

GENOVEVA GARCIA AGUIRRE

Manual de Métodos para el Análisis de Micotoxinas en Granos



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

GENOVEVA GARCIA AGUIRRE

**Manual de Métodos para el Análisis
de Micotoxinas en Granos**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Manual de Métodos para el Análisis
de Micotoxinas en Granos**

**COORDINACION DE LA INVESTIGACION CIENTIFICA
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE ALIMENTOS**

Manual de Métodos para el Análisis de Micotoxinas en Granos

Genoveva García Aguirre

Departamento de Botánica,
Instituto de Biología.
Universidad Nacional Autónoma
de México. México, D.F.
04510. México.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
MEXICO, 1989

Primera Edición 1989
DR © 1989 Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria 04510, México, D.F.
Impreso y hecho en México
ISBN 968-36-0759-4

CONTENIDO

PROLOGO	1
PREFACIO	3
INTRODUCCION	7
MUESTREO	9
PREPARACION DE LA MUESTRA	12
TOXINAS DE <i>ASPERGILLUS</i>	13
Aflatoxinas	13
Propiedades químicas	13
MÉTODOS DE DETECCIÓN EN PRODUCTOS AGRICOLAS	14
Método presuntivo, Shotwell	14
Métodos discriminatorios rápidos	16
Método de minicolumna Barabolak <i>et al.</i>	18
Método de minicolumna Cucullu <i>et al.</i>	22
Método de minicolumna Holaday y Landsen	26
Método de minicolumna Holaday - Velasco	30
Método de minicolumna Pons <i>et al.</i>	34
Método de minicolumna Romer	38
Método de minicolumna Shannon <i>et al.</i>	46
Método de minicolumna Velasco	50
Método discriminatorio para maíz	54
Métodos analíticos	
Método CB para cacahuate y productos de cacahuate	58
Método BF para cacahuate y productos de cacahuate	66
Método para maíz	70
Ocratoxinas	78
Propiedades químicas	78

Métodos de Detección en Productos Agrícolas	
Métodos analíticos	
Método oficial AOAC	79
Método discriminatorio y cuantitativo, Valente y Rodríguez - Amaya	86
Esterigmatocistina	90
Propiedades químicas	90
Métodos de Detección en Productos Agrícolas	
Métodos analíticos	
Método oficial AOAC	91
Método desarrollado por Shannon y Shotwell	98
TOXINAS DE <i>PENICILLIUM</i>	102
Ocratoxinas	78
Esterigmatocistinas	90
Rubratoxinas	102
Propiedades químicas	102
Acido Penicílico	102
Propiedades químicas	103
Métodos de Detección en Productos Agrícolas	
Métodos analíticos	
Método por cromatografía gas-líquido, Thorpe y Johnson	104
Citrinina	110
Propiedades químicas	110
TOXINAS DE <i>FUSARIUM</i>	111
Zearalenona	111
Propiedades químicas	111
Métodos de Detección en Productos Agrícolas	
Métodos analíticos	
Método oficial AOAC (cromatografía de capa fina)	112
Método oficial AOAC (cromatografía de líquidos)	122
Tricotecenos	126
Toxina T-2	126
Propiedades químicas	126
Desoxinivalenol	127
Propiedades químicas	127
Métodos de Detección en Productos Agrícolas	

Métodos discriminatorios rápidos	
Método de Shannon <i>et al.</i>	128
Métodos analíticos	
Cromatografía de capa fina AOAC	134
Cromatografía de gases AOAC	142
Diacetoxiscirpenol	127
Propiedades químicas	127
Nivalenol	127
Propiedades químicas	127
Métodos para detectar varias toxinas en un sustrato	146
Método múltiple para zearalenona, aflatoxinas y ocratoxinas	147
LITERATURA CITADA	154

PROLOGO

Las micotoxinas formadas por los hongos en productos agrícolas, amenazan la salud humana y animal y causan pérdidas económicas a productores y procesadores si se permite que entren en los alimentos o sus derivados. Las micotoxinas se forman durante el desarrollo de granos de cereales en el campo o durante su almacenamiento. Desafortunadamente, hasta ahora es imposible prevenir la formación de tales micotoxinas, como las aflatoxinas en el campo. Por tanto, es necesario proteger los alimentos utilizando métodos confiables para el análisis de micotoxinas en granos.

Los métodos para la detección y determinación de micotoxinas caen en tres categorías. La única prueba que podría usarse en el sitio de compra o en un elevador en el campo es la prueba presuntiva que identificaría los lotes contaminados de granos de cereales. Las pruebas presuntivas están usualmente basadas en la inspección visual, algunas veces con luz ultravioleta de los granos de cereales o de las semillas de oleaginosas para detectar el crecimiento de mohos. La segunda categoría incluye pruebas discriminatorias rápidas, que están diseñadas para establecer la presencia o ausencia de una micotoxina y son usadas para aceptar o rechazar un lote de granos. Las pruebas discriminatorias rápidas involucran una extracción y una purificación seguidas por la detección en una minicolumna. Idealmente, las pruebas discriminatorias rápidas no deben durar más de 10-15 minutos. La tercera categoría consiste en la determinación cuantitativa de niveles de micotoxinas en un cereal u oleaginosa. Los métodos que determinan niveles de micotoxinas con frecuencia son complicados y se llevan mucho tiempo. Incluyen una extracción, uno o más pasos de purificación y la medición de las micotoxinas en extractos semipurificados por cromatografía de capa fina, cromatografía de alta resolución o cromatografía de gases.

Es preferible que los métodos analíticos usados en los programas de inspección para micotoxinas específicas sean aquellos validados por estudios colaborativos, aprobados por sociedades científicas reconocidas tales como la Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, AOAC), la International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC), la American Association of Cereal Chemists (Asociación Americana de Químicos de Cereales, AACC) y la American Oil Chemists Society (Sociedad Americana de Químicos de Aceites, AOCS).

Aunque ha habido investigación y programas de vigilancia de micotoxinas en México y América Central y del Sur durante años, nunca se había hecho un manual amplio escrito en español para el análisis de micotoxinas. A través de mi correspondencia con científicos de esta parte del mundo, estoy bien consciente de la necesidad de tal manual. Por tanto, me dio gusto que Genoveva García Aguirre escribiese uno sobre la metodología analítica con estas características. También estoy impresionada por los resultados de su esfuerzo. Otros científicos ciertamente agradecerán contar con su manual.

Odette L. Shotwell
Research Leader
Mycotoxin Research
Northern Regional Research Center
Agricultural Research Service
U.S. Department of Agriculture

P R E F A C I O

En México, el problema de las micotoxinas como contaminantes naturales potenciales de alimentos es conocido y discutido desde principios de la década de 1960, época en la que fueron descubiertas las aflatoxinas y las implicaciones sanitarias de éstas y otras micotoxinas puestas de manifiesto a nivel mundial.

A pesar del interés que existe para conocer en nuestro país la magnitud del problema, los esfuerzos realizados hasta ahora han sido escasos, esporádicos, desarticulados y la información generada heterogénea y difundida de manera restringida e ineficiente; la razón fundamental de esta situación es principalmente de tipo económico y han sido solamente algunas universidades las que han intentado sistematizar este tipo de estudios y ocasionalmente algunas dependencias gubernamentales y paraestatales relacionadas directamente con el problema.

Un aspecto importante para conocer el peligro potencial o real que representan las micotoxinas en los diferentes alimentos susceptibles de estar contaminados, es la determinación y cuantificación de una o varias toxinas en un producto en particular; para esto, han sido desarrollados métodos específicos tanto cualitativos o semicuantitativos como cuantitativos para diferentes toxinas en diferentes sustratos, así como métodos llamados múltiples para varias toxinas en el mismo sustrato. Existen asociaciones de especialistas que han validado, en estudios colaborativos alrededor del mundo, algunos métodos que así han oficializado; algunos de estos métodos oficiales no son fáciles de implantar en México ni en otros países subdesarrollados debido a la sofisticación del equipo requerido o sugerido y su costo, además del costo de los solventes y, en muchas ocasiones la inaccesibilidad tanto física como económica de algunas de las sustancias o piezas de equipo propuestas.

Aunado a lo anterior, la información generada en otras partes del mundo es publicada y difundida en la mayoría de los casos, en revistas especializadas de distribución más o menos amplia y casi siempre en idiomas diferentes al español, lo que restringe su accesibilidad a un buen número de técnicos que la requieren.

El presente manual intenta ilustrar algunos de los métodos desarrollados para la detección y determinación de algunas de las micotoxinas de mayor riesgo sanitario potencial en diversos productos agrícolas. Fue iniciado en 1987, cuando el Programa Universitario de Alimentos (PUAL) me propuso ofrecer un taller sobre micotoxinas, que fue realizado en noviembre de ese año en forma de demostraciones. Una parte consistió en la identificación de especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*; aquí deseo expresar mi agradecimiento a la M. en C. Rebeca Martínez Flores y Pas. de Biól. Lucía Castañeda Heredia, por su ayuda en el proceso de demostración a cada uno de los participantes de los mecanismos para la identificación de las especies. La otra parte del taller consistió en demostraciones para la determinación de aflatoxinas, tanto por métodos rápidos como cuantitativos en alimentos; en este caso maíz. En este momento la ayuda que me proporcionó Rebeca Martínez fue invaluable.

El taller de micotoxinas de noviembre de 1987 se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Biología en el aspecto micológico, y en las del Instituto de Fisiología Celular la parte química y teórica; a las autoridades de ambas dependencias Universitarias hago patente mi agradecimiento por su apoyo.

La evaluación final por los participantes a este taller fue positiva y sugirió la producción de algo más amplio, una cosa condujo a la otra y el material didáctico originado para el taller fue corregido, mejorado y ampliado.

Las ilustraciones fueron realizadas por el Sr. Francisco Martínez Ortiz, a quien deseo agradecer su colaboración. La Sra. Enriqueta Olvera Escorcia, realizó el trabajo mecanográfico; agradezco su eficiencia, paciencia y cooperación al usar parte de

su tiempo fuera de horas de oficina para tener el manuscrito en el tiempo establecido.

Al final, pero especialmente, agradezco al PUAL su apoyo, sin el cual el presente manual no hubiese sido posible; el PUAL organizó el taller, origen del manual, consiguió y contrató al dibujante y me apoyó en todo el proceso de realización del manual. Especialmente agradezco a la I. A. Gabriela Sánchez su constante y continuo apoyo, tanto durante la preparación y realización del taller como durante el proceso de realización del manual, solucionando problemas menores y mayores y eliminando toda clase de obstáculos.

Agradezco a la Dra. Julia Mignucci Universidad de Puerto Rico sus sugerencias al manuscrito.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Odette L. Shotwell por sus sugerencias y por haber aceptado escribir el prólogo.

Genoveva García Aguirre
Instituto de Biología, UNAM.

INTRODUCCION

Muchos microorganismos, entre ellos los mohos, tienen la capacidad para producir metabolitos secundarios de gran actividad biológica. Debido a su complejidad estructural y propiedades bioquímicas, estos metabolitos secundarios, altamente especializados, pueden ser típicos para especie y con frecuencia típicos para cepa (Lillehoj, *et al.*, 1972; Steyn, 1977).

Las micotoxinas son un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios producidos por algunos mohos y se ha sugerido que se forman de manera biosintética a través de varias rutas como las de los poliquétidos, terpenos, aminoácidos, etc. (Bu'Lock, 1975, 1980; Patterson, 1980).

El conocimiento sistemático de las micotoxinas se inició a principios de la década de 1960, con el descubrimiento de las aflatoxinas como resultado de la muerte de miles de pavitos en Inglaterra; más tarde se reconoció a las aflatoxinas como cancerígenos hepatocelulares muy potentes y posteriormente se implicó a estas sustancias con la alta incidencia de cáncer hepático en algunas poblaciones humanas; inspecciones de diferentes alimentos de distintas regiones y en épocas diferentes condujeron a establecer que se trataba de un problema internacional (Irving, 1971; Shotwell, *et al.*, 1973; Stoloff, 1979).

Los resultados de las investigaciones en aflatoxinas y sus implicaciones sanitarias han conducido a que estos estudios se extiendan a otras micotoxinas, producidas principalmente por *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* y han involucrado a gran cantidad de especialistas de diferentes disciplinas, como agrónomos, bioquímicos, estadísticos, fitomejoradores, fitopatólogos, médicos, micólogos, nutriólogos, químicos analíticos,

químicos orgánicos, tecnólogos de alimentos, veterinarios, expertos que en ocasiones han coordinado sus esfuerzos para generar información que conduzca al conocimiento de la magnitud del problema y a la solución de las dificultades sanitarias y económicas derivadas del mismo.

Los especialistas y los científicos que se han involucrado en conocer las micotoxinas, han sido apoyados fuertemente por asociaciones de productores agrícolas y ganaderos, agencias sanitarias, universidades y centros de investigación en todo el mundo, interesados directamente en el problema, y han puesto especial atención en el desarrollo de métodos para su detección rápida y eficiente en los diversos productos agrícolas que pudiesen estar contaminados.

Han sido desarrollados dos tipos de pruebas para la detección de micotoxinas: químicas y biológicas, además se pueden incluir radioinmunoensayo (RIA) y ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA). Las técnicas de bioensayo son solamente semicuantitativas y generalmente no específicas. Las más comunes no son útiles para propósitos de inspección y no sirven para los bajos niveles requeridos con propósitos de control de alimentos (Krogh, 1977; 1977a; Schuller, *et al.*, 1983). Las técnicas químicas aunque más confiables y rápidas pueden inducir a identificaciones positivas falsas, especialmente si el analista tiene poca experiencia con el producto agrícola usado.

Para determinar la concentración real de micotoxinas en un alimento o producto alimenticio dado, es necesario tener en cuenta varios factores que aportan error al resultado final; los más importantes de éstos son muestreo, preparación de la muestra y análisis, y el mayor error lo aporta el muestreo mientras que el análisis aporta el menor. (Whitaker, *et al.*, 1976; Campbell, 1978; Whitaker, *et al.*, 1979.)

MUESTREO

El objeto de muestrear cualquier material es obtener una porción de éste para hacer inferencias con respecto a ese lote en particular; para que los resultados sean significativos, es necesario que la muestra sea representativa (Steel y Torrie, 1980).

El aspecto más importante en el análisis de micotoxinas es el muestreo porque éste es el factor más importante de los que contribuyen la variabilidad del análisis. Lo primero que debe ser considerado es el material que será muestreado y su estado de producción: en el campo, durante la cosecha, transporte, almacenamiento, industrialización, utilización (Davis, *et al.*, 1980).

Las dificultades del análisis se derivan de la baja proporción de granos contaminados en un lote y de la gran variación de aflatoxinas entre granos infectados; algunos productos tienen grandes problemas de muestreo como el cacahuate y otras oleaginosas; los cereales tienen dificultades intermedias debido al tamaño, y en el caso del maíz por su gran incidencia de contaminación, los productos molidos representan menos problemas, los materiales bien mezclados no representan problemas de muestreo ni la leche debido a su naturaleza fluida (Campbell, *et al.*, 1986; Campbell, 1979).

Debido a la heterogeneidad de la contaminación con micotoxinas de los alimentos, los métodos tradicionales de muestreo no son adecuados; esto no es válido para la leche, por su naturaleza fluida ni para pastas o polvos que han sido molidos; en el caso de granos, es necesario definir la población, ésta puede ser el grano en cualquier estado de producción, cosecha, transporte, procesamiento o utilización (Shotwell, *et al.*, 1974; 1977; 1980; Campbell, *et al.*, 1986).

Una vez definida la población se debe tomar en cuenta la localización del lote que será muestreado, en la planta en pie, en los diferentes medios de transporte que pueden ser usados, en los distintos locales de almacenamiento y la forma de almacenamiento: a granel o encostalado (Davis, *et al.*, 1980).

Los planes de muestreo que existen a la fecha, han sido desarrollados para aflatoxinas, pero como no existe evidencia que demuestre que la distribución de la contaminación con otras micotoxinas sea diferente, estos planes han sido extendidos a las micotoxinas en general (Davis, *et al.*, 1980).

Una muestra representativa debe incluir la aleatorización para evitar cualquier tipo de sesgo y se obtiene más fácilmente usando muestreadores automáticos cuando se puede, cuando no, el uso de caladores tanto manuales como mecánicos es conveniente; en el caso de material encostalado es mejor muestrear en el momento de llenar o de vaciar los costales, sin embargo, también se pueden usar caladores cuando los costales están cerrados. En el caso de lotes encostados, es mejor muestrear cada costal, cuando son muchos se sugiere muestrear una cuarta parte de los mismos. En el caso de que el muestreo se realice en un silo lo más adecuado es muestrear en el momento de llenarlo o de vaciarlo (Campbell, 1977; Davis, *et al.*, 1980).

Debido a que la concentración de aflatoxinas es muy alta en un porcentaje muy pequeño de semillas en un lote, la variación en las muestras obtenidas de ese lote es muy alta, lo que dificulta la estimación real de la concentración de aflatoxinas en el mismo, la varianza entonces resulta inversamente proporcional al tamaño de la muestra. Se ha demostrado que la distribución de las concentraciones de las muestras, con relación a la concentración del lote, es agregada, así que más de la mitad de las concentraciones de las muestras, es menor a la concentración del lote. La agregación decrece al incrementarse el tamaño de la muestra hasta alcanzar una aproximación a la distribución normal en muestras grandes. Por otra parte, algunas veces la concentración de la muestra es mucho más alta que la del lote. Lo anterior conduce a sugerir que para tener una estimación adecuada de la

concentración de micotoxinas en un lote, es necesario tener un número adecuado de muestras del tamaño apropiado. Un factor que no debe ser subestimado es el económico, los costos de muestreo deben ser considerados al tomar la decisión de un muestreo y es necesario balancear los costos con la precisión requerida (Whitaker, *et al.*, 1972; 1979; Whitaker *et al.* 1974; Velasco y Whitaker, 1975; Tiemstra, 1976; Whitaker, 1977; Davis, *et al.*, 1980).

La cantidad de muestra generalmente es mayor de la requerida, por lo que resulta necesario mezclar perfectamente todo el material antes de separar la muestra precisada. Después de mezclada, la muestra puede ser subdivida para obtener la muestra de trabajo, esto se consigue usando divisores mecánicos o siguiendo la técnica de cuarteo.

Con relación a los planes de muestreo, a partir del reconocimiento del problema de las aflatoxinas, la práctica general ha venido siendo, usar muestras de 1 K mínimo; la FDA (Food and Drug Administration), EUA, se ha avocado a muestras de ± 7 K. El tamaño del lote generalmente no afecta la variabilidad aleatoria asociada al muestreo, si el tamaño de la muestra es pequeña, comparada con el tamaño del lote. Una muestra de 22 K tomada adecuadamente, es tan representativa de un lote de 45 K de cacahuate crudo descascarado, como de uno de 180 K. Al paso del tiempo, el tamaño de la muestra para el control de aflatoxinas en cacahuates en EUA se ha elevado de 5 K a 10 K, a 22 K hasta 63 K actualmente, tres muestras de 21 K. Este incremento en el tamaño de la muestra, evolucionó como resultado de la necesidad de los industriales de resultados más confiables y tiene la ventaja de reducir simultáneamente el número de lotes buenos rechazados y el número de lotes malos aceptados en un programa de pruebas. La desventaja está en el incremento de los costos de muestreo y preparación de muestras (Coon, *et al.*, 1972; Campbell, 1977, 1978; Schuller, 1976).

Otro aspecto que debe tomarse en consideración con relación a la obtención de muestras representativas, además de la naturaleza de la contaminación, es el tamaño de los granos

individuales. En general se requieren muestras más grandes para granos más grandes como la nuez de Brasil, 8-10 g cada semilla, comparada con el cacahuate que puede pesar menos de 0.5 g cada semilla.

Cuando se trata de una inspección para determinar con exactitud la distribución de la concentración en diferentes lotes, se requieren muestras grandes, cuando sólo se busca el promedio de la concentración en todos los lotes, las muestras pueden ser pequeñas (Davis, *et al.*, 1980).

Muestra de ± 5 K son adecuadas para la mayoría de las inspecciones de maíz.

Una vez que han sido obtenidas las muestras, deben ser transportadas al laboratorio para su análisis; en muchas ocasiones el número de muestras es tan grande que no pueden ser procesadas inmediatamente, por lo que es necesario almacenarlas temporalmente y en este tiempo pueden crecer los mohos y producir toxinas, lo que daría datos falsos; para evitar este problema es recomendable almacenar las muestras preferiblemente a 0 °C, hecho que incrementa costos, otra solución es secar las muestras hasta alcanzar humedades apropiadas por abajo de 13-13.5% (Davis, *et al.*, 1980).

PREPARACION DE LA MUESTRA

Una vez obtenida una muestra representativa de un lote, es necesario prepararla para el análisis. Los pasos básicos de esta preparación son mezclado del material, quebrado para reducir el tamaño de las partículas de manera que pasen una criba estándar Núm. 14, mezclado para uniformizar, y subdividir para obtener una porción que sufrirá una molienda posterior (harina que pase una criba Núm. 20) que produzca material para subdividirlo a su vez en el tamaño de muestra requerido para el análisis (25-100 g) aunque la mayoría de los métodos usan muestras de trabajo de 50 g (Stoloff, 1969; Stoloff y Dantzman, 1972; Walking, 1980).

TOXINAS DE ASPERGILLUS

Aflatoxinas. De las micotoxinas conocidas a la fecha, las aflatoxinas son las más célebres, ya que han sido las más estudiadas debido a las implicaciones sanitarias que representan tanto para la salud animal como para la humana (Goldblatt, 1969; Detroy, *et al.*, 1971; Christensen, 1975; Shank, 1976; Hertz, 1977; Diener, *et al.*, 1983).

Las aflatoxinas son producidas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* del grupo *Aspergillus flavus* (Raper y Fenell, 1965; Davis y Diener, 1983; Wei, *et al.*, 1984; Wicklow, 1984). *Aspergillus flavus* crece y produce aflatoxinas en productos agrícolas, alimentos procesados y bebidas, entre estos productos, algunos en los que las aflatoxinas pueden representar un problema serio son cacahuate, maíz, pasta de semilla de algodón, arroz, sorgo y otros granos, en bebidas como cerveza también han sido reportadas, así como en algunas frutas secas como higos y en quesos y carnes (Bullerman, *et al.*, 1969 1969b; Takahashi, 1974; Buchanan, *et al.*, 1975; Stoloff, 1976; Davis y Diener, 1978). Aunque la evidencia es poca, en condiciones de campo, *A. flavus* solamente produce aflatoxinas B mientras que *A. parasiticus* produce aflatoxinas B y G (Davis y Diener, 1978, Diener y Davis, 1969).

Los efectos de las aflatoxinas en animales son muy variables, dependen de la especie, edad, sexo, condiciones nutricionales del animal, dosis, período y frecuencia de ingestión, composición de la dieta, etc. Las aflatoxinas son mutágenas, carcinógenas, teratógenas y muy tóxicas para la mayoría de las especies animales. El órgano afectado primariamente es el hígado pero se pueden observar cambios en la mayoría de los otros órganos (Allcroft, 1969; Butler, 1969; 1974; Legator, 1969; Wogan, 1969; Davis y Diener, 1978).

Propiedades Químicas: Aflatoxina B1 Peso molecular 312, fórmula empírica $C_{17}H_{12}O_6$, se descompone sin fundirse de 268 a 269 °C, ópticamente activa (α)_D^{CHCl₃} 558, fluoresce azul brillante en la luz ultravioleta y exhibe absorción UV λ _{máx.}^(EtOH) 223, 265 y 326 μ u (ϵ = 25,600, 13,400 y 21,800); V _{máx.}^{CHCl₃} 1760 (muy intenso), 1684

(débil), 1632, 1598 y 1562 cm^{-1} máx. Espectro ultravioleta ($\lambda_{\text{máx.}}^{\text{EtOH}}$) 225, 264 y 332 ($\epsilon = 8500, 9200$ y 13900). Rf en cromatografía de capa fina de gel de sílice 0.5 en cloroformo/metanol, 97+3, ligeramente soluble en agua, soluble en la mayoría de los solventes de polaridad media, incluyendo alcoholes y cloroformo y es insoluble en hexano (Büchi y Rae, 1969; Davis y Diener, 1978).

MÉTODOS DE DETECCIÓN EN PRODUCTOS AGRICOLAS

Método Presuntivo. El método más rápido para detectar aflatoxinas en granos de maíz que pudiesen estar contaminados con esta toxina es la técnica de luz negra; ahora bien, esta técnica no detecta aflatoxinas, lo que detecta son partes de granos que brillan con una fluorescencia verde-amarillenta brillante, fluorescencia que generalmente es producida por *A. flavus* o *A. parasiticus* cuando crecen en semillas de maíz, algodón, sorgo, trigo o cebada vivas. La semilla que es muerta durante el secado o por otra razón, no produce esta fluorescencia. La fluorescencia típica de la prueba generalmente está confinada a la parte amilácea de la semilla y a las partes periféricas del embrión y aparentemente es producida por una reacción entre el ácido kójico producido por el hongo y una peroxidasa asociada con la semilla viva. Por lo anterior, la fluorescencia verde-amarillenta brillante, no se debe a las aflatoxinas, sino a que está asociada con el crecimiento del hongo en la semilla viva. La mayoría, si no es que todos los aislamientos del hongo que producen aflatoxinas, producen la fluorescencia verde-amarillenta brillante pero se ha encontrado que algunas cepas del hongo que producen la fluorescencia, producen poca aflatoxina. En semillas muertas se pueden producir aflatoxinas sin que se produzca la fluorescencia típica de la prueba.

