



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL I

**"DESARROLLO Y APLICACION DE NUEVAS TECNICAS
PARA EL ANALISIS DE AFLATOXINAS
EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS"**

SUSANA DIAZ SALVADOR

Memoria presentada para optar
al Título de Doctor en Veterinaria

Directores de la Tesis:

D. Miguel Angel Moreno Romo

D. José Luis Blanco Cancelo

Madrid, 1993

ABREVIATURAS

A: adenina
AACC: American Association of Cereal Chemistry
ADN: ácido desoxirribonucleico
AF: aflatoxina
AFL: aflatoxicol
AM: medio de cultivo de Adye y Mateles
AOAC: Association of Official Analytical Chemists
ARN: ácido ribonucleico
ATF: ácido trifluoroacético
 a_w : actividad de agua
BCR: Community Bureau of Reference
C: citosina
CCF: Cromatografía en Capa Fina
CCFAE: Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia
CEE: Comunidad Económica Europea
CG: Cromatografía de Gases
CL: Cromatografía Líquida
cm: centímetro
 cm^2 : centímetro cuadrado
col.: colaboradores
CV: coeficiente de variación
Da: dalton
DD: diálisis difásica
DL₅₀: dosis letal cincuenta
EE: error estándar
EEUU: Estados Unidos
ELISA: Enzimoimmunoanálisis
FDA: Food and Drug Administration
G: guanina
g: gramo
GAO: United States General Accounting Office
h: hora
IARC: International Agency for Research on Cancer
IC: intervalo de confianza
IDF: International Dairy Federation
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
kg: kilogramo
l: litro
M: molar
m: metro
 m^2 : metro cuadrado
 m^3 : metro cúbico
máx.: máximo
mg: miligramo
min: minuto
ml: mililitro
mm: milímetro
mini-DD: mini diálisis difásica
N: Normal
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng: nanogramo
nm: nanómetro
 n° : número
ODS: octildecilsilano
pg: picogramo
PM: peso molecular
RDA: antigua República Democrática de Alemania
Rec.: recuperación

Ref.: referencia

R_f : Factor de migración en Cromatografía en Capa Fina

RFA: antigua República Federal de Alemania

RIA: Radioinmunoanálisis

rpm: revoluciones por minuto

sol.: solución

T: timina

TD₅₀: dosis tumoral cincuenta

UHT: Ultra High Temperature

URSS: antigua Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas

UV: ultravioleta

v: volumen

VHB: virus de la hepatitis B

°C: grado centígrado

µg: microgramo

µl: microlitro

σ: desviación estándar

\bar{x} : media aritmética

Agradecimientos

Quisiera expresar mi gratitud a todos los miembros del Departamento de Patología Animal I que, de una forma u otra, me habéis prestado vuestra colaboración durante la realización de esta tesis doctoral, en particular:

Al profesor Lucas Domínguez, a quien deseo agradecer no sólo sus inestimables consejos e ideas a lo largo de este trabajo sino, lo que para mi ha sido mucho más importante, tu apoyo y confianza constante desde mi incorporación en este departamento.

Al profesor Miguel Ángel Moreno, por tu labor de dirección y por ser un ejemplo de profesionalidad y dedicación.

Al profesor José Luis Blanco, por el tiempo invertido en la dirección de esta tesis y por haber sido quien me inició en la forma de trabajar en un laboratorio.

A Javier Prieta, con quien he compartido durante este tiempo ideas, opiniones, preocupaciones y horas de trabajo. Te agradezco tu valiosa amistad y estar siempre dispuesto a ayudar cuando hiciera falta.

A mi amigo Rabah Bellahsene, por tu afecto y tu admirable espíritu de sacrificio y tesón en tu trabajo, a pesar de las dificultades.

A mis compañeros "del laboratorio de hongos", Javier Bayo, Cristina Pascual e Ignacio Seplién, y al resto de compañeros del departamento en especial José Antonio Orden, Javier Hernández, Alicia Gibello, Carmen Delgado, Paloma Suárez, Dolores Cid, Belén López, Carmen Martín y Gustavo Domínguez, con quienes he compartido otras tareas y momentos agradables a lo largo de todo este tiempo.

Al profesor Ricardo de la Fuente, ya que todas las clases tuyas que tuve oportunidad de recibir en la Licenciatura hicieron que me interesase por conocer el trabajo que se hacía en este departamento.

También quisiera agradecer a la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid y a la Fundación Mapfre la concesión de las dos becas que me han permitido realizar este trabajo.

Asimismo, agradezco a Elesa S.A. la donación de los lotes de leche utilizados en las primeras fases de esta tesis.

Por último, deseo expresar mi gratitud a mi familia y amigos sin cuyo ánimo, paciencia y comprensión no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Y a José Antonio, por su ejemplo profesional y personal y por no permitirme dudar de mí misma en ningún momento. El haber compartido contigo los momentos buenos y malos de este trabajo hace que para mí tenga mucho más sentido.

A mi padre,
A mi abuelo Luis,
A José Antonio

Todas las cosas deben
hacerse tan sencillas como
sea posible, pero no más
sencillas de lo que son.

Albert Einstein

Indice

INDICE

I. INTRODUCCION	
I. 1. AFLATOXINAS: GENERALIDADES	1
I. 1. 1. Concepto y origen	1
I. 1. 2. Estructura	2
I. 1. 3. Actividad biológica	4
I. 1. 4. Mecanismo de acción	9
I. 1. 5. Importancia económica	13
I. 1. 6. Importancia sanitaria	15
I. 2. PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS	20
I. 2. 1. Contaminación indirecta de la leche y productos lácteos con AF M ₁	22
I. 2. 1. 1. Transformación de la AF B ₁ en AF M ₁ : nivel y factores que afectan	22
I. 2. 1. 2. Estabilidad de la AF M ₁ en productos lácteos	23
I. 2. 1. 3. Incidencia de la AF M ₁ en leche y productos lácteos	25
I. 2. 2. Contaminación directa por aflatoxinas en productos lácteos	28
I. 2. 2. 1. Crecimiento de hongos y producción de aflatoxinas	28
I. 2. 2. 2. Estabilidad de aflatoxinas distintas a la AF M ₁ en leche y productos lácteos	31
I. 2. 2. 3. Incidencia de aflatoxinas distintas a la AF M ₁ en leche y productos lácteos	32
I. 2. 3. Legislación sobre los niveles de aflatoxinas en productos lácteos	34
I. 3. METODOS DE ANALISIS DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS	37
I. 3. 1. Generalidades sobre el análisis de aflatoxinas en alimentos	37
I. 3. 2. Métodos de análisis de AF M ₁ en leche y productos lácteos	40
I. 3. 2. 1. Métodos cromatográficos	40
I. 3. 2. 2. Métodos inmunológicos para el análisis de AF M ₁ en leche y productos lácteos	46
I. 3. 2. 3. Validación y comparación entre los métodos de análisis de AF M ₁ en leche y productos lácteos	47
I. 3. 3. Métodos de análisis de otras aflatoxinas en leche y productos lácteos	48
I. 3. 4. Métodos comerciales para el análisis rápido de la AF M ₁ sola o en combinación con otras aflatoxinas	49
I. 3. 5. Métodos empleados para el análisis de aflatoxinas en leche y productos lácteos según las reglamentaciones oficiales	50
I. 4. TECNICAS DE MEMBRANA PARA LA EXTRACCION Y SEPARACION DE SUSTANCIAS	52
I. 4. 1. Antecedentes	52
I. 4. 2. Diálisis difásica	56
I. 4. 2. 1. Fundamento de la técnica	56
I. 4. 2. 2. Aplicaciones de la DD	58
I. 4. 2. 3. Ventajas generales de la técnica de DD	59
I. 4. 2. 4. Posibilidades futuras de la técnica de DD	59
II. OBJETIVOS	
II. 1. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO	61
III. MATERIAL Y METODOS	
III. 1. MATERIAL	64
III. 1. 1. Aflatoxinas	64
III. 1. 2. Aparatos de uso general	64
III. 1. 3. Material de vidrio	65
III. 1. 4. Reactivos	65
III. 1. 5. Medios de cultivo	66
III. 1. 6. Material para diálisis difásica	66
III. 1. 7. Material para Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia (CCFAE)	67
III. 1. 8. Otros materiales	67
III. 1. 9. Alimentos empleados en los diferentes estudios	68
III. 2. METODOS	68
III. 2. 1. Precauciones y normas de manejo de las aflatoxinas	68
III. 2. 2. Modo de empleo de las soluciones patrón de aflatoxinas	69
III. 2. 2. 1. Soluciones de trabajo y condiciones de almacenamiento	69
III. 2. 2. 2. Calibración de las soluciones patrón	70
III. 2. 2. 3. Mantenimiento y uso de los patrones	71
III. 2. 3. Desarrollo de la técnica de DD aplicada a la extracción de aflatoxinas en leche con detección mediante CCFAE	72
III. 2. 3. 1. Planteamiento del trabajo	72
III. 2. 3. 2. Preparación de las muestras de leche	73
III. 2. 3. 3. Contaminación de las muestras de leche con solución acuosa de aflatoxinas	74

III. 2. 3. 3. 1. Preparación de la solución acuosa de aflatoxinas en medio AM	74
III. 2. 3. 3. 2. Análisis de la concentración de aflatoxinas en la solución de medio AM	74
A. Extracción de las aflatoxinas de la solución acuosa	74
B. Separación y detección de las aflatoxinas de la solución acuosa	75
C. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en la solución acuosa	77
III. 2. 3. 4. Contaminación de las muestras de leche con solución patrón de aflatoxinas en triclorometano	78
III. 2. 3. 5. Preparación de los tubos de diálisis	78
III. 2. 3. 6. Extracción de las aflatoxinas	79
III. 2. 3. 7. Separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos	80
III. 2. 3. 8. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en los extractos de leche	81
III. 2. 3. 9. Cálculo del límite de determinación de la técnica para el análisis de leche	81
III. 2. 3. 10. Cálculo del límite de detección de la técnica de DD en muestras de leche	82
III. 2. 4. Desarrollo de la técnica de DD aplicada a la extracción de aflatoxinas en leche en polvo con detección mediante CCFAE	83
III. 2. 4. 1. Planteamiento del trabajo	83
III. 2. 4. 2. Preparación de las muestras de leche en polvo	83
III. 2. 4. 3. Preparación de los tubos de diálisis	84
III. 2. 4. 4. Extracción de las aflatoxinas	84
III. 2. 4. 5. Separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos de leche en polvo	85
III. 2. 4. 6. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en los extractos de leche en polvo	85
III. 2. 4. 7. Cálculo del límite de determinación de la técnica para el análisis de leche en polvo	85
III. 2. 4. 8. Cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de aflatoxinas de leche en polvo	86
III. 2. 5. Desarrollo de la técnica de DD aplicada a la extracción de aflatoxinas en yogur con detección mediante CCFAE	86
III. 2. 5. 1. Planteamiento del trabajo	86
III. 2. 5. 2. Preparación de las muestras de yogur	86
III. 2. 5. 2. 1. Preparación de las muestras de yogur elaborado en nuestro laboratorio	87
A. Elaboración del yogur	87
B. Contaminación del yogur	87
II. 2. 5. 2. 2. Preparación de las muestras de yogur comercial	88
III. 2. 5. 3. Preparación de las membranas de diálisis	88
III. 2. 5. 4. Extracción de las aflatoxinas de las muestras de yogur	88
III. 2. 5. 5. Separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos	89
III. 2. 5. 6. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en los extractos de yogur	89
III. 2. 5. 7. Cálculo del límite de determinación de la técnica para el análisis de yogur	89
III. 2. 5. 8. Cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de aflatoxinas de yogur	90
III. 2. 6. Desarrollo de la técnica de DD aplicada a la extracción de aflatoxinas en queso, con detección mediante CCFAE	90
III. 2. 6. 1. Planteamiento del trabajo	90
III. 2. 6. 2. Preparación de las muestras de queso	91
III. 2. 6. 3. Preparación de las membranas de diálisis	92
III. 2. 6. 4. Extracción de las aflatoxinas de las muestras de queso	92
III. 2. 6. 5. Separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos de queso	93
III. 2. 6. 6. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en los extractos	93
III. 2. 6. 7. Cálculo del límite de determinación de la técnica para el análisis del queso	93
III. 2. 6. 8. Cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de aflatoxinas de queso	94
III. 2. 7. Desarrollo de una técnica de mini-DD aplicada a la extracción de aflatoxina M ₁ en muestras de leche	94
III. 2. 7. 1. Planteamiento del trabajo	94
III. 2. 7. 2. Preparación de las muestras de leche	94
III. 2. 7. 3. Preparación de las membranas de diálisis	95
III. 2. 7. 4. Extracción de la aflatoxina M ₁	95
III. 2. 7. 5. Separación y detección de la aflatoxina M ₁ en los extractos de leche	96
III. 2. 7. 6. Cuantificación de la AF M ₁	96
III. 2. 7. 7. Cálculo del límite de determinación de la técnica de mini-DD para el análisis de leche	96
III. 2. 8. Incidencia de aflatoxina M ₁ en leche comercial	97
III. 2. 8. 1. Toma de muestras	97
III. 2. 8. 2. Análisis de AF M ₁	97
III. 2. 9. Empleo de material de referencia para la validación de la técnica de DD desarrollada para la extracción de AF M ₁ en leche en polvo	98

