of aflatoxin. *Archives of Veterinary Sciences*, 8,51-55.

Skrbic Biljana, Zivancev Jelena, Antic Igor, Godula Michal. 2014. Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: assessment of human and animal exposure. *Food Control* 40: 113- 119.

Stack M.E. & Pohland A.E. 1975. Collaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of aflatoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58 (1): 110-113.

Sweeney, M.J. & Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 149-163.

Tapia-Salazar M, García-Pérez O. D., Nieto-López M., Ricque-Marie D., Villarreal-Cavazos D., Cruz-Suárez Lucia E. 2010. Uso de sequestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. México. pp. 514-546.

-
-
- Torres Villar M., Aparicio Medina J. M., García Gómez J. L.** 2014. La aflatoxicosis: Un problema a resolver dentro de la Medicina Veterinaria. Cuba. Revista electrónica de Veterinaria - ISSN 1695-7504. Volumen 15 N° 02. Pp. 1-34
- Trejo Vázquez Irma.** 1999. El clima de la selva baja caducifolia en México. Investigaciones Geográficas Boletín 39. Pp. 40-52
- Urbán G, Pérez J, Martínez F, Gutiérrez R, Vega S, Coronado M, et al.** 2010. Aflatoxina M1 en leche y queso de cabra producidos en Apaseo El Grande, Guanajuato, México. *Rev Salud Anim.*; 32 (2): 84-88.
- Valecia Argumedo L.M.** 1984. Determinación de aflatoxinas en muestra de maíz de los molinos para nixtamal del Distrito Federal. Tesis. Lic. Nutrición y Ciencia de los Alimentos. México, D.F. UIA. 126 pp.
- Vallejo López M.** 2012. Determinación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 presentes en harina en harina de maíz del sector Tumbaco mediante el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Tesis licenciatura. Departamento de ciencias de la vida ingeniera en biotecnología. 2012. Pp. 77
- Vaqueiro C. y Morales J.C.** 1975. Aflatoxinas. *Rev. Tecnol. Alim.* 10:53-58.
- Vega y León S, Gutiérrez R, Coronado M, Perez J, Ramírez A.** 2009. Leche orgánica una propuesta para la ganadería sustentable. Realidades y posibilidades. En Producción sustentable calidad y leche orgánica. Eds: García L y Brunett L. Casa abierta al tiempo. Universidad Autónoma Metropolitana. Pp. 57-84.
- Zeluta A., Maurizi A., Frigola A., Esteve M. J., Coli R. & Burini G.** 2009. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.* Pp 19: 380 - 385.

ANEXO 1**Cálculo RF de aflatoxina estándar**

- ✚ Los cálculos de Rf de la placa que aparece en la figura 5 corridas en Cloroformo/Metanol 9:1.

Aflatoxina	Valores	Resultado
B1	1.4 / 3.8	0.4
B2	1.1 / 3.8	0.31
G1	0.8 / 3.8	2.28
G2	0.9 / 3.8	2.57

ANEXO 2

- ✚ Curva patrón de AFB1 partiendo con una concentración de **0.16mg/mL** para HPLC.

Curva parte 1

Se hizo una curva de la AB1 partiendo de 0.16mg/mL de AFB1 como se muestra a continuación.

I.	3	3 µg/mL
II.	2	2 µg/mL
III.	1	1 µg/mL
IV.	0	0.5 µg/mL
V.	-1	0.1 µg/mL
VI.	-2	0.05 µg/mL
VII.	-3	0.025 µg/mL

Usando la formula conocida $C_1V_1=V_2C_2$

III. Así para tener una concentración de **1 µg/mL** :

$$V_1 = \frac{V_2 C_2}{C_1} = \frac{(1 \mu\text{g/mL})(3\text{mL})}{0.16\text{mg/mL}} = ?$$

Con una conversión primero de **0.16mg/mL**.

$$\frac{0.16\text{mg}}{\text{mL}} \left(\frac{1\mu\text{g}}{0.001\text{mg}} \right) = 160\mu\text{g/mL}$$

Entonces:

$$V_1 = \frac{1\mu\text{g/mL}(3\text{mL})}{160\mu\text{g/mL}} = 0.01875 = 0.019\text{mL}$$

Se convierte para una medición más exacta

$$0.019\text{mL} \left(\frac{1\mu\text{L}}{0.001\text{mL}} \right) = 19 \mu\text{L}$$

Se necesitan tomar **19 µL** de la AFB1 estándar para 3mL.

Curva parte 2

Para los demás puntos de la curva se hicieron de la siguiente manera.

I. Así para 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$V_1 = \frac{3\mu\text{g}/\text{mL}(3\text{mL})}{160\mu\text{g}/\text{mL}} = 0.05625\text{mL}$$

Se convierte para una medición más exacta

$$0.05625\text{mL} \left(\frac{1\mu\text{L}}{0.001\text{mL}} \right) = 56.25 \mu\text{L}$$

Se necesitan tomar **56.25 μL** de la AFB1 estándar para 3mL.

II. Así para 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$V_1 = \frac{2\mu\text{g}/\text{mL}(3\text{mL})}{160\mu\text{g}/\text{mL}} = 0.0375 \text{ mL}$$

Se convierte para una medición más exacta

$$0.0375 \text{ mL} \left(\frac{1\mu\text{L}}{0.001\text{mL}} \right) = 37.5 \mu\text{L}$$

Se necesitan tomar **37.5 μL** de la AFB1 estándar para 3mL.

IV. Así para 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$V_1 = \frac{0.5\mu\text{g}/\text{mL} (3\text{mL})}{160\mu\text{g}/\text{mL}} = 0.009375 \text{ mL}$$

Se convierte para una medición más exacta

$$0.009375 \text{ mL} \left(\frac{1\mu\text{L}}{0.001\text{mL}} \right) = 9.375 \mu\text{L}$$

Se necesitan tomar **9.375 μL** de la AFB1 estándar para 3mL.