La interpretación correcta de esta prueba es muy importante para evitar errores en el reporte. Los errores más frecuentes están en la descripción del color y del brillo típico de la prueba en

muestras de granos, pero principalmente en alimentos. Algunos materiales extraños y algunas semillas de maleza como el toloache (*Datura* spp), en el hilo o sin la testa, puede fluorescer de un color verde-amarillento similar al de la prueba. Los granos de maíz y las puntas del olote, especialmente cuando han sido expuestos a condiciones ambientales desfavorables, pueden fluorescer de color amarillo, las puntas y las glumas del maíz y alas de abejas pueden fluorescer amarillo claro, la semilla de soya sin testa, fluoresce verde-amarillento opaco. Los errores pueden reducirse tomando algunas precauciones:

- 1) Usar como referencia partículas auténticamente positivas que no hayan sido muy expuestas a la luz ultravioleta.
- 2) Usar como referencia un patrón de color.
- 3) Confirmar la solubilidad del material fluorescente, ya que es soluble en agua.
- 4) Confirmar que la partícula fluorescente proviene del endospermo amiláceo o de fragmentos del embrión del grano de maíz.

Se recomienda que el grano sea quebrado antes de la inspección con la luz negra, ya que algunas muestras positivas se pueden perder, al examinar granos enteros, debido a la localización de este material fluorescente en el grano, también se recomienda que tanto el grano entero, cuando éste no se deba quebrar, como las piezas del quebrado, sean observadas desde varios ángulos para evitar perder las partículas brillantes durante la inspección. Las muestras molidas permiten la detección de más muestras positivas, pero si no se tiene cuidado, se corre el riesgo de reportar muestras positivas falsas.

El examen con la luz negra debe hacerse en un cuarto oscurecido o en una cámara oscura, con luz ultravioleta de longitud de onda de 365 nm. Se recomienda usar una lámpara de alta intensidad y lentes o gogles protectores para luz ultravioleta que, además de incrementar el contraste, previenen el posible daño en los ojos debido a la exposición continua a este tipo de luz. La prueba de la luz negra no determina aflatoxinas, es una

prueba estrictamente presuntiva pero cuando se presenten una o más partículas por Kg, la muestra debe ser considerada positiva y analizada para aflatoxinas (Shotwell, *et al.*, 1975; 1975b; Tuite y Scott, 1978; Kwolek y Shotwell, 1979; Shotwell y Hesselstine, 1981; Shotwell, 1981; 1983).

Este método ha sido aprobado por la American Association of Cereal Chemists (AACC method 45-15) (AACC, 1987).

Métodos discriminatorios rápidos. La mayoría de los métodos para detectar y cuantificar aflatoxinas en productos agrícolas, particularmente aquellos que involucran cromatografía de capa fina, son largos y costosos, y en muchas ocasiones resultan inaccesibles tanto para los científicos como para los técnicos de los países en vías de desarrollo, y también en el caso de los compradores de los productos agrícolas de países desarrollados que necesitan detectar aflatoxinas en cuestión de minutos, o en el caso de plantas productoras de alimentos que requieren de un buen control; con este último tipo de intereses también se tiene que pensar en locales adaptados como laboratorios, en los lugares de concentración de granos, y que en un gran número de casos no tienen las facilidades ni el equipo de los laboratorios en los que se hacen estudios analíticos. Para solucionar estos problemas han sido desarrollados métodos rápidos que permiten la detección de las aflatoxinas en varios productos agrícolas, en 15 a 30 min. En general estos métodos intentan ser cualitativos o semicuantitativos y permiten hacer una discriminación preliminar y clasificar a los productos entre seguros y dudosos.

La selección de estos métodos debe estar basada en las necesidades del usuario, entre las que se pueden incluir el uso de equipo relativamente barato, que pueda ser mantenido y reparado fácil y rápidamente en el mismo lugar en el que está siendo usado; los solventes necesarios deben ser rápida y fácilmente accesibles y de bajo costo y el entrenamiento del operador, en el caso de comercialización de granos u operarios de plantas productoras de alimentos no necesariamente muy perfeccionado. Un factor que no debe subestimarse es el riesgo sanitario y ecológico (Hesselstine y Shotwell, 1973; Romer, 1971, 1973; Seitz

y Mohr, 1974; Shannon, *et al.*, 1973; Shotwell y Stubblefield, 1973; Shotwell, *et al.*, 1976; 1977; Barabolak, 1977; Tuite y Scott, 1978; Romer, *et al.*, 1979; Shannon y Shotwell, 1979; Stanly, *et al.*, 1979; Denzel, 1981; Eguiazu y Frank, 1981; Jemmali, 1981; Polzhofer, 1981; Shotwell y Holaday, 1981; Kamimura, *et al.*, 1985; Spilman, 1985).

Son muchos los métodos que han sido desarrollados con estos objetivos en mente, pero los que han sido validados en estudios colaborativos y que están aprobados por el Joint Mycotoxin Committee que representa la Association of Official Analytical Chemist (AOAC), la American Oil Chemists' Society (AOCS), la American Association of Cereal Chemists (AACC) e informalmente hasta 1980 la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), que desde 1979 ha sido miembro formal del Conjunto de Comités, y han sido tomados de la 14a. edición del libro de Métodos de la AOAC, son dos, los que utilizan minicolumnas: el de Romer y el de Holaday Velasco; el uso de estos métodos es lo más recomendable, sin embargo, debido a problemas principalmente de tipo económico, de facilidad para obtener las sustancias necesarias, de la rapidez con la que pueden ser surtidas y por otras muchas razones, no es posible en algunas ocasiones seleccionar uno de éstos, ahora bien, existen otros que pueden ser usados de manera eficiente y cuyos resultados son satisfactorios cuando se tiene el cuidado de tomar en cuenta sus limitaciones y, previo a la implantación se aprueba su eficiencia en las condiciones en las que se va a realizar; tomando en cuenta factores importantes como índices de recuperación y coeficientes de variabilidad, comparando esta eficiencia con alguno de los métodos oficiales o con otros métodos reconocidos de manera extraoficial por las bondades de su uso.

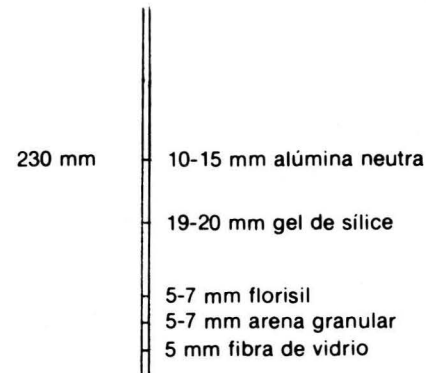
A continuación se presentan varios métodos rápidos de minicolumna incluyendo los oficiales. La presentación de los métodos está organizada en dos columnas, en la de la izquierda se describe el método ilustrado como un diagrama de flujo y en la de la derecha se marcan las especificaciones de los materiales usados, así como comentarios, sugerencias y explicaciones.

Método de minicolumna de Barabolak *et al.* (1974) también conocido como CPC, aplicable a maíz, 5 ppb, y productos derivados del maíz, 10 ppb.

Método

Preparación de la muestra

Empaque de la minicolumna



Extracción



50 g muestra
+
± 10 g celita
+
150 ml acetona/agua
(85 + 15)

Vel. alta 3 min

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Ver preparación de muestras
Tubo de vidrio 3 mm d.i.

Alúmina neutra 80-100 mesh, Brockmann, actividad I (Fisher Scientific Co., Núm.A950)
Gel de sílice (E. Merck, Núm.7734)

Florisil 100-200 mesh (Fisher Scientific Co., Núm.F101)

Arena granular fina
* Activar el florisil, gel de sílice y alúmina 2 h a 110 °C y almacenar en desecador

Muestra molida que pase criba de 10 mesh
Celita 545 (Johns-Manville Corp.)

Acetona grado analítico en recipiente de vidrio
125 ml acetona 100% en el caso de aguas de remojo (steep liquor)

Licuada de alta velocidad a prueba de explosión, con vaso de 1 L. Hacer un agujero de unos 32 mm a ± 1 cm del centro de la tapa para el escape de vapores

Filtrar



60-70 ml filtrado

Transferir



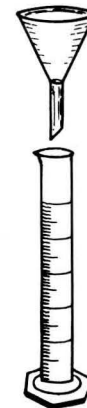
50 ml filtrado
+
20 ml (NH₄)₂SO₄ acuoso 40%
+
130 ml H₂O
agitar, dejar reposar 2-3 min
+
± 10 g celita
agitar

Papel filtro de textura abierta
185 mm
Embudo de 150 mm

Probeta 100 ml

Vaso de precipitados, 250 ml

filtrar





100 ml filtrado
+
3 ml benceno

Embudo de separación, 125 ml
con tapón de teflón

Benceno grado analítico en re-
cipiente de vidrio

Usar pipeta para agregar el
benceno

agitar vigorosamente 30 seg
dejar separar las fases
desechar fase acuosa



fase de benceno
+
50 ml H₂O
agitar suavemente
desechar fase acuosa

Evitar la emulsificación

Transferir a vial pequeño

Usar baño de vapor (baño ma-
ría)



fase de benceno

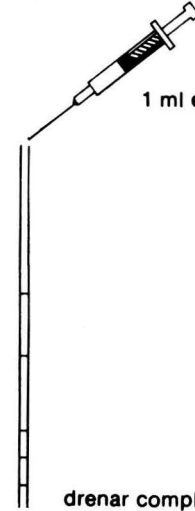


evaporar a sequedad en atmósfera de nitró-
geno



redisolver el residuo en
3 ml CHCl₃/acetona
(90 + 10)

Cloroformo grado analítico en
recipiente de vidrio



1 ml extracto

drenar completamente



1 ml CHCl₃/acetona
90 + 10

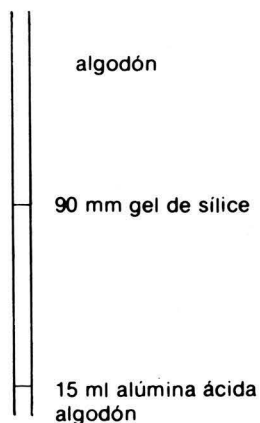
drenar

examinar

La banda de aflatoxinas se loca-
liza en el tope de la capa de flori-
sil

Método de minicolumna de Cucullu *et al.*, 1972. Aplicable a semilla y harina de algodón.

Método



Especificaciones, comentarios, sugerencias

Tubo de borosilicato (Corning Núm. 234060 o Kimble Núm. 80200) 6 mm d.e.; 4 mm d.i.

Gel de sílice CC-4 especial para cromatografía en columna (Mallinckrodt Núm.7086)

Secar 2 h a 110 °C y almacenar en desecador

También se puede usar gel de sílice 0.05-0.02 (E. Merck Núm.7734, distribuida por Brinkmann Instruments, Núm.69-01-29)

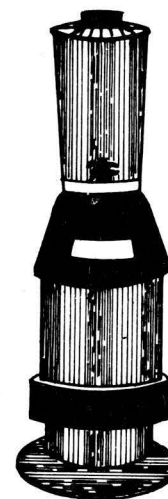
Alúmina ácida 80-200 mesh (Fisher A-948) o Brockmann grado de actividad I (E. Merck Núm.1097, distribuida por Brinkmann Instruments Núm.60-01-35) ajustar la actividad a grado II agregando 3% de agua y agitando bien, dejar equilibrar toda la noche

Algodón absorbente. Remojar en CHCl_3 , exprimir y dejar secar al aire

Preparación de la muestra

Ver preparación de muestras

Extracción



50 g muestra
+
± 10 g celita
+
150 ml acetonitrilo/agua,
80 + 20

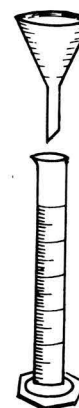
3 min vel. alta

Licuadora de alta velocidad Waring modelo E.P.I. o equivalente con vaso de 1 L y tapa

Celita para ayudar a filtrar o Hyflo Super-Cel (Johns-Manville Corp.) lavada con ácido

Acetonitrilo grado analítico en recipiente de vidrio

Filtrar



colectar 30 ml filtrado

Papel filtro 18.5 cm



20 ml filtrado
+
25 ml NaCl acuoso
+
3 ml benceno

agitar bien \pm 30 seg
dejar que las capas se
separen
drenar y desechar la
capa inferior



capa superior de benceno
+
15 ml NaCl acuoso

agitar \pm 30 seg
dejar que las capas se
separen
desechar la capa
inferior
transferir la capa
superior de benceno
a vial pequeño



+
 \pm 1 g Na_2SO_4 anhidro
tapar y agitar bien

Embudo de separación, forma
de pera 60 o 125 ml

NaCl grado analítico al 5% en
agua destilada

Benceno grado analítico en re-
cipiente de vidrio

Na_2SO_4 , polvo anhidro, grado
analítico

insertar la columna en el extracto y permitir
que suba hasta \pm 1 cm sobre la capa de alú-
mina

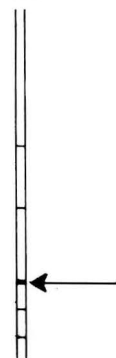


sacar la columna y limpiar sus
paredes externas
pasar al solvente de desarrollo



5 ml solvente de desarrollo
desarrollar 5 min

Examinar



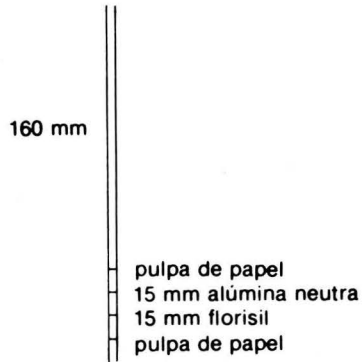
Solvente de desarrollo, cloroformo/acetoneitrilo/2 propanol,
93+5+2

* Una banda apenas distingui-
ble indica una concentración de
 \pm 10-20 mg/Kg de aflatoxinas to-
tales

La banda de aflatoxinas se loca-
liza a \pm 1 cm sobre la zona de
alúmina

Método de minicolumna de Holaday y Landsen, 1975. Aplicable a varios productos agrícolas, harina de cacahuate, mantequilla de cacahuate, maíz, arroz, harina de semilla de algodón, 2 ppb.

Método



Extracción



100 g muestra
+
200 ml metanol/agua,
80 + 20

1 min vel. alta

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Tubo de vidrio, 0.5 mm d.i.

Las columnas se pueden conseguir en Tudor Scientific Glass Co. (Belvedere, S.C.)

Pulpa de papel

Alúmina neutra 100-200 mesh, activada a grado V (E. Merck o Woelm)

Florisil 100-200 mesh

* Para mejores resultados, la interfase entre el florisil y la alúmina debe ser lo más recta que sea posible

Cualquier tamaño de muestra es bueno siempre que se conserve la proporción peso de muestra/volumen de solvente

Metanol grado analítico en recipiente de vidrio

Licuada a prueba de explosión

Filtrar



10 ml extracto
+
10 ml sol. salina

agitar vigorosamente 5-10 seg

Filtrar

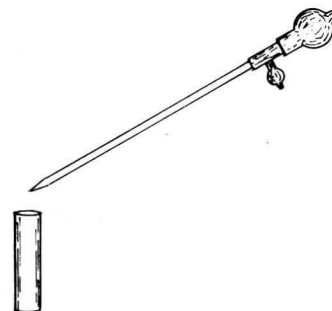


15 ml extracto/sol. salina
usando disco de fibra de vidrio



15 ml filtrado
+
3 ml benceno

tapar y agitar vigorosamente 10 seg
dejar que se separen las dos capas



Papel filtro de tipo de filtrado rápido 15 cm

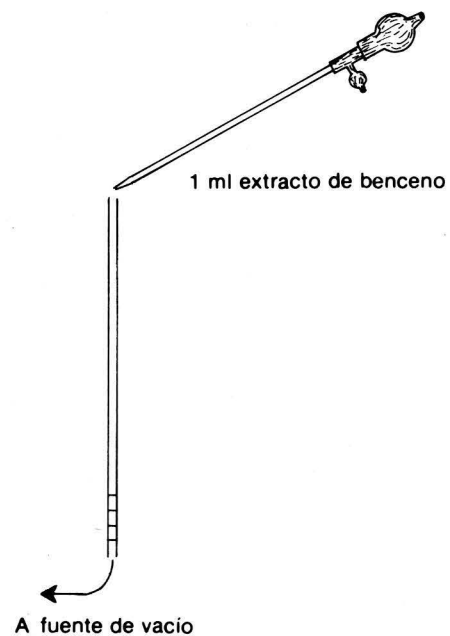
Tubos de cultivo desechable 18 × 150 mm con tapón de plástico desechable

Solución salina, 600 g cloruro de sodio, 600 g acetato de zinc y 15 ml ácido acético, disueltos en 4L de agua

Disco de fibra de vidrio (90 mm)

Benceno grado analítico en recipiente de vidrio

Usar pipeta y bulbo para tomar alícuota de 1 ml de la capa de benceno



Conectar base de la columna a fuente de vacío

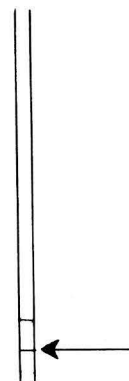
Después que el extracto ha pasado, agregar 5 ml de solución de lavado de la columna, dejar pasar y continuar ejerciendo vacío durante 2 min más o hasta que el solvente se haya evaporado de la columna

Solución de lavado hexano/acetona 80 + 20

Hexano grado analítico en recipiente de vidrio

Acetona grado analítico en recipiente de vidrio

Examinar



La banda de las aflatoxinas se localiza en el centro de la columna o en la interfase del florisil y la alúmina

* En este momento se detectan 4 ppb de aflatoxinas. La adición de 2 ml máximo de la capa de benceno (extracto) incrementa la sensibilidad a aproximadamente 2 ppb

* Tuite y Scott usan tolueno como sustituto de benceno debido a que este último puede ser leucemígeno

Método de minicolumna de Holaday-Velasco (AOAC, 1984, primera acción oficial, aplicable para maíz amarillo y blanco y para cacahuete crudo, 10 ppb)

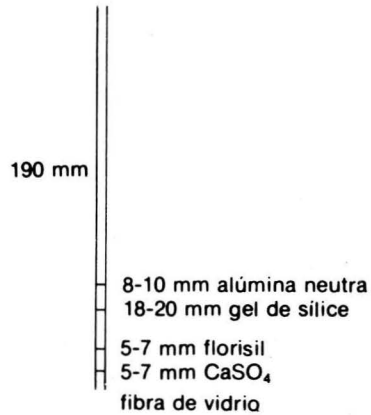
Método

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Tubo de vidrio de borosilicato estándar, 6 mm d.i.

Alúmina neutra, Brockmann activatec J, 80-200 mesh. Fisher Scientific Co. Núm.4-950 o JT Baker Chemical Co. Núm.0540. Activada 2 h a 110 °C
Gel de sílice, E. Merck No7734 (Silica gel 60) para columna
Florisil, 100-200 mesh, Fisher Scientific Co. Núm.101
CaSO₄ drierita no indicadora 20-40 mesh. W.A. Hammond drierite Co.

* Secar los materiales de empaque de la columna 1-2 h a 110 °C. Almacenar en desecador



Extracción



50 g muestra
+
MeOH/H₂O, 80 + 20

vel. alta agitar 1 min

Filtrar



15 ml extracto
+
15 ml sol. salina
agitar vigorosamente 10 seg

Filtrado



15 ml filtrado
+
3 ml benceno



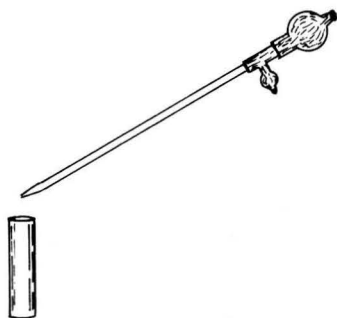
agitar suavemente 10 seg
dejar separar las capas

Metanol grado técnico

Licuada de alta velocidad Waring con vaso de 1 L, hacer un agujero de unos 32 mm a ± 1 cm del centro de la tapa para permitir el escape de los vapores

Papel filtro Whatman Núm. 4
Embudo desechable de plástico 57 mm diámetro
Tubo de cultivo 20 × 150 ml con tapón de plástico
En lugar de tubo puede usarse un embudo de separación pequeño
Solución salina, 600 g NaCl, 600 g Zn(OAc)₂ + 15 ml HOAC en 4 L H₂O

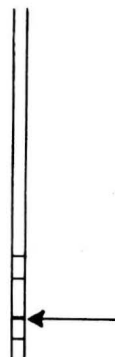
Papel filtro Whatman Núm. 4
Embudo desechable de plástico 57 mm diámetro



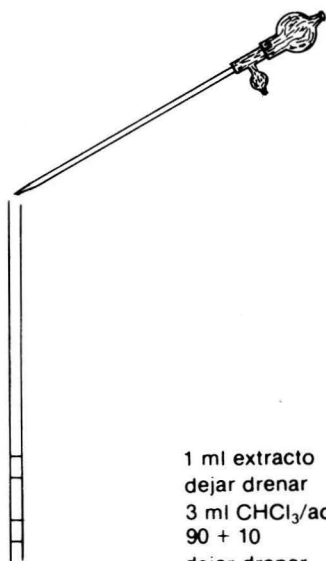
Usar pipeta y bulbo, no pipetear con la boca

Pipeta desechable de 1 ml

Examinar con lámpara UV obscureciendo o en cámara de luz ultravioleta (cromatovue)



La banda fluorescente se localiza en el tope de la capa de florisil



Drenar el extracto hasta que llegue al tope del adsorbente

Agregar el solvente de elución CHCl_3 /acetona, 90 + 10

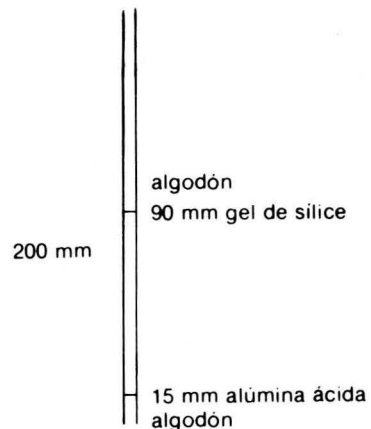
Cloroformo grado analítico en recipiente de vidrio

Acetona grado analítico en recipiente de vidrio

1 ml extracto
dejar drenar
3 ml CHCl_3 /acetona,
90 + 10
dejar drenar

Método de minicolumna de Pons, *et al.*, 1973, aplicable a oleaginosas, semilla de algodón, cacahuete, lino, cereales, maíz, trigo, avena, cebada, centeno, arroz y nueces de árbol: pistache, almendra, nuez de brasil, nuez encarcelada, avellana, 10 ppb

Método



Especificaciones, comentarios, sugerencias

Tubo de vidrio de borosilicato estándar 4 mm d.i., 6 mm d.e. (Corning 234060 o Kimble 80200)

Gel de sílice, especial para cromatografía en columna 100 - 200 mesh. Secar 2 h a 110 °C y almacenar en desecador. Silica AR CC-4 (Mallinckrodt Chemical Works Núm.7086; 7081. Silica AR CC-7 Núm.7087. Silica gel 0.05 - 0.2 mm (E.Merck Núm. 7724) *(Pons prefiere CC- 4)

Alúmina ácida, Brockmann grado de actividad I, 80 - 200 mesh. (Fisher Scientific Co. Núm.A-948.) Ajustar la actividad a grado II agregando 3% H₂O, agitando bien y dejando equilibrar toda la noche. (Puede sustituirse con otras alúminas ácidas)

Algodón absorbente. Remojar en CHCl₃ caliente, exprimir y secar al aire

Extracción



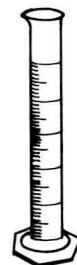
50 g muestra
+
150 ml CHCl₃/H₂O,
80 + 20
+
10 g celita

Licuada de alta velocidad Waring Mod. EP-1 o equivalente con vaso de acero inoxidable de 1 L y tapa de fricción

Celita Hyflo Super-Cel lavado con ácido (Johns-Marville Corp.)