III. 2. 9. 1. Preparación de las muestras	98
III. 2. 9. 2. Extracción de la AF M ₁ mediante DD	99
III. 2. 9. 3. Separación, detección y cuantificación de la AF M ₁	99
III. 2. 9. 4. Pruebas especificadas por la BCR para la validación de técnicas analíticas a partir de materiales de referencia	99
III. 2. 10. Tratamiento de los resultados	100
IV. RESULTADOS	
IV. 1. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN LECHE CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCF AE	102
IV. 1. 1. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF M ₁	103
IV. 1. 2. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF G ₁ y AF B ₁	105
IV. 1. 3. Método definitivo desarrollado	106
IV. 2. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN LECHE EN POLVO CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCF AE	117
IV. 2. 1. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF M ₁	117
IV. 2. 2. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF G ₁ y AF B ₁	118
IV. 2. 3. Método definitivo desarrollado	119
IV. 3. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN YOGUR CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCF AE	132
IV. 3. 1. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF M ₁	132
IV. 3. 2. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF G ₁ y AF B ₁	134
IV. 3. 3. Método definitivo desarrollado	135
IV. 4. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN QUESO CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCF AE	144
IV. 4. 1. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF M ₁	145
IV. 4. 2. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF G ₁ y AF B ₁	147
IV. 4. 3. Método definitivo desarrollado	148
IV. 5. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE MINI-DD PARA LA EXTRACCION DE AF M ₁ EN LECHE CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCF AE	157
IV. 6. DETERMINACION DE AF M ₁ EN LECHE COMERCIAL MEDIANTE EXTRACCION POR DD Y DETECCION POR CCF AE	163
IV. 7. RESULTADOS DE LA VALIDACION DE LA TECNICA DE DD DESARROLLADA PARA LA EXTRACCION DE AF M ₁ EN LECHE EN POLVO, MEDIANTE EL EMPLEO DE MATERIALES DE REFERENCIA	170
V. DISCUSION	
V. 1. CONSIDERACIONES INICIALES SOBRE LAS DISTINTAS TECNICAS DE DD DESARROLLADAS	174
V. 1. 1. Discusión del material y métodos empleado	174
V. 1. 1. 1. Elección de las aflatoxinas	174
V. 1. 1. 2. Preparación de los patrones y sistemas de contaminación de los substratos	174
V. 1. 1. 3. Elección de la membrana de diálisis	179
V. 1. 1. 4. Elección del solvente de extracción	179
V. 1. 1. 5. Elección del sistema de detección por CCF AE	180
V. 1. 1. 6. Observaciones generales sobre el método	182
V. 1. 2. Influencia de los parámetros de la DD en los resultados	184
V. 1. 2. 1. Influencia de la naturaleza del solvente y su disposición respecto al tubo de diálisis	184
V. 1. 2. 2. Influencia de la temperatura de extracción	185
V. 1. 2. 3. Influencia del tiempo de extracción	185
V. 1. 2. 4. Influencia del valor de pH de la muestra	187
V. 1. 2. 5. Influencia de la relación de volumen entre la fase acuosa y orgánica	188
V. 2. TÉCNICA DE DD APLICADA A LA LECHE CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCF AE	189
V. 2. 1. Análisis de AF M ₁	189
V. 2. 2. Análisis de AF G ₁ y AF B ₁	194
V. 3. TÉCNICA DE DD APLICADA A LA LECHE EN POLVO CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCFAE	195
V. 3. 1. Análisis de AF M ₁	195
V. 3. 2. Análisis de AF G ₁ y AF B ₁	197
V. 4. TECNICA DE DD APLICADA AL YOGUR CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCF AE	198

V. 4. 1. Análisis de AF M ₁	198
V. 4. 2. Análisis de AF G ₁ y AF B ₁	201
V. 5. TÉCNICA DE DD APLICADA AL QUESO CON DETECCIÓN POSTERIOR MEDIANTE CCFAE	203
V. 5. 1. Análisis de AF M ₁	203
V. 5. 2. Análisis de AF G ₁ y AF B ₁	207
V. 6. EXTRACCIÓN DE AF M ₁ MEDIANTE mini-DD Y DETECCIÓN POSTERIOR POR CCFAE	209
V. 7. DETERMINACIÓN DE AF M ₁ EN LECHE COMERCIAL	210
V. 8. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE DD PARA LA EXTRACCIÓN DE AF M ₁ DE LECHE EN POLVO A PARTIR DE MATERIALES DE REFERENCIA	214
VI. CONCLUSIONES	217
VII. RESUMEN	
VII. 1. RESUMEN	219
VII. 2. SUMMARY	221
VIII. BIBLIOGRAFIA	223

Introducción

I. 1. AFLATOXINAS: GENERALIDADES

I. 1. 1. Concepto y origen

Las aflatoxinas (AF) forman parte del amplio grupo de metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos filamentosos, conocido genéricamente como micotoxinas [Goto, 1990].

Sólo ciertas cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* son capaces de sintetizar aflatoxinas, cuando las condiciones ambientales y nutricionales son las adecuadas [Pohland y Wood, 1987; Nahm, 1990]. No obstante, las cepas aflatoxigénicas del género *Aspergillus* son muy comunes y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sobre todo en zonas de clima cálido y húmedo. Esto aumenta en gran medida el riesgo de contaminación de alimentos por hongos capaces de sintetizar estas sustancias, fundamentalmente en el caso de que las condiciones de almacenamiento de esos alimentos no sean las adecuadas [Pohland y Wood, 1987].

La función biológica de las aflatoxinas, como la de la mayoría de los metabolitos secundarios, no está clara. Se trata de compuestos de bajo peso molecular, que se acumulan después de la fase de crecimiento del hongo y que no son esenciales para la vida de éste [Bennet y Bentley, 1989; Moss, 1992].

Se conocen más de una veintena de aflatoxinas distintas pero relacionadas estructuralmente. Estas toxinas provienen tanto del metabolismo de los hongos aflatoxigénicos como de las transformaciones que sufren estos compuestos al ser ingeridos y metabolizados por los animales [Pohland y Wood, 1987]. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados sobre estas micotoxinas, desde su descubrimiento hasta la actualidad, se han referido fundamentalmente a las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ [Butler, 1974; Pohland y Wood, 1987].

Las cuatro primeras toxinas pueden encontrarse en numerosos tipos de alimentos y en proporciones variables; si bien la AF B₁ aparece de forma general

en mayor cantidad que las otras, siendo además la que presenta un poder tóxico más alto [Pohland y Wood, 1987; Palmgren y Hayes, 1987; Goto, 1990]. Estas cuatro aflatoxinas han sido consideradas responsables de intoxicaciones en animales por consumo de alimentos contaminados desde los años sesenta [Asplin y Carnaghan, 1961; Blount, 1961; Loosmore y Harding, 1961], aunque hay algunas evidencias que sugieren la intervención de estas micotoxinas en procesos de intoxicación registrados antes de esas fechas [Newberne y col., 1955; Burnside y col., 1957].

La AF M₁ es el primer producto conocido procedente de la metabolización de las aflatoxinas por parte de los animales. Allcroft y Carnaghan, entre 1962 y 1963, descubrieron que vacas alimentadas con harina de cacahuete contaminada con AF B₁ secretaban en la leche un factor tóxico, con efecto similar al de la aflatoxina ingerida en análisis empleando patitos de un día [Allcroft y Carnaghan, 1963]. En estudios posteriores se comprobó que tanto la AF M₁ como la AF M₂ se podían aislar de la leche, orina, hígado y riñón de varias especies de animales, incluido el hombre, así como de maíz y cacahuets contaminados por hongos [Allcroft y col., 1966; Holzapfel y col., 1966; Campbell y col., 1970; Krogh y col., 1973; Coulter y col., 1984; Helferich y col., 1986].

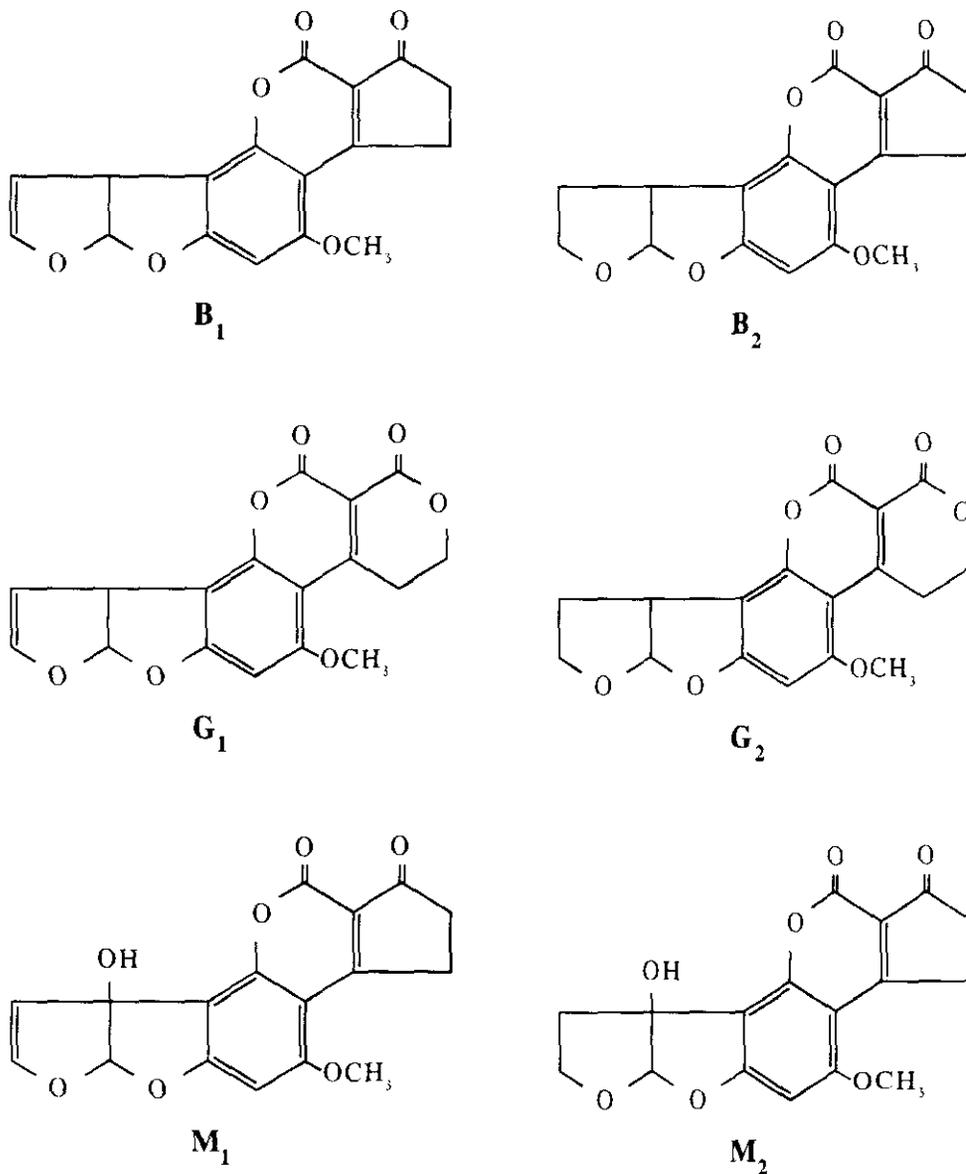
I. 1. 2. Estructura

La estructura química de las aflatoxinas B₁ y G₁, evidenciada por Asao y col. en 1963, está constituida por la fusión de un núcleo cumarínico y otro bifurano a los que se añaden una pentanona en el caso de la AF B₁ y un anillo ciclohexanoico en la AF G₁. La AF B₂ y AF G₂ son dihidroderivados de la AF B₁ y AF G₁ respectivamente [Palmgren y Hayes, 1987].