V. Así para $0.1 \mu\text{g/mL}$

$$V_1 = \frac{0.1 \mu\text{g/mL} (3\text{mL})}{160 \mu\text{g/mL}} = 0.001875$$

Se convierte para una medición más exacta

$$0.001875\text{mL} \left(\frac{1 \mu\text{L}}{0.001\text{mL}} \right) = 1.875 \mu\text{L}$$

Se necesitan tomar **1.875 μL** de la AFB1 estándar para 3mL.

VI. Así para $0.05 \mu\text{g/mL}$

$$V_1 = \frac{0.05 \mu\text{g/mL} (3\text{mL})}{160 \mu\text{g/mL}} = 0.0009375 \text{ mL}$$

Se convierte para una medición más exacta

$$0.0009375 \text{ mL} \left(\frac{1 \mu\text{L}}{0.001\text{mL}} \right) = 0.9375 \mu\text{L}$$

Se necesitan tomar **0.9375 μL** de la AFB1 estándar para 3mL.

VII. Así para $0.025 \mu\text{g/mL}$

$$V_1 = \frac{0.025 \mu\text{g/mL} (3\text{mL})}{160 \mu\text{g/mL}} = 0.00046875 \text{ mL}$$

Se convierte para una medición más exacta

$$0.00046875 \text{ mL} \left(\frac{1 \mu\text{L}}{0.001\text{mL}} \right) = 0.46875 \mu\text{L}$$

Se necesitan tomar **0.46875 μL** de la AFB1 estándar para 3mL.

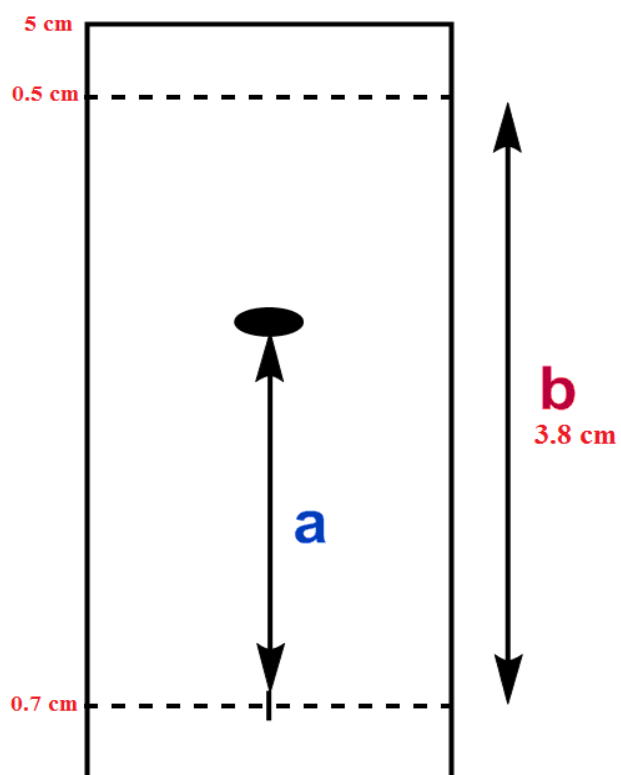
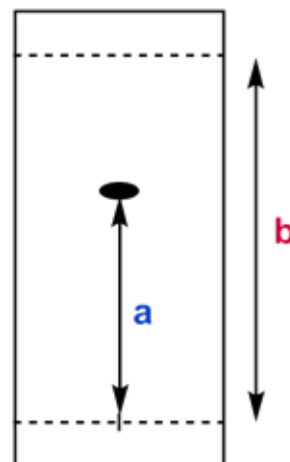
✚ Concentración del maíz 1 para HPLC

Maíz
<p>Conversión:</p> $1\mu\text{L} \left(\frac{0.001\text{mL}}{1\mu\text{L}} \right) \left(\frac{0.16\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 0.00016\text{mg}$ <p>Por lo tanto:</p> <p>El 100% es 0.00016mg es lo que se colocó de la aflatoxina estándar. Y el 80% sería 0.00013mg lo que quizá pueda tener en mi muestra.</p> $15\mu\text{L} \left(\frac{0.001\text{mL}}{1\mu\text{L}} \right) (\text{¿? de AF}) = 0.00013\text{mg de AF}$ <p>Se tomó de la muestra con concentración de 0.0086mg/mL para tener una concentración de 0.5 mg/mL la cual fue la mitad de la curva patrón.</p> <p>Entonces primero se convierte:</p> $0.00086 \left(\frac{1\mu\text{g}}{0.001\text{mg}} \right) = 8.6\mu\text{g/mL}$ <p>Luego:</p> <p>Se usa la formula conocida que dice $C_1V_1 = V_2C_2$</p> $V_1 = \frac{V_2C_2}{C_1} = \frac{(0.5 \mu\text{L/mL}) (3\text{mL})}{8.6\text{mg/mL}} = 0.17\text{mL}$ <p>Se convierten para una mayor exactitud:</p> $0.174\text{mL}(1\mu\text{L}) = 174 \mu\text{L}$

ANEXO 3

✚ Medidas de las placas gel de sílice tipo (TCL 60 F₂₅₄).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida del compuesto (a)}}{\text{Distancia recorrida del compuesto (b)}}$$



✚ Características de la columna

Jupiter C18
Phenomenex,
Fase Reversa
300Å
5u
250 x 360nm
25 cm de largo
4.6 mm de diámetro

✚ Procedimiento de almacenamiento de la columna

Se sacó el volumen de la columna con la formula $V=\pi r^2 L$ y se almaceno en una fase de 65% acetonitrilo y 35% agua

V= Volumen en mL

r=Radio en cm

L= Largo en cm

Así:

$$V= 3.1416 (0.23)^2 (25\text{cm})$$

$$V= 4.155\text{cm}^3 \text{ es igual a } 4.155\text{mL}$$

Por 5 veces el volumen de la columna, son 20,775mL

Para el lavado de la columna se lleva a un flujo de 0.2mL/min durante:

$$20,775 \frac{(1\text{min})}{0.2\text{mL}} = 103.875 \text{ min}$$

Procedimiento de lavado de la columna

Se limpió con 10 veces el volumen de la columna usando la fórmula de $V = \pi r^2 L$

V= Volumen en mL

r=Radio en cm

L= Largo en cm

Así:

$$V = 3.1416 (0.23)^2 (25\text{cm})$$

$$V = 4.155\text{cm}^3 \text{ es igual a } 4.155\text{mL}$$

Por 10 veces el volumen de la columna, son 41,55mL

Para el lavado de la columna se lleva a un flujo de 0.2mL/min

$$41.55\text{mL} \left(\frac{1\text{min}}{0.2\text{mL}} \right) = \mathbf{207.74 \text{ min}}$$

La columna se puede lavar con:

1. 95%agua / 5% acetonitrilo (Para remover buffer)
2. THF
3. 95%acetonitrilo / 5% agua
4. Fase móvil

Limpieza y guardado del sistema HPLC

Para uso el sistema se limpió a un flujo de 1.0 con la fase móvil que se usó, como primer paso se tiene que abrir la válvula de escape para sacar el aire contenido.