3 min vel. alta

Filtrar



50 ml filtrado



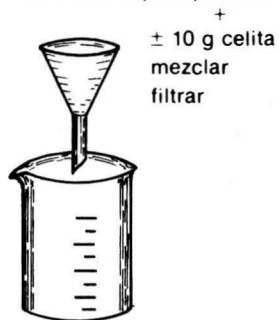
50 ml filtrado
+
20 ml sol. acetato de plomo 20%
+
130 ml H₂O

Papel filtro Whatman Núm. 4 o equivalente, 18.5 cm diámetro

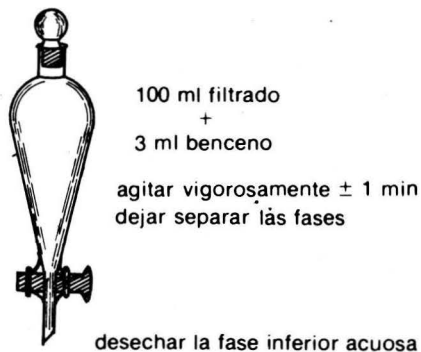
Probeta de 250 ml

Solución de acetato de plomo, disolver 200 g acetato trihidrato de plomo neutro en agua destilada a baño de vapor. Agregar 3 ml ácido acético glacial y diluir a 1 L

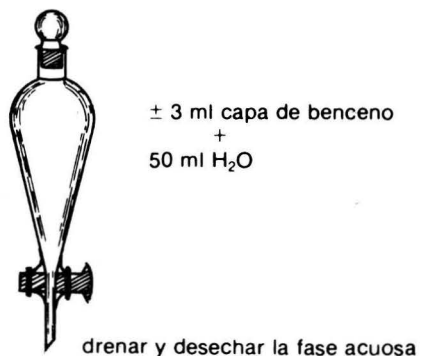
Agitar y dejar reposar ± 3 min para permitir floculación o precipitación



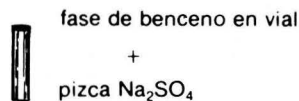
El filtrado debe ser incoloro, si está lechoso regresar la primera porción del filtrado (± 30 ml) al filtro y refiltrar



Benceno grado analítico en recipiente de vidrio



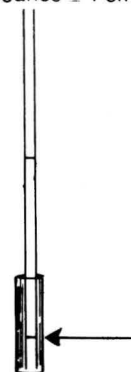
Agitar invirtiendo el embudo suavemente unas 10 veces para evitar la emulsificación



El extracto no debe estar turbio
Vial ± 2 dram

Na₂SO₄ anhidro en polvo

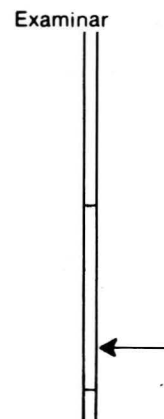
colocar la columna en el extracto y permitir que sea absorbido hasta que el solvente alcance ± 1 cm arriba de la zona de la alúmina



Sacar la columna del extracto y limpiar las paredes externas



Solvente de desarrollo
CHCl₃/CH₃CN/2-propanol, 95 + 5 + 2



La banda de aflatoxinas se localiza ± 1 cm arriba de la zona de la alúmina, el criterio para la detección positiva de aflatoxinas es una banda fluorescente azulosa

Para una mejor estimación, comparar con un patrón

Método de minicolumna de Romer, AOAC, 1984, primera acción oficial, aplicable para la detección de aflatoxinas totales (B1 + B2 + G1 + G2) en: almendras 5 ppb; maíz blanco y amarillo, harina de cacahuate y de semilla de algodón, cacahuate, mantequilla de cacahuate y pistache 10 ppb y en alimentos para ganado, 15 ppb

Método

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Tubo de vidrio de borosilicato estándar, 6 mm d.i.

Alúmina neutra. Brockmann activada, J 80 200 mesh. Fisher Scientific Co. Núm. 4-950 o JT Baker Chemical Co. Núm. 0540. Activada 2 h a 110 °C

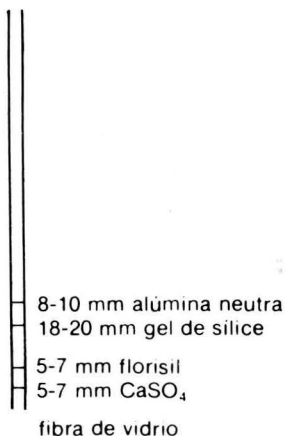
Gel de sílice, E. Merck Núm. 7734 (Silica gel 60) para columna

Florisil, 100-200 mesh. Fisher Scientific Co. Núm. 101

CaSO₄, drierita no indicadora 20-40 mesh. W.A. Hammond drierite Co.

* Secar los materiales de empaque de la columna 1-2 h a 110 °C
Almacenar en desecador

190mm



Extracción



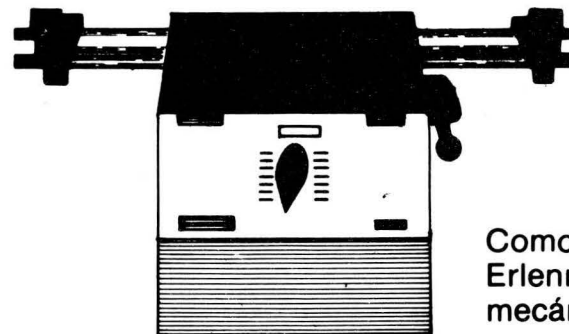
50 g muestra
+
250 ml acetona/agua, 85 + 15

vel. alta (3 min)

Licuada de alta velocidad, a prueba de explosión, con vaso de 1 L, hacer un agujero de unos 32 mm a ± 1 cm del centro de la tapa para permitir el escape de los vapores

Acetona grado técnico en frasco de vidrio

Agua desionizada



vel. alta (45 min)

Como alternativa usar matraz Erlenmeyer de 500 ml y agitador mecánico, Burrell o equivalente

Filtrar

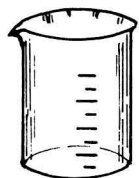


150 ml

Papel filtro Whatman Núm. 4, 24 cm de diámetro

Embudo 160 mm

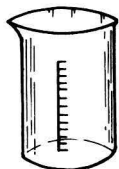
Probeta graduada 250 ml



150 ml filtrado
+
± 3 g CuSO₄ básico

mezclar bien

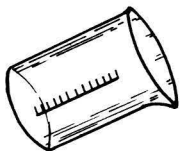
Transferir 150 ml de extracto a vaso de precipitados de 400 ml



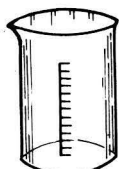
170 ml 0.2N NaOH
+
30 ml Slurry de FeCl₃

mezclar bien

Vaso de precipitados de 600 ml
Solución 0.2N NaOH, 8 g NaOH/L
Slurry FeCl₃. Mezclar 20 g FeCl₃ anhidro (Fisher Scientific Co. Núm. 1-89 o equivalente) con 300 ml H₂O



extracto CuSO₄



NaOH + Slurry de Fe
+

150 ml tierra de diatomeas
mezclar bien

Usar vaso de precipitados de 150 ml como medida

Tierra de diatomeas Hyflo Super Cel o equivalente

Filtrar



150 ml filtrado



150 ml extracto
+
150 ml H₂SO₄ 0.03%
+
10 ml CHCl₃

agitar vigorosamente ± 2 min
dejar separar las fases

Papel Whatman Núm. 4

Embudo de 160 mm
También se puede usar embudo de Buchner de 100 mm d.i.

Probeta graduada 250 ml

Embudo de separación de 500 ml

Sol. 0.03% H₂SO₄. Diluir 0.3 ml H₂SO₄ en 1 L

Cloroformo grado analítico en recipiente de vidrio

Embudo de separación de 500 ml

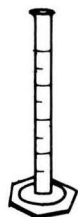




fase inferior de CHCl_3 (13-14 ml)
+
100 ml sol. de lavado de KOH

girar suavemente 30 seg y dejar separar las 2 fases

Solución de lavado de KOH
0.02N KOH con 1% KCl. Disolver
1.12 g KOH y 10 g KCl en 1 L H_2O



emulsión
+
 ± 1 g Na_2SO_4
agitar
dejar separar las fases

Si se emulsiona, pasar la emulsión a una probeta de 10 ml, agregar ± 1 g de Na_2SO_4 anhidro, tapar y agitar 30 seg y dejar separar, la fase de CHCl_3 no necesita estar completamente transparente



emulsión
+
50 ml 0.03% H_2SO_4

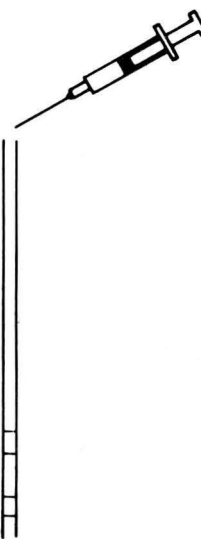
Si no se desemulsiona transferir la emulsión a un embudo de separación de 150 ml y lavar con 50 ml 0.03% H_2SO_4



3 ml extracto

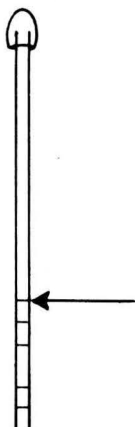
Colectar 3 ml extracto de CHCl_3 en una probeta graduada de 10 ml

Cromatografía



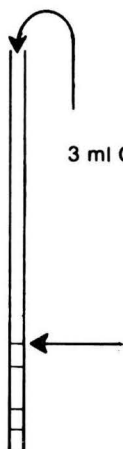
Jeringa de 5 ml con aguja 1.5 pulgadas, 15 gage

Dejar pasar el extracto a través de la columna por gravedad (15-30 min)



Para acelerar la elución se puede usar un bulbo en el tope de la columna aplicando aire suavemente para forzar el solvente por la columna, 10 cm/min, hasta que el solvente aparezca en la punta. Dejar el resto del solvente correr por gravedad

Cuando el solvente llegue al tope del adsorbente agregar 3 ml solvente de elución. CHCl_3 /acetona 9 + 1



3 ml CHCl_3 /acetona, 9 + 1

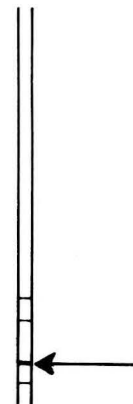
CHCl_3 grado analítico en recipiente de vidrio
Acetona grado analítico en recipiente de vidrio

Drenar hasta que el solvente llegue al tope del adsorbente

dejar drenar por gravedad

* No dejar que la columna se seque durante la determinación, para evitar pérdida de aflatoxinas

Examinar



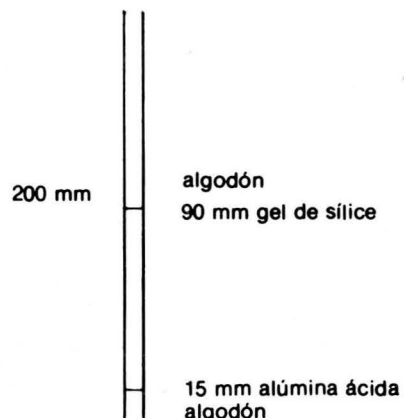
Examinar la columna con lámpara UV en cuarto oscurecido o en un gabinete especial (Cromatovue)

Realizar las observaciones con extractos de muestras solas, con muestras inoculadas con cantidades conocidas de estándar y con estándar solo

La banda fluorescente se localiza en el tope de la capa de florisil a ± 2 cm de la base de la columna

Método

Especificaciones, comentarios, sugerencias

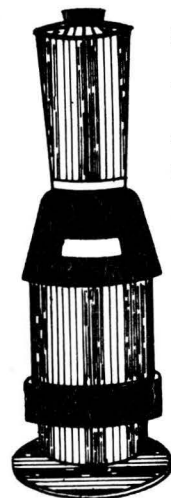


Tubo de borosilicato estándar 4 mm d.i. 6 mm d.e. (Corning Núm. 2340060 o Kimble Núm. 80200) Algodón absorbente. Remojar en CHCl_3 caliente, exprimir y secar en el aire

Gel de sílice especial para cromatografía en columna o 100-200 mesh. Secar 2 h a 110°C y almacenar en desecador. Silica AR CC-4 (Mallinckrodt Chemical Works Núm. 7086; 7081. Silica AR CC-7 Núm. 7087. Silica gel 0.05-0.2 mm (E. Merck Núm. 7734) (Pons prefiere CC-4)

Alúmina ácida, Brockman grado de actividad I, 80-200 mesh. (Fisher Scientific Co., Núm. A-948) Ajustar la actividad a grado II agregando 3% H_2O , agitando bien y dejando equilibrar toda la noche. (Puede substituirse con otras alúminas ácidas)

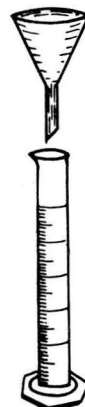
Extracción



50 g muestra
+
10 g celita
+
150 ml solvente de extracción

3 min vel. alta

Celita Núm. 545 (Johns Manville) lavada con ácido
Solvente de extracción acetona¹agua, 85 + 15
Acetona grado analítico en recipiente de vidrio



50 ml filtrado
+
sol. saturada acuosa
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
+
130 ml H_2O dest.
+
10 g celita

agitar

dejar reposar 2 min

Papel Whatman Núm. 2 V plisado o equivalente, 18.5 cm
Embudo 120 mm de pie corto

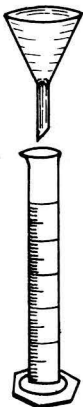
Probeta graduada de 250 ml
Solución saturada acuosa
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \pm 70 \text{ g}/100 \text{ ml}$



10 ml filtrado
+
20 ml sol. sat. acuosa
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
+
10 g celita

agitar, dejar reposar
2 min

Filtrar



Transferir



100 ml filtrado
+
3 ml benceno
agitar 30 seg
dejar que las capas se separen
desechar fase acuosa
fase de benceno
+
50 ml H_2O
agitar
dejar separar las 2 fases
desechar la fase acuosa

Vaso de precipitados de 250 ml

Embudo de separación de 125 ml

agregar el agua lentamente

Transferir



fase de benceno
+
suficiente Na_2SO_4

Vial pequeño

Na_2SO_4 granular, anhidro; agregar mezclando para aclarar la solución

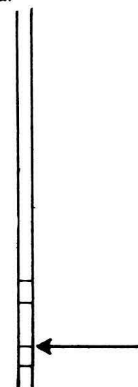


dejar que el extracto suba por la columna hasta alcanzar ± 1 cm arriba de la capa de Al_2O_3

sacar la columna del extracto, limpiar las paredes externas e introducirla en el solvente de desarrollo
desarrollar la columna 5 min

Solvente de desarrollo
 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}/2$ -isopropanol,
93 + 5 + 2

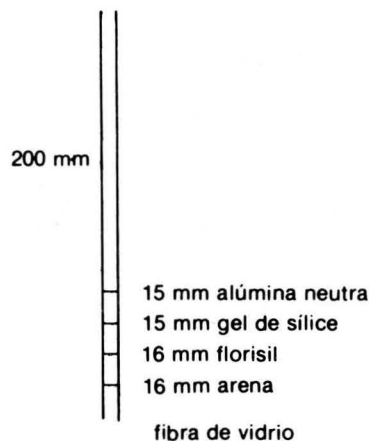
Examinar



La banda de aflatoxinas se localiza ± 1 cm arriba de la zona de Al_2O_3

Método de minicolumna de Velasco, 1972; Velasco y Whitten, 1973, aplicable a productos de semilla de algodón, detección 10 ppb

Método



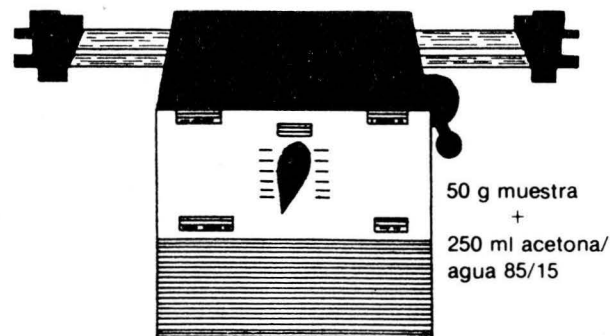
Especificaciones, comentarios, sugerencias

Tubo de vidrio 3 mm d.i. los tubos pueden ser usados varias veces

Alúmina neutra, 80-200 mesh Brockmann, actividad I
Gel de sílice para columna de cromatografía (E. Merck) o equivalente
Florisil 100-200 mesh
Arena

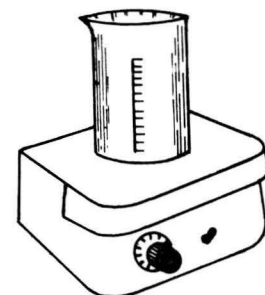
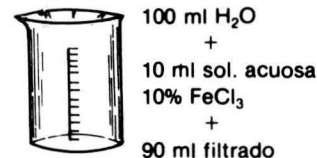
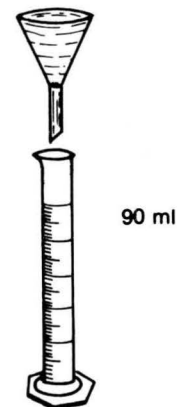
Activar los adsorbentes a 110 °C, 2 h

Extracción



agitar 30 min

Filtrar



agitar ± 1 min

eleva el pH inicial a ± 1.8-4.6
agregando 13.4 ml NaOH 4%

Usar agitador magnético

Agitar varios minutos después de cada adición de NaOH para permitir la adsorción completa de los pigmentos en el gel férrico formado



todo el filtrado 180 ± 5 ml
 +
 200 ml H₂O
 +
 2 x 25 ml CHCl₃

Embudo de separación de 500 ml

Extraer 2 veces con 25 ml CHCl₃



combinar las dos capas de cloroformo



evaporar

dejar enfriar

Usar baño de vapor

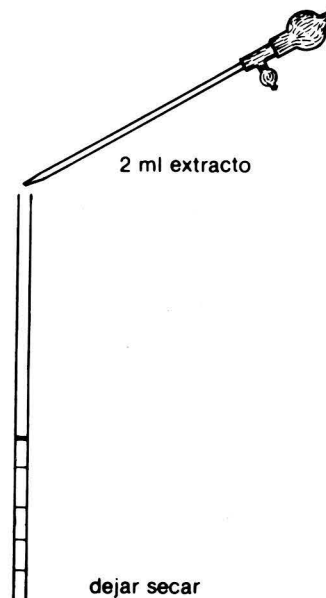


transferir cuantitativamente el residuo a un vial con 3 x 2 ml CHCl₃ acetona 90 + 10

3×2 ml = 3 porciones de 2 ml cada una de CHCl₃ acetona, 90 + 10

Cloroformo grado analítico en recipiente de vidrio

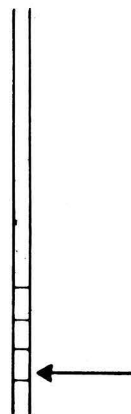
Acetona grado analítico en recipiente de vidrio



2 ml extracto

dejar secar
 enjuagar con 1 ml CHCl₃, acetona 90 + 10
 dejar secar

Examinar



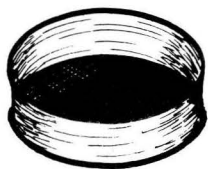
Los tubos pueden ser examinados húmedos o secos, las intensidades son ligeramente más altas cuando los tubos están húmedos que cuando están secos

La banda de aflatoxinas aparece en la capa de florisil

Maíz. Primera acción AOAC 1984, también aprobado por la AACC.

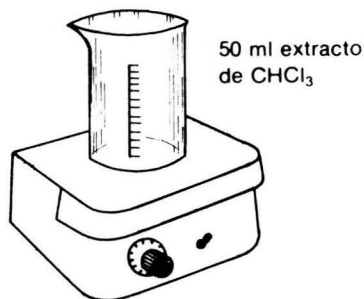
Método

Preparación de la muestra



Determinación

Monitoreo rápido



evaporar en baño de vapor hasta dejar el residuo de aceite

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Moler el lote completo, pasar por una criba Núm. 14, dividir la muestra de manera secuencial hasta obtener porciones de 1 a 2 K, conservar el excedente

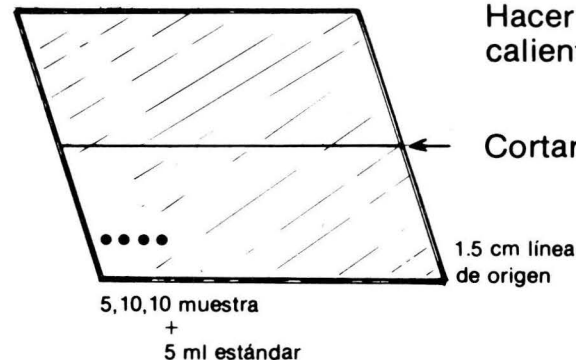
Moler la porción de 1 a 2 K a que pase por una criba Núm. 20

Homogenizar

Tomar la muestra analítica usando divisor

Igual que CB para cacahuete

Igual que CB para cacahuete hasta la obtención del extracto, usar la segunda porción de 50 ml, del extracto de CHCl_3



Hacer las manchas con el aceite caliente

Cortar el gel de sílice con lápiz

desarrollar en éter anhidro en tanque no equilibrado 30 min

dejar secar

redesarrollar en la misma dirección en tanque no equilibrado con acetona/ CHCl_3 1 + 9 (\pm 20 min)

Desarrollar hasta que el tope del solvente llegue a la mitad de la placa

Solvente de desarrollo, éter anhidro grado analítico en recipiente de vidrio

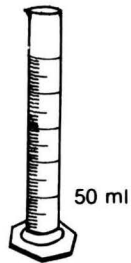
Ajustar la proporción de acetona/ CHCl_3 como sea necesario para modificar el R_f de las aflatoxinas

Método

50 g muestra
+
25 ml H₂O
+
25 g tierra de diatomeas
+
250 ml CHCl₃



Agitar 30 min



Especificaciones, comentarios, sugerencias

Erlenmeyer de 500 ml, o cubeta de acero inoxidable

Tierra de diatomeas, Hyflo Super Cel

CHCl₃ (0.75% EtOH), grado analítico

Agitador de acción de muñeca Burrel o equivalente

Papel filtro plisado S&S 588 o equivalente

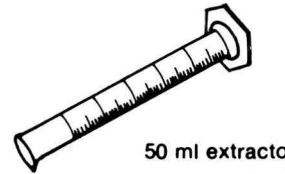
Embudo 150 mm

Probeta de 500 ml

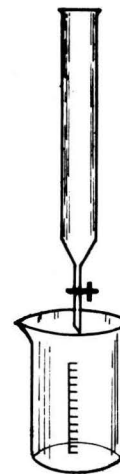
Si la filtración es lenta, transferir a embudo de Buchner precubierto con una capa de unos 5 mm de tierra de diatomeas y usar vacío (ligero para evitar la evaporación de CHCl₃)



15 g Na₂SO₄
10 g gel de sílice
5 g Na₂SO₄
fibra de vidrio



50 ml extracto



flujo máximo

desechar

Tubo de cromatografía 22 × 300 mm

Na₂SO₄ grado analítico granular

Después de los 5 g Na₂SO₄, agregar CHCl₃ hasta ± la mitad del tubo

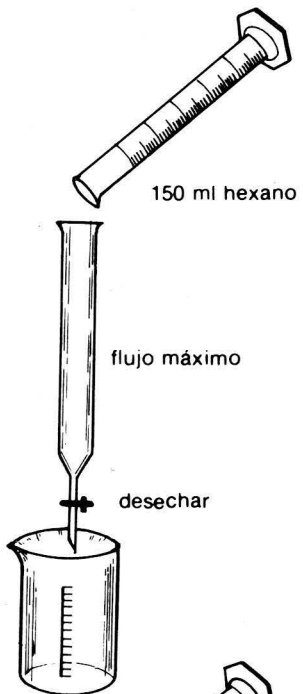
Gel de sílice para columna de cromatografía. E. Merck (Darmstadt) Silica gel 60, 0.063-0.2 mm. Activada secando 1 h a 105 °C. Agregar agua 1 ml/100 g Mezclar bien. Almacenar 15 h en recipiente hermético

Lavar las paredes del tubo con ± 20 ml CHCl₃ y mezclar para dispersar el gel de sílice

Cuando el rango de asentamiento disminuya, drenar un poco del CHCl₃ para ayudar al asentamiento dejando 5-7 cm arriba del gel de sílice

Agregar los 15 g de Na₂SO₄ lentamente

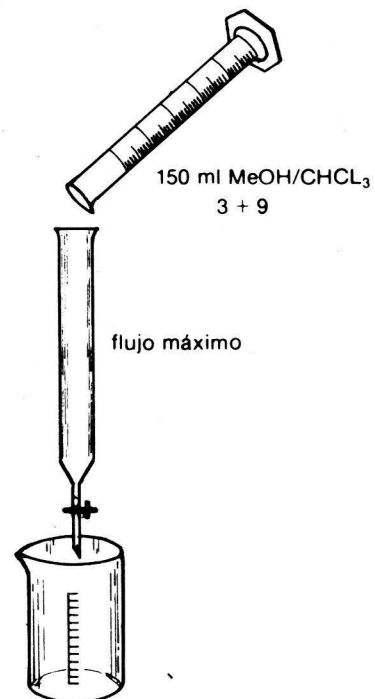
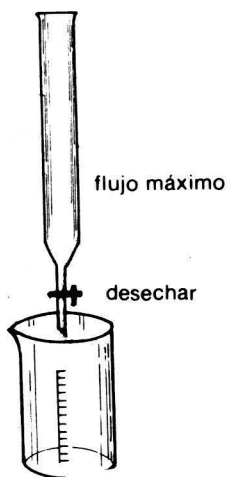
Drenar el CHCl₃ hasta el tope del Na₂SO₄



Hexano grado analítico en recipiente de vidrio

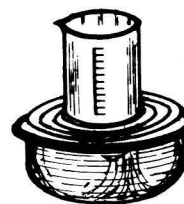


Eter (anhidro 0.01% alcohol)



MeOH grado analítico en recipiente de vidrio

colectar desde el momento de la adición hasta que el flujo pare

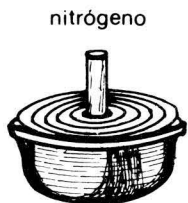


Baño de vapor

evaporar a casi sequedad

transferir el residuo cuantitativamente con CHCl_3 a un vial

Vial 4 dram



evaporar a casi sequedad en baño de vapor con atmósfera de nitrógeno

Tapar el vial con tapón hueco de polietileno



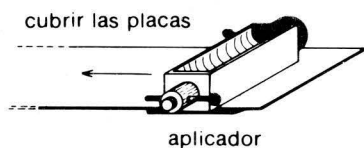
30 g gel de sílice
+
H₂O cantidad recomendada por el fabricante

agitar vigorosamente

Gel de sílice para cromatografía de capa fina. Macherey, Nagel GHR, Macherey, Nagel & Co. P.O. Box 307, D-516 Duren, Germany distribuida por Brinkman Instruments, Inc, Applied Science Adsorbosil 105 y Mallinckrodt Silic AR 4 G o 7 G