La mayoría de las restantes aflatoxinas descritas proceden también de la hidroxilación en diferentes puntos de la estructura molecular de las cuatro aflatoxinas principales. Tal es el caso de la AF M₁ y de la AF M₂, derivados 4-hidroxilados de la AF B₁ y AF B₂ respectivamente [Palmgren y Hayes, 1987] (Figura I.1.).

La parte más reactiva de la estructura de las aflatoxinas es el anillo lactónico. Por otro lado, la existencia de un núcleo bifurano confiere a las moléculas de aflatoxina una gran rigidez, lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares [Palmgren y Hayes, 1987].

Figura I.1. Estructura química de las principales aflatoxinas.



I. 1. 3. Actividad biológica

La importancia de las aflatoxinas reside en sus efectos nocivos para la salud de los animales y del hombre ya que se trata de sustancias que pueden actuar como agentes tóxicos, carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos e inmunosupresores.

Los primeros análisis sobre la toxicidad aguda de las aflatoxinas se realizaron en 1961 por Sargeant y col., empleando patitos de un día. A partir de entonces los numerosos estudios llevados a cabo, fundamentalmente con la AF B₁ por su mayor poder tóxico y frecuencia de aparición, han establecido el carácter predominantemente hepatotóxico de estas sustancias, tanto en sus efectos agudos como crónicos [Butler, 1969, 1984; Palmgren y Hayes, 1987].

La toxicidad aguda de las aflatoxinas se produce por ingestión de dosis muy bajas si se comparan con otros tóxicos y cursa generalmente con necrosis periportal, hemorragias, degeneración grasa del hígado y muerte del animal. Las lesiones hepáticas y los síntomas generales que acompañan al proceso hepatotóxico varían en las distintas especies animales [Butler, 1974].

Las propiedades carcinogénicas de las aflatoxinas (siempre refiriéndonos en mayor medida a la AF B₁) se han caracterizado en la mayoría de los sistemas biológicos, comprobándose que el consumo de dietas contaminadas de forma natural o la administración de las aflatoxinas por distintas vías inducía la aparición de tumores hepáticos en la mayoría de los animales (peces, aves, roedores, carnívoros y primates) [Palmgren y Hayes, 1987; Goto, 1990; Wogan, 1992]. No obstante, las aflatoxinas también pueden producir alteraciones en riñón, aparato digestivo, cerebro y sistema inmune [Krogh, 1989].

En este sentido, y aunque los estudios sobre la AF G₁ han sido más limitados, parece ser que esta toxina es capaz de inducir con mayor frecuencia que la AF B₁ tumores renales, a pesar de que su actividad tóxica es relativamente

menor [Butler, 1984].

La comparación cuantitativa del potencial carcinogénico de la AF B₁ en diferentes especies animales puede establecerse mediante el cálculo de la TD₅₀, es decir, el nivel de dosis con el cual se espera que el 50% de los animales testados desarrollen un tumor específico. La Tabla I.1. recoge la TD₅₀ obtenida en diferentes estudios con roedores [Wogan, 1992].

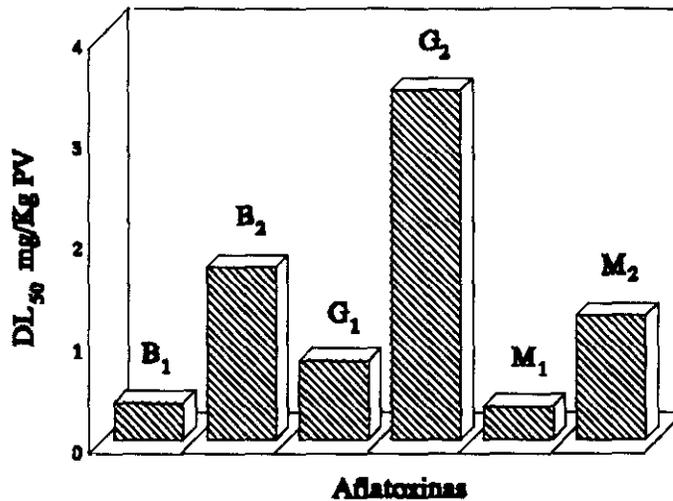
Tabla I.1. TD₅₀ vía oral de la AF B₁ en distintas variedades de rata y ratón [Wogan, 1992].

Especie	TD ₅₀ (µg/Kg PV y día)	
	♂	♀
Rata Fischer	1'3	7,5
Rata Wistar	5'8	6'9
Rata Porton	3'1	12'5
Ratón C3H	>70	
Ratón Swiss	5'3	

Con respecto a la AF M₁ existen varios trabajos sobre sus efectos tóxicos en animales de laboratorio. Sin embargo, comparado con la AF B₁, lo que se conoce de su toxicidad es relativamente poco. Esto se debe a que en principio no fue fácil contar con suficiente cantidad del compuesto puro como para realizar estudios de toxicidad con gran número de animales y a largo plazo. Por este motivo, la mayoría de los ensayos con AF M₁ han sido diseñados para periodos de exposición cortos o a medio plazo [Van Egmond, 1991]. No obstante, existen varias publicaciones sobre métodos de obtención de forma natural de la AF M₁, ya que las mezclas sintéticas utilizadas en algunas experiencias de toxicidad han demostrado una disminución en el poder tóxico de la sustancia [Hsieh y col., 1986].

Las investigaciones realizadas han puesto de manifiesto que la DL₅₀ vía oral para patitos de un día en el caso de la AF M₁ es muy similar a la de la AF B₁ (Figura I.2.) [Holzapfel y col., 1966; Purchase, 1967].

Figura I. 2. DL₅₀ vía oral de las principales aflatoxinas en patitos de un día.



En relación a la carcinogenicidad de la AF M₁ se han llevado a cabo varios estudios después de comprobar la similitud tanto estructural como toxicológica de esta toxina con la AF B₁ [Van Egmond, 1991]. Las investigaciones más importantes sobre los efectos crónicos de la AF M₁ se han efectuado empleando ratas.

En un primer estudio realizado por Wogan y Pagialunga en 1974, se administró a un lote de ratas 25 µg de AF M₁ sintética mediante intubación, cinco días a la semana durante ocho semanas. Transcurrido el tiempo del ensayo una parte de los animales desarrollaron tumores hepáticos y la otra evidenciaron lesiones preneoplásicas en el hígado.

Un segundo estudio se realizó administrando a ratas vía oral toxina natural a dosis de 50 µg/Kg durante un periodo entre 19-21 meses. Los resultados obtenidos fueron la aparición de nódulos neoplásicos en el hígado del 16% de los animales, desarrollando carcinomas intestinales el 5% de los animales restantes [Cullen y col., 1987].

La conclusión que se obtiene de estas experiencias es que la AF M₁ presenta propiedades hepatotóxicas y carcinogénicas. De forma cuantitativa parece que el

efecto tóxico agudo en roedores es ligeramente inferior al producido por la AF B₁, siendo la actividad carcinogénica sensiblemente menor [Van Egmond, 1991; Stoloff, 1980]. La Tabla I.2. muestra algunos de los estudios realizados sobre la inducción de tumores en animales tras la administración de AF B₁ o AF M₁ [Goto, 1990].

Tabla I.2. Estudios sobre la producción de hepatomas en distintas especies de animales sometidos a la acción de la AF B₁ o la AF M₁ administradas por diferentes vías [Goto, 1990].

Especie	AF	Dosis	Duración	Incidencia de hepatomas
Ratón	B ₁	3 mg/Kg i.p.	82 semanas	28/29
Rata (macho)	B ₁	1 mg vía oral	42-58 semanas	18/18
Rata	B ₁	1 mg/Kg en dieta	41-64 semanas	18/21
Guppy	B ₁	6 mg/Kg en dieta	11 meses	7/11
Trucha común	B ₁	4 µg/Kg en dieta	16 meses	14/40
Trucha arcoiris	B ₁	8 µg/Kg en dieta	16 meses	32/40
Pato	B ₁	30 µg/Kg en dieta	14 meses	8/11
Mono	B ₁	53-1369 mg total en dieta	45-145 meses	3/9
Mono	B ₁	99-1354 mg total en dieta	39-147 meses	8/13
Rata (macho)	M ₁	1 mg en dieta	100 semanas	1/29
Rata (macho)	M ₁	50 µg/Kg en dieta	16-19 meses	2/31
Trucha común	M ₁	4 µg/Kg en dieta	12 meses	6/46
Trucha arcoiris	M ₁	16 µg/Kg en dieta	12 meses	30/43

Con respecto a la AF M₂ las investigaciones son más escasas, debido a que su incidencia en alimentos es inferior y a que las cantidades que aparecen son mucho más bajas. En cualquier caso los estudios realizados demuestran que el poder tóxico de esta micotoxina es inferior al de la AF M₁, igual que ocurre con los dihidroderivados de las aflatoxinas B₁ y G₁ (AF B₂ y AF G₂ respectivamente) [Van

Egmond, 1991; Stoloff, 1980).

En lo que se refiere a la capacidad mutagénica de las aflatoxinas, estudios realizados por Wong y Hsieh [1976], empleando el test de Ames con *Salmonella typhimurium*, demostraron que si se tomaba como 100 el valor de mutagenicidad relativa de la AF B₁ el resultado para la AF G₁ y la AF M₁ correspondía aproximadamente al 3% de ese valor.

El efecto teratogénico se ha investigado casi con exclusividad en la AF B₁ y se ha comprobado que varía mucho según la especie animal. En los estudios realizados se ha descrito la aparición de efectos teratogénicos en ratas, pollos y cricetos, pero no así en ratones [Di Paolo y col., 1967].

De igual manera, el papel inmunosupresor de las aflatoxinas se ha venido estudiando en mayor medida en la AF B₁, mediante ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* [Corrier, 1991]. Se sabe que la ingestión de estas sustancias causa atrofia del timo y de la bolsa de Fabrizio en pollos y pavos [Thaxton y Hamilton, 1971] y supresión de la inducción de la mitosis en linfocitos T y B humanos y bovinos [Corrier, 1991]. Asimismo, en algunas especies animales se produce una reducción en la cantidad de inmunoglobulinas sintetizadas y en la actividad del complemento [Panangala y col., 1986; Thurston y col., 1986, 1989; Pestka y Bondy, 1990; Corrier, 1991]. Todos estos efectos tienen su origen en la alteración de la síntesis proteica ocasionada por las aflatoxinas y que trastorna la proliferación y diferenciación normal de las células del sistema inmune, la síntesis de mediadores como las interleuquinas y la producción de anticuerpos [Thurston y col., 1986; Corrier, 1991].

Los efectos negativos sobre la inmunidad originados por las aflatoxinas se traducen en una menor resistencia a la infección por diversos agentes patógenos, así como en la disminución de la funcionalidad de los mecanismos naturales de control sobre las células pretumorales [Corrier, 1991].

La toxicidad de las aflatoxinas es muy variable, dependiendo principalmente

de la vía de metabolización de estas sustancias en el organismo y de la toxicidad de los metabolitos resultantes. Otros aspectos, además de la especie, que influyen en la intensidad y variabilidad de los efectos tóxicos de las aflatoxinas son la raza, edad, sexo (ligado a factores endocrinos) y estado de salud y nutrición del animal [Palmgren y Hayes, 1987]. En este sentido, la influencia que ejerce la dieta en la toxicidad de las aflatoxinas es función principalmente de su contenido en proteínas y vitamina A, que actúan como agentes protectores hepáticos y del contenido y composición de los lípidos de la dieta, ya que los lípidos ricos en ácidos grasos insaturados protegen frente a la acción de las aflatoxinas [Dirr, 1987; Palmgren y Hayes, 1987; Gorelick, 1990].

I. 1. 4. Mecanismo de acción

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, el metabolismo desempeña un papel muy importante en el modo de acción de las aflatoxinas. Se conoce desde hace tiempo que las aflatoxinas ingeridas son activadas por las enzimas del sistema oxidativo microsomal, primero en el hígado y probablemente después también en otros órganos [Gorelick, 1990; Chu, 1991].