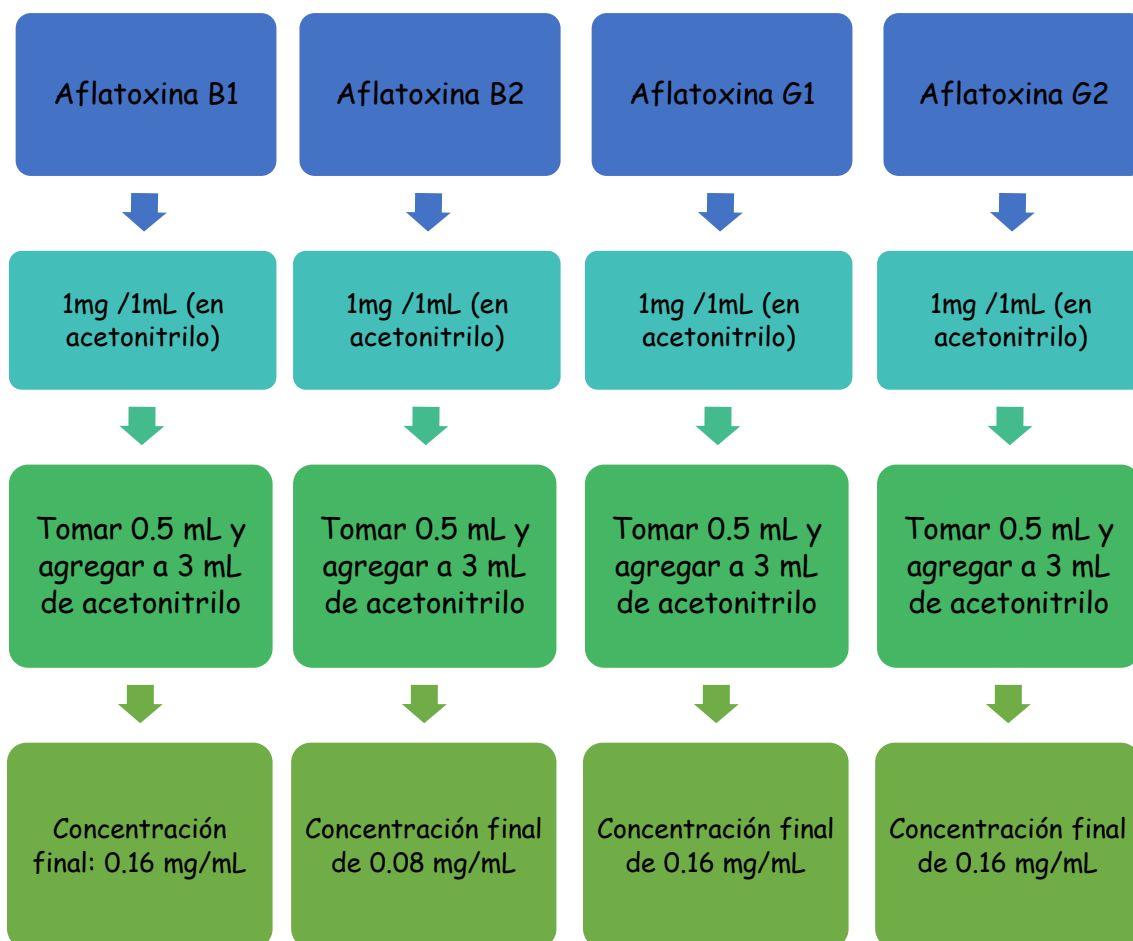
Para el guardado del sistema se usó un flujo 1.0 con una fase 65% acetonitrilo y 35% agua y posteriormente se drena, tarda aproximadamente 15 minutos y al finalizar todo es envuelto para evitar la contaminación.