Es más fácil conseguir en México las placas precubiertas. Merck 5721

Placas de vidrio 20 × 20 cm
Cubrir con 0.25 mm de gel de sílice
Dejar secar ± 10 min
Secar 2 h a 80 °C o 1 h a 110 °C
Almacenar en desecador



placa preliminar

Puede omitirse si se conoce el contenido aproximado de aflatoxinas en la muestra



residuo del extracto
+
200 µl benceno/CH₃CN
98 + 2

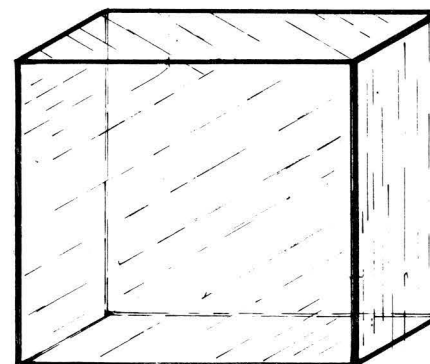
tapar
agitar

Benceno grado analítico en recipiente de vidrio

CH₃CN grado analítico en recipiente de vidrio

Agitador vortex

colocar la placa en el tanque de desarrollo



± 2 cm solvente de desarrollo

desarrollar la placa 40 min a 23-25 °C hasta que las aflatoxinas alcancen un R_f 0.4 - 0.7

sacar la placa del tanque

dejar evaporar el solvente

observar con luz UV

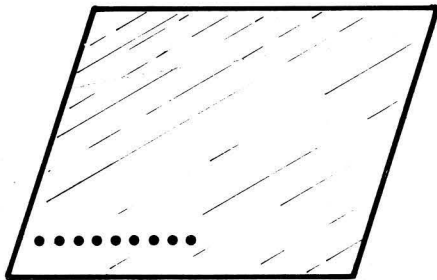
Solvente de desarrollo, acetona/CHCl₃, 1 + 9

La mezcla de solventes puede variar de 5 + 95 a 15 + 85 acetona/CHCl₃

Calcular la concentración de aflatoxinas por comparación visual

Estimar la dilución necesaria si se requiere

placa cuantitativa



3.5 5 6.5 6.5
muestra +
5 3.5 5 6.5 5 1
estándar

desarrollar igual que la placa preliminar

Cálculo de la concentración B1

$$\mu\text{g/Kg} = (S \times Y \times V) \quad (X \times W)$$

Si la placa preliminar sugiere una nueva concentración del extracto de la muestra, evaporar y redissolver en el volumen de benceno/CH₃CN (98 + 2) calculado

S = μl estándar aflatoxina B1 igual al problema

Y = concentración del estándar de aflatoxina B1 $\mu\text{g/ml}$

V = μl de la dilución final del extracto de la muestra

X = μl extracto de la mancha de la muestra con intensidad de fluorescencia igual a S (estándar de B1)

W = gramos de muestra aplicados a la columna

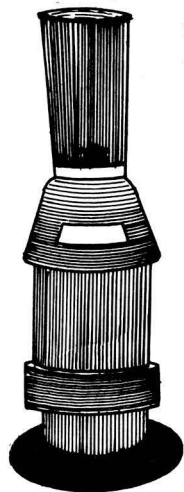
La alícuota de 50 ml de CHCl₃ del extracto de mantequilla de cacahuate o de semilla de cacahuate removida en la extracción generalmente contiene de 5-6 ml de grasa que se adiciona al volumen por lo que la alícuota de 45 ml de CHCl₃ que ha sido extraída realmente representa 9 g de material en lugar de 10 g como en los materiales no oleosos

Calcular B2, G1 y G2 igual

Método BF. AOAC, 1984, aplicable a cacahuate y productos de cacahuate

Método

50 g mantequilla de cacahuate
+
250 ml MeOH/H₂O, 55 + 45
+
100 ml hexano



1 min vel. alta

100 g cacahuates o
harina de cacahuate
+
500 ml MeOH/H₂O,
55 + 45
+
200 ml hexano
+
4 g NaCl

transferir

frasco de centrifuga



centrifugar 5 min a 2000 rpm



Especificaciones, comentarios, sugerencias

MeOH grado analítico en recipiente de vidrio
Hexano grado analítico en recipiente de vidrio

NaCl grado analítico

Si no tiene prisa o se carece de centrifuga, dejar la mezcla en el vaso de la licuadora, la separación ocurrirá en unos 30 min (en el caso de los cacahuates crudos o tostados y la mantequilla de cacahuate)



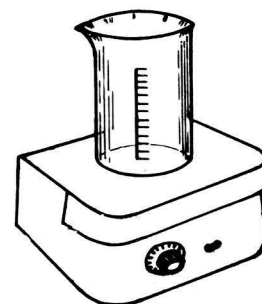
25 ml fase MeOH
+
25 ml CHCl₃
agitar 30 - 60 seg

dejar separar las fases
capa inferior CHCl₃

CHCl₃ grado analítico en recipiente de vidrio

Vaso de precipitados de acero inoxidable. Se puede usar un vaso de precipitados de vidrio de 100 ml pero se requiere mayor tiempo para evaporar

No dejar pasar la pasta con el extracto



evaporar el solvente hasta dejar entre 2 ml y casi sequedad o hasta que el vapor de condensación no se vea en el pico del vaso

Poner un poco de agua bajo el matraz para mejorar la transferencia de calor

No dejar el vaso en la placa caliente después que el solvente se ha evaporado

Como alternativa se puede usar matraz Erlenmeyer y baño de vapor

transferir el extracto a un vial lavando cuidadosamente

Vial 4 dram



evaporar a sequedad en atmósfera de nitrógeno, en baño de vapor o en placa caliente

Disolver en extracto en 200 μ l benceno/ CH_3CN , 98 + 2 para el manchado

Benceno grado analítico en recipiente de vidrio

Igual que CB. No se requiere corrección para la grasa en el solvente de extracción

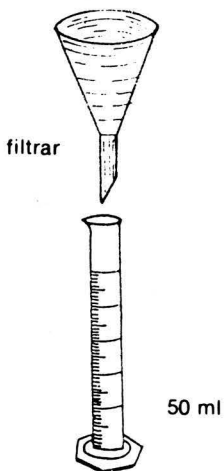
cromatografía y cálculos

Método

50 g muestra
+
25 g tierra diatomeas
+
250 ml CHCl₃



agitar 30 min



Especificaciones, comentarios, sugerencias

Tierra de diatomeas, Hyflo Super-Cel
CHCl₃ grado analítico en recipiente de vidrio

Agitador de acción de muñeca Burrel o equivalente

Papel filtro preplisado S & S o equivalente
Embudo de 150 mm
Probeta de 500 ml

Si la filtración es lenta, transferir a embudo de Buchner precubierto con una capa de ± 5 mm de tierra de diatomeas y ejercer vacío ligero

Recibir los primeros 50 ml del filtrado

columna de cromatografía, empaque de la columna



± 15 g Na₂SO₄
 ± 10 g gel de sílice
 ± 5 g Na₂SO₄
fibra de vidrio

Columna de vidrio 22 x 300 mm con punta de teflón

Na₂SO₄ granular anhidro grado analítico

Gel de sílice para columna E. Merck (Darmstadt)

Silica gel 60, 0.063-0.2 mm, activar secando 1 h a 105 °C, agregar H₂O 1 ml/100 g, tapar, agitar hasta bien mezclado y almacenar 15 h, en recipiente hermético

Colocar una pequeña bola de fibra de vidrio

Agregar ± 5 g Na₂SO₄ para dar base al gel de sílice

Agregar CHCl₃ hasta llenar $\frac{1}{2}$ de la columna

Agregar ± 10 g gel de sílice

Limpiar las paredes internas de la columna con ± 20 ml CHCl₃ y agitar para que se disperse al gel de sílice

Cuando el rango de sedimentación disminuya, drenar el CHCl₃, dejando 5-7 cm sobre el gel de sílice

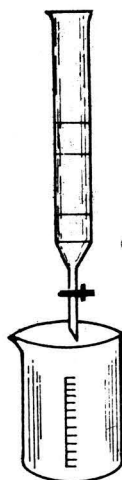
Agregar lentamente ± 15 g de Na₂SO₄

Drenar el CHCl₃ hasta el tope del Na₂SO₄

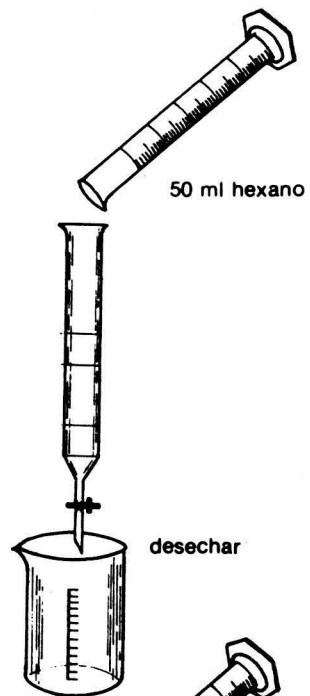
Usar la misma probeta en la que se recibió el extracto durante todos los pasos de purificación



los primeros 50 ml del extracto

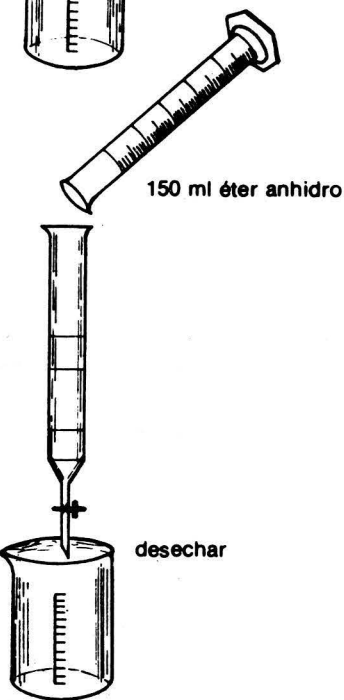


drenar hasta el tope de Na₂SO₄



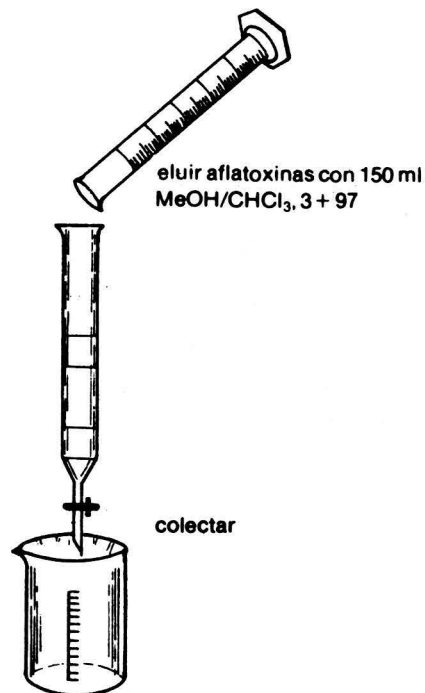
50 ml hexano

Hexano grado analítico en recipiente de vidrio



150 ml éter anhidro

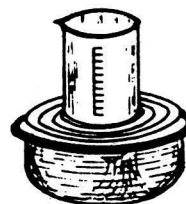
Eter anhidro 0.1% alcohol grado analítico en recipiente de vidrio



eluir aflatoxinas con 150 ml MeOH/CHCl₃, 3 + 97

MeOH grado analítico en recipiente de vidrio

Colectar esta fracción desde el momento de la adición hasta que cese el flujo



evaporar a casi sequedad en baño de vapor

Usar piedras de ebullición

Transferir el residuo cuantitativamente con CHCl₃ a un vial pequeño



evaporar a sequedad

sellar el vial con tapón hueco de polietileno

placa preliminar

resuspender el extracto en 200 μ l benceno/ CH_3CN 98 + 2

placa cuantitativa



3.5,5,6.5,6.5,
muestra +
5 3.5,5,6.5,5,1
estándar

Es preferible en atmósfera de nitrógeno

Si se requiere un extracto más limpio, concentrar el eluido a unos 50 ml transferir a columna de cromatografía con 10 g de gel de sílice y proceder a la purificación desde el principio omitiendo el paso de hexano

Agitar vigorosamente en agitador Vortex
En México conseguimos las placas precubiertas. Merck 5721

desarrollar la placa 40 min a 23-25 °C hasta que las aflatoxinas alcancen un Rf 0.4 - 0.7

sacar la placa del tanque
dejar evaporar el solvente
observar con luz UV

Solvente de desarrollo, acetona/ CHCl_3 , 1 + 9
la mezcla de solventes puede variar de 5 + 95 a 15 + 85 acetona/ CHCl_3

Calcular la concentración de aflatoxinas por comparación visual

* Este método es muy similar al CB, checar

Ocratoxina A. De las ocratoxinas reconocidas a la fecha, aparentemente la ocratoxina A es la más importante; cuando fue descrita se reconoció su toxicidad en patitos, ratones y ratas; esta toxina ha sido aislada de muchos productos alimenticios. De los hongos reconocidos como productores de ocratoxinas los más importantes *Aspergillus ochraceus* del grupo *A. ochraceus* (Raper y Fennell, 1965) y *Penicillium viridicatum* del subgénero *Penicillium* (Pitt, 1979) Sección Asymetrica-Fasciculata (Raper y Thom, 1949). Los productos de los que la ocratoxina A ha sido aislada en forma natural son: cebada, maíz, avena, centeno, trigo, frijol blanco, alimentos balanceados a base de granos, cacahuate y semilla de café (Steyn, 1971; Davis y Diener, 1978; Nesheim, 1976).

Los efectos de las ocratoxinas no han sido estudiados tan ampliamente como los de las aflatoxinas pero también dependen de la especie y peso del animal; con frecuencia estos efectos no son específicos pero en el caso de síntomas crónico el hígado y el riñón son afectados (Steyn, 1971; Davis y Diener, 1978).

Propiedades Químicas: Compuesto cristalino, incoloro, peso molecular, aproximadamente 404, fórmula empírica $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Punto de fusión cuando cristalizado en benceno $94 - 96^{\circ}C$ (cuando se cristaliza con xileno el punto de fusión es $169^{\circ}C$). Fluoresce azul verdoso con luz UV en placas de cromatografía de capa fina de gel de sílice, cuando es expuesta a gases de amonio, la fluorescencia cambia a azul intenso. R_f 0.7 en tolueno-acetato de etilo 90%-ácido fórmico (6:3:1). Absorción UV máxima 215 y 334 nm, coeficientes de extinción 36,800 y 64,000 (Steyn, 1971; Cole, 1976).

A continuación se presenta el método oficial de la AOAC, que es un método analítico de cromatografía de capa fina.

Método para ocratoxinas en cebada. AOAC, 1984

Método

Preparación y extracción de la muestra



agitar 30 min

50 g muestra
+
25 ml 0.1M H_3PO_4
+
250 ml $CHCl_3$

Especificaciones, comentarios, sugerencias

H_3PO_4 (85%) grado analítico en recipiente de vidrio
 $CHCl_3$ grado analítico en recipiente de vidrio

Agitador de acción de muñeca Burrel o equivalente

filtrar

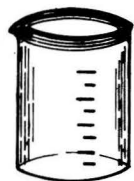
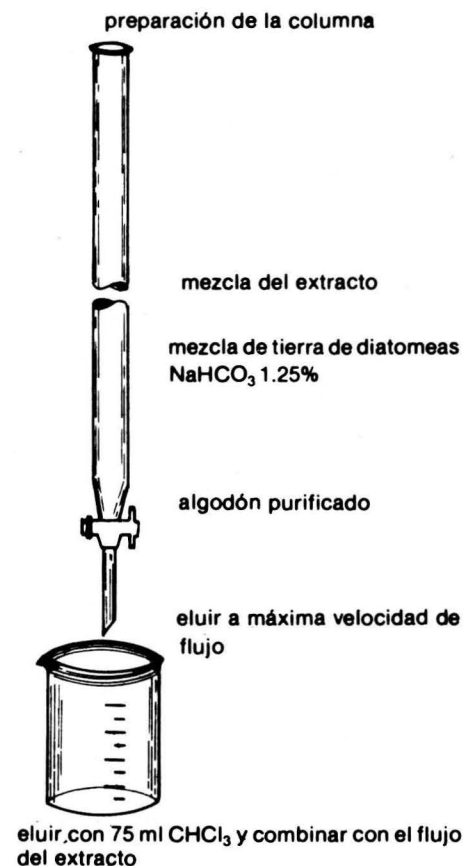


± 10 g tierra de diatomeas
filtro de fibra de vidrio

Embudo Buchner de 9 cm filtro de papel de fibra de vidrio Whatman GF/B o equivalente
Tierra de diatomeas, Hyflo Super-Cel

Remojar ± 900 g celita 545 (lavada en ácido) toda la noche en MeOH

Separación de los ácidos
a) remoción de los ésteres



evaporar a sequedad en baño de vapor
reservar para la separación de los ésteres

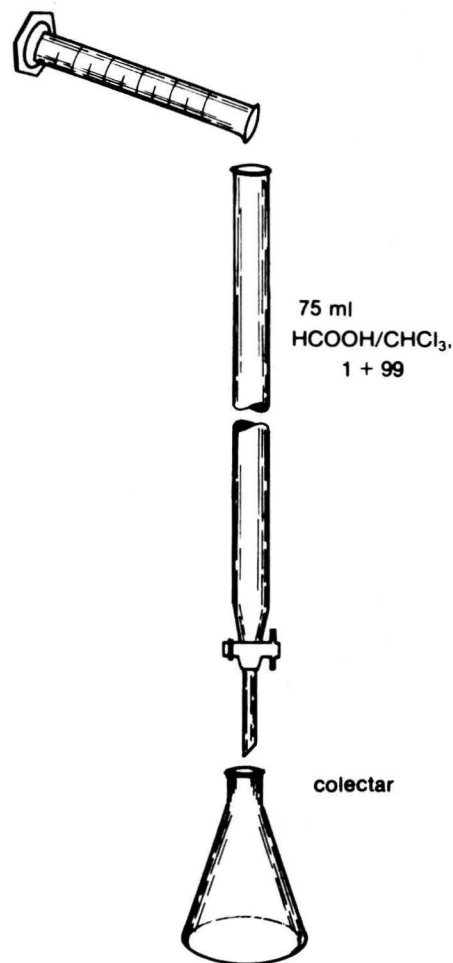
Tubo de cromatografía 700 × 17 mm d.e.

Mezcla del extracto: 50 ml extracto con 20 ml hexano*
Hexano grado analítico en recipiente de vidrio

Algodón purificado, lavar 50 g de algodón absorbente en un vaso de precipitados con 1 L de CHCl_3 .
Decantar la solución y evaporar el CHCl_3 residual. Conservar el algodón en recipiente cerrado
Mezcla de tierra de diatomeas, en vaso de precipitados de 50 ml, 2 g de tierra de diatomeas, mezclar con solución 1.25% NaHCO_3

* Reservar el excedente del extracto de CHCl_3 para las pruebas confirmatorias.

b) remoción de los ácidos



Usar $\text{HCOOH}/\text{CHCl}_3$, 1 + 99 recién preparado
 HCOOH (90%) grado analítico en recipiente de vidrio

Erlenmeyer 250 ml

Agregar 2 piedras de ebullición



evaporar a casi sequedad en baño de vapor
transferir el residuo cuantitativamente con CHCl_3
evaporar a sequedad (baño de vapor, atmósfera de nitrógeno)

Tubo de centrifuga cónico de 15 cm
El retraso en la evaporación de $\text{HCOOH}/\text{CHCl}_3$, puede provocar pérdida de ocratoxinas
Reservar el extracto para TLC



residuo de ésteres
+
50 ml hexano

Disolver el residuo obtenido en el paso de separación de ésteres en 50 ml hexano y pasar por la columna

Usar el mismo recipiente del residuo para los subsecuentes solventes

separación de los ésteres



2.5 ml sol. metanólica/tierra de diatomeas

algodón purificado

Tubo de cromatografía 350 × 25 mm

Mezcla de tierra de diatomeas/sol. metanólica de NaHCO_3 , 0.3 g NaHCO_3 en 30 ml H_2O y agregar 70 ml MeHO y 4 g tierra de diatomeas



50 ml benceno/hexano
1 + 9

desechar

Forzar los solventes de elución con gas comprimido a 1-2 psi (6.9 - 13.8 kpa)

No dejar que la columna se seque



100 ml HCOOH/benceno/hexano

eluir



evaporar a sequedad

transferir cuantitativamente a tubo de centrifuga con CHCl_3

evaporar a sequedad en baño de vapor, atmósfera de nitrógeno



Solución HCOOH/benceno/hexano: agitar 100 ml benceno/hexano, 20 + 80 con 10 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 30 + 70 dejar que las capas se separen y desechar la capa inferior. Agitar la capa superior con 5 ml HCOOH, desechar la capa inferior

Benceno/hexano equilibrado previamente con 2.5 ml solución metanólica de NaHCO_3

evaporar inmediatamente
Tubo de centrifuga cónico

cromatografía de capa fina
análisis visual

disolver el extracto de remoción de ácidos en
750 μl HOAC/benceno

•••••
3,5,7,5,10,10 5,7,5,10 5,7,5,10

+
10ng est. ocr. A
+
10ng est. ocr. B

extracto estándar estándar
 ocratoxina A ocratoxina B

desarrollar en tanque no forrado y no equilibrado

sacar la placa del tanque y dejar evaporar el solvente a temperatura ambiente

observar con luz UV de onda larga y corta

Gel de sílice Macherey-Nagel
GHR distribuida por Brinkmann
Instruments INC. Adsorbosil
105. Applied Sciences Silic
AR4G Mallinckrodt

HOAC grado analítico en recipiente de vidrio

Solvente de desarrollo, benceno/
 MeOH/HOAc , 18 + 1 + 1
Combinar 2 volúmenes MeOH/HOAc , 1 + 1 con 18 vol. benceno

Ajustar la proporción benceno/
 MeOH/HOAc si es necesario,
reducir benceno para incrementar R_f

El rango de R_f va de 0.4-0.8, la
ocratoxina A arriba de la B
La ocratoxina A fluoresce más
intensamente en luz UV de onda
larga y la B es más brillante en la
longitud de onda corta
Comparar las muestras con los
patrones de referencia

Método

Preparación de la muestra

Extracción



5 min en baja

50 g muestra
+
270 ml MeOH
+
30 ml sol. acuosa
KCl 4%

Especificaciones, comentarios, sugerencias

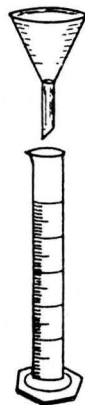
Ver preparación de muestras
Licuadora Waring con vaso de 1 L, no es necesario que sea a prueba de explosión

Metanol, E. Merck

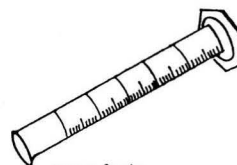
Solución de cloruro de potasio, 4%, 40 g KCl/L

Papel filtro preplisado

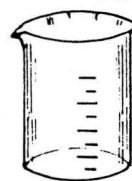
Filtrar



150 ml



transferir



150 ml extracto
+
150 ml sol. clarificadora
(sol. Cu_2SO_4 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
dependiendo de la muestra)

+
50 ml tierra de diatomeas (medido en vaso de precipitados de 50 ml)



agitar con agitador de vidrio



150 ml extracto
+
150 ml H_2O destilada

extraer con 2×10 ml cloroformo

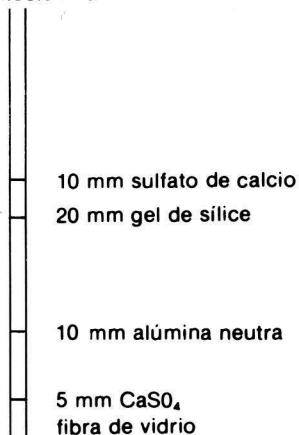
Vaso de precipitados de 600 ml

Solución clarificadora:
solución de sulfato cúprico, 10%, 100 g CuSO_4 /L
solución de sulfato de amonio, 30%, 300 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L
Tierra de diatomeas. Hyflo Super-Cel o equivalente

2×10 = dos porciones independientes

Cloroformo, grado analítico en recipiente de vidrio, E. Merck

minicolumna



agregar 2 ml extracto de cloroformo de la primera extracción y dejar drenar hasta el tope de CaSO₄

agregar 4 ml tolueno/acetato de etilo/ácido acético (50 + 49 + 1)

Tubo de vidrio de 8 mm d.e. long. 200 mm con un cuello de 60 mm después de adelgazar el tubo a un diám. de 4 mm de d.e. Sulfato de calcio anhidro, 20-40 mesh, preparado de sulfato de calcio anhidro en polvo E. Merck Gel de sílice, Silica gel 60, 70-230 mesh, E. Merck

Alúmina neutra 100-200 mesh, E. Merck

Secar 1 h a 110 °C y mantener en desecador

Tolueno grado analítico en recipiente de vidrio

Acetato de etilo grado analítico en recipiente de vidrio

Acido acético grado analítico en recipiente de vidrio

Si hay ocratoxina A presente, la banda fluorescente azul, se presentará en la interfase gel de sílice/alúmina.