Aunque este sistema enzimático es capaz de detoxificar una gran variedad de compuestos mediante reacciones de hidroxilación y favorecer así su excreción posterior, algunas sustancias se convierten en más reactivas, más electrofílicas y son capaces de unirse a distintas macromoléculas alterando sus funciones [Palmgren y Hayes, 1987; Chu, 1991].

Este es el caso de la AF B₁ que, en una primera fase, se convierte en un derivado epóxido de corta vida pero de gran reactividad, que es capaz de formar conjugados por unión a proteínas, ácidos nucleicos u otros compuestos como el glutatión [Palmgren y Hayes, 1987; Gorelick, 1990; Chu, 1991].

La formación de conjugados con ADN se produce originalmente en la posición N-7 de la guanina y se han descrito varios conjugados naturales a partir

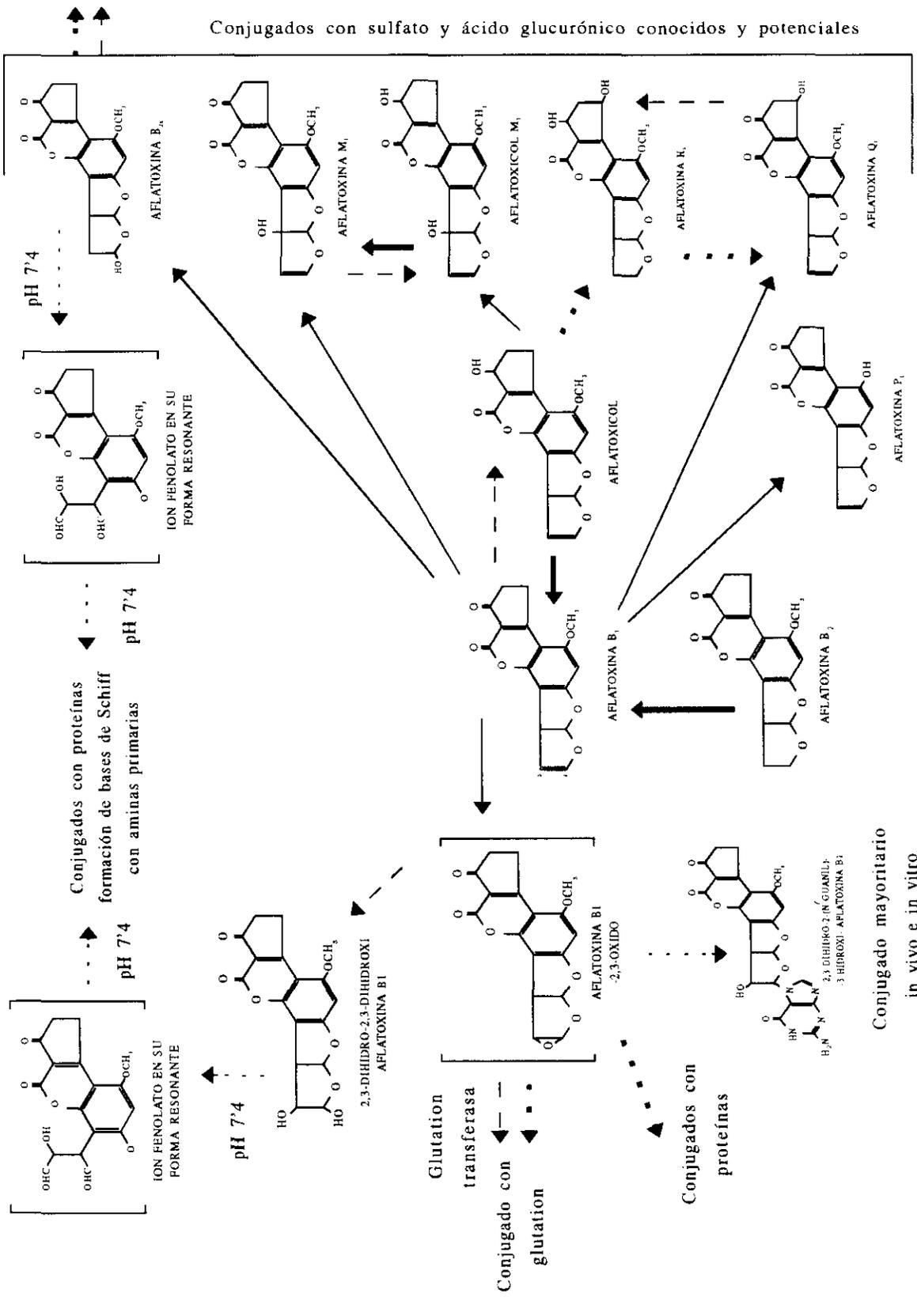
de aflatoxinas diferentes; entre ellos están el conjugado 8,9 dihidro-9-hidroxi(N⁷-guanil) AF B₁, el conjugado AF M₁-N-7 guanina, el conjugado AF P₁-N-7 guanina, etc [Essigman y col., 1977; Croy y col., 1978; Autrup y col., 1985; Hsieh y col., 1988; Chu, 1991; Wogan, 1992].

En cualquier caso parece ser que existen varios factores que deben modular la formación de conjugados, fundamentalmente del epóxido de la AF B₁ y el ADN y con ello la susceptibilidad de las especies a la carcinogénesis. En este sentido, los mecanismos de competencia en la unión a ácidos nucleicos, que se establecen entre el glutathione y el compuesto activado de la AF B₁, dan lugar a una reducción en el potencial carcinogénico de esta aflatoxina en aquellas especies que presentan una mayor capacidad para la formación de conjugados con glutathione [Palmgren y Hayes, 1987; Gorelick, 1990; Chu, 1991].

Los intermediarios formados tras las reacciones de hidroxilación de las aflatoxinas pueden ser excretados por distintas vías [Palmgren y Hayes, 1987; Chu, 1991]. La mayoría de ellos, así como la fracción de aflatoxina ingerida y no hidroxilada, se detectan normalmente como conjugados con ácido glucurónico o sulfatos [Wei y col., 1985a, b]. Así por ejemplo, la AF M₁, que es un metabolito formado por hidroxilación en la posición 4- de las moléculas de AF B₁, se ha detectado en forma de conjugado con ácido glucurónico en excreciones de pollo [Mabee y Chipley, 1973].

En algunas especies otra posibilidad conocida dentro de la metabolización de las aflatoxinas es la que conduce a la formación de aflatoxicol. Éste se produce a partir de la AF B₁ en una reacción de reducción mediada por una deshidrogenasa NADHP dependiente. El interés principal del aflatoxicol, aparte de tratarse de uno de los metabolitos más tóxicos, es que su reacción de formación es reversible, sirviendo de reservorio de AF B₁ en los animales que lo producen. Una reacción similar ocurre en el caso de la ingestión de AF M₁ y la formación de su metabolito aflatoxicol M₁ (AFL M₁) [Palmgren y Hayes, 1987; Gorelick, 1990]. Las distintas posibilidades de metabolización de la AF B₁ se resumen en la siguiente página (Figura I.3.).

Figura I.3. Transformaciones metabólicas posibles de la AF B₁ [Palmgren y Hayes, 1987]. La flecha continua indica reacciones mediadas por oxigenasas microsomales, la flecha continua gruesa reacciones por deshidrogenasas microsomales, la flecha de puntos reacciones químicas directas, la flecha discontinua otras reacciones y la flecha punteada gruesa reacciones hipotéticas.



En resumen, la diferente sensibilidad de los animales a la acción tóxica de las aflatoxinas depende de aspectos de su cinética como son: la diferente absorción a través del tracto digestivo [Kumagai, 1989] (por ejemplo, en el caso de la molécula de AF M₁ al tratarse de un compuesto más polar que la AF B₁ su nivel de absorción intestinal es menor), la distribución en el organismo y los mecanismos de metabolización y excreción utilizados por las distintas especies animales [Helferich y col., 1986; Wolzak y col., 1986; Palmgren y Hayes, 1987; Gorelick, 1990].

Los efectos principales que conlleva la unión de las aflatoxinas a macromoléculas son la alteración en la síntesis de ADN, ARN y proteínas (enzimas, inmunoglobulinas, interferón...) [Thaxton y Hamilton, 1986; Balachandran y Ramarkishnan, 1988; Thurston y col., 1989]. Esto conlleva la aparición de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, disgregación temporal de los ribosomas, disminución en la respiración celular por desacoplamiento en el mecanismo de fosforilación oxidativa e interrupción del transporte de electrones, alteración de la glicolisis y gluconeogénesis así como disminución en la actividad de ciertas hormonas al establecerse una competencia por los receptores específicos (se sabe que la AF M₁ incluso en cantidades muy bajas compite con el estradiol por los receptores localizados en el útero) [Palmgren y Hayes, 1987].

Asimismo, la formación de compuestos de gran reactividad que se unen a los ácidos nucleicos (fundamentalmente ADN mitocondrial) es responsable del poder carcinogénico de las aflatoxinas. Estos compuestos actúan como agentes genotóxicos [Autray y Boutibonnes, 1986; Odugbesan y col., 1988], dando lugar a dos lesiones premutacionales diferentes, que pueden conllevar a la activación de oncogenes y a la iniciación de un proceso tumoral [Palmgren y Hayes, 1987; Chu, 1991; Wogan, 1992]. La primera de estas lesiones se origina tras la eliminación de forma espontánea o la reparación enzimática de las posiciones con conjugados epóxido-N-7 guanina, dando lugar a sitiosapurínicos donde la adenina tiene una gran afinidad por insertarse en la posición correspondiente de la cadena opuesta del ADN. Esto puede dar lugar a una mutación por sustitución de un par de bases G-C por un par T-A. La segunda lesión premutacional se produce al originarse un derivado

formamidopirimidínico resistente a los procesos de reparación enzimática del ADN, que puede dar lugar a mutaciones si está presente en la fase de replicación del ADN [Palmgren y Hayes, 1987; Chu, 1991; Wogan, 1992].

I. 1. 5. Importancia económica

La evaluación de las pérdidas económicas derivadas de la presencia de aflatoxinas en alimentos es compleja, debido a que son muchos los factores que hay que tener en cuenta para poder realizar la valoración [Burdaspal, 1984].

Por una parte, la detección de materias primas o alimentos contaminados puede ocasionar desde la pérdida absoluta del producto o cultivo a la pérdida de mercados o la disminución de ingresos por la venta de las mercancías a menor precio [Burdaspal, 1984; Palmgren y Hayes, 1987; Moss, 1991].

Hay que tener en cuenta que la trascendencia de estos hechos en algunos países productores es a veces notablemente elevada, sobre todo si se considera que muchos de estos países están en vías de desarrollo y su mayor fuente de ingresos es la exportación de materias primas para la elaboración de alimentos. Además, en la mayoría de los casos los países afectados presentan una climatología favorable para la producción de aflatoxinas y muchas veces los sistemas de almacenamiento y procesado no son los más adecuados [Burdaspal, 1984; Moss, 1991]. Un ejemplo del problema que puede plantear la contaminación con aflatoxinas lo tenemos en Turquía, que vio cerrado su mercado de higos secos en toda la región escandinava por detectarse aflatoxinas en un 30% de las muestras analizadas [Steiner y col., 1988; Moss, 1991].

Cuando se detecta la presencia en partidas agrícolas de estas micotoxinas en concentraciones superiores a las establecidas por la legislación o, en su defecto, a las recomendadas por diferentes organismos, existen pocas alternativas [Burdaspal, 1984; Moss, 1991]. Una de ellas es la destrucción total del producto contaminado, como ocurrió a finales de los años setenta en Arizona donde se tuvieron que destruir

miles de galones de leche [Kuhn, 1978, citado en Palmgren y Hayes, 1987].

En otros casos (semillas o forrajes fundamentalmente) es posible el tratamiento con agentes detoxificantes [Müller, 1983] como el peróxido de hidrógeno [Applebaum y Marth, 1982], aldehídos [Codifer y col., 1976; Heimbecher y col., 1988], procedimientos de amoniación [Gardner, 1971; Park, 1984], etc. Entre estas técnicas la más recomendable por sus efectos y viabilidad económica es el empleo de amoniaco. Los productos tratados de esta forma reducen significativamente sus niveles de contaminación siendo seguros para la alimentación de animales [Norred y Morrissey, 1983]. Por ejemplo, existen estudios con resultados muy favorables sobre el tratamiento de piensos contaminados con AF B₁ destinados posteriormente para la alimentación de ganado vacuno [Mckinney y col., 1973]. En estos estudios se comprobó una disminución considerable de la cantidad de AF M₁ secretada en leche por los animales que consumieron los piensos detoxificados [Frémy y Quillardet, 1985].