ANEXO 4

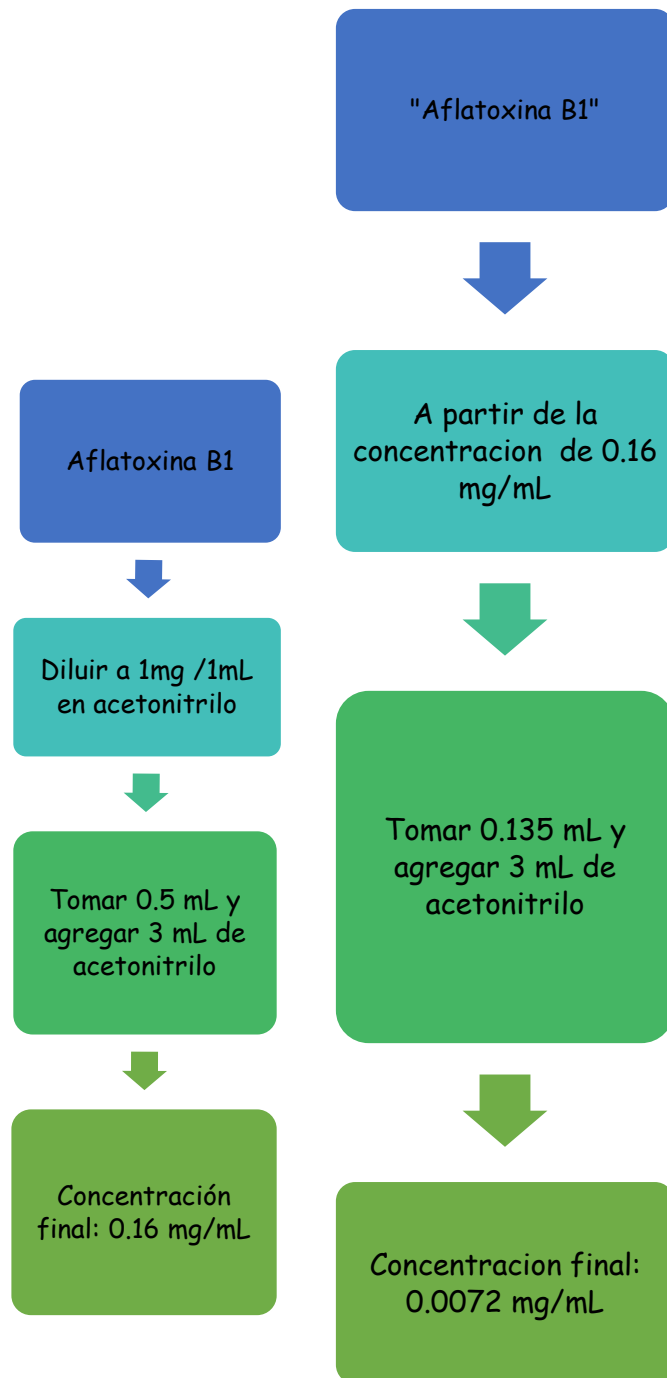
Método de extracción de aflatoxinas por TCL



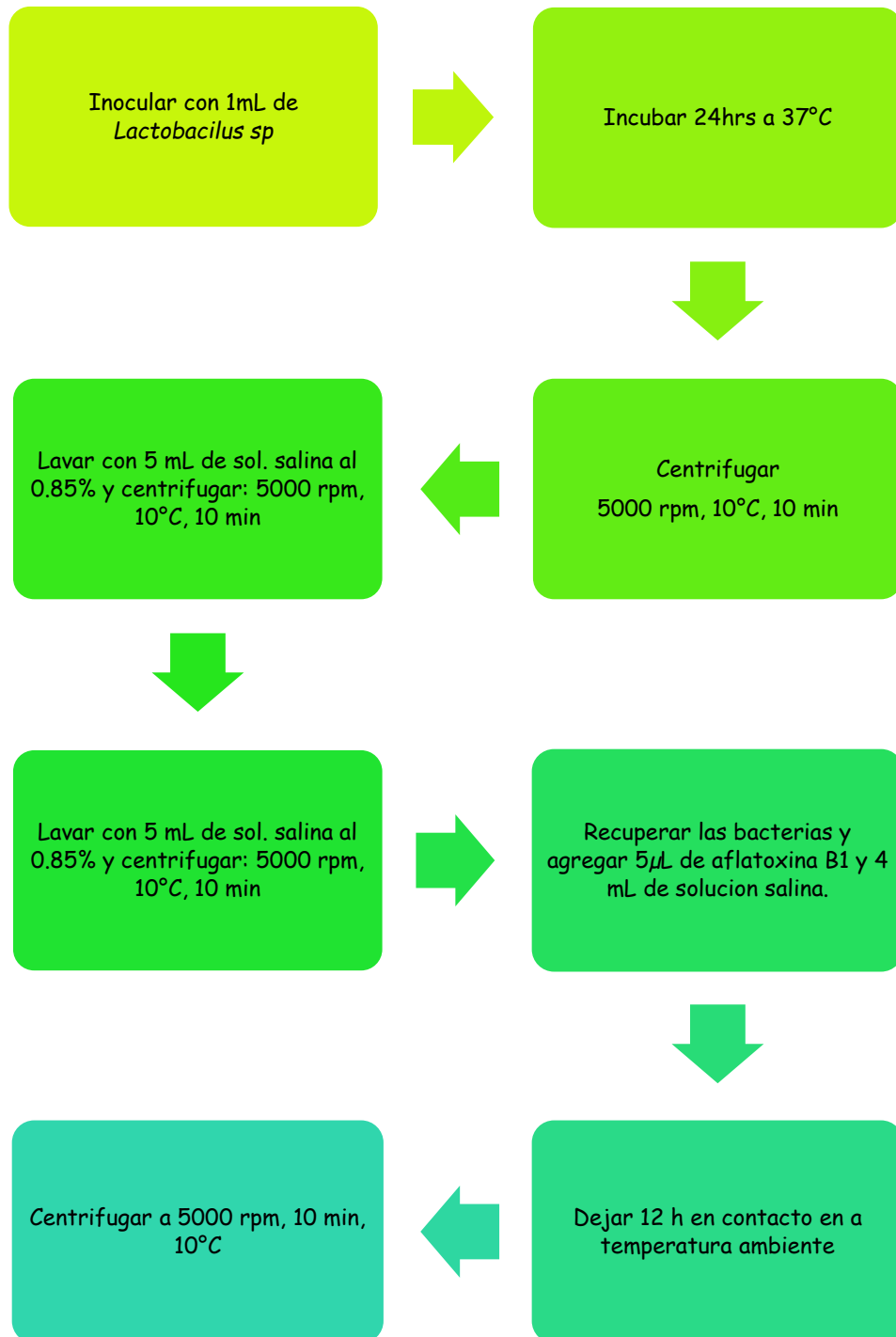
Preparación de estándares de aflatoxinas: para ser comparadas con las extraídas del maíz.