Límite de detección 80 µg/kg

Los cálculos se hacen según la técnica de la AOAC

Vial 10 ml

Cuantificación



combinar 3 ml de cada uno de los 2 extractos de cloroformo



evaporar a casi sequedad en baño de vapor a 80 °C

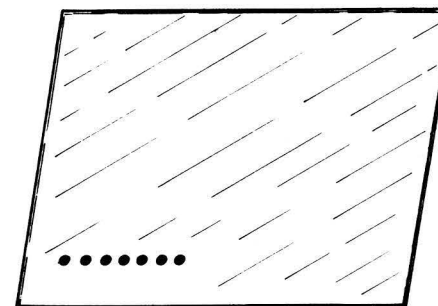
Redisolver el residuo en 200 µl benceno



colocar el vial tapado en baño ultrasónico

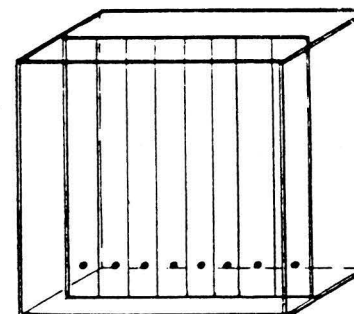
30 seg

Benceno grado analítico en recipiente de vidrio



hacer las manchas en placas de cromatografía. Usar extracto y estándar

Placas de cromatografía de 20 × 20 Silica gel 60, 0.25 mm de espeso E. Merck Activar las placas antes de usarlas, a 110 °C 1 h



desarrollar la placa en tanque no equilibrado con el solvente de desarrollo

Solvente de desarrollo tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (5 + 4 + 1)

Acido fórmico grado analítico en recipiente de vidrio

Esterigmatocistina. Esta toxina ha sido reportada como poco frecuente en forma natural en productos agrícolas; sin embargo su similitud química y sus propiedades biológicas con las aflatoxinas la hacen importante desde el punto de vista de sanidad de los alimentos. El hongo productor más importante es *Aspergillus versicolor* del grupo *A. versicolor* (Raper y Fennell, 1965). *A. versicolor* tiene una distribución amplia y se ha encontrado contaminando granos, alimentos, pan, productos de cereales, carnes secas y quesos. Otros hongos reportados como productores son *Dreschlera*, sp., de los Dematiaceae (Ellis, 1971), *A. nidulans* (Raper y Fennell, 1965), *Penicillium luteum* (fase sexual *Talaromyces lutens*) (Pitt, 1979). Los efectos de la esterigmatocistina son similares a los de las aflatoxinas aunque no tan fuertes (Davis y Diener, 1978).

Propiedades Químicas: Compuesto cristalino, amarillo. Peso molecular 338, fórmula empírica $C_{19}H_{14}O_6$. Fluoresce color rojo ladrillo mate en luz UV, Rf cerca de 0.8 en cloroformo/metanol (98:2), en placas de cromatografía de capa fina en gel de sílice. La fluorescencia cambia a amarillo cuando la placa es asperjada con solución de cloruro de aluminio. Soluble en cloroformo y piridina, insoluble en agua y soluciones de hidróxido de sodio y de carbonato de sodio. Ópticamente activa. $(\alpha)_D^{25}$ absorción máxima en luz UV 205, 233, 264 y 325 nm. Se descompone a 265 °C (Cole, 1976; Davis y Diener, 1978).

A continuación se presentan dos métodos analíticos, incluyendo el oficial aprobado por la AOAC.

Esterigmatocistina en cebada y trigo AOAC, 1984.

Método



50 g muestra
+
180 ml CH_3CN
+
20 ml sol. KCl 4%

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Erlenmeyer 500 ml

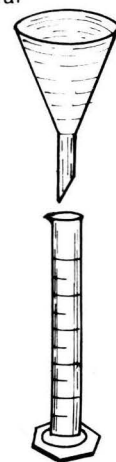
CH_3CN grado analítico en recipiente de vidrio



agitar 30 min

Agitador de acción de muñeca, Burrel o equivalente, o usar agitador oscilante

filtrar



100 ml

Papel filtro Whatman Núm. 1 plisado o equivalente

Embudo de 150 mm de pie corto



100 ml filtrado
+
50 ml hexano

agitar



hexano
desechar capa superior
de hexano

(repetir)



extracto
+
50 ml hexano

agitar

desechar capa superior
de hexano

Embudo de separación de 250 ml

Hexano grado analítico en recipiente de vidrio



extracto ($\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$)
+
25 ml H_2O
+
50 ml CHCl_3

agitar
dejar separar las capas



colectar la capa inferior
transparente



capa acuosa
+
25 ml CHCl_3

agitar
dejar separar las capas



agregar la capa transparente a la anterior

agregar piedras en ebullición (SiC)

Erlenmeyer 250 ml

SiC (Carborundum Co), eliminar por flotación en H_2O las piedras muy finas y materiales extraños, lavar con acetona y secar



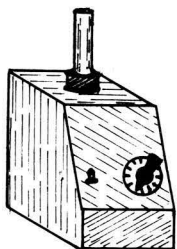
evaporar a casi sequedad
en baño de vapor



transferir el residuo cuantitativamente
a vial con CHCl_3

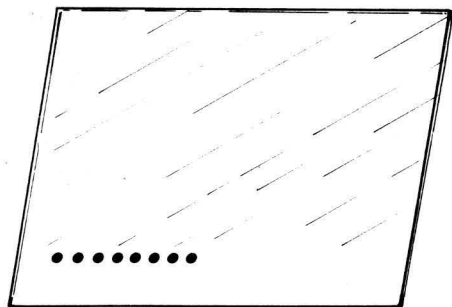
evaporar a sequedad en baño de vapor en
atmósfera de nitrógeno, tapar el vial y reser-
var para cromatografía de capa fina

cromatografía de capa fina
cromatografía preliminar



residuo
+
1 ml benceno

agitar vigorosamente



1,5,5,10

+

5

1,2,5,10

extracto estándar

desarrollar la placa con benceno/HOAc-
/MeOH 90 + 5 + 5

Vial 4 dram, tapón hueco de po-
lietileno (Kimble Products Núm.
60910-L)

Este paso puede ser omitido
cuando se conoce la cantidad
aproximada de esterigmatocis-
tina

Se recomienda usar agitador
mecánico Vortex

Trabajar en luz incandescente,
muy baja y tan rápido como sea
posible

Tanque revestido con papel fil-
tro y equilibrado con el mismo
solvente

cuando el frente del solvente llegue a unos 4
cm del extremo de la placa, sacarla y secarla
asperjar la placa de manera pareja con solu-
ción de AlCl_3

calentar la placa a 80°C 10 min

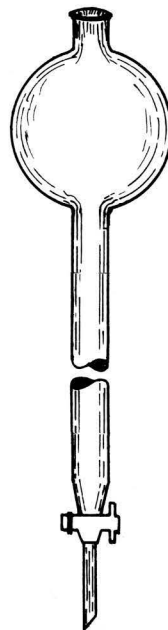
examinar con luz UV de onda corta

si las manchas de los extractos fluorescen,
comparar su intensidad de fluorescencia con
la de los estándares y determinar cuáles son
comparables, interpolar si es necesario

μg Esterigmatocistina/Kg

$$(S \times Y \times V) / (25 \times X)$$

cromatografía en columna



15 g Na_2SO_4
20 g gel de sílice

5 g Na_2SO_4

fibra de vidrio

Solución de AlCl_3 20%
Disolver 20 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100
ml alcohol

Fluorescencia amarillo-brillante

Comparar las manchas y el bri-
llo de los extractos contra los
estándares

Si no se observan, la muestra
puede contener hasta $100\mu\text{g/Kg}$
de esterigmatocistina

S = μl estándar equivalente al
extracto

Y = μg estándar/ml

V = μl dilución final del ex-
tracto

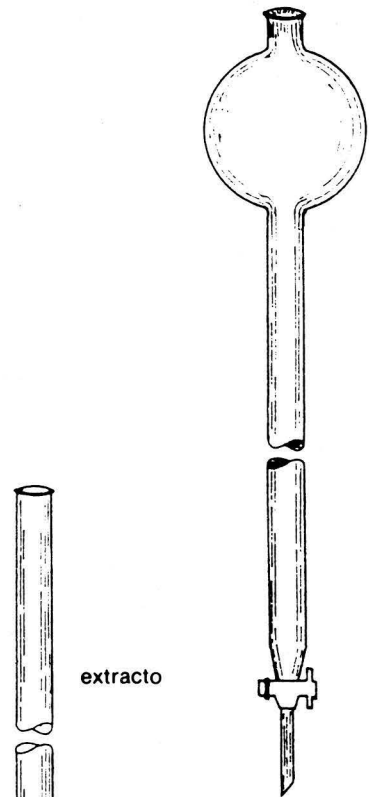
X = μl extracto que da una in-
tensidad de fluorescencia
igual a S estándar

Tubos de cromatografía $22 \times$
300 mm con punta de teflón, tipo
reservorio 250 ml

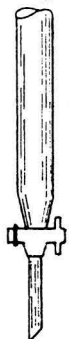
Na_2SO_4 grado analítico en reci-
piente de vidrio

Gel de sílice 0.063-0.2 mm E
Merck o equivalente

Colocar una bola de fibra de vi-
drio en la punta de la columna
Agregar ± 5 g Na_2SO_4 para dar
una base pareja al gel de sílice



extracto



eluir con 200 ml
ciclohexano/ETOH
(4 + 1)



colectar todo el eluido

Llenar la columna hasta la mitad con ciclohexano
Ciclohexano grado analítico en recipiente de vidrio
Agregar 10 g gel de sílice
Lavar las paredes de la columna con \pm 20 ml ciclohexano y agitar para dispersar el gel de sílice
Cuando el asentamiento del gel de sílice sea más lento, drenar el ciclohexano para ayudar al asentamiento dejando 5-8 cm de solvente sobre el gel de sílice
Agregar lentamente \pm 5g Na_2SO_4 anhidro
Drenar el ciclohexano hasta el tope del Na_2SO_4

Cuantitativamente transferir lo que quede del extracto a la columna con la mínima cantidad de benceno necesario para hacer la transferencia

Erlenmeyer de 300 ml



evaporar a casi sequedad



transferir cuantitativamente a vial con CHCl_3



evaporar a sequedad en baño de vapor en atmósfera de nitrógeno

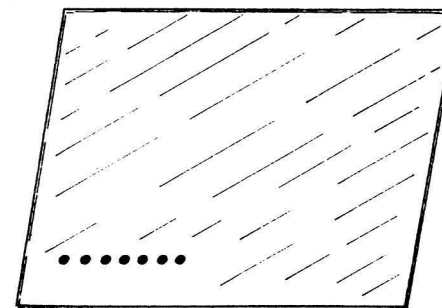
cromatografía de capa fina final

disolver el extracto en un volumen de benceno que dé una concentración final de aproximadamente $5 \mu\text{g/ml}$ basándose en la estimación preliminar

Usar piedras de ebullición, SiC
Evaporar en baño de vapor

Vial 4 dram

Para agitar el vial se considera preferible usar un agitador Vortex



3.5, 5, 6.5, 6.5 μl

+

5 3.5, 6 μl

extracto

estándar

Determinación por cromatografía de capa fina, Shannon y Shotwell, 1976, aplicable a maíz amarillo y blanco, centeno, avena, sorgo, arroz blanco y rojo y semilla de soya

Método

extracción



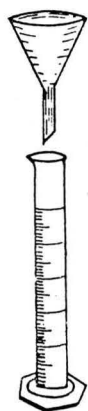
agitar en vel. baja 3 min

50 g muestra
+
180 ml metanol
+
20 ml sol. KCl 4%

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Muestra molida que pase una malla Núm. 20
Metanol grado analítico en recipiente de vidrio
Solución KCl 4%, disolver 4 g KCl en 100 ml H₂O

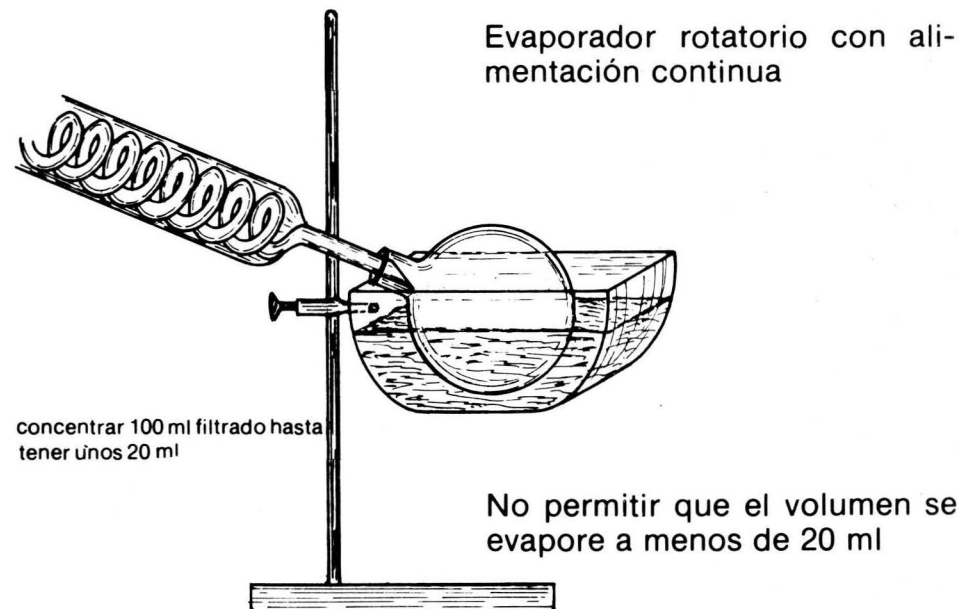
filtrar



100 ml

Papel filtro preplisado S & S 588 o equivalente
Embudo 150 mm

Probeta 250 ml

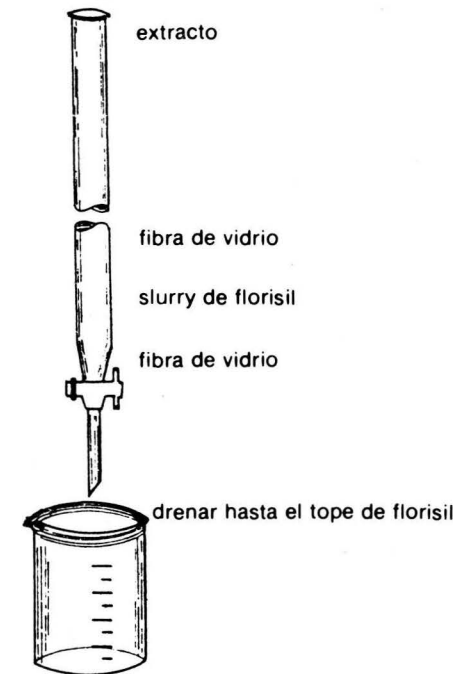


Evaporador rotatorio con alimentación continua

concentrar 100 ml filtrado hasta tener unos 20 ml

No permitir que el volumen se evapore a menos de 20 ml

cromatografía en columna



Colocar firmemente un tapón de fibra de vidrio en el fondo del tubo
Agregar 75 ml etanol/agua 9 + 1 Etanol grado técnico
Agregar 10 g de florisil a la columna y agitar para formar un slurry
Florisil 60-100 mesh (Fisher Núm. F-100)
Dejar asentar el florisil
Drenar el solvente hasta unos 5 cm sobre el florisil
Colocar un tapón de fibra de vidrio encima del florisil y drenar el solvente hasta el tope del tapón
Drenar el extracto a una velocidad de flujo 5 - 7 ml/mm



2 x 10 ml hexano

80 ml hexano

desechar las fases de hexano

Enjuagar el matraz del extracto, dos veces con 10 ml hexano
Hexano grado técnico

eluir con 80 ml hexano a una velocidad de flujo 5 - 7 ml/mm



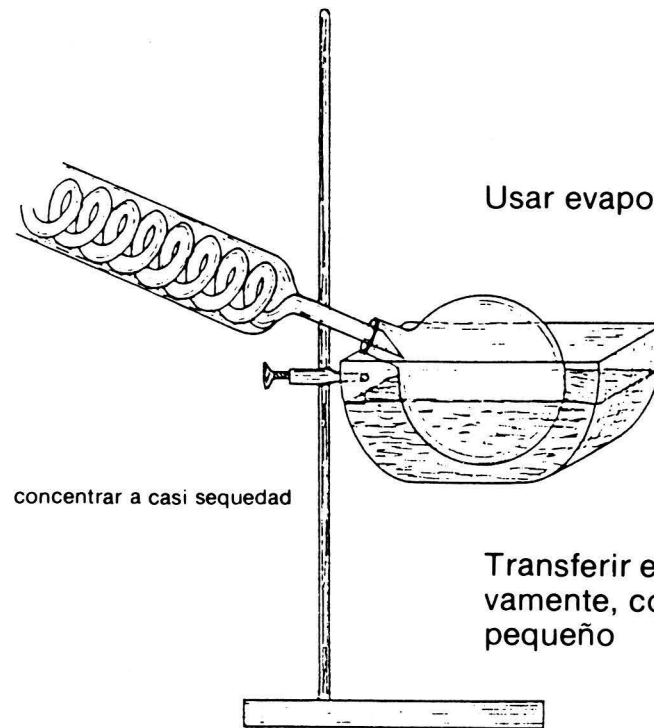
200 ml acetona/cloruro de metileno 5 + 95

eluir esterigmatocistina

transferir el extracto a matraz de fondo redondo

Acetona grado analítico en recipiente de vidrio

Cloruro de metileno grado analítico en recipiente de vidrio



Usar evaporador rotatorio

concentrar a casi sequedad

Transferir el extracto cuantitativamente, con acetona, a un vial pequeño

Evaporar a sequedad en atmósfera de nitrógeno (usar baño de vapor)

Resuspender el extracto con 1 ml benceno

cromatografía de capa fina

1,5,5, 10, 1, 2, 5, 10

+
5

extracto estándar

desarrollar la placa en benceno/etanol/ácido acético 90 + 5 + 5 o 94 + 3 + 3

*Ocratoxina A**Esterigmatocistina*

Rubratoxinas. Producidas por *Penicillium purpurogenum* (*P. rubrum*) del subgénero *Biverticillium* (Pitt, 1979), (*P. rubrum* y *P. purpurogenum* de la serie *Purpurogenum*, Raper y Thom, 1949).

Estas toxinas han sido asociadas con la toxicosis del maíz mohoso en cerdos; sin embargo, no se conoce la extensión real del problema en condiciones naturales. La rubratoxina B ha sido reportada como hepatotóxica; mutágena, embriocida y teratógena, (Burnside, *et al.*, 1957; Evans y Harbison, 1977; Hood *et al.*, 1973; Mirocha, 1980).

Propiedades Químicas: Rubratoxina B, la más abundante. Peso molecular 518, fórmula empírica $C_{26}H_{30}O_{11}$, punto de fusión 158-186 °C, ópticamente activa $[\alpha]_D^{20} + 67^\circ$, espectro infrarrojo 3550 cm^{-1} , 1860 cm^{-1} , 1821 cm^{-1} , 1784 cm^{-1} , 1761, 1719, 1693, 1255, 926, 719 cm^{-1} . Absorción UV máxima 251 nm 96,000, Rf aproximado en cromatografía de capa fina 0.54 en cloroformo/metanol/ácido acético (80:20:20). Rubratoxina A, fórmula empírica $C_6H_{32}O_{11}$. Punto de fusión con descomposición 210-214. Ópticamente activa $[\alpha]_D^{20} + 84^\circ$ ($\epsilon = 2.0$ en acetona). Absorción ultravioleta máxima en acetonitrilo 204 nm ($\epsilon = 31900$). Absorción máxima en el infrarrojo 3400, 1850, 1815, 1779, 1760, 1720 y 1695 cm^{-1} .

Ambas rubratoxinas son ligeramente solubles en agua, solubles en alcoholes, metil acetato, dioxano y acetona; insolubles en cloroformo y solventes no polares. Ambas son incoloras, cristalinas y relativamente estables. La rubratoxina B es estable en $NaHCO_3$ caliente, no así la rubratoxina A y lentamente se vuelve amarilla (Natori *et al.*, 1970; Davis y Diener, 1978; Mirocha, 1980).

Acido Penicílico: Esta sustancia, ha sido reconocida como toxina desde hace mucho tiempo y la han asociado con varios

hongos encontrados con frecuencia en alimentos. Fue aislado por primera vez de *Penicillium puberulum* de maíz; es producido por muchas especies de *Penicillium*, la más importante es *P. puberulum* del subgénero *Penicillium* (Pitt, 1979); Serie *Asymetrica-Fasciculata* (Raper y Thom, 1949), también miembros del grupo *Aspergillus ochraceus* (Raper y Fennell, 1976), están considerados como productores de esta toxina. Los alimentos en los que se ha demostrado la presencia de ácido penicílico son maíz y frijol. El ácido penicílico ha sido descrito como antibiótico con actividad antihelmíntica y antiviral; sin embargo, también es cancerígeno en condiciones experimentales (Ciegler, *et al.*, 1971; Davis y Diener, 1978; Wilson, 1976).

Propiedades Químicas: Material cristalino, peso molecular 170, fórmula empírica $C_8H_{10}O_4$. Soluble en agua caliente, alcohol, éter, benceno, cloroformo y etil-acetato; ligeramente soluble en agua fría e insoluble en éter de petróleo y hexano. Punto de fusión 83-85 °C (hidratado, 58-64 °C), pero es estable en solventes y alimentos a 100 °C o más. Absorción máxima UV 226-227 nm ($\epsilon = 10,471$) en agua, 225 nm en etanol 76%, 224 nm en etanol, 221 en metanol y cambia a 224 en 0.02N HCl y 293 nm en 0.02N NaOH, Rf 0.45 en cromatografía de capa fina en cloroformo/acetato de etilo/ácido fórmico (6:4:1). Espectro infrarrojo con bandas a 3270, 1728, 1643, 1352, 909 y 811 cm^{-1} en KBr. (Ciegler, *et al.*, 1971; Davis y Diener, 1978).

El método analítico que se presenta a continuación es el desarrollado por Thorpe y Johnson, 1974; Thorpe es el referi asociado para ácido penicílico de la AOAC.

Método de determinación por cromatografía gas-líquido, Thorpe y Johnson, 1974, para maíz y frijol seco.

Método

preparación de la muestra

extracción



60 g muestra
+
200 ml acetato de etilo



transferir el filtrado a embudo de separación



Especificaciones, comentarios, sugerencias

Moler la muestra que pase criba con aberturas de 2 mm

Acetato de etilo grado analítico en recipiente de vidrio

Licuada a prueba de explosión

Papel filtro de filtración rápida

Probeta graduada de 250 ml

Medir la cantidad de filtrado recuperada

Embudo de separación de 250 ml

partición líquido/líquido



extracto
+
3 x 25 ml
bicarbonato de sodio

combinar las soluciones alcalinas y acidificar a pH 3 con HCl, 1 + 1



extraer la solución ácida con
2 x 50 ml acetato de etilo

combinar las porciones de acetato de etilo
pasar la fase de acetato de etilo por 30 g Na_2SO_4
lavar el Na_2SO_4 con 25 ml acetato de etilo



evaporar los extractos combinados hasta un volumen de 2 - 3 ml

3 x 25 ml = tres porciones independientes de 25 ml cada una

Usar papel pH

2 x 50 ml = dos porciones de acetato de etilo

Na_2SO_4 anhidro grado analítico

Usar concentrador Kudena-Danish (Kontes Glass Co., Vineland, N.J. 08360)

Evaporador rotatorio, usarlo como alternativa

transferir el extracto a vial



evaporar a sequedad en atmósfera de nitrógeno

columna de cromatografía



extracto
+
5 ml solvente de elución

Na₂SO₄

gel de sílice

fibra de vidrio

enjuagar el vial con 2 × 5 ml solvente de elución y agregar a la columna



+
160 ml solvente de elución

desechar los primeros 25 ml de eluido y co-
lectar 150 ml

Jsar acetato de etilo para enjuagar el matraz

Vial 4 dram

Columna de cromatografía 250 mm × 14 mm d.i. con reservorio de 250 ml

Colocar una bola de fibra de vidrio en el fondo de la columna
Agregar 10 ml de solvente de elución

Solvente de elución: hexano/etil acetato/ácido fórmico, 750 + 250 + 1

Agregar 3 g gel de sílice agitando para eliminar burbujas
Gel de sílice. Silica gel 60, 0.06-0.2

Agregar 3 g Na₂SO₄ anhidro

Drenar el solvente hasta el tope del empaque

* Disolver el extracto con 5 ml del solvente de elución, usar agitación suave y agregar a la columna

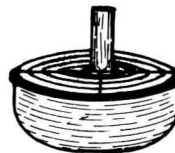
Dejar pasar el extracto hasta el tope del empaque

No dejar secar el empaque

Colectar en probeta graduada de 250 ml, velocidad de flujo ± 3 ml/min

evaporar hasta dejar ± 2 ml

transferir a vial



evaporar a sequedad en atmósfera de nitrógeno

formación de derivados



250 μl anhídrido trifluoracético

dejar la muestra a temperatura ambiente 15 min

disolver el derivado en 1.0 ml isooctano



Vial 3 dram

Microjeringa 250 ml

Anhídrido trifluoracético (Columbia Organic Chemicals Co. Inc., Columbia SC 29205)

Preparar el derivado TFA del ácido penicílico enjuagando las paredes del vial con el solvente

Evaporar el exceso de reactivo usando un flujo suave de nitrógeno hasta que desaparezca de la muestra el olor del anhídrido trifluoracético

Estandarización de la curva

Preparar diluciones de estándar en acetato de etilo a concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 μg/ml

Pipetear 1 ml de cada solución en viales separados y evaporar justo a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno

Inyectar 3 μ l de cada solución en el cromatógrafo

Cromatógrafo de gases. Nuclear Chicago modelo 5000 o equivalente con detector de captura de electrones y registrador de 5 mv. Condiciones: Columna de vidrio en forma de U $6 \times 1/4$ " d.i. empacada con OV-101 3% en gas Chrom. Q 100-200 mesh (Applied Science Laboratories, State College Pa 16801); flujo de nitrógeno 70-80 ml/min. Temperaturas ($^{\circ}$ C): inyector 160, detector 215 columna 140-160 para eluir TFA ácido penicílico en 5-8 min. Ajustar el voltaje de la celda para linealidad máxima.