No obstante, el empleo de sistemas de detoxificación no es rentable en determinados casos por encarecer el producto. Además, estos sistemas no se utilizan para el tratamiento de los alimentos destinados al consumo humano por producirse alteraciones en la calidad organoléptica de los mismos. A esto se añade la falta de estudios sobre la posible toxicidad en el hombre de los derivados formados por amoniación, lo que ha supuesto la prohibición del empleo de este sistema de detoxificación en Estados Unidos por recomendación de la FDA (Food and Drug Administration) [Lee, 1989].

Otro aspecto importante que se suma son los gastos derivados del uso de procedimientos de vigilancia y control para la detección de aflatoxinas en alimentos, así como de la investigación sobre toxicología y métodos de análisis de estas sustancias [Burdaspal, 1984].

Por otro lado, es necesario considerar las pérdidas económicas derivadas de la aparición de brotes de intoxicación en animales de abasto. Este tipo de pérdidas son muy altas cuando se produce la muerte de un elevado número de animales. No obstante, y dado que los casos de intoxicaciones masivas no son muy frecuentes en la actualidad, hay que tener más en consideración el efecto del consumo reiterado de pequeñas dosis de aflatoxinas por los animales [Burdaspal, 1984]. Esto se traduce, como hemos señalado anteriormente, en una mayor susceptibilidad frente a procesos infecciosos y parasitarios, como son: salmonelosis, brucelosis, listeriosis, coccidiosis, fasciolosis, candidiasis, etc [Panangala y col., 1986; Thurston y col., 1986; Corrier, 1991], pérdidas en la productividad de los animales y retraso en el crecimiento, entre otras consecuencias mucho más difíciles de valorar desde el punto de vista económico [Panangala y col., 1986; Harvey y col., 1989].

I. 1. 6. Importancia sanitaria

Desde el punto de vista sanitario podemos considerar que las aflatoxinas son sin duda las micotoxinas con mayor riesgo potencial para la salud humana [Campbell y Stoloff, 1974].

El contacto del hombre con las aflatoxinas puede provenir tanto del consumo directo de productos agrícolas contaminados (maíz, cacahuetes, etc) como del consumo de productos animales que contengan residuos de aflatoxinas. En este caso los alimentos susceptibles de presentar contaminación varían desde la leche y sus derivados, hasta la carne, hígado o incluso huevos (esto último demostrado experimentalmente), aunque el riesgo real proviene de la ingestión de productos lácteos contaminados. Estudios basados en los conocimientos sobre la tasa de conversión de las aflatoxinas en sus derivados y en los patrones de la dieta de las poblaciones parecen demostrar que el riesgo tóxico por consumo de productos contaminados de origen animal se encuentra en el mismo orden de magnitud o menor que el derivado de la ingestión de productos elaborados a partir de vegetales contaminados con aflatoxinas [Kuiper-Goodman, 1991].

La incidencia de las aflatoxinas en la salud de los animales es más frecuente que en la del hombre debido a que, por el tipo de dieta que consumen, están más expuestos a ellas. No obstante, en determinadas zonas de África y Asia el contacto del hombre con las aflatoxinas es bastante alto, registrándose casos de intoxicación aguda y crónica [Kuiper-Goodman, 1991].

En el hombre, las aflatoxinas han sido incriminadas en la etiología de casos de hepatitis aguda, síndrome de Reye, cirrosis en niños malnutridos y kwashiorkor [Serch-Hansen, 1970; Campbell y Stoloff, 1974; Austwick, 1984; De Vries y col., 1990]. La mayoría de estos procesos afectan principalmente a los niños ya que son mucho más susceptibles que los adultos a los efectos de las aflatoxinas, debido a su menor peso, menor capacidad para la detoxificación, metabolismo más rápido y desarrollo incompleto de diversos tejidos y órganos [Kuiper-Goodman, 1991].

Otro aspecto que debe considerarse es la implicación de las aflatoxinas como agentes de riesgo laboral, principalmente en agricultores, químicos o personal de laboratorio que trabaje con estas sustancias. En este sentido, el conocimiento sobre la presencia de estas sustancias en forma de aerosoles y su posible efecto es aún escaso. Algunos estudios han proporcionado evidencias circunstanciales de la asociación entre la exposición a polvo contaminado con aflatoxinas y el desarrollo de cáncer en el hombre [Deger, 1976; Dvorackova, 1976]. Otras investigaciones han evaluado la cantidad de aflatoxinas presente en la atmósfera y el polvo, en graneros y otros locales donde se almacenaban alimentos, encontrándose niveles superiores a 600 ng/m^3 [Burg y Shotwell, 1984], que suponían la inhalación de 120 ng en una jornada de trabajo de ocho horas [Sorenson, 1990].

Asimismo, en 1983, Wicklow y Shotwell estudiaron la presencia de aflatoxinas en los conidios de cepas de *Aspergillus* productoras de estas toxinas, encontrando niveles de mg/Kg. Estos estudios sugieren la posibilidad de añadir otro factor de riesgo en trabajadores agrícolas que se encuentre en contacto con hongos.

A pesar de la necesidad de realizar más investigaciones sobre el riesgo de exposición a las aflatoxinas en lugares de trabajo, sobre los efectos tóxicos de la inhalación de estas sustancias y sobre la implicación de otros factores en tales efectos, es posible afirmar que existe un riesgo potencial en ciertas profesiones que debe tenerse en cuenta [Sorenson, 1990].

El aspecto más importante y controvertido sobre el riesgo del consumo de aflatoxinas por el hombre es la relación de estas sustancias con el desarrollo de tumores hepáticos [Hsieh, 1989; Stoloff, 1989; Bruce, 1990; Wogan, 1992]. La AF B₁ no fue considerada formalmente como carcinógeno para el hombre por la IARC (International Agency for Research of Cancer) hasta 1987. Los aspectos que debían tenerse en cuenta para decidir la inclusión de la AF B₁ dentro del grupo de sustancias consideradas como carcinógenos humanos eran los siguientes [Hsieh, 1989]:

- Incidencia de las aflatoxinas en alimentos de consumo humano.
- Grado de exposición del hombre a las aflatoxinas.
- Correlación entre la ingestión de aflatoxinas y la formación de tumores.
- Reproducibilidad de los efectos en animales.
- Establecimiento de un modelo animal que sirviera para explicar el modo de acción de las aflatoxinas en el hombre.

Como ya hemos mencionado en otros apartados, las aflatoxinas y fundamentalmente la AF B₁ son carcinógenos potentes en muchas especies animales. No obstante, algunas especies de primates y el ratón son bastante resistentes a la acción carcinogénica de las aflatoxinas, a pesar de que algunos estudios con estos animales han demostrado la aparición de tumores incluso en localizaciones diferentes al hígado: adenocarcinoma de páncreas, osteosarcomas, etc [Hsieh, 1989].

Se han empleado varios modelos animales con la finalidad de extrapolar al hombre el mecanismo de acción de las aflatoxinas comprobado en esos sistemas. Los estudios realizados con primates y concretamente con mono Rhesus han demostrado la producción de AF Q₁ como metabolito mayoritario, siendo también

esta aflatoxina la que se detecta en mayor cantidad en la orina humana [Buchi y col., 1974]. Estos estudios hacen pensar que el modelo experimental con primates puede servir para explicar el mecanismo de acción de las aflatoxinas en el hombre.

Con respecto a la correlación entre la ingestión de aflatoxinas y el desarrollo de tumores hepáticos sólo ha sido posible obtener datos mediante estudios epidemiológicos, a menudo controvertidos, la mayoría realizados en Africa y Asia y en los cuales muchas veces no se han tenido en cuenta otros factores concurrentes [Hsieh, 1989; Stoloff, 1989; Bruce, 1990]. El principal factor de confusión, que permanece hasta la actualidad, es la elevada prevalencia del virus de la hepatitis B (VHB) en las zonas de mayor incidencia en la aparición de tumores hepáticos. A partir de las primeras investigaciones algunos autores atribuyeron a las aflatoxinas el papel principal en el desarrollo del cáncer, mientras que otros establecieron como agente etiológico primario al VHB.

Los argumentos a favor de las aflatoxinas como agentes etiológicos primarios en el cáncer hepático se basan en varios estudios realizados en Africa y Asia en los años setenta, en los que se comprobó una relación entre la presencia de aflatoxinas en la dieta y el desarrollo de tumores hepáticos [Bruce, 1990]. En este sentido, el establecimiento de programas de control sobre las aflatoxinas en algunos países africanos ha hecho decrecer significativamente la aparición de cáncer hepático [Bijlsma, 1981; Harington y col., 1983; Hsieh, 1989].

Por otro lado, varios autores han cuestionado la validez de los estudios epidemiológicos anteriores debido a que en ellos no se tenía en cuenta la alta prevalencia del VHB en las zonas geográficas estudiadas, además de ser muy difícil calcular el grado de exposición del hombre a las aflatoxinas [Stoloff, 1989]. Asimismo, investigaciones realizadas en el sudeste de EEUU, donde la tasa de ingestión de aflatoxinas era elevada y la prevalencia del VHB reducida, mostraron una incidencia de tumores hepáticos muy baja, lo que hacía pensar en el VHB como el agente etiológico primario del cáncer hepático [Hsieh, 1989; Stoloff, 1989; Bruce, 1990; Wogan, 1992].

Más recientemente las tesis apuntan a que las aflatoxinas sean un cofactor junto con el VHB en el desarrollo del cáncer primario hepático [Harris y Sun, 1984]. Esta afirmación se basa, entre otros estudios [Peers y col., 1987], en ensayos realizados en China, donde existe una elevada tasa de infección por el VHB y una alta incidencia de tumores hepáticos. No obstante, el mayor número de muertes por cáncer hepático se registra en aquellas zonas del país donde la ingestión de aflatoxinas presenta un nivel alto [Stoloff, 1989; Bruce, 1990; Wogan, 1992]. Asimismo, estudios realizados empleando patos, que son hospedadores naturales de un virus estrechamente relacionado con el VHB de humanos, han demostrado que cuando se les administraba una dieta contaminada con aflatoxinas el número de animales que desarrollaban tumores hepáticos era mayor y el porcentaje de supervivencia a dosis más altas de aflatoxina disminuía sensiblemente [Cova y col., 1990].

Uno de los principales problemas para dilucidar el papel concreto de las aflatoxinas y del VHB en el desarrollo del cáncer primario hepático es la dificultad en determinar la exposición del hombre a las aflatoxinas [Kuiper-Goodman, 1991]. Por este motivo los estudios más recientes, desde finales de los años ochenta, están tratando de analizar la presencia de metabolitos como la AF M₁ y AF Q₁ y conjugados de aflatoxinas, en fluidos humanos (orina y suero), que sirvan para valorar la exposición a las aflatoxinas en el periodo más extenso posible [Frémy y Quillardet, 1985; Autrup y col., 1987; Liu y col., 1990; Sabbioni y col., 1990; Skipper y Tannenbaum, 1990; Sabbioni y Wild, 1991; Kuiper-Goodman, 1991; Wogan, 1992]. Así por ejemplo, el análisis de la presencia de AF B₁ en orina da idea de una exposición muy reciente (24-48 horas), ya que esta toxina en su forma original se excreta muy rápido. En contraste, se ha demostrado que la AF B₁ se une covalentemente a la albúmina mediante enlaces con la molécula de lisina [Okaye y col., 1990]. La vida media de la albúmina es de unos veinte días y esto permite la acumulación de conjugados de forma que se puede tener una idea de la exposición a más largo plazo. El conjugado de la AF B₁ y la albúmina puede evidenciarse en suero sanguíneo, existiendo relación entre los niveles de este conjugado y el que se produce con ADN lo que puede servir como referencia para reflejar el grado de daño hepático [Gan y col., 1988; Wild y col., 1990].

Los sistemas de detección de estos indicadores también se están perfeccionando, empleándose actualmente métodos inmunológicos (ELISA, cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales) y químicos (cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficacia) [Groopman y col., 1985; Liu y col., 1990; Sabbioni y col., 1990; Wild y col., 1990].

La aplicación de marcadores del grado de exposición, como puede ser el conjugado de AF B₁ y albúmina, conjuntamente con el estudio del VHB puede servir para clarificar el papel de cada uno de estos factores en la etiología y la patogenia del cáncer primario hepático [Kuiper-Goodman, 1991].