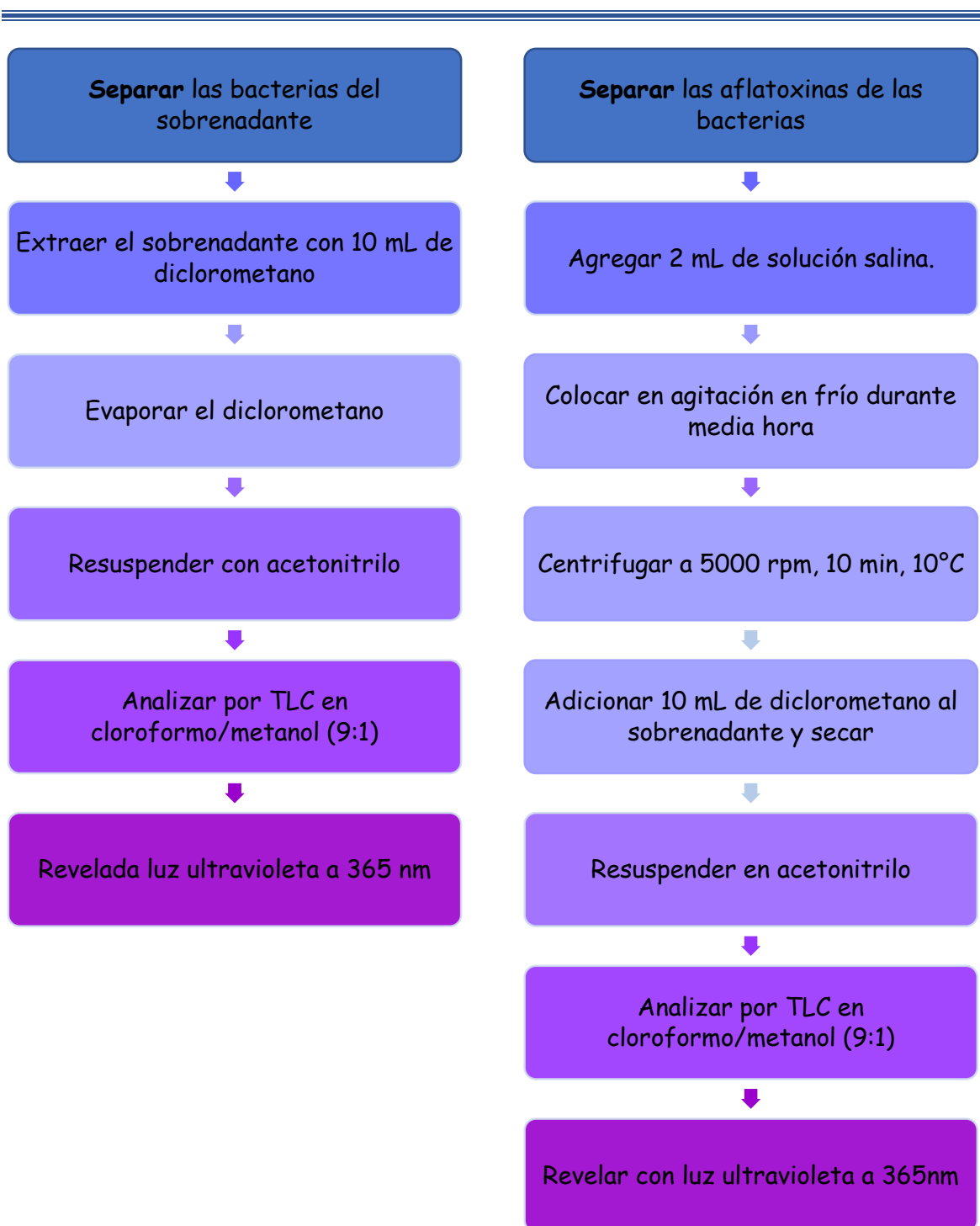


Preparación de estándares de aflatoxina B1

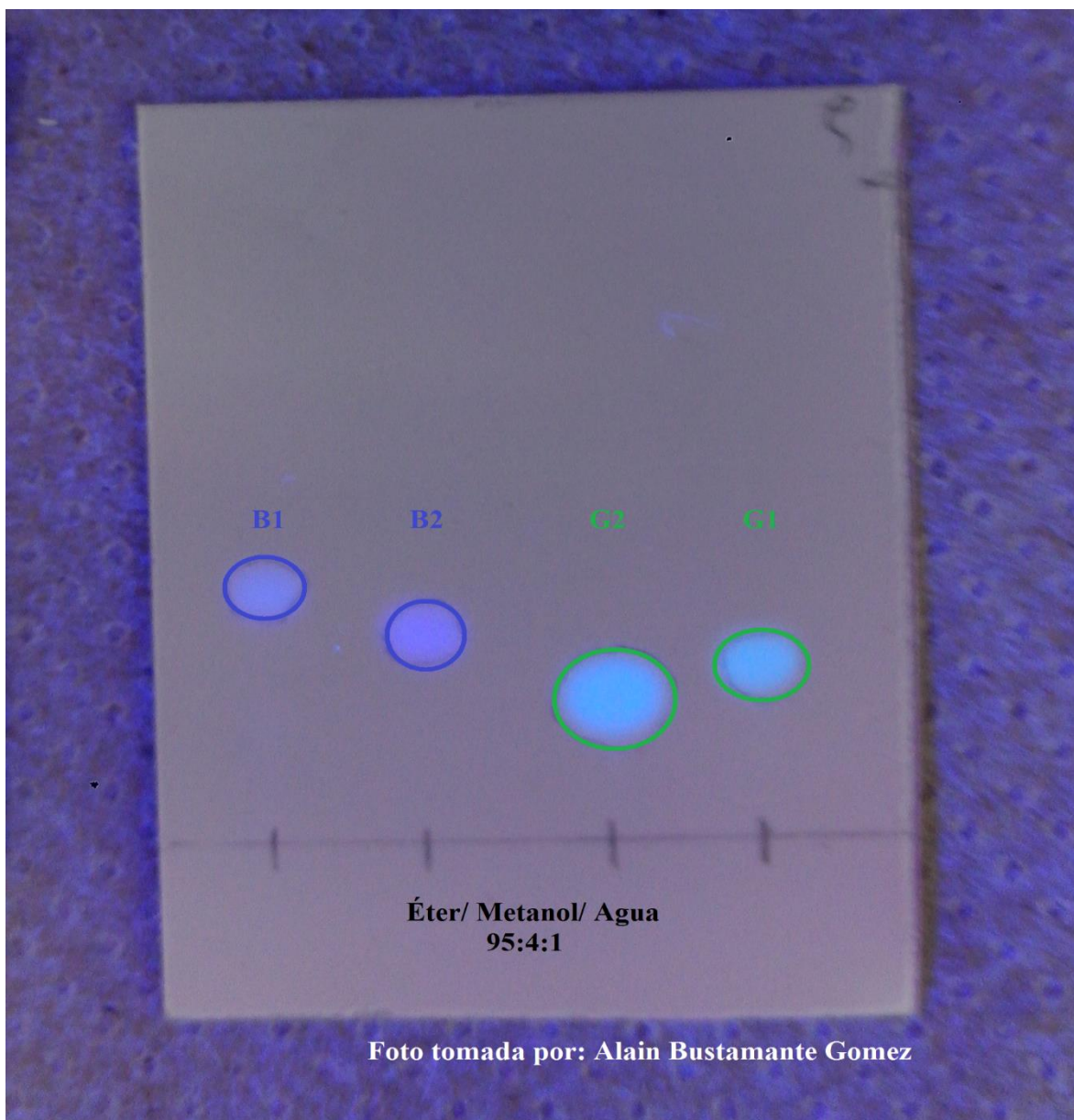


Extracción de aflatoxina B1 por bacterias