Ajustar la sensibilidad del electrómetro de forma que una inyección de 3 μ l de 0.5 μ g TFA ácido penicílico/ml de $\pm 10\%$ de deflexión

Preparar la curva de μ g de ácido penicílico contra respuesta

Si el pico de la muestra es mayor que el más alto de estándar, en rango lineal, diluir en 1.0 ml de isooctano y reinyectar

calculos

μ l ac. penicílico/Kg muestra

$(I'/I) \times (A/A') \times (C/S) \times 200/R \times 1000 \times D$

I' = solución del estándar inyectado

I = solución de la muestra

A' = altura del pico de estándar TFA ácido penicílico

A = altura del pico TFA ácido penicílico

C = concentración del estándar μ g/ml

S = g de muestra

R = ml de solvente recuperados

D = ml muestra final

* Thorpe es el referi asociado de la AOAC

determinación

inyectar 3 μ l del extracto derivatizado en el cromatógrafo

seguir cada derivado con una inyección de 3 μ l de estándar e identificar el pico de la muestra, comparando tiempos de retención

Citrinina. A pesar de que no ha sido bien estudiada en alimentos y productos agrícolas, uno de los hongos que la producen *Penicillium citrinum*, está amplia y abundantemente distribuido en la naturaleza, particularmente en climas cálidos, ha sido encontrado en forma natural en maíz y arroz. Las especies productoras más importantes de citrinina son *P. citrinum*, Thom, subgénero *Furcatum* (Pitt, 1979); *Asymetrica-Velutina* (Raper y Thom, 1949), y *P. viridicatum*, Westling, subgénero *Penicillium* (Pitt, 1979); *Asymetrica-Fasciculata* (Raper y Thom, 1949), en la naturaleza, en condiciones de laboratorio, muchas otras especies de *Penicillium* y algunas de *Aspergillus* la producen. En condiciones naturales, han aislado citrinina de cebada, trigo, avena, centeno y arroz. La toxicidad de la citrinina en condiciones de laboratorio es principalmente renal pero también afecta al sistema parasimpático (Davis y Diener, 1978; Uraguchi, 1971).

Propiedades Químicas: Compuesto cristalino amarillo. Peso molecular 250. Fórmula empírica $C_{13}H_{14}O_5$. Punto de fusión 172 °C, ópticamente activa (α)_D-37.4. Flouresce amarillo limón en luz UV de onda larga. Rf en placas de cromatografía de capa fina 0.56 en tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico 5 + 4 + 1. Absorción UV máxima 319, 353 y 222 nm en etanol. Soluble en agua y la mayoría de los solventes orgánicos dependiendo del pH. (Davis y Diener, 1978; Uraguchi, 1971; Saito, *et al.*, 1971).

TOXINAS DE *FUSARIUM*

Zearalenona. Actúa como un producto de tipo hormonal más que como una toxina; sin embargo, los desórdenes estrogénicos que causa son serios en cerdos y han sido conocidos desde 1928 (Mc Nutt *et al.*, 1928; Urry *et al.*, 1966). Los hongos que lo producen son miembros del género *Fusarium*, algunas de cuyas especies reportadas como productoras de zearalenona son *F. graminearum* (*F. roseum*), *F. moniliforme*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* y *F. tricinctum* siendo el más importante *F. graminearum*, Schwabe, Sección Discolor (Booth, 1971). La toxina ha sido aislada de granos (Davis y Diener, 1978).

El estrogenismo se caracteriza por infertilidad en ambos sexos de animales alimentados con granos mohosos, principalmente cerdos, en las hembras hay agrandamiento de la vulva, de las mamas, prolapso del recto y atrofia de los ovarios (vulvovaginitis); en los machos se observa el crecimiento de las glándulas mamarias y reducción de los testículos (Mirocha, *et al.*, 1971, 1967).

Propiedades Químicas: Sustancia blanca cristalina, peso molecular 318, fórmula empírica $C_{18}H_{22}O_5$; está clasificada como una lactona del ácido resorcílico. Soluble en álcalis diluidos, acetona, alcoholes, cloroformo y éter; ligeramente soluble en éter de petróleo e insoluble en agua. Punto de fusión 164-165 °C. Absorción máxima UV 236, 274 y 316 nm, coeficientes de extinción 29,700; 13,909 y 6,020. Ópticamente activa (α)_D-170.5. Flouresce azul-verde con luz UV (360 nm) y más verdoso a 260 nm. Rf 0.7 en placas de cromatografía desarrolladas en tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (6:3:1) (Davis y Diener, 1978; Mirocha, *et al.*, 1971).

Zearalenona. Primera acción AOAC, 1984, también aprobado por la AACC. Maíz.

Método

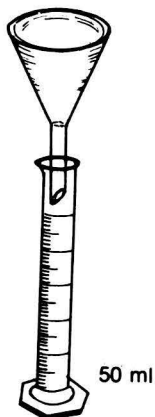
Extracción



agitar 30 min

50 g muestra
+
25 ml H₂O
+
25 g tierra de diatomeas
+
250 ml CHCl₃

Filtrar



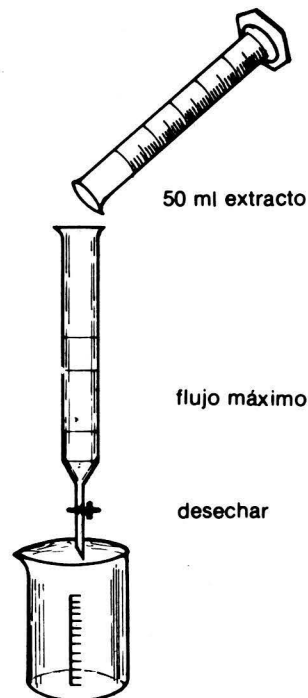
112

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Hyflo Super-Cel

CHCl₃ grado analítico en recipiente de vidrio

Los primeros 50 ml del filtrado



Tubo de cromatografía 22 × 300 mm

Na₂SO₄ grado analítico, granular

Después de los 5 g Na₂SO₄, agregar CHCl₃ hasta ± la mitad del tubo

Gel de sílice para columna de cromatografía. E. Merck (Darmstadt)

Silica gel 60, 0.063-0.02 mm. Activada secando 1 h a 105 °C.

Agregar agua 1 ml/100 g. Mezclar bien

Almacenar 15 h en recipiente hermético

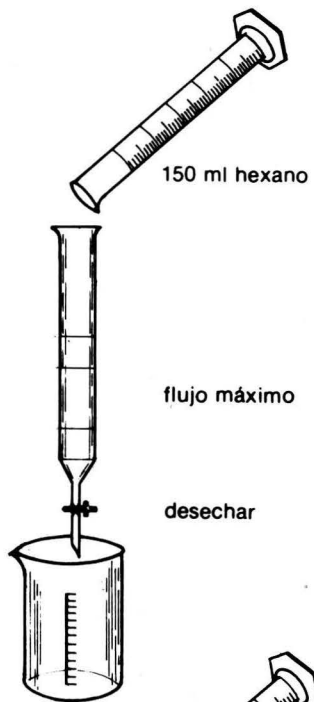
Lavar las paredes del tubo con ± 20 ml CHCl₃ y mezclar para dispersar el gel de sílice

Cuando el rango de asentamiento disminuya, drenar un poco del CHCl₃ para ayudar al asentamiento dejando 5-7 cm arriba del gel de sílice

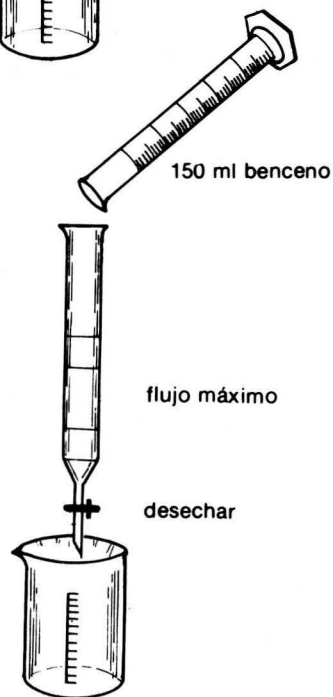
Agregar los 15 g de Na₂SO₄ lentamente

Drenar el CHCl₃ hasta el tope del Na₂SO₄

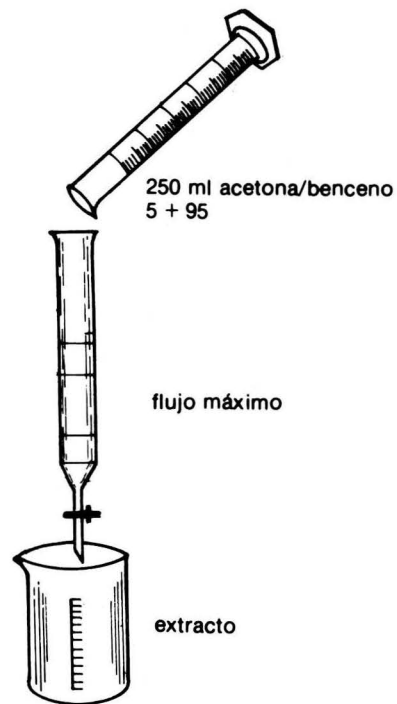
113



Hexano grado analítico en recipiente de vidrio



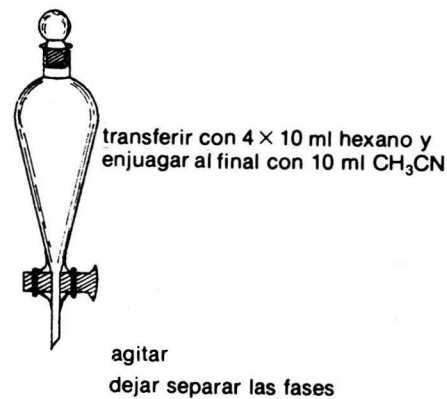
Benceno grado analítico en recipiente de vidrio



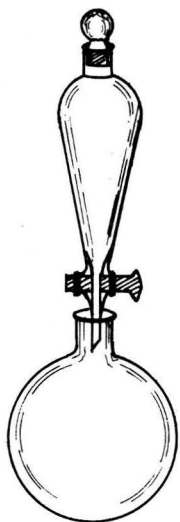
Acetona grado analítico en recipiente de vidrio



Es preferible en atmósfera de nitrógeno

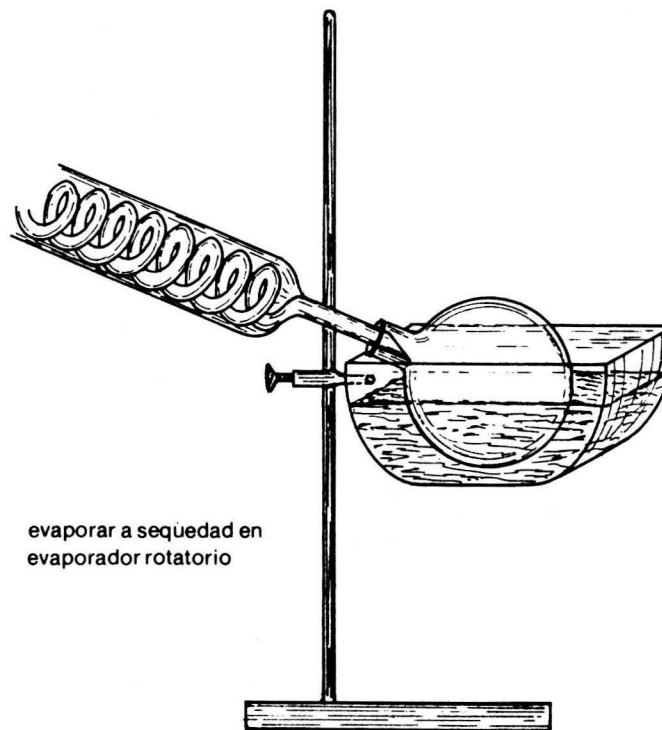


4 x 10 ml hexano = 4 porciones de 10 ml hexano

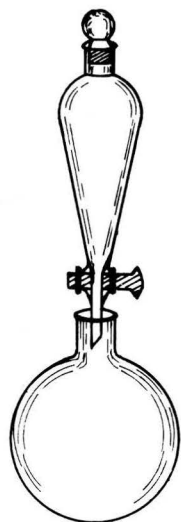


Embudo de separación de 60 ml

fase de CH_3CN



evaporar a sequedad en
evaporador rotatorio



5 ml CH_3CN

Extraer la fase de hexano con 5
ml CH_3CN

combinar las 2
fracciones de CH_3CN

transferir a vial con CHCl_3



Usar pipeta y bulbo



Vial 4 dram

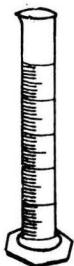


evaporar a sequedad

Evaporar en atmósfera de nitrógeno

Cuando se sospeche la presencia de zearalenona, asperjar las placas con solución AlCl_3 (20 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de alcohol) calentar 5 min a 130°C y examinar con luz UV 360 nm. La zearalenona fluoresce azul en la luz UV después de asperjada con AlCl_3 .

cromatografía

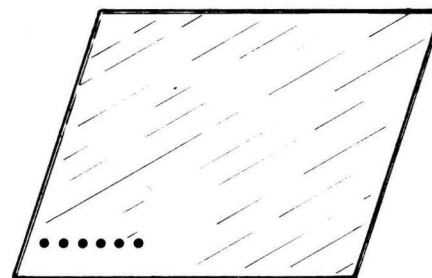


residuo
+
500 ml benceno

agitar vigorosamente

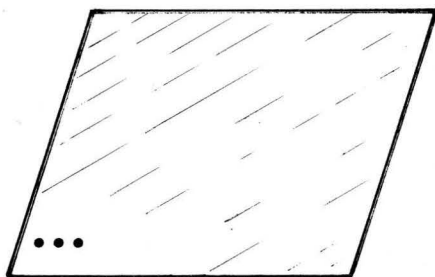
Usar agitador de tubos Vortex

placa cuantitativa



4 6 8
extracto 3 5 7
estándar

placa preliminar



10,10 extracto
+
5,5 estándar

desarrollar

cálculos

$$\mu\text{g/Kg} = (S \times Y \times V) / (X \times W)$$

desarrollar en tanque forrado y equilibrado \pm 40 min

Solventes de desarrollo
Alcohol/ CHCl_3 5 + 95
Alcohol/ CHCl_3 3.5 = 96.5
HOAc/benceno 5 + 95
HOAc/benceno 10 + 90

hacer las diluciones que se estimen necesarias

$S = \mu\text{g}$ solución del estándar igual al problema

$Y =$ concentración de la solución de estándar $\mu\text{g/ml}$

$V = \mu\text{g/L}$ de la dilución final del extracto de la muestra

$X = \mu\text{l}$ solución del extracto inoculado que da una fluorescencia igual a S

$W = \mu\text{g}$ de muestra aplicada a la columna (10 g)

Si la dilución final del extracto no corresponde a 10 g calcular el peso de la muestra y sustituir

Método cromatográfico de líquidos para zearalenona y zearalenol en maíz, AOAC, 1985

Método

- 50 g muestra
- + 25 g tierra de diatomeas
- + 20 ml H₂O
- + 250 ml CHCl₃

tapar bien



agitar 15 min



50 ml extracto
primera porción



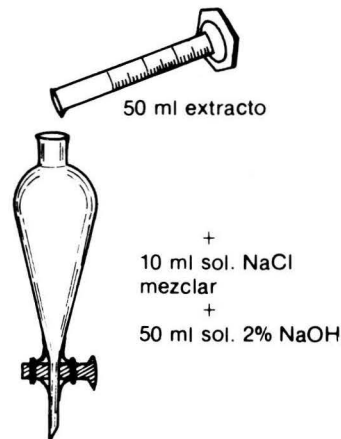
50 ml extracto
segunda porción

Especificaciones, comentarios, sugerencias

En frasco de extracción. Pesar la muestra con precisión, frasco de extracción de 500 ml con tapón de rosca, empaque de teflón. Rotar el matraz para mezclar un poco antes de agregar el CHCl₃.

Probeta de 100 ml

Colectar la 2a. porción para usarla en caso de perder la primera



Embudo de separación de 250 ml

Solución saturada acuosa de NaCl

agitar vigorosamente ± 1 min

dejar las fases separarse completamente

desechar la fase inferior y tanto sedimento (si hay) como sea posible

agregar 50 ml CHCl₃ agitar ± 1 min

dejar que las fases se separen

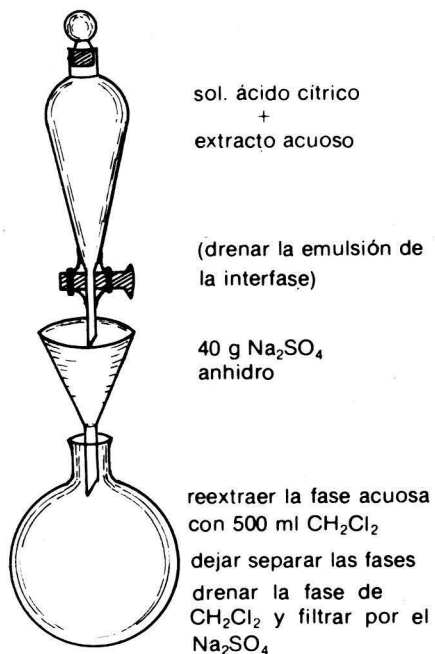
desechar la fase inferior de CHCl₃



Solución de ácido cítrico
disolver 106 g de ácido cítrico monohidrato en 1L H₂O

agitar ± 1 min

dejar que las fases se separen



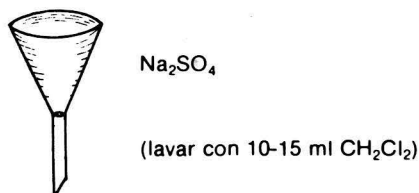
sol. ácido cítrico
+
extracto acuoso

(drenar la emulsión de
la interfase)

40 g Na_2SO_4
anhidro

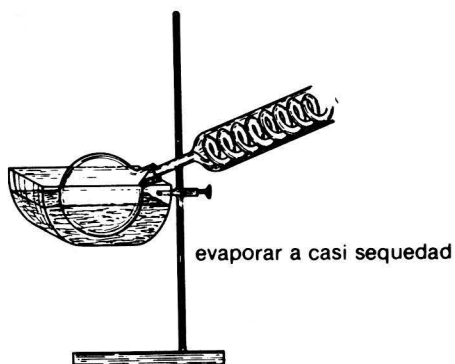
reextraer la fase acuosa
con 500 ml CH_2Cl_2
dejar separar las fases
drenar la fase de
 CH_2Cl_2 y filtrar por el
 Na_2SO_4

Matraz de fondo redondo 500 ml



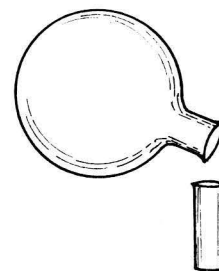
Na_2SO_4

(lavar con 10-15 ml CH_2Cl_2)



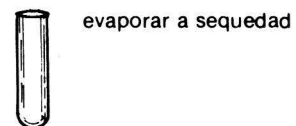
Evaporador rotatorio

evaporar a casi sequedad



transferir el residuo a un vial con 3-4 lavadas
con CH_2Cl_2

Vial 4 ml con tapón de rosca y
empaque de teflón



evaporar a sequedad

Evaporar en atmósfera de nitrógeno

disolver en 0.500 ml de fase móvil mezclando
en un agitador Vortex
determinación

Fase móvil. MeOH, CH_3CN y
 H_2O (1.0 + 1.6 + 2.0) y desgasifi-
car por sonicación o en vacío.
Agitar continuamente durante
su uso

fijar el flujo de la fase móvil a 2.0 ml/min
acondicionar la columna con varios volúme-
nes de la fase móvil

si la línea basal permanece errática lavar con
 CH_3CN y volver a equilibrar con la fase móvil

Determinación

Ajustar el detector de fluorescencia a 236 nm
(excitación), 418 nm. (emisión), rango 1.0 uA,
supresión alta, tiempo constante \pm 4-6-s (0.1
promedio del ancho del pico.)
Fijar impresor a 2 min/cm

Cromatógrafo de líquidos. Modelo 6000 (Wa-
ters Assoc. Inc.) o equivalente con válvula de
inyección y anillo de inyección de 20 ul.

Columna. Zorbax fase reversa C_8 o C_{18} . (Du-
pont Analytical Instruments, Wilmington, D.
E 19898) o equivalente

Detector fluorescente. Modelo FS970 con ex-
citación de longitud de onda variable y filtro
de emisión 418 nm (Kratos, Ramsey, N. J.
07446) o equivalente

Inyectar 20 ul de cada solución estándar y
construir la curva estándar graficando altura
de los picos contra concentración.

Tiempo de retención de zearalenol 4.5 min.
tiempo de retención de zearalenona 5.5 min.

Inyectar 20 ul estándar en condiciones
idénticas

Identificar los picos de zearalenona y α zeara-
lenol por tiempos de retención

Cálculos
Zearalenona/ α zearalenol
= $(\text{PH}/\text{PH}') \times \text{ng estándar}$
inyectado/g de muestra
inyectados (0.4 g)

PH y PH' = altura de los picos de la muestra y
el estándar respectivamente

Usar estándares que den picos altos compara-
dos con la altura de los picos de la muestra

Tricotecenos. Compuestos con una gran actividad biológica; de los más de 45 conocidos a la fecha como producidos en forma natural, los más relacionados con brotes de toxicidad, han sido la toxina T-2 y la vomitoxina. Los hongos productores de tricotecenos son varias especies de los géneros *Gibberella*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Cephalosporium*, *Trichothecium*, *Stachybotrys* y *Verticimonosporium*, hongos que no están relacionados taxonómicamente; la mayoría de estos géneros están considerados como poco importantes, ya que son raros y se encuentran en nichos ecológicos restringidos; éste no es el caso de *Fusarium* que es cosmopolita e induce gran cantidad de enfermedades vegetales en cultivos de importancia económica (Committee on Protection Against Mycotoxins, 1983).

Las inspecciones epidemiológicas realizadas hasta ahora, han demostrado que los tricotecenos están distribuidos ampliamente en cereales y que son causantes de algunas enfermedades humanas y de animales domésticos de etiología desconocida (Ueno, 1983).

Con base en el sistema de clasificación de Booth, 1971 y considerado por Ichinoe y Kurata, 1983, como el mejor para identificar especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos, las especies productoras de toxina T₂ son *F. acuminatum*, *F. sporotrichoides*, *F. sulphureum*, *F. oxysporum*, *F. sp. carthami* y *F. moniliforme*; de vomitoxina o desoxinivalenol, *F. graminearum* (*G. zae*), *F. culmorum*; de diacetoxiscirpenol, *F. culmorum*, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides*, *F. sulfureum*, *F. poae*, *F. solani* var *coerulum*, *F. moniliforme*; de nivalenol; *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. nivale* (Ichinoe y Kurata, 1983).

Propiedades Químicas: Toxina T-2. Agujas blancas, peso molecular 466, fórmula empírica C₂₄H₃₄O₉, punto de fusión 151-152 °C, Rf 0.40 en cloroformo/metanol 98 + 2, 0.36 en tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico 6 + 3 + 1, 0.28 en benceno/metanol/ácido acético 24 + 2 + 1 (α)²⁵ + 15 ETOH a 26 °C. Coeficiente de extinción menor o igual a 230 nm. Soluble en alcohol, acetona, acetato de etilo, benceno y cloroformo, insoluble en hexano y agua (Committee on Protection Against Mycotoxins, 1983). Des-

oxinivalenol (DON, vomitoxina). Agujas, peso molecular 296, fórmula empírica C₁₅H₂₀O₆ punto de fusión 151 - 153-°C Rf 0.45 en cloroformo/metanol/agua 80 + 20, 0.1, 0.61 en cloroformo-/metanol 5 + 1 (α)²⁵+ 6.35 ETOH, coeficiente de extinción 4,500 ETOH, 218. Soluble en alcoholes, tolueno y piridina, insoluble en hexano y butano, ligeramente soluble en cloroformo y acetona (Committee on Protection Against Mycotoxins, 1983). Diacetoxiscirpenol. Cristales, peso molecular 366, fórmula empírica C₁₉H₂₄O₅ punto de fusión 162-164 °C, Rf 0.36 en cloroformo/metanol 5 + 1, coeficiente de extinción menor o igual 230 nm. Nivalenol, cristales, peso molecular 312, fórmula empírica C₁₅H₂₃O₇, Rf 0.42 en cloroformo/metanol 5 + 1 (α)²⁵+ 21.5 ETOH, coeficiente de extinción 7500 MeOH, 218 (Committee on Protection Against Mycotoxins, 1983).