I. 2. PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

La leche y sus derivados constituyen el principal grupo de alimentos de origen animal susceptibles de contaminación por aflatoxinas. La presencia de estas sustancias en dichos productos puede ser el resultado de dos formas de contaminación [Blanco y col., 1989a; Van Egmond, 1991]:

a. Directa: debida al crecimiento en el producto de hongos aflatoxigénicos y producción de toxinas, siendo el queso el derivado lácteo que con mayor frecuencia presenta este problema. Las aflatoxinas que se detectan mayoritariamente en este tipo de contaminación son: AF B₁, AF G₁, AF B₂ y AF G₂, de entre las cuales la más importante, como hemos mencionado en el apartado anterior de esta introducción, es la AF B₁ [Bullerman, 1981; Blanco y col., 1989a; Van Egmond, 1989b y 1991].

b. Indirecta: derivada del consumo por parte de animales en periodo de lactación de alimentos contaminados con aflatoxinas, lo que da lugar a la aparición en la leche de estos animales de diversos metabolitos tóxicos. Este es principalmente el caso de la contaminación de leche y derivados con AF M₁, pudiendo aparecer, aunque en cantidades mucho menores, AF M₂, AF GM₁, AF GM₂, AFL M₁, AF B₁ y AF M₄ [Blanco y col., 1989a; Van Egmond, 1989b, 1991]. Este último

metabolito fue detectado recientemente en leche [Lafont y col, 1986a], apareciendo junto con la AF M₁ en una proporción del 16% con respecto a ésta [Lafont y col., 1986b]. Estudios posteriores han demostrado que la AF M₁ se produce *in vitro* por cepas de *A. parasiticus* y su toxicidad aguda y crónica parece ser mayor que la de la AF B₁ [Van Egmond, 1989b].

La cantidad de aflatoxina que aparece en los casos de contaminación directa de los alimentos es normalmente muy superior a la resultante de la contaminación indirecta [Blanco, 1986; Blanco y col., 1989a; Kuiper-Goodman, 1991]. No obstante, la contaminación directa no suele representar un problema ya que el crecimiento de hongos aflatoxigénicos en un alimento da lugar en numerosos casos a alteraciones organolépticas del mismo y a su rechazo para el consumo. Sin embargo, no es posible garantizar que la ausencia de hongos aflatoxigénicos en un producto asegure que éste se encuentre libre de aflatoxinas, ya que estas sustancias pueden persistir después de que los hongos hayan desaparecido [Blanco, 1986; Blanco y col., 1989a].

La contaminación indirecta de productos lácteos con AF M₁ representa un problema grave, debido a la alta frecuencia con que se ha detectado en numerosos países y al riesgo potencial de producirse efectos tóxicos crónicos por el consumo reiterado de alimentos contaminados con dosis bajas de esta aflatoxina. Un aspecto muy importante a tener en cuenta es que la leche y sus derivados son productos con un alto nivel de consumo y representan una parte esencial en la elaboración de alimentos infantiles, con el riesgo tóxico que esto conlleva [Van Egmond, 1991].

I. 2. 1. Contaminación indirecta de la leche y productos lácteos con AF M₁

I. 2. 1. 1. Transformación de la AF B₁ en AF M₁: nivel y factores que afectan

Desde el descubrimiento de la AF M₁ se han realizado numerosos estudios para establecer el nivel de conversión de la AF B₁ ingerida en su metabolito

mayoritario en leche. El primer estudio sobre esta transformación data de 1964 y fue realizado por Van der Linde y col., empleando cuatro vacas a las que se administró diariamente 2 Kg de pienso contaminado con AF B₁ a un nivel de 4 mg/Kg, durante 18 días. La AF M₁ se detectó a las 12 horas de la ingestión, representando un valor menor del 1% de la AF B₁ ingerida y desapareciendo tres días después de dejar de administrar la dieta. Después de este estudio se han realizado muchos otros, oscilando los valores de transformación entre el 0'2 y el 3% de la AF B₁ ingerida [Patterson y col., 1980; Tripet y col., 1981a; Blanco, 1986].

No obstante, muchos de estos estudios se han llevado a cabo administrando a los animales niveles de AF B₁ muy superiores a los establecidos como tolerados para alimentación animal y que no suelen presentarse frecuentemente. Asimismo, hay que considerar las diferencias debidas a los distintos límites de detección y recuperación de las técnicas analíticas empleadas por distintos autores para la detección de la AF M₁ [Van Egmond, 1989b, c].

Los límites medios de aflatoxinas admitidos para las raciones de ganado lechero oscilan normalmente entre 10 y 20 µg/Kg [Park y Njapau, 1989; Van Egmond, 1989b]. Son pocas las investigaciones que han ajustado a esos niveles las raciones suministradas a animales con objeto de establecer la conversión de AF B₁ en AF M₁, a pesar de que los resultados serían más representativos del riesgo de contaminación indirecta por esta aflatoxina, sirviendo, asimismo, para poder establecer las medidas legislativas oportunas.

En cualquier caso, la transformación de AF B₁ en AF M₁ depende de varios factores, relacionados con la alimentación (cantidad, características del alimento consumido y nivel de dosis de AF B₁), metabolismo del animal (nivel de producción, fase de la lactación, especie -se sabe que la oveja secreta AF M₁ en menor cantidad que la vaca pero la secreción se inicia antes-, raza, momento del día...) y otros factores (manejo y estación del año) [Blanco, 1986; Blanco y col., 1989a].

I. 2. 1. 2. Estabilidad de la AF M₁ en productos lácteos

Existe un gran número de estudios acerca del efecto sobre la AF M₁ de los procedimientos empleados en la elaboración y conservación de la leche y sus derivados.

Con respecto a los tratamientos térmicos los estudios iniciales mostraron resultados bastante contradictorios, pero en general la mayoría de los autores están de acuerdo en afirmar que el tratamiento térmico de la leche (pasterización o esterilización) no afecta significativamente a la AF M₁ [Kiermeier, 1973; Stoloff, 1980; Wiseman y Marth, 1983a]. Las diferencias observadas en los resultados se han atribuido a la variabilidad en los parámetros analizados, al empleo de distintas técnicas de detección y a la forma de contaminación de las muestras de leche [Yousef y Marth, 1989].

En relación a los procesos de conservación a bajas temperaturas los resultados son todavía más contradictorios. Parece ser que la forma de contaminación de la leche influye decisivamente en los resultados. Así por ejemplo, Kiermeier y Mashaley congelaron a -18 °C durante 6 días leche artificialmente contaminada, obteniendo una disminución del contenido de AF M₁ al 32%. Cuando estos autores emplearon leche contaminada de forma natural la pérdida fue del 2-8% [Kiermeier y Mashaley, 1977]. No obstante, otros estudios han demostrado la estabilidad de la AF M₁ durante el almacenamiento en refrigeración y congelación de varios productos lácteos [Stoloff y col., 1975; Blanco y col., 1988a, 1993].

La estabilidad de la AF M₁ durante la elaboración del yogur ha sido demostrada por numerosos autores, empleando leche contaminada de forma artificial y natural [Wiseman y Marth, 1983b; Frémy y Chu, 1984; Blanco y col., 1993]. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por otros autores que estudiaron el efecto sobre la AF M₁ de condiciones ácidas similares a las producidas durante la elaboración del yogur [Wiseman y Marth, 1983a]. Asimismo, otras experiencias han

puesto de manifiesto la estabilidad de esta sustancia durante la conservación del yogur en refrigeración [Blanco y col., 1993].

Los estudios sobre la influencia de los procesos de elaboración de leche concentrada y en polvo sobre la estabilidad de la AF M₁ han dado lugar a resultados variables. Hay que tener en cuenta dos factores en los estudios realizados con estos productos. En primer lugar, el proceso de eliminación del agua da lugar a una concentración de la AF M₁ en el producto final y en segundo lugar, la concentración simultánea de otras sustancias puede afectar a la estabilidad de la aflatoxina más que el procesado en sí mismo [Yousef y Marth, 1989]. Un estudio llevado a cabo por la Oficina de Referencia Comunitaria (BCR -Community Bureau of Reference), sobre la estabilidad de la AF M₁ en la leche en polvo contaminada de forma natural y preparada como material de referencia, ha demostrado la estabilidad de la aflatoxina en estas muestras, mantenidas en sobres de aluminio envasados al vacío a 20 °C, durante al menos ocho años [Van Egmond y Wagstaffe, 1986].

Con respecto a la elaboración de mantequilla y nata, la mayor solubilidad de las aflatoxinas en la fase acuosa y su unión a la caseína explican que el contenido de AF M₁ se distribuya aproximadamente en un 15% en la fase lipídica (nata) y un 85% en la fase acuosa [Yousef y Marth, 1989]. Asimismo, el contenido de AF M₁ en mantequilla con respecto a la nata de partida para su elaboración se reduce en más de un 50%, tal y como han demostrado varios estudios [Kiermeier y Mashaley, 1977; Wiseman y Marth, 1983b].

En cuanto al efecto de la elaboración de productos lácteos congelados sobre la AF M₁, Wiseman y Marth [1983c] demostraron la estabilidad de esta aflatoxina después de la congelación y durante ocho meses de almacenamiento posterior.

La elaboración del queso influye de forma variable en la estabilidad de la AF M₁, dependiendo los resultados del tipo de queso, forma de contaminación de la leche, proceso de elaboración y técnica de detección empleada [Wiseman y Marth, 1983a; Blanco y col., 1989a; Yousef y Marth, 1989]. En estudios realizados por Blanco y col.

[1988a] sobre queso tipo Manchego no se detectaron pérdidas significativas de AF M₁, comprobándose también la estabilidad de esta aflatoxina durante el proceso de madurado y almacenamiento del queso tanto en refrigeración como en congelación.

Finalmente, la AF M₁ permanece estable durante la elaboración de queso fundido, lo que se puede explicar por la estabilidad térmica de la aflatoxina ya mencionada anteriormente [Bracket y Marth, 1982b].

1. 2. 1. 3. Incidencia de la AF M₁ en leche y productos lácteos

La mayor parte de los estudios realizados sobre la presencia de productos lácteos contaminados con AF M₁ se han llevado a cabo en leche. Las primeras referencias datan de 1963 [Allcroft y Carnaghan, 1963], aunque el primer estudio en el que se señala la aparición de muestras positivas (5/21) con un rango de contaminación de 0'02 a 0'2 µg/l fue el realizado en 1968 por Purchase y Vorster.

Durante los años setenta el país que llevó a cabo mayor número de estudios sobre la incidencia de la AF M₁ en productos lácteos fue la República Federal de Alemania (RFA) [Kiermeier y Mücke, 1972; Kiermeier, 1973; Kiermeier y col., 1977]. Los resultados globales de varios de estos trabajos mostraron porcentajes de muestras positivas que oscilaron entre el 17 y el 75% de las analizadas, con un rango de concentración de AF M₁ entre 0'02 y 2'00 µg/l. Dentro de estos estudios el más completo en cuanto a variedad de productos analizados fue el de Polzhofer en 1977. Este autor comprobó la presencia de AF M₁ en muestras de leche, leche en polvo, yogur, queso fresco, queso curado, queso para fundir y queso tipo Camembert, correspondiendo los rangos de contaminación más bajos a la leche y los más altos al queso curado y a la leche en polvo.

A finales de los años setenta y principio de los ochenta el establecimiento en algunos países de medidas reguladoras sobre el contenido permitido de aflatoxinas en las raciones para ganado lechero supuso una mejoría en cuanto a los

niveles de incidencia de AF M₁ detectados en leche y otros productos lácteos. Uno de los ejemplos lo tenemos en el Reino Unido; en este país, los resultados del programa de seguimiento establecido para el control de la presencia de aflatoxinas durante los años 1977-1979 mostraron unos porcentajes muy elevados de incidencia de AF M₁ en leche (aproximadamente el 75%). Por este motivo, en 1981, se estableció la prohibición en la importación de diversas materias primas para la elaboración de piensos destinados a la alimentación del ganado lechero. El resultado de esta prohibición, reflejado en un trabajo realizado entre 1981 y 1983, fue el descenso en la presencia de AF M₁ en leche al 4% de las muestras analizadas [citado en Jodral, 1977 y Moss, 1992]. Asimismo, la prohibición en Suiza de alimentar al ganado lechero con tortas de cacahuete hizo disminuir considerablemente la aparición de AF M₁ en leche [citado en Blanco y col., 1989a, b]. Un caso semejante se ha dado en Francia, donde a principios de los ochenta se detectaban porcentajes altos de contaminación por AF M₁, lo que motivó que se estableciera un riguroso programa de control cuyos resultados fueron muy positivos [Tripet y col., 1981b].