ANEXO 5

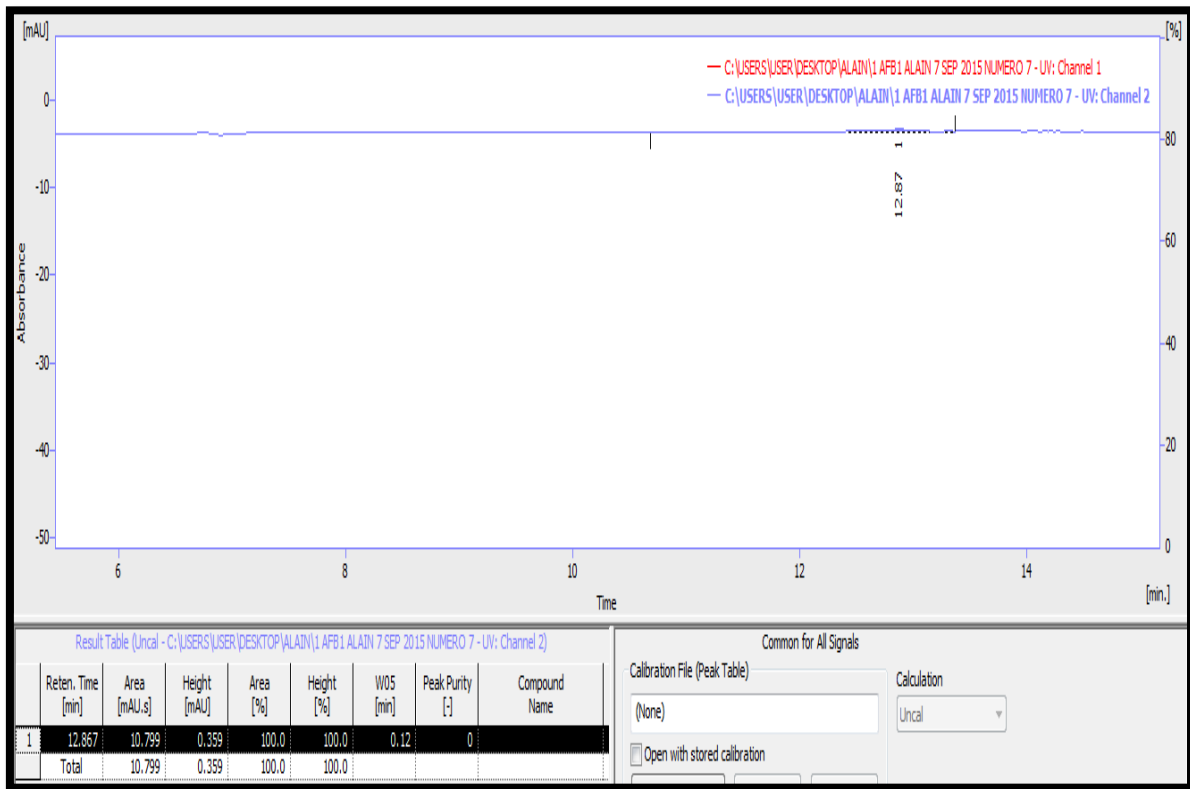


Aflatoxinas estándares B1, B2, G1 y G2 diluidas en éter/metanol/agua en las proporciones 94%, 4% y 1% respectivamente