Desoxinivalenol. Método discriminatorio rápido, Shannon, *et al.*, 1985, aplicable a maíz, trigo y cebada con niveles de detección de 1 ppb, avena con 1.5 ppb, suelo, plantas verdes y agua 0.75 ppb.

Método



50 g muestra
+
50 ml acetonitrilo/solución
KCl 4%, 9 + 1

tapar con tapón de rosca y agitar a mano 5 min

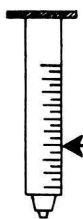
quitar el tapón de rosca y colocar el tapón con pico



invertir el frasco,
presionar ligeramente

colectar 2 ml del filtrado

columna



fibra de vidrio
gel de sílice C₁₈

fibra de vidrio

golpear ligeramente mientras se va adicionando el C₁₈

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Frasco de extracción. Dynalab Corp., P.O. Box 112, Rochester, N.Y. 14592-0112, frascos dispensadores de polipropileno con pico y tapón de rosca extra

Colocar una bolita de fibra de vidrio en la punta del pico

Jeringa desechable de 10 ml Becton-Dickinson

Gel de sílice C₁₈ -Waters Associates, reverse fase, 55-105 μm
Agregar el gel de sílice hasta la marca 4 ml (son 2 g)

columna de matriz hidrofílica



fibra de vidrio
10 ml matriz hidrofílica

fibra de vidrio



2 ml filtrado
+
2 ml agua
mezclar

transferir a columna de sílica gel C₁₈



émbolo

jeringa de 20 ml

tapón de hule No. 1

columna C₁₈

colectar el eluido

Matriz hidrofílica. Analthichen International, Harbor City, Ca.

Jeringa desechable de polipropileno de 20 ml Aldrich

Colocar la columna de sílica gel C₁₈ bajo una jeringa de 20 ml adaptada con una punta desechable de pipeta a través de un tapón de hule

Presionar el émbolo cuidadosamente para filtrar la mezcla del extracto por el sílica gel C₁₈

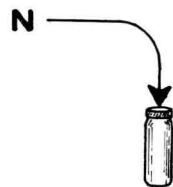
enjuagar con 2 ml H₂O



3 ml, eluidos combinados
+
3 x 4 ml acetato de etilo

columna de matriz hidrofílica

colectar en vial pequeño



evaporar a sequedad

Enjuagar el recipiente del extracto, con 2 ml H₂O y pasarlo por la columna de silica gel C₁₈

Usar presión para eluir

Drenar completamente y combinar con el eluido original

Pasar 3 ml de los eluidos combinados por una jeringa de 20 ml adaptada en su base con una jeringa de 10 ml conteniendo la matriz hidrofílica

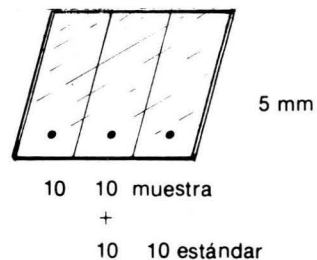
Dejar reposar 5 min y agregar 3 enjuagues consecutivos de 4 ml de acetato de etilo

Colectar y combinar enjuagues en vial pequeño

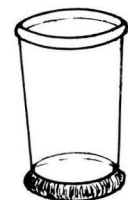
Evaporar a sequedad al aire o usando nitrógeno, no usar calor

cromatografía de capa fina

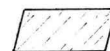
residuo
+
100 µl cloroformo/acetona 4 + 1
mezclar bien



10 10 muestra
+
10 10 estándar



desarrollar



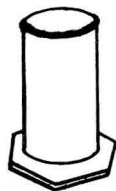
secar al aire

Placas de cromatografía Whatman, M.K. 6-F, precubiertas

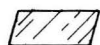
Marcar 2 líneas verticales en la placa, separadas 8 mm entre sí, formarán 3 canales

Desarrollar la placa en tanque con acetato de etilo
No permitir que el solvente llegue a la zona de las manchas

Sacar del tanque cuando el frente del solvente llegue a unos 5 mm del tope de la placa

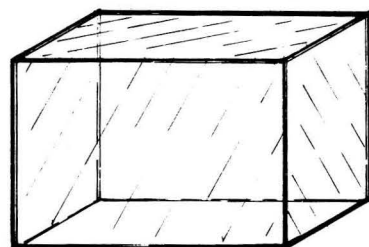


redesarrollar en cloroformo/acetona/alcohol isopropílico, 8 + 1 + 1



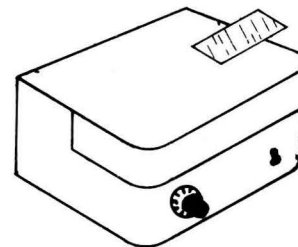
secar al aire

Dejar secar al aire hasta que ya no se detecte el olor del solvente



pasar la placa rápidamente por una solución de cloruro de aluminio 20%

Solución de cloruro de aluminio.
Disolver 200 g $\text{Al}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ grado analítico en 1L de etanol



secar el reverso de la placa y colocarla en una placa precalentada a 121 °C, 5-7min

dejar enfriar

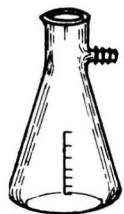
observar con luz UV 365 nm

La respuesta es una mancha azul comparable a la del estándar

Desoxinivalenol en trigo, cromatografía de capa fina AOAC, 1986, aplicable a niveles de 300 ng/g

Método

extracción



50 g muestra
+
200 ml CH₃CN/H₂O
84 + 16

Especificaciones, comentarios, sugerencias

Erlenmeyer 500 ml (Kitasato)

CH₃CN grado analítico en recipiente de vidrio



Tubo de cromatografía, polipropileno (10 mm d.i. × 50 mm) con filtro disco de plástico y reservorio (QS-Q, California Scientific, 410 Martin Av. Santa Clara, Ca. 95050)

Frasco de filtración 125 ml con tapón de hule con un agujero de 11 mm diám. para ajustar el tubo cromatográfico



30 min vel. alta



Colocar una bolita de fibra de vidrio en el fondo del tubo de cromatografía y agregar ± 0.1 g celita

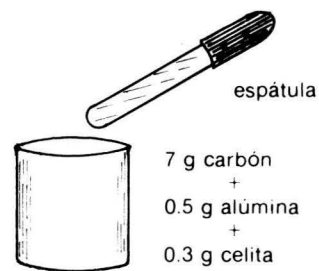
filtrar



colectar 20 ml

Papel Whatman Núm. 2

Probeta de 25 ml



espátula

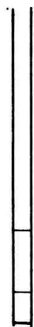
7 g carbón
+
0.5 g alúmina
+
0.3 g celita

mezclar perfectamente

Tierra de diatomeas. Celita 545 lavada con ácido

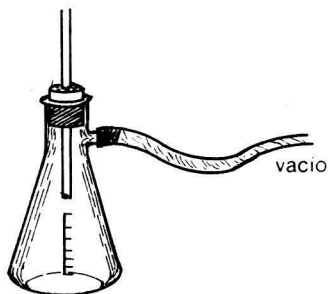
Vaso de precipitados de 50 ml
Carbón activado. Dargo G-60 (J.T. Baker Chemical Co.)

Alúmina. Neutra, activada, 80-200 mesh Núm. 9296 (MCB Manufacturing Chemists, Inc., South Plainfield, N.J.07080) o equivalente



agregar al tubo 1.5 g mezcla
carbón/alúmina/celita

± 0.1 g celita
fibra de vidrio

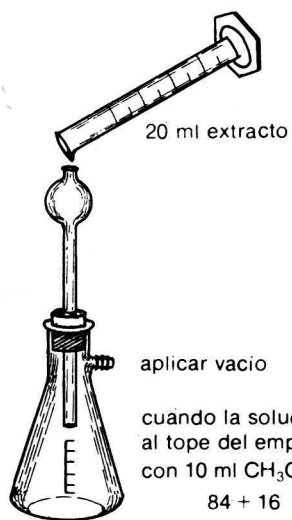


* La proporción carbón/alúmina/celita es 7 + 5 + 3. Se puede preparar suficiente para varias columnas. Usar 1.5 g para cada columna

Golpear ligeramente la columna para asentar el empaque

Aplicar succión y colocar una bola de fibra de vidrio en el tope

* Las columnas se pueden preparar con anterioridad conservándolas verticales en vaso de precipitados y cubiertas con papel aluminio



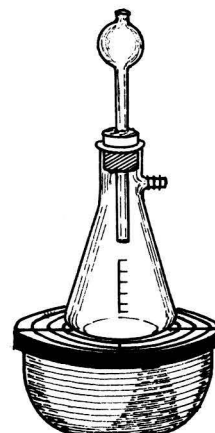
aplicar vacío

cuando la solución llegue al tope del empaque enjuagar con 10 ml $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$
84 + 16

Velocidad de flujo 2-3 ml/min con 20 cm Hg

Enjuagar las paredes de la probeta con $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 84 + 16
No permitir que la columna se seque entre adiciones

continuar aplicando vacío hasta que pare el flujo

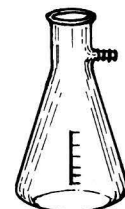


evaporar lentamente

Cubrir la salida del vacío con papel aluminio y evaporar lentamente en baño de vapor

No permitir que la muestra se contamine con el agua de condensación

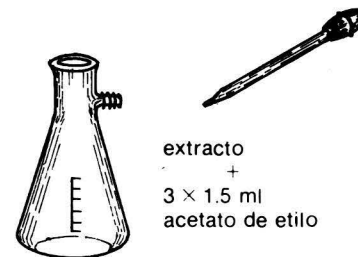
Es esencial que no permanezcan gotas de agua en el frasco mientras se enfría



residuo +
3 ml acetato de etilo

calentar a ebullición en baño de vapor

Sacar del baño de vapor y agitar con movimientos rotatorios para disolver el DON

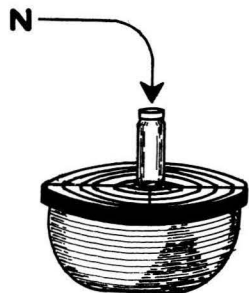


extracto +
3 x 1.5 ml
acetato de etilo

Transferir el extracto a vial y enjuagar con tres porciones de acetato de etilo



Vial 2 dram



evaporar a sequedad en baño de vapor en atmósfera de nitrógeno

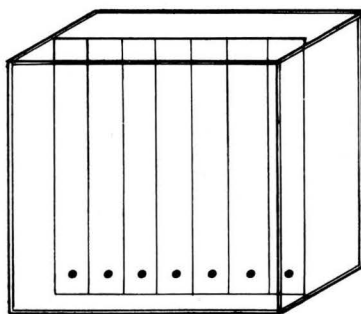
Conservar el extracto seco para cuantificación en placa de cromatografía de capa fina

El extracto final representa 5 g de muestra

placas de cromatografía residuo

+
100 μ l $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$, 4 + 1

5, 10
extracto 1, 2.5, 10, 20 μ l
estándar



desarrollar con CHCl_3 /acetona/isopropanol, 8 + 1 + 1

Hacer las manchas en placas rayadas, canales de 1 cm

Solución estándar 20 μ g DON/ μ l

Para desarrollar las placas, no equilibrar el tanque

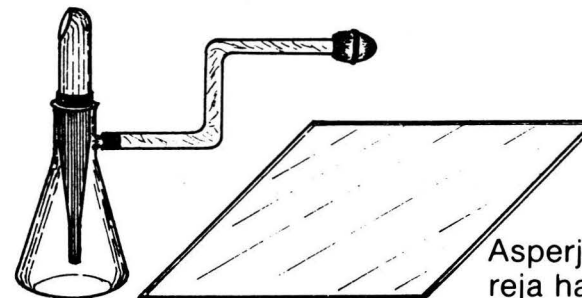
Tiempo aproximado de desarrollo 1 h

sacar la placa del tanque y dejar evaporar el solvente

Evaporar el solvente de la placa a temperatura ambiente en campana bien ventilada. Tiempo aproximado 10 min

El solvente residual de la placa puede decolorar las manchas de DON en las operaciones subsecuentes

para placas no inmersas



AlCl_3

Asperjar la placa de manera pareja hasta que luzca húmeda

Solución de cloruro de aluminio

1) Reactivo de aspersión. Disolver 20 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de alcohol/ H_2O (1 + 1)

2) Reactivo de inmersión. 15 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con 15 ml H_2O y agregar 85 ml alcohol; mezclar y entibiar en baño de vapor hasta que se disuelva

Antes de calentar observar la placa rápidamente en luz UV de onda larga para buscar posibles interferencias fluorescentes azules

calentar en posición vertical 7 min a 120 °C en horno de convección

Puede ser necesario optimizar tiempo y temperatura

colocar la placa en superficie fría, en la oscuridad, 1 min

El DON se observa como una mancha fluorescente azul en un $R_f \pm 0.6$

cuantificar DON por comparación visual o densitométricamente

Las respuestas densitométricas deben ser confirmadas por inspección visual especialmente para niveles $200 \mu\text{g/g}$

cálculos

$$\text{DON, } \mu\text{g/g} = S \times (C/X) \times (V/W)$$

S = μl estándar igual a la muestra

C = concentración del estándar ($20 \mu\text{g/ml}$)

X = μl de muestra, de la mancha con fluorescencia igual a la mancha del estándar

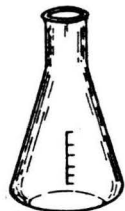
V = volumen final de la muestra

W = cantidad de muestra representada en el extracto final

Cuando se requieren diluciones el equivalente a 0.75 g de muestra de la solución del extracto fueron usados en la determinación inicial; por lo tanto en el vial hay una solución de extracto equivalente a 4.25 g de la muestra

Método

extracción



25 g muestra
+
10 ml agua
+
125 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$,
8 + 2



agitar 1 h vel. alta

filtrar



10 ml filtrado

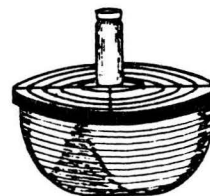
Especificaciones, comentarios, sugerencias

Erlenmeyer 250 ml

Muestra molida que pase una malla de 2 mm

Papel filtro plisado

Vial 4 dram



Bloque de calor seco

evaporar a sequedad en atmósfera de nitrógeno

Columna

preparar slurry de gel de sílice

insertar los tubo de cultivo en los recipientes de la centrifuga

insertar las columnas Quick-sep en cada tubo de cultivo

pipetear 5 ml slurry de gel de sílice en cada columna

centrifugar 2 min a 1000 rpm

desechar el líquido colectado en cada tubo de cultivo

disolver el residuo de la muestra en 3 ml CH_2Cl_2 usando agitador vortex

transferir a la columna

centrifugar 2 min a 1000 rpm

desechar líquido del tubo de cultivo

lavar columna con 10 ml tolueno/acetona. 8 + 2

centrifugar 2 min a 1000 rpm desechar líquido del tubo de cultivo

insertar columna en tubo de cultivo limpio

eluir DON de la columna con 8 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95 + 5

transferir cuantitativamente el eluido a un vial de 4 dram

concentrar a sequedad en bloque de calentamiento seco a 60 °C en atmósfera de nitrógeno

Slurry de gel de sílice, agitar 25 g gel sílice con 100 ml CH_2Cl_2

Gel de sílice E. Merck Silica gel H, partícula mediana (10-40 μm) (Brinkmann Instruments, Inc.) Calentar 25 g 3 h a 110 °C. Enfriar a temperatura ambiente en desecador, agregar 1.5 ml H_2O , agitar hasta estar bien mezclado y almacenar toda la noche en recipiente hermético

Tubos de cultivo desechables 125 x 16 mm (Kimble Products) Centrifuga IEC EXO para locales peligrosos Calse, grupo D (International Equipment Co., Damon Corp., Needham Heights, Ma 02194)

Columna para limpieza de las muestras Columnas desechables de poli-propileno ajustadas con filtro de plástico y embudo de extensión 12 ml Quick-Sep Code QS-D y QS-R (Bio Lab Products San Jose, Ca. 95128)

el extracto final representa 2 g de muestra

derivatización

transferir 3 μl DON a nivel 3 dram,
evaporar a sequedad

tratar extracto de la columna de idéntica ma-
nera

transferir 1.0 ml solución catalizadora 4-
DMAP a un vial y agregar 50 μl HFBA

cerrar el vial firmemente y calentar 20 min a
60 °C en bloque de calor seco. Dejar la mez-
cla de la reacción derivatizada enfriar a tem-
peratura ambiente

agregar/ml solución acuosa NaHCO_3 3% vial
y mezclar 2 min en mezclador de tubos

dejar en reposo hasta que las fases se sepa-
ren completamente

transferir con jeringa 100 μl de la fase orgá-
nica (superior) a un vial de 2 dram que con-
tenga 900 μl de hexano

la concentración final de la solución estándar
expresada como DON equiv. peso/ μl es 0.1
ng/ μl

cromatografía de gases condiciones de ope-
ración: Gas acarreador CH_4/Ar , 5 + 95: veloci-
dad de flujo 60 ml/min; velocidad de
impresión 0.5 cm/min; ajuste de atenuación
para dar FSD 10% por 100 pg, estándar,
puerta de inyección 200 °C, programa de
temperatura del horno: 175 °C temperatura
inicial por 10 min inicialmente velocidad del
programa de 10 °/min temperatura final 250
C, temperatura final 5 min

estandarizar la curva de respuesta

determinación

inyectar 2 μl extracto

calcular DON en la muestra comparando el
área bajo la curva con el área bajo la curva del
estándar de DON derivatizado

Catalizador, 4 dimetilaminopiri-
dina (4-DMAP), 99% mín. Purity
(Aldrich Chemical Co.) Prepa-
rar la solución catalizadora con-
teniendo 2 mg/ml disolviendo
100 mg 4-DMAP en 50 ml toluen-
o/ CH_3CH , 95 + 5

HFBA Anhidrido, ácido hepta-
fenorobutírico. Pierce Chemical
Co.

Completar la cromatografía de
gases el mismo día que se hagan
los derivados

$$\text{DON, } \mu\text{g/g} = (C'/C) \times (V'/V) \times (\text{PA}/\text{PA}')$$

C' = Concentración del estándar
($\mu\text{g}/\text{ml}$)

V' = Volumen del estándar in-
yectado (μl)

PA = Área del pico de la mues-
tra

PA' = Área del pico del estándar

C = Concentración de la
muestra (0.0002 g/ μl , si se
usaron 25 g de muestra)

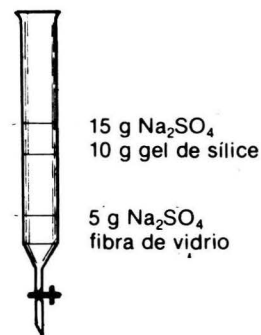
V = Volumen del extracto de la
muestra inyectado

Métodos para detectar varias toxinas en un sustrato. Debido a que algunos de los hongos productores de micotoxinas, producen más de uno de estos metabolitos secundarios y, por otra parte, un mismo sustrato puede aceptar el desarrollo de diferentes especies de mohos, es lógico esperar que determinado sustrato esté contaminado con más de una micotoxina, por esta razón, han sido desarrollados varios llamados métodos múltiples en los que se pueden detectar y en ocasiones cuantificar varias toxinas (Durackova, *et al.*, 1976; Eppley, 1968; Josefson, *et al.*, 1977; Roberts y Paterson, 1975; Vorster, 1969). Se presenta el método de Eppley, 1968.

Método múltiple para zearalenona, aflatoxinas y ocratoxinas, Eppley, 1968.

Método

Columna



Especificaciones, comentarios, sugerencias

Tubo de cromatografía 22 × 300 mm

Na₂SO₄ grado analítico granular
Después de los 5 g Na₂SO₄, agregar CHCl₃ hasta ± la mitad del tubo

Gel de sílice para columna de cromatografía. E. Merck (Darmstadt) Silica gel 60, 0.063-0.2 mm. Activada secando 1 h a 105 °C. Agregar agua 1 ml/100 g Mezclar bien. Almacenar 15 h en recipiente hermético

Lavar las paredes del tubo con ± 20 ml CHCl₃ y mezclar para dispersar el gel de sílice

Cuando el rango de asentamiento disminuya, drenar un poco del CHCl₃ para ayudar al asentamiento dejando 5-7 cm arriba del gel de sílice

Agregar los 15 g de Na₂SO₄ lentamente

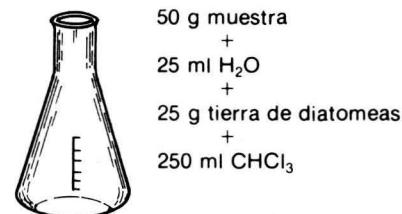
Drenar el CHCl₃ hasta el tope del Na₂SO₄

Erlenmeyer de 500 ml, o cubeta de acero inoxidable

Tierra de diatomeas. Hyflo Super-Cel

CHCl₃ (0.75% EtOH), grado analítico

Extracción





agitar 30 min vel. alta

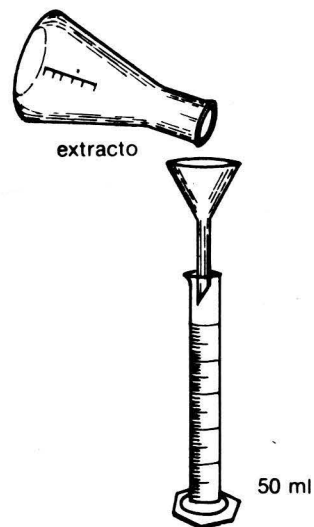
Agitador de acción de muñeca
Burrel o equivalente



3 min vel. alta

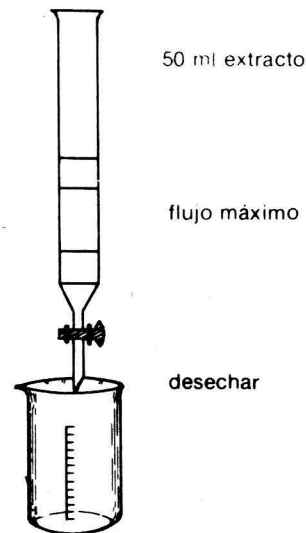
Como alternativa se puede usar
licuadora

Licuadora a prueba de explosión



Papel filtro plisado S&S 588 o
equivalente
Embudo 150 mm

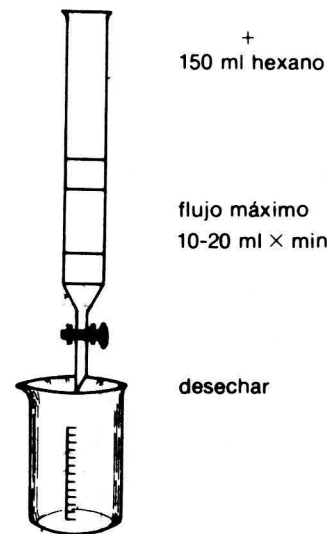
Probeta de 500 ml



50 ml extracto

flujo máximo

desechar

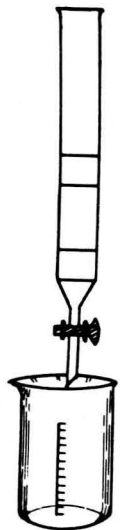


+
150 ml hexano

flujo máximo
10-20 ml × min

desechar

Hexano grado analítico en reci-
piente de vidrio

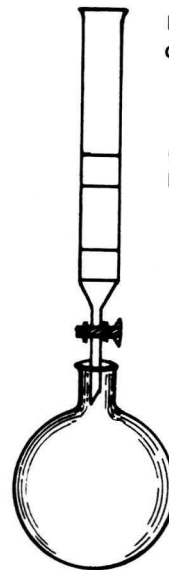


+
150 ml benceno

flujo máximo

desechar

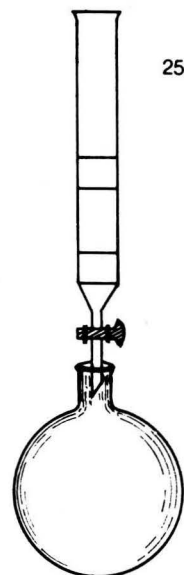
Benceno grado analítico en recipiente de vidrio



lavar con 150 ml dietil éter
desechar

eluir aflatoxinas con 150 ml
MeOH/CHCl₃, 3 + 97

Segunda fracción



+
250 ml acetona/benceno,
5 + 95

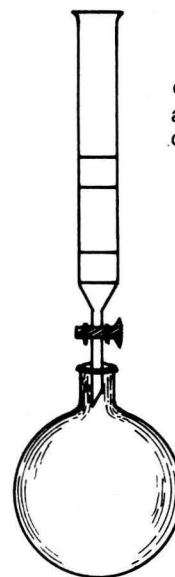
flujo máximo

colectar

Primera fracción

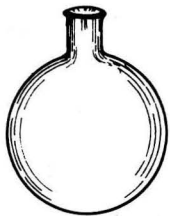
Acetona grado analítico en recipiente de vidrio