Otro país que viene llevando a cabo, desde finales de los años setenta, controles continuados sobre la presencia de AF M₁ en leche es Estados Unidos. Varios estados de este país (fundamentalmente los mayores productores de leche) cuentan con planes de control conjuntos entre el gobierno y las industrias, con objeto de reducir los niveles de contaminación por aflatoxinas [GAO, 1991]. En un estudio realizado por Coppedge en 1983 sobre el control de aflatoxinas en Arizona, que abarcaba desde el año 1978 hasta el año de publicación del trabajo, se obtuvo un porcentaje de muestras positivas del 68% en 1978, porcentaje que descendió en años sucesivos hasta el 13% y se incrementó de nuevo en 1983 hasta el 59%. Los niveles de contaminación detectados en todos los años oscilaron entre 0'10 y 2'00 µg/l (superior en algunos casos al límite establecido por la FDA, que se encuentra en 0'50 µg/l [GAO, 1991]). Los resultados recopilados en años posteriores, a partir de los datos proporcionados por diferentes estados, muestran que en 1986 no se encontraron niveles superiores a los permitidos en 182 muestras analizadas. No obstante, la sequía que afectó al mediooeste de Estados Unidos en 1988 originó la aparición de niveles altos de aflatoxinas en cereales (sobre todo maíz) y otros

productos, con el consiguiente aumento en los niveles de AF M₁ en leche, tanto en este país como en algunos países europeos importadores. En este mismo año la FDA encontró niveles de AF M₁ superiores a 0'50 µg/l en el 5 a 8% de las muestras analizadas. Asimismo, los resultados proporcionados por siete estados coincidieron con los anteriores, apareciendo un total de muestras positivas del 7 al 12% de las analizadas [Park y Njapau, 1989; GAO, 1991]. No obstante, los datos publicados en 1991 sobre un muestreo realizado en Georgia durante el año 1989 sobre leche recogida en las granjas, en los tanques de conservación y muestras del producto elaborado, mostraron un porcentaje total de positivos del 0'8%, correspondiendo el mayor número de muestras positivas a la leche recogida directamente en las granjas [GAO, 1991].

La presencia de AF M₁ en productos lácteos en España ha sido muy poco estudiada. Durante los años setenta el estudio más relevante fue realizado por Jodral, quien analizó 1150 muestras de leche de las que 72 resultaron positivas, con un nivel de contaminación mínimo de 0'05 µg/l [Jodral, 1977; Jodral y col. 1984]. En los años ochenta un estudio efectuado en 97 muestras de leche por Burdaspal y col., mostró un porcentaje de positivos del 7'3% y un rango de contaminación entre 0'02 y 0'04 µg/l de AF M₁ [Burdaspal y col., 1983]. Asimismo, Blanco y col. [1988b] efectuaron el análisis de esta aflatoxina en 47 muestras de leche UHT, encontrando un 30% de positivos y un rango de contaminación entre 0'02 y 0'10 µg/l. En cuanto a la aparición de publicaciones más recientes sobre la presencia de AF M₁ en leche en España, un trabajo realizado en 1990 por Macho y col., en el que se analizaron 61 muestras de leche cruda y 33 muestras de leche UHT obtuvo como resultados en el caso de la leche cruda un 85% de muestras positivas con un nivel de contaminación inferior a 0'010 µg/l, un 13% entre 0'010 y 0'025 y un 1'6% entre 0'025 y 0'050 µg/l. En el caso de la leche UHT el 84'8% de las muestras presentaron niveles de contaminación inferiores a 0'010 µg/l y el 4'2% restante se encontraron entre 0'010 y 0'025 µg/l [Macho y col., 1992].

Para evaluar los estudios sobre la incidencia de aflatoxinas en productos lácteos hay que tener en cuenta varios factores. En primer lugar, en muchos casos

se ha observado una marcada diferencia estacional entre los niveles de contaminación, lo cual se explica desde el punto de vista de las pautas de alimentación seguidas para el ganado lechero. En segundo lugar, el límite de detección de las técnicas empleadas influye en el porcentaje de muestras positivas, por lo que a veces es difícil comparar los datos entre varios estudios. También hay que tener en cuenta el tipo de producto analizado, ya que, como hemos comentado anteriormente, en el caso de productos desecados la concentración que sufre la toxina da lugar al aumento en el número de positivos. Finalmente, el establecimiento de medidas de control y la limitación en el nivel permitido de aflatoxinas está influyendo positivamente en el descenso de los niveles de aflatoxinas en leche y productos lácteos, salvo que se presenten circunstancias adversas como la sequía de 1988 en Estados Unidos [Blanco y col., 1989a, GAO, 1991].

I. 2. 2. Contaminación directa por aflatoxinas en productos lácteos

I. 2. 2. 1. Crecimiento de hongos y producción de aflatoxinas

Como ya hemos mencionado anteriormente, la contaminación directa de los productos lácteos por aflatoxinas es el resultado del crecimiento sobre el alimento de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* que son capaces de producir estas sustancias si la composición del producto y las condiciones ambientales son las adecuadas [Blanco y col., 1989a, b; Van Egmond, 1989b].

El producto lácteo más susceptible de padecer este tipo de contaminación por distintas micotoxinas es el queso, debido a que se trata de un alimento que se enmohece fácilmente si no se toman las medidas necesarias durante su elaboración, maduración y conservación hasta su consumo [Bullerman, 1981; Medina y col., 1984; Blanco y col., 1989a, b].

Se han realizado numerosos estudios sobre la flora fúngica capaz de desarrollarse en los distintos tipos de queso. Las especies aisladas con mayor frecuencia pertenecen en su mayor parte al género *Penicillium*. Dentro del género

Aspergillus los aislamientos más habituales corresponden a *A. versicolor*, hongo productor de esterigmatocistina. Afortunadamente, varios estudios han demostrado que el crecimiento de cepas de *A. flavus* en queso es poco frecuente, aislándose cepas de *A. parasiticus* todavía en menos ocasiones [Scott, 1989].

No obstante, hay que tener en cuenta que en algunos de los trabajos sobre la determinación de la flora fúngica del queso el aislamiento de especies del género *Aspergillus* no ha sido acompañado de la investigación sobre la presencia de micotoxinas, incluidas las aflatoxinas. En aquellos casos en que esta determinación se ha efectuado las aflatoxinas detectadas con mayor frecuencia han sido la AF B₁ y la AF B₂ [Bullerman, 1981].

La mayor parte de las investigaciones sobre la contaminación directa del queso con hongos aflatoxigénicos se han llevado a cabo mediante inoculación experimental de cepas productoras en diferentes tipos de queso y empleando condiciones muy variables [Medina y col., 1984; Scott, 1989]. Este tipo de estudios comenzó en 1967 con un trabajo de Lie y Marth en el que se investigaba la producción y difusión de las aflatoxinas en porciones de queso tipo Cheddar inoculadas en su superficie con esporas de *A. flavus* y *A. parasiticus*. A partir de esa fecha los estudios realizados incluyen una gran variedad de tipos de queso, formas de inoculación, niveles de inoculación y condiciones de incubación (temperatura y tiempo). Los resultados de estos trabajos han sido variables, existiendo discrepancias entre los distintos autores sobre la idoneidad del queso como sustrato para el crecimiento de *Aspergillus* y producción de aflatoxinas [Blanco y col., 1989a, b; Scott, 1989].

Con respecto a la determinación de la flora fúngica de otros productos lácteos, varios estudios realizados en yogur han descrito el aislamiento de cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus* aunque, al igual que ocurría en el queso, el género predominante era *Penicillium*. Asimismo, dentro de las especies productoras de aflatoxinas el mayor porcentaje de aislamientos obtenido en estos estudios corresponde a cepas de *A. flavus* [Mateos y Suárez, 1984; Blanco y col., 1989b; Jordano y col.,

1989].

La leche esterilizada homogeneizada y la nata constituyen buenos sustratos para la producción de aflatoxinas, habiendo sido detectadas cantidades superiores a los 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en leche tras nueve días de incubación a 22 °C y cantidades superiores a 500 $\mu\text{g}/\text{g}$ en nata [Jacquet y col., 1970]. Asimismo, diversos autores han demostrado la producción de estas sustancias en leche en polvo, aunque el valor de actividad de agua (a_w) tiene una gran influencia en el crecimiento de hongos y producción de aflatoxinas en este producto. En este sentido, Kiermeier y Behringer, en 1977, empleando leche en polvo inoculada con *A. parasiticus* e incubada durante 14 días a 20 °C detectaron la producción de AF G₁, AF G₂, AF B₁, AF B₂ y AF M₁, aunque la concentración mayor correspondió a la AF G₁.

Con relación a la leche condensada y la mantequilla, el primer producto sólo permite el crecimiento de hongos y la posible formación de aflatoxinas cuando no se encuentra azucarado; por su parte, la mantequilla ha demostrado no ser un sustrato muy adecuado para el crecimiento de *Aspergillus* y, por tanto, la cantidad de aflatoxinas detectada ha sido escasa o nula [Blanco y col., 1989b].

En resumen podemos decir que, en aquéllos productos lácteos en los que es posible el crecimiento fúngico, la incidencia de hongos capaces de producir aflatoxinas es baja y, en cualquier caso, estos hongos constituyen una mínima parte de la flora fúngica total. Dentro de los hongos aflatoxigénicos la mayor incidencia corresponde a las cepas de *A. flavus*, produciéndose principalmente AF B₁, AF B₂ y AF G₁. La producción de aflatoxinas depende de la composición del alimento así como de ciertos factores ambientales que son determinantes. Estos factores son: temperatura, actividad de agua, pH, luz, fenómenos de competencia microbiana y empleo de sustancias antifúngicas [Blanco y col., 1989b].

1. 2. 2. 2. Estabilidad de aflatoxinas distintas a la AF M₁ en leche y productos lácteos

La estabilidad de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en productos lácteos no ha sido estudiada tan ampliamente como en la AF M₁.

Con relación al queso, varios trabajos han puesto de manifiesto la estabilidad de la AF B₁ y de la AF G₁ durante el proceso de elaboración, maduración y almacenamiento de diferentes tipos de queso: Suizo, Gouda, Manchego, etc [Lieu y Bullerman, 1977; Blanco y col., 1988a].

En el caso de la leche los estudios son muy escasos. En 1970, Jacquet y Boutibonnes comprobaron que la AF B₁ y AF G₁ añadidas a leche esterilizada y acidificada con ácido láctico permanecieron estables durante al menos cuatro días.

La estabilidad de las aflatoxinas de los tipos B y G en yogur ha sido investigada por varios autores, obteniendo resultados contradictorios. Las investigaciones realizadas por Megalla y Hafez [1982] sobre la influencia del proceso de elaboración del yogur sobre la AF B₁ describían una marcada disminución de esta aflatoxina, debida a la transformación en AF B_{2a} en condiciones ácidas. Asimismo, Megalla y Mohran [1984] describen la conversión de la AF B₁ a AF B_{2a} y aflatoxicol en leche fermentada con *Streptococcus lactis*. De forma similar, Räsic y col. [1991] han descrito un descenso del 97% en 600 µg/Kg de AF B₁ añadida a la leche antes de la fermentación y un descenso del 90% si el nivel de contaminación era de 1.400 µg/Kg. En contraposición a estos resultados, en un trabajo realizado por Blanco y col. [1993], en el que se contaminaba la leche con una solución de aflatoxinas en bicarbonato sódico elaborando posteriormente yogur, se comprobó la estabilidad de las aflatoxinas B₁, G₁, B₂ y G₂ durante el proceso de elaboración de este producto y posterior almacenamiento a 4 °C durante 21 días.

I. 2. 2. 3. Incidencia de aflatoxinas distintas a la AF M₁ en leche y productos lácteos

A pesar del gran número de investigaciones realizadas en relación a la determinación de la flora fúngica y condiciones de producción de las aflatoxinas por contaminación directa con hongos aflatoxigénicos, se han llevado a cabo pocos estudios sobre la presencia de estas aflatoxinas de forma natural en productos lácteos. Algunos de los trabajos realizados en este sentido se resumen en la Tabla I.3 [Scott, 1989].

Tabla 1.3. Resultados obtenidos en diversos estudios sobre la incidencia de aflatoxinas diferentes a la AF M₁ en productos lácteos [Scott, 1989]. (a: datos sin determinar).