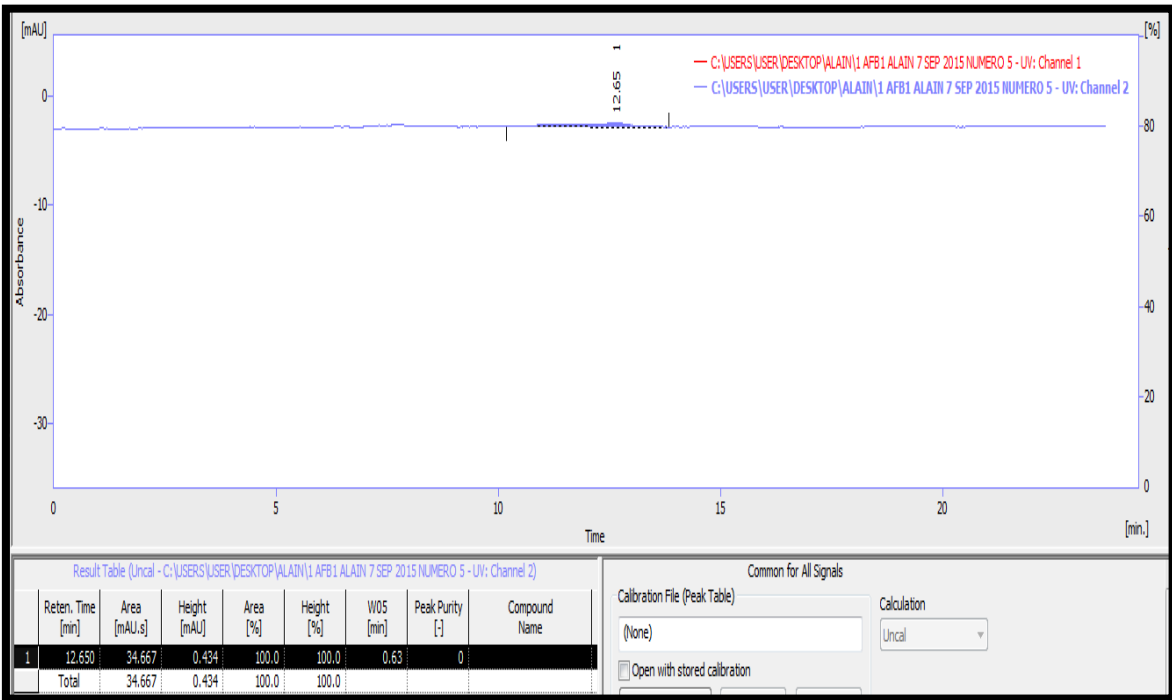
ANEXO 6

Curva patrón de aflatoxina B1 a 356nm

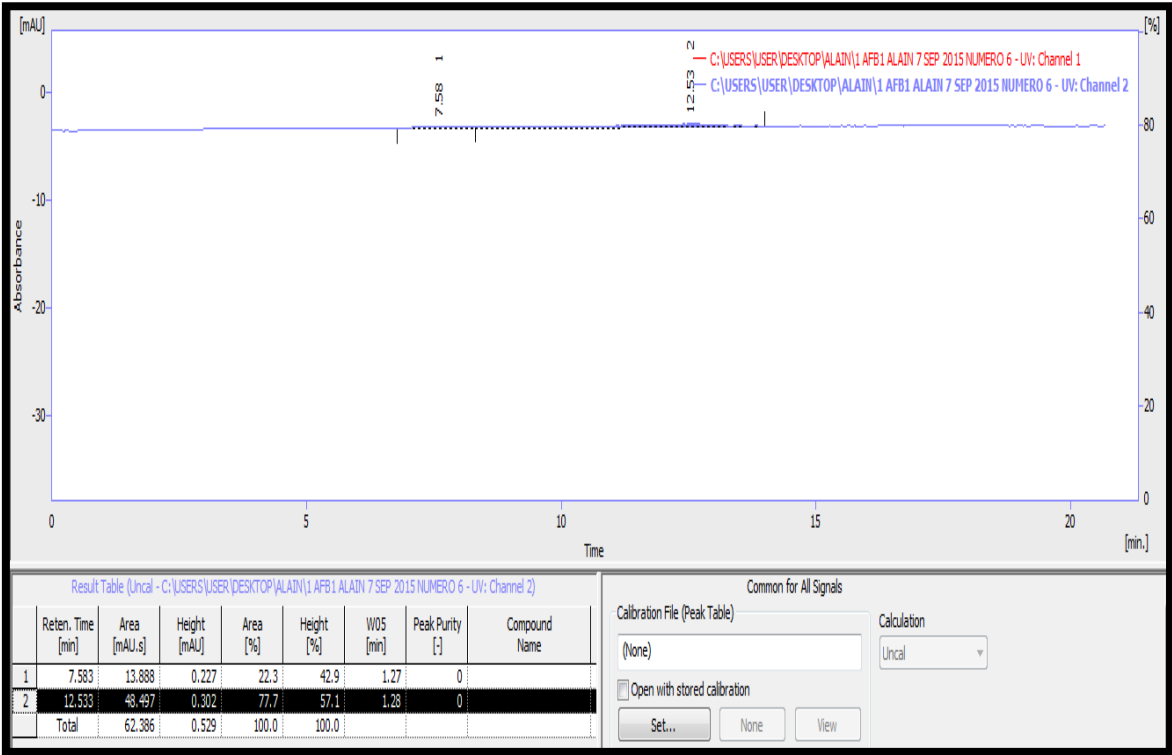
Concentración de aflatoxina B1 a **0.025 µg/mL**



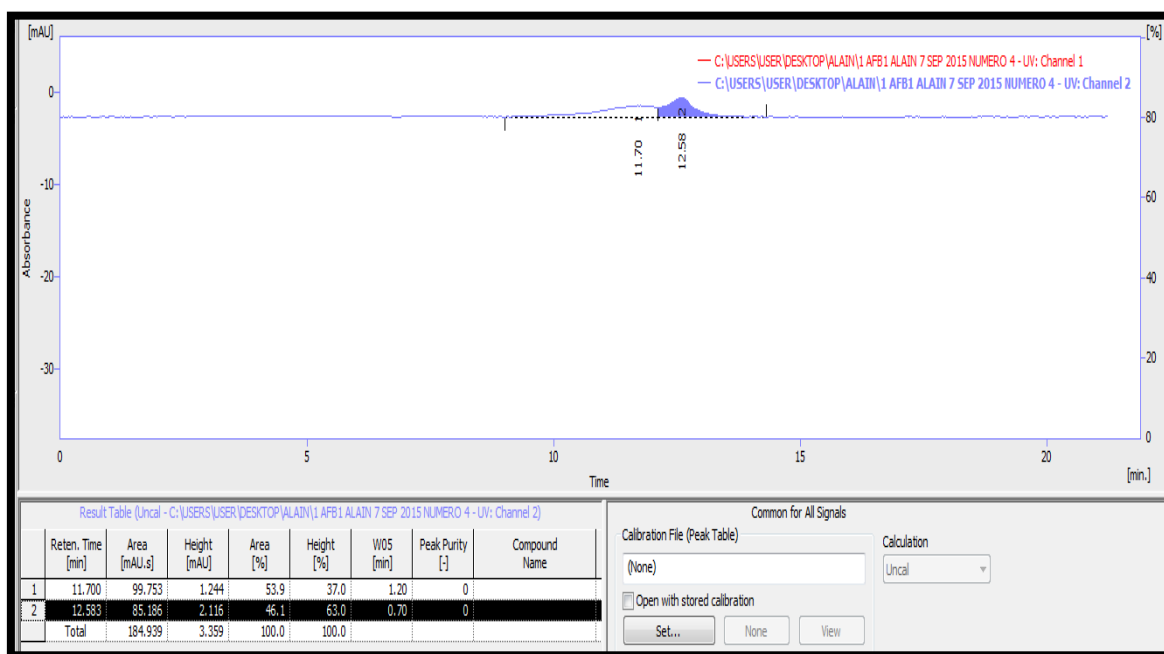
Concentración de aflatoxina B1 a **0.05 µg/mL**