Benceno grado analítico en recipiente de vidrio

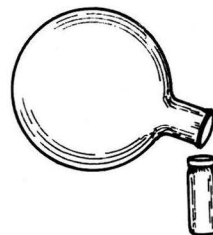


eluir aflatoxinas con 250 ml
ácido acético glacial/benceno,
1 + 9

Tercera fracción



agregar piedras de ebullición a las dos primeras fracciones y evaporar a casi sequedad en baño de vapor

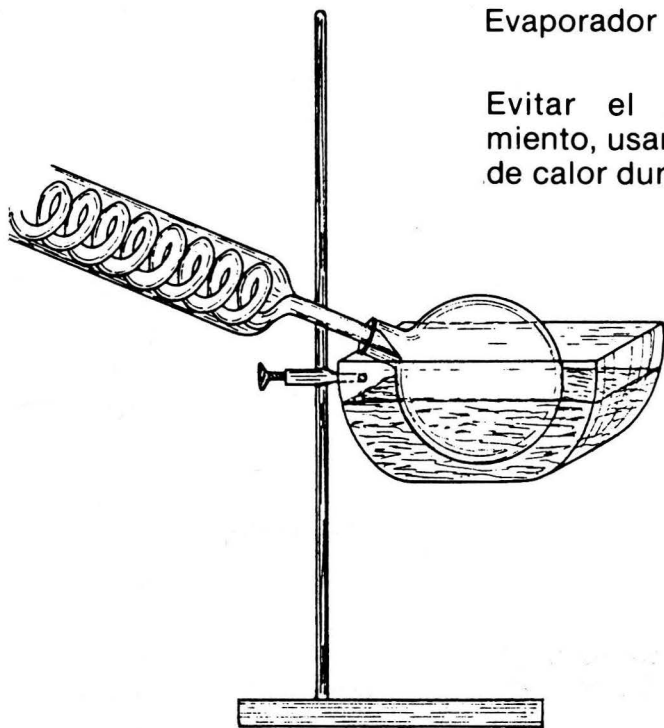


transferir todos los residuos cuantitativamente a viales con CHCl_3

evaporar la tercera fracción a sequedad

Evaporador rotatorio

Evitar el excesivo calentamiento, usar la mínima cantidad de calor durante la evaporación



evaporar en baño de vapor

Es preferible usar atmósfera de nitrógeno

BIBLIOGRAFIA CITADA

- American Association of Cereal Chemists. 1986. Aflatoxin in corn: presumptive test. *In* AACC Revisions to Approved Methods. Method 45—15: 1—4.
- Allcroft, R. 1969. Aflatoxicosis in farm animals. *In* L.A. Goldblatt (ed.), *Aflatoxin*. Academic Press, Nueva York, pp. 237—264.
- Association of Official Analytical Chemists. 1984. Natural Poisons. Official Methods of Analysis. 14 ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- Barabolak, R. 1977. Improved procedure for quantitative determination of aflatoxins in corn and wet milled corn products. *JAOAC* 60: 308—310.
- Barabolak, R., C. R. Colburn y R. J. Smith. 1974. Rapid screening method for examining corn and corn—derived products for possible aflatoxin contamination. *JAOAC* 57: 764—766.
- Booth, C. 1971. *The Genus Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Kew, Surrey, 273 pp.
- Buchanan, J. R., N. F. Sommer y R. J. Fortlage. 1975. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production of fig fruits. *Appl. Microbiol.* 30: 238—241.
- Büchi, G. y I. F. Rae. 1969. The structure and chemistry of the aflatoxins. *In* L. Goldblatt (ed.), *Aflatoxin*. Academic Press, Nueva York, pp. 55—105.
- Bullerman, L. B., P. A. Hartman y J. C. Ayres. 1969. Aflatoxin production in meats I. Stored meats. *Appl. Microbiol.* 18: 714—717.
- Bullerman, L. G., P. A. Hartman y J. C. Ayres. 1969b. Aflatoxin production in meats II. Aged salamis and aged country cured hams. *Appl. Microbiol.* 18: 718—722.
- Bu'Lock, J. F. 1975. Secondary metabolism in fungi and its relationships to growth and development. *In* G.E. Smith y D.R. Berry (eds.), *The Filamentous Fungi. Industrial Mycology*. Vol. 1. Arnold, Londres, pp. 33—58.
- Bu'Lock, J. F. 1980. Mycotoxins as secondary metabolites. *In* P. S. Stein (ed.), *The Biosynthesis of Mycotoxins. A study in secondary metabolism*. Academic Press, Nueva York, pp. 1—166.
- Burnside, J. E., W. L. Sippel, J. Forgacs, W. T. Carll, M. B. Atwood y E. R. Doll. 1957. A disease of swine and cattle caused by eating moldy corn. II Experimental production with pure cultures of molds. *Amer. J. Vet. Res.* 18: 817—824.
- Butler, W. H. 1969. Aflatoxicosis in laboratory animals. *In* L.A. Goldblatt (ed.), *Aflatoxin*. Academic Press, Nueva York, pp. 223—226.
- Butler, W. H. 1974. Aflatoxin. *In* I. F. H. Purchase (ed.), *Mycotoxins*. Elsevier, Amsterdam.
- Campbell, A. D. 1977. Food mycotoxins survey and monitoring programs. *Pure and Appl. Chem.* 49: 1703—1707.
- Campbell, A. D. 1978. Food mycotoxins survey and monitoring programs. *Ann. Nutr. Alim.* 31: 403—410.
- Campbell, A. D. 1979. Sampling foodstuffs for mycotoxin analysis. *Pure and Appl. Chem.* 52: 205—211.
- Campbell, A.D., T. B. Whitaker, A. E. Pohland, J. W. Dickens, D. F. Park. 1986. Sampling, sample preparation, and sampling plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. *Pure and Appl. Chem.* 58: 305—314.
- Christensen, C. W. 1975. *Molds mushrooms and mycotoxins*. Univ. of Minnesota Press, Mineápolis, pp. 59—85.
- Ciegler, A., R. W. Detroy y E. B. Lillehoj. 1971. Patulin, penicillic acid, and other carcinogenic lactones. *In* A. Ciegler, S. Kardis y S. J. Ajl (eds.), *Microbial Toxins Vol. VI*. Academic Press, Nueva York, pp. 409—434.
- Cole, R. J. 1976. *Aspergillus* toxins other than aflatoxin. *In* J. V. Rodricks (ed.), *Mycotoxins and other fungal related food problems*. Adv. Chem. Ser. 149 Am. Chem. Soc., Washington, D. C., pp. 68—89.
- Committee on Protection Against Mycotoxins. Board on Toxicology and Environmental Health Hazards. Commission on Life Sciences. National Research Council. 1983. Protection Against Trichothecene Mycotoxins. National Academy Press, Washington, D. C., 227 pp.
- Coon, F. B., F. J. Baur y L. R. L. Symes. 1972. International aflatoxin check sample program: 1971 study. *JAOCS* 55: 315—327.

- Cucullu, A. F., W. A. Pons Jr., y L. A. Goldblatt, 1972. Fast screening method for detection of aflatoxin contamination in cottonseed products. *JAOAC* 55: 1114—1119.
- Davis, N. D. y U. L. Diener. 1978. Mycotoxins. In L. R. Beuchat (ed.), *Food and Beverage Mycology*. Avi, Westport, pp. 397—444.
- Davis, N. D. y U. L. Diener. 1983. Biology of *A. flavus* and *A. parasiticus*. In U. L. Diener R. L. Asquith y J. W. Dickens (eds.), *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*. Southern Cooperative Series Bull. 279. Auburn University, Alabama, pp. 1—5.
- Davis, N. D., J. W. Dickens, R. L. Freie, P. B. Hamilton, O. L. Shotwell, y T. D. Wyllie. 1980. Protocols for surveys, sampling, post collection handling, and analysis of gran sample involved in mycotoxin problems. *JAOCS* 63: 95—102.
- Denizel, T. 1981. Screening pistachio nuts for aflatoxins using a minicolumn technique. (OECD) *Handbook on rapid detection methods of mycotoxins* pp. 27—31.
- Detroy, R. W., E. B. Lillehoj y A. Ciegler. 1971. Aflatoxin and related compounds. In A. Ciegler, S. Kardis y S. J. Ajl (eds.), *Microbial Toxins* Vol. VI. Academic Press, Nueva York, pp. 3—178.
- Diener, U. L. y N. D. Davis. 1969. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In L. Goldblatt (ed.), *Aflatoxin*. Academic Press, Nueva York, pp. 13—54.
- Diener, U. L., R. L. Asquith y J. W. Dickens (eds.). 1983. Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Southern Cooperative Series Bull. 279 Auburn University, Alabama, 112 pp.
- Durackova, Z., V. Betina y P. Nemeč. 1976. Systematic analysis of mycotoxins by thin layer chromatography. *J. Chromatography* 116: 141—154.
- Eguiazu, G. y K. K. Frank. 1981. Rapid methods for the detection of aflatoxin B1 in sunflower seeds and sunflower seed products. (OECD) *Handbook on rapid detection methods of mycotoxins* 32—36.
- Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Agricultural Bureaux, Kew, Surrey, 608 pp.
- Eppley, R. M. 1968. Screening method for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin. *JAOAC* 51: 74—78.
- Evans, M. A. y Harbison, R. D. 1977. Prenatal toxicity of rubratoxin B and its hydrogenated analog. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39: 13—22.
- Goldblatt, L. (ed.), 1969. *Aflatoxin. Scientific Background, Control and Implications*. Academic Press, Nueva York, 472 pp.
- Herz, K. O. 1977. The FAO Programme and Mycotoxins. *Ann. Nutr. Alim.* 31: 545—550.
- Hesseltine, C. W. y O. L. Shotwell. 1973. New methods for rapid detection of aflatoxin. *Pure and Appl. Chem.* 35:259—266.
- Holaday, C. E. y J. Landsen. 1975. Rapid screening method for aflatoxin in a number of products. *J. Agr. Food Chem.* 23: 1134—1136.
- Hood, R. D., J. E. Ines y W. Hayes. 1973. Effects of rubratoxin on prenatal development in mice. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 10: 200—207
- Ichinoe, M. y K. Kurata. 1983. Trichothecene—producing fungi. In Y. Ueno (ed.), *Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Developments in Food Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 73—82.
- Irving Jr. G. W. 1971. Aflatoxin research. A review of agricultural research service studies. *ARS* 20—17: 1—12.
- Jemmali, M. 1981. Sensitive cellulose minicolumn for the rapid detection of aflatoxin in agricultural products. (OECD) *Handbook on rapid detection methods of mycotoxins.* 13—17.
- Josefson, B. G. C. y T. E. Moller. 1977. Screening method for the detection of aflatoxins, ochratoxin, patulin, sterigmatocystin, and zearalenone in cereals. *JAOAC* 60: 1369—1371.
- Kamimura, H., M. Nishijima, K. Yasida, K. Ushiyama. S. Tabata, S. Matsumoto y T. Nishima. 1985. Simple, rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. *JAOAC* 68: 458—461.

- Krogh, P. 1977. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. *Pure and Appl. Chem.* 49: 1719—1721.
- Krogh, P. 1977a. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. *Ann. Nutr. Alim.* 31: 411—414.
- Kwolek, W. F. y O. L. Shotwell. 1979. Aflatoxin in white corn under loan. V. Aflatoxin prediction from weight percent of bright greenish—yellow fluorescent particles. *Cereal Chem.* 56: 342—345.
- Legator, M. S. 1969. Biological assay for aflatoxins. *In* L. A. Goldblatt (ed.), *Aflatoxin*. Academic Press, Nueva York, pp. 107—149.
- Lillehoj, E. B., O. L. Shotwell y C. W. Hesseltine. 1972. Poisons from molds. *Crop and Soils Magazine*. Dic. 15—16.
- Mc Nutt, S. H., P. Purwin y C. Murray. 1928. Vulvo—vaginitis in swine. Preliminary report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 73: 484—492.
- Mirocha, C. J., C. M. Christensen y G. H. Nelson. 1967. Estrogenic metabolite produced by *Fusarium graminearum* in stored corn. *Appl. Microbiol.* 15: 479—593.
- Mirocha, C. J., C. M. Christensen y G. H. Nelson. 1971. F—2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. *In* Kardis, A. Ciegler y S. J. Ajl (eds.), *Microbial Toxins*. Vol. VII. Academic Press, Nueva York, pp. 107—138.
- Mirocha, C. J. 1980. Rubratoxin, sterygmatoxystin and stachybotris mycotoxins. *In* FDA Conference on mycotoxins in animal feeds and grains related to animal health USDC, NTIS, PB80—221773. 152—232.
- Natori, S., S. Sakaki, H. Kurata, S. U. Dagawa. M. Ichione, M. Suito, M. Umeda y K. Otsubo. 1970. Production of rubratoxin B by *Penicillium purpurogenum* Stall. *Appl. Microbiol.* 19: 613—617.
- Nesheim, S. 1976. The ochratoxin and other related compounds. *In* J. V. Rodricks (ed.), *Mycotoxins and other fungal related food problems*. Adv. Chem. Ser. 149, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 273—295.
- Patterson, D. S. P. 1980. Mycotoxins. *In* H. J. M. Brown et al., *Environmental Chemistry*. The Royal Soc. Chem. Burlington, pp. 205—232.
- Pitt. J. 1979. *The genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Tallaromyces*. Academic Press. Londres. 604 pp.
- Polzhofer, K. 1981. Semiquantitative determination of total aflatoxin contents in vegetable substances. (Rapid screening test). (OECD) *Handbook on rapid detection methods of mycotoxins*, pp. 18—26.
- Pons Jr., W. A., A. F. Cucullu, A.O. Franz Jr., L. S. Lee y L. A. Goldblatt. 1973. Rapid detection of aflatoxin contamination in agricultural products. *JAOAC* 56: 803—807.
- Raper, K. B. y D. I. Fennell. 1965. *The Genus Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 686 pp.
- Raper, K. B. y C. Thom. 1949. *A Manual of the Penicillia*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 875 pp.
- Roberts, B. A. y D. A. P. Patterson. 1975. Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs, using a novel membrane cleanup procedure *JAOAC* 58: 1178—1181.
- Romer, T., N. Ghouri y T. M. Boling. 1979. Minicolumn screening methods for detecting aflatoxin: state of art. *JAOAC* 56: 795—797.
- Romer, T. 1971. Screening method for the detection of aflatoxin in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *JAOAC* 58: 500—506.
- Romer, T. 1973. Determination of aflatoxin in mixed feeds. *JAOAC* 6: 1111—1114.
- Saito, M., M. Enomoto y T. Tatsuno. 1971. Yellowed rice toxins. Luteoskirin and related compounds, chlorine—containing compounds, and citrinin. *In* A. Ciegler, S. Kardis, S. J. Ajl (eds.), *Microbial Toxins*. Vol. VI. Academic Press, Nueva York, pp. 299—380.
- Schuller, P. L., H. P. Van Egmond y L. Stoloff. 1983. Limits and regulations on mycotoxins. *Proc. Int. Symp. Mycotoxins* 111—129.

- Schuller, P. L., W. Horowitz y L. Stoloff. 1976. A review of sampling plans and collaboratively studied methods of analysis for aflatoxins. *JAOAC* 59: 1315—1343.
- Seitz, L.M. y K.E. Mohr. 1974. Aflatoxin detection in corn: a simple screening test. *Cereal Chem.* 51: 487—491.
- Shank, R. C. 1976. The role of aflatoxin in human disease. *In* J.V. Rodricks (ed.), *Mycotoxins and other fungal related food problems*. Adv. Chem. Ser. 149. Amer. Chem. Soc. Washington, D.C., pp. 51—57.
- Shannon, G. M., R. E. Peterson y O. L. Shotwell. 1985. Rapid screening method for detection of deoxynivalenol. *JAOAC* 68: 1126—1128.
- Shannon, G. M. y O. L. Shotwell. 1979. Minicolumn detection methods for aflatoxin in yellow corn: Collaborative study. *JAOAC* 62: 1070—1075.
- Shannon, G. M. y O. L. Shotwell. 1976. Thin layer chromatographic determination of sterigmatocystin in cereal grains and soybeans. *JAOAC* 59: 963—965.
- Shannon, G. M., R. D. Stubblefield y O. L. Shotwell. 1973. Modification of rapid screening method for aflatoxin in corn. *JAOAC*. 56: 1024—1025.
- Shotwell, O. L. 1983. Aflatoxin detection and determination in corn. *In* U. L. Diener, R. L. Asquith y J. B. Dickens (eds.), *Aspergillus flavus* in corn. Southern Cooperative Series Bull. 279. Auburn University, Alabama, pp. 38—45.
- Shotwell, O. L., M. L. Goulden, A. M. Jepson, W. F. Kwolek y C. W. Hesseltine. 1975. Aflatoxin occurrence in some white corn under loan, 1971. III. Association with bright greenish—yellow fluorescence in corn. *Cereal Chem.* 52: 670—677.
- Shotwell, O. L. y C. W. Hesseltine. 1981. Use of Bright greenish—yellow fluorescence as a presumptive test for aflatoxin in 1978 corn. *Cereal Chem.* 58: 124—127.
- Shotwell, O. L., G. M. Shannon y C. W. Hesseltine. 1975b. Aflatoxin occurrence in some white corn under loan. 1971. II. Effectiveness of rapid test in segregating contaminated corn. *Cereal Chem.* 52: 381—387.
- Shotwell, O. L., M. L. Goulden y C. W. Hesseltine. 1974. Aflatoxin distribution in contaminated corn. *Cereal Chem.* 51: 492—499.
- Shotwell, O. L., M. L. Goulden, J. W. Dickens y C. W. Hesseltine. 1980. Aflatoxin: distribution in contaminated corn plants. *Cereal Chem.* 57: 206—208.
- Shotwell, O. L., M. L. Goulden, E. B. Lillehoj, W. F. Kwolek y C. W. Hesseltine. 1977. Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest. III. Aflatoxin distribution in contaminated insect—damaged corn. *Cereal Chem.* 54: 620—626.
- Shotwell, O. L., M. L. Goulden y W. F. Kwolek. 1977. Determination of aflatoxin in corn: evaluation of filter fluorometer reading of minicolumns. *JAOAC* 60: 1220—1222.
- Shotwell, O. L., C. W. Hesseltine y M. L. Goulden. 1973. Incidence of aflatoxin in southern corn, 1969—1970. *Cereal Science Today* 18: 192—195.
- Shotwell, O. L. y C. E. Holaday. 1981. Minicolumn detection methods for aflatoxin in raw peanuts; collaborative study. *JAOAC* 64: 674—677.
- Shotwell, O. L., G. M. Shannon y M. L. Goulden. 1976. Confirmation of results of rapid screening test for aflatoxins performed at corn elevator. *JAOAC* 59: 1419—1421.
- Shotwell, O. L. y R. D. Stubblefield. 1974. Collaborative study of three screening methods for aflatoxin in corn. *JAOAC* 56: 808—812.
- Spilman Jr., J. R. 1985. Modification of the rapid screening method for aflatoxin in corn for quantitative use. *JAOAC* 68: 453—456.
- Stanly, G. I., V. P. Diprosimo y A. C. Koontz. 1979. Minicolumn detection method applied to almonds: Collaborative study. *JAOAC* 62: 136—140.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1980. *Principles and procedures of statistics*. 2a. ed. Mc Graw—Hill Book Co. Nueva York. 633 pp.
- Steyn, P. S. 1977. Some new micotoxins. *Pure and Appl. Chem.* 49: 1771—1778.
- Steyn, P. S. 1971. Ochratoxin and other dihydroisocoumarins. *In* A. Ciegler, S. Kardis y S. J. Aji (eds.), *Microbial Toxins*. Vol. VI. Academic Press, Nueva York, pp. 179—205.
- Stoloff, L. 1976. Occurrence of mycotoxins in food and feeds. *In* J. V. Rodricks (ed.), *Mycotoxins and other related food problems*. Adv. Chem. Ser. 149 Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 23—50.

- Stoloff, L. 1979. The three eras of fungal toxin research. *JAOAC* 56: 784—788.
- Stoloff, L., A. D. Campbell, A. C. Beckwith, S. Nesheim, J. S. Winsbush, Jr., O. M. Fordham, Jr. 1979. Sample preparation for aflatoxin assay: the nature of the problem and approaches to a solution. *JAOAC* 46:678—684.
- Stoloff, L. y J. Dantzman. 1972. Preparation of lot samples of nut meats for mycotoxin assay. *JAOAC* 49: 264—266.
- Takahashi, M. D. 1974. Thin layer chromatographic determination of aflatoxin in wine. *JAOAC* 57: 875—879.
- Tiemstra, P. J. 1976. A study of the variability associated with sampling peanuts for aflatoxin. *JAOCS* 46: 667—672.
- Tuite, J. y F. H. Scott. 1978. Rapid screening methods for aflatoxin in corn. *Plant Disease Control*. Purdue University Department of Botany and Plant Pathology, Indiana, BP—5—22.
- Ueno, Y. 1983. Historical background of trichothecene problems. In Y. Ueno (ed.), *Trichothecenes. Chemical; Biological, and Toxicological Aspects*. Developments in Food Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 1—5.
- Uraguchi, K. 1971. Citreoviridin. In A. Ciegler, S. Kardis y S. J. Ajl (eds.), *Microbial Toxins*. Vol. VI. Academic Press, Nueva York, pp. 357—367.
- Urry, W. H., L. Wehrmeister, E. B. Kodge y P. H. Kidy. 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron letters* 27:3109—3114.
- Valente Soares, L. M. y D. B. Rodríguez—Amaya. 1985. Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *JAOAC* 68: 1128—1130.
- Velasco, J. y T. B. Whitaker. 1975. Sampling cottonseed lots for aflatoxin contamination. *JAOCS* 52: 191—195.
- Velasco, J. y M. E. Whitten. 1973. Evaluation of florisil tubes in detection of aflatoxin. *JAOAC* 50: 120—121.
- Velasco, J. 1972. Detection of aflatoxin using small columns of florisil. *JAOCS* 49: 141—142.
- Vorster, L. J. 1969. A method for the analysis of cereals and groundnuts for three mycotoxins. *Analyst* 94: 136—142.
- Walking, A. E. 1980. Sampling and preparation of samples of peanut butter for aflatoxin analysis. *JAOAC* 63: 103—106.
- Wei, D. L., W. L. Chen, R. D. Wei y S. C. Jong. 1984. Identity and aflatoxin producing ability of *Aspergillus flavus* reference cultures. In H. Kurata y Y. Ueno (eds.), *Toxigenic Fungi, Their Toxins and Health Hazards*. Elsevier, Amsterdam, pp. 87—97.
- Whitaker, T. B. 1977. Sampling granular foodstuffs for aflatoxin. *Pure and Appl. Chem.* 49: 1709—1717.
- Whitaker, T. B., J. W. Dickens y R. J. Monroe. 1972. Comparison results. *JAOCS* 51: 214—218.
- Whitaker, T. B., J. W. Dickens y R. J. Monroe. 1979. Variability associated with testing corn for aflatoxin. *JAOCS* 56: 789—794.
- Whitaker, T. B., J. W. Dickens y R. J. Monroe. 1972. Comparison of the observed distribution of aflatoxin in shelled peanuts to the negative binomial distribution. *JAOCS* 49: 590—593.
- Whitaker, T. B., M. E. Whitten, y R. J. Monroe. 1976. Variability associated with testing cottonseed for aflatoxin. *JAOCS* 53: 502—505.
- Whicklow, D. T. 1984. Adaptation in wild and domesticated yellow—green aspergilli. In H. Kurata y Y. Ueno (eds.), *Toxigenic Fungi, Their Toxins and Health Hazards*. Elsevier, Amsterdam, pp. 78—86.
- Wilson, D. M. 1976. Patulin and penicillic acid. In J. V. Rodricks. (ed.), *Mycotoxins and other fungal related food problems*. Adv. Chem. Ser. 149 Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 90—190.
- Wogan, G. N. 1969. Metabolism and biochemical effects of aflatoxins. In L. A. Goldblatt (ed.), *Aflatoxin*. Academic Press. Nueva York, pp. 152—186.

**Manual de Métodos para el Análisis
de Micotoxinas en Granos, editado por
el programa Universitario de Alimentos,
se terminó de imprimir en Lito Roda,
en Abril de 1989. Su composición se hizo
en helvética de 12 pts. y la edición
consta de 1,000 ejemplares.**

ACERCA DEL MANUAL

El manual, primero en su género hecho en México, incluye 24 métodos para la determinación semicuantitativa o cuantitativa de micotoxinas en granos y semillas, la mayoría de estos métodos son los oficiales de la Association of Official Analytical Chemists (1984) y otras sociedades científicas internacionales relacionadas. También se presenta un método presuntivo para aflatoxinas en maíz. Los métodos están arreglados como diagramas de flujo ilustrados. Para cada micotoxina se da una pequeña introducción, efectos y propiedades químicas.

ACERCA DE LA AUTORA

Genoveva García Aguirre es egresada de la Facultad de Ciencias, UNAM, en donde obtuvo la Licenciatura (1972) y la Maestría en Ciencias (1975), en Biología. Ha recibido entrenamiento sobre micotoxinas en alimentos en el Seed Quality Laboratory, USDA, Beltsville, Md., E.U.A. 1973, en el Ministerio de Agricultura y Pesca, España 1980, y muy intensamente desde 1973 en el Northern Regional Research Lab. Peoria, Il., E.U.A. Actualmente presta sus servicios en el Instituto de Biología, UNAM., haciendo investigación sobre micoflora y micotoxinas en alimentos, y es Profesora de Micología y Fitopatología en la Facultad de Ciencias.