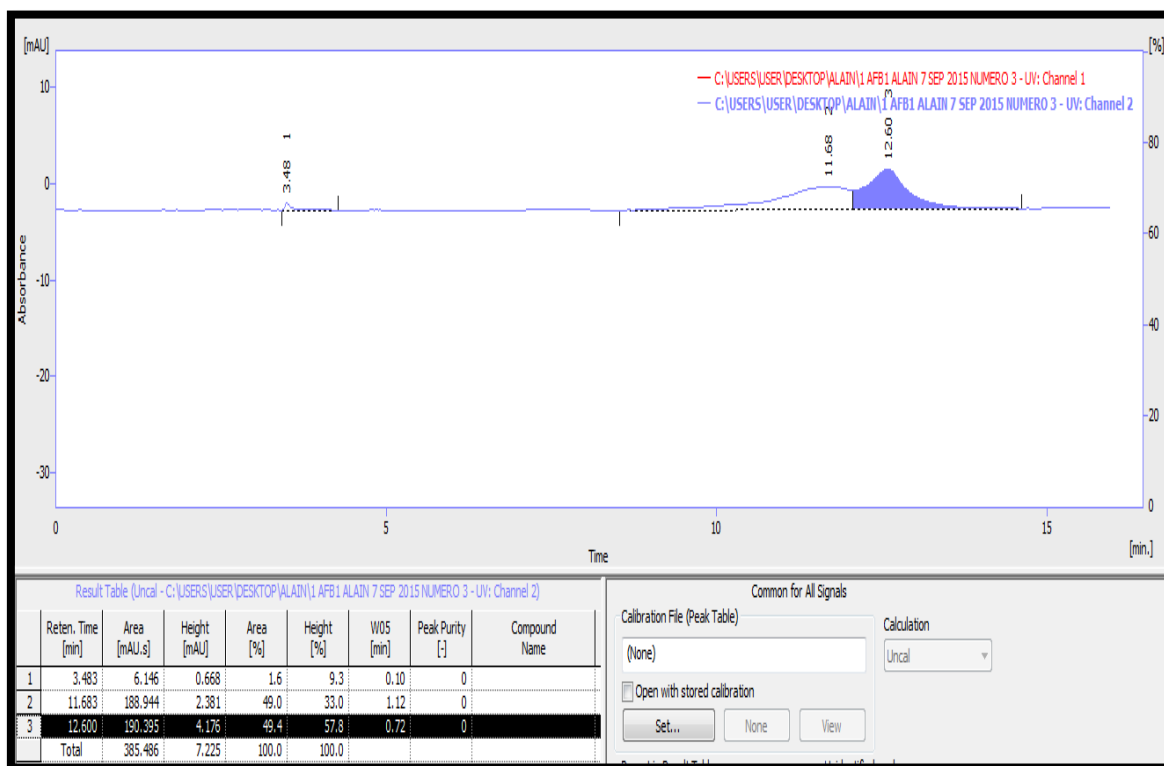
Concentración de aflatoxina B1 a **0.1 µg**



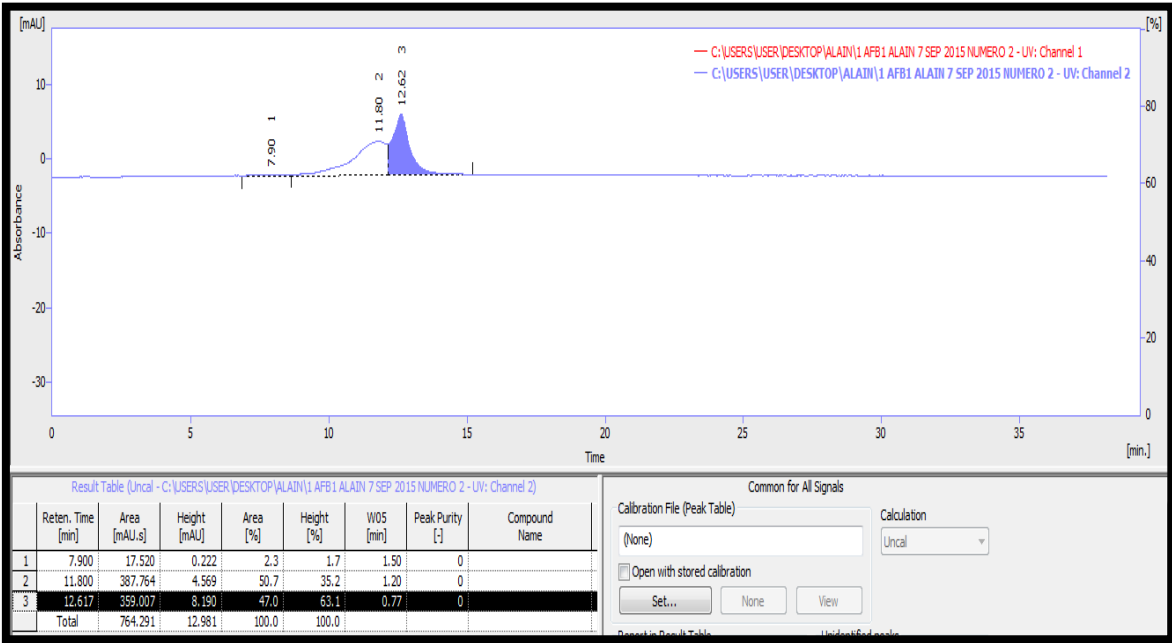
Concentración de aflatoxina B1 a **0.5 µg/mL**



Concentración de aflatoxina B1 a **1 µg/mL**



Concentración de aflatoxina B1 a 2 µg/mL



Concentración de aflatoxina B1 a 3 µg/mL