Pais	Muestra	Incidencia	Nivel ^a	Refs.
Francia	Quesos	3(dudoso)/90		Jacquet y col. (1970)
RFA	Quesos	16/222	<10 ng/g	Kiermeier y Böhm (1971)
RFA	Queso Tilsit	1/1	7 ng/g (AF B ₁)	Kiermeier y Behringer (1972)
Francia	Queso Pepper	1 muestra	"Alta" ^a	Jacquet y Teherani (1974)
RFA	Queso	2/115	^a	Kiermeier y Rumpf (1975)
Rumanía	Queso	6/34	^a	Galea y Bara (1976)
EEUU	Queso	1 muestra	^a	Bullerman (1976)
India	Queso	6/26	8-15 ng/g (AF B ₁)	Paul y col. (1976)
Irán	Leche	2/95	^a	Suzangar y col. (1976)
India	Varios productos	2/23	10 y 20 ng/g (AF B ₁)	Paul y col. (1976)
Túnez	Queso	1/248	1 ng/g (AF B ₁)	Boutrif y col. (1977)
RDA	Leche en polvo	1/18	6'4 ng/g (AF B ₁)	Fritz y col. (1977)
Egipto	Queso	79/133	10-50 ng/g	Mahrous y col. (1978)
Checoslovaquia	Leche en polvo	5/5	42-550 ng/g (AF B ₁)	Jesenská y Polánková (1978)
Yugoslavia	Leche	5/105	>2.500 (AF B ₁ princi- palmente)	Sutic y col. (1979)
Francia	Leche en polvo	3'6%	^a	Jacquet y Lafont (1979)
Egipto	Queso Roquefort	2/62	^a	Naguib y col. (1983)
España	Leche	2/1150	0'28-0'36 ng/g (AF B ₁)	Villarejo y col. (1984)
Japón	Varios productos	1/320	680 ng/g (AF B ₁) y 24 ng/g (AF B ₂)	Toya (1985)

I. 2. 3. Legislación sobre los niveles de aflatoxinas en productos lácteos

La protección frente a sustancias peligrosas potencialmente presentes en alimentos es un aspecto muy importante tanto desde el punto de vista sanitario como económico. El conocimiento de los efectos tóxicos, de la incidencia y de las tecnologías aplicables al análisis de las sustancias tóxicas y peligrosas son factores determinantes en el análisis de riesgos y en el establecimiento de medidas reguladoras que se plasman definitivamente en niveles de tolerancia permitidos y en el establecimiento de métodos oficiales de análisis por los diferentes gobiernos [Stoloff y col., 1991].

En el caso de las aflatoxinas como contaminantes de productos lácteos, las medidas reguladoras afectan tanto a estos alimentos como a los destinados al consumo por el ganado lechero [Van Egmond, 1989a; Stoloff y col., 1991].

Las razones para establecer límites en el contenido de AF M₁ en productos lácteos fueron presentadas por la FDA y por las autoridades sanitarias holandesas. Los argumentos propuestos por la FDA estaban basados en la mayor susceptibilidad de los niños a los efectos de las aflatoxinas y en los posibles efectos de la AF M₁ en la salud. El nivel máximo tolerado se determinó a partir de los datos obtenidos durante un periodo de alta tasa de contaminación en maíz, en un área de Estados Unidos donde este producto es bastante vulnerable a la contaminación por hongos aflatoxigénicos. Las razones argumentadas por Holanda se basaban en diferentes estudios experimentales sobre la carcinogenicidad de la AF B₁ y su comparación con la AF M₁ [Stoloff y col., 1991]. En realidad, las bases científicas para establecer unos niveles son reducidas y se sostienen principalmente en la semejanza estructural entre la AF B₁ y la AF M₁ [Van Egmond, 1989a].

Desde 1981 ha habido un marcado aumento en el número de países que tienen establecidos niveles de tolerancia para la AF M₁ en productos lácteos (3 en 1981, 14 en 1987). La mayoría de estos países presentan niveles de tolerancia para distintos productos, siendo más bajos los niveles de aflatoxina permitidos en los

productos destinados a la elaboración de alimentos infantiles. En la mayoría de los casos los límites tolerados se ajustan a los límites de detección de las técnicas analíticas recomendadas (Tabla I.4.) [Van Egmond, 1989a, b; Stoloff y col., 1991].

El segundo aspecto de la legislación sobre niveles permitidos de aflatoxinas, estrechamente relacionado con la aparición de estas sustancias en productos lácteos, es la legislación sobre alimentos destinados al ganado lechero. En la actualidad un total de 35 países cuentan con medidas aprobadas o propuestas. Dentro de ellos, los miembros comunitarios presentan desde 1984 un nivel de tolerancia máximo de AF B₁ en alimentos para ganado lechero de 10 µg/Kg. Por su parte, algunos países de la Comunidad Económica Europea (CEE) tienen niveles de tolerancia específicos para determinados ingredientes en los alimentos destinados al consumo animal [Van Egmond, 1989a, b; Stoloff y col., 1991].

Tabla I.4. Niveles de tolerancia de AF M₁ en productos lácteos [Van Egmond, 1989a, b].

País	Alimento	Tolerancia (µg/Kg)
Argentina	Leche líquida	0'500 (M ₁ +B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)
	Leche en polvo	5'000 (M ₁ +B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)
	Alimentos infantiles basados en leche	0'100
Austria	Cualquier producto lácteo para alimentación infantil	0'010
	Otros tipos de leche y productos lácteos	0'050
	Suero y sus productos	0'025
	Suero en polvo y en pasta	0'400
	Mantequilla	0'020
	Queso	0'250
	Leche en polvo y derivados, leche condensada y derivados	0'400
Bélgica	Leche, leche en polvo y leche condensada (reconstituída)	0'100
Brasil	Leche y derivados del país	0'500
	Leche y productos lácteos importados	0'100
Checoslovaquia	Todos los productos lácteos salvo:	5'000
	Leche	0'500
	Leche para alimentos infantiles	0'100
	Otros alimentos infantiles	1'000
EEUU	Leche entera, desnatada y batida	0'500
Francia	Leche en polvo para alimentos infantiles	0'200
Holanda	Leche y otros productos salvo:	0'050
	Queso	0'200
	Mantequilla	0'020
	Leche en polvo	0'050
	Alimentos infantiles	0'000
Nigeria	Leche líquida	1'000
RFA	Leche	0'050
	Leche para alimentos infantiles	0'010

Tabla I.4 (continuación).

País	Alimento	Tolerancia ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Rumanía	Leche y derivados	0'000
Suecia	Productos de leche líquida	0'050
Suiza	Existente:	
	Leche, leche en polvo, leche condensada, nata y leche batida	0'050
	Leche para alimentos infantiles	0'010 (M_1+B_1)
	Suero y sus productos	0'025
	Mantequilla	0'020
	Queso	0'250
	Propuesta:	
	Alimentos infantiles	0'020
	Leche y sus derivados	0'050
	Queso	0'250
URSS	Leche y derivados	0'500
	Alimentos infantiles	0'000

I. 3. METODOS DE ANALISIS DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

I. 3. 1. Generalidades sobre el análisis de aflatoxinas en alimentos

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas y de sus propiedades tóxicas se han realizado muchas investigaciones sobre el desarrollo de métodos para el análisis de estas sustancias. Estos métodos son necesarios para el establecimiento de programas adecuados de control de alimentos, así como para la investigación sobre aspectos relacionados con las aflatoxinas tales como su producción por los hongos aflatoxigénicos o el metabolismo de estas sustancias en los animales.

Independientemente del método de análisis empleado, la determinación específica del nivel de aflatoxinas en un alimento implica generalmente: la recogida de una muestra representativa, la homogeneización de la misma, la separación de

una cantidad más pequeña a partir de la muestra original y el análisis posterior [Dickens y Whitaker, 1986; GAO, 1991]. El muestreo es un aspecto muy importante a la hora de realizar una valoración de la cantidad de aflatoxinas presente en un alimento ya que puede ser fuente de un alto porcentaje de error. En este sentido, hay que tener en cuenta que la distribución de las aflatoxinas en los alimentos no suele ser homogénea, salvo en el caso de productos líquidos. Además, el nivel de aflatoxinas en un alimento puede variar en función de cuándo se realice el muestreo. También influye el tamaño de la muestra ya que ésta debe ser representativa y suficiente para realizarse el análisis (en el caso de alimentos líquidos suelen precisarse cantidades menores). Asimismo, cuando se trata de cereales, forrajes, etc, la toma de la cantidad definitiva de muestra (muestra analítica) para realizar la determinación puede ser otra fuente de error adicional. Por estos motivos, los procedimientos de muestreo para los diferentes alimentos deben ser diseñados de acuerdo al modo en que se produzca la contaminación con las aflatoxinas y a las características propias del alimento [Horwitz, 1984; Dickens y Whitaker, 1986; Jewers y col., 1989; Hernández y Sanchís, 1990].

Los primeros métodos para la detección de aflatoxinas, empleados incluso antes de conocerse su estructura química, fueron los métodos biológicos. Se han realizado pruebas con la mayoría de los sistemas biológicos [Sargeant y col., 1961]: animales vertebrados [Butler, 1969; Halver, 1969; Cole y col., 1986], artrópodos [Draughon y Childs, 1982; Cole y col., 1986], moluscos [Townsend y Lee, 1967], microorganismos [Yates y Porter, 1982; Tiwari y col., 1985; Cole y col., 1986], plantas [Cole y col., 1986] y cultivos celulares [Buckle y Sanders, 1990; Robb y col., 1990]. Algunos de estos ensayos tienen la ventaja de ser sencillos, rápidos y económicos, aunque su especificidad suele ser baja [Cole y col., 1986]. Hoy en día las pruebas biológicas no suelen emplearse como sistema de detección. Sólo las técnicas basadas en cultivos celulares tienen cierta aplicación en un futuro como métodos de diagnóstico [Buckle y Sanders, 1990]. No obstante, existe un método aprobado por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (Association of Official Analytical Chemists-AOAC), basado en el empleo de embrión de pollo como sistema para la detección de aflatoxinas [Scott, 1990a].

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas (Tabla I. 5.) ha servido para el desarrollo de numerosos métodos químicos de análisis de estas sustancias, siendo en la actualidad los sistemas más empleados. Las características más importantes que deben reunir estos procedimientos para ser considerados como buenos métodos de análisis son: especificidad, sensibilidad, repetitividad, sencillez y posibilidad de automatización [Shotwell, 1986]. Preferiblemente, los métodos empleados en el análisis de aflatoxinas, como sucede con la mayoría de residuos de interés, deben ser validados a través de estudios de colaboración entre varios laboratorios y aprobados por sociedades científicas de reconocido prestigio tales como la AOAC, la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), la AACC (American Association of Cereal Chemistry), etc [Lee, 1989; Stubblefield y Van Egmond, 1989].

Tabla I.5. Propiedades fisicoquímicas de las principales aflatoxinas [Windhloz, 1976].

	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂
Fórmula	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
P. Fusión (°C)	268-269	286-289	244-246	237-240	299	293
Fluorescencia	Azul	Azul	Verde	Verde	Verde-violeta	Violeta
uv máx.	223/25.600	265/11.700	243/11.500	265/9.700	226/23.100	221/20.000
(etanol)/ε	265/13.400	363/23.400	257/9.900	363/21.000	265/11.600	264/10.900
	362/21.800		264/10.00		357/19.000	357/21.000
			362/16.100			

Todos los métodos de análisis pueden encuadrarse dentro de tres categorías: los ensayos presuntivos, los ensayos rápidos de carácter cualitativo o semicuantitativo y finalmente los métodos cuantitativos [Shotwell, 1986]. Desde el punto de vista de los métodos fisicoquímicos los análisis presuntivos suelen aplicarse casi exclusivamente a cereales y frutos secos y se basan en la inspección del alimento directamente mediante luz ultravioleta (UV) [Steiner y col., 1988]. Los métodos rápidos se caracterizan por utilizar extractos semipurificados y se fundamentan en el empleo

de minicolumnas y en la detección mediante observación con luz UV [Velasco, 1972]. Por último, las técnicas cuantitativas suelen requerir un procesamiento complicado, cuyos pasos principales son: extracción, purificación, concentración, separación final, detección y cuantificación [Shotwell, 1986; Stubblefield y Van Egmond, 1989].

Finalmente, un grupo de técnicas que se vienen desarrollando desde los años ochenta para el análisis de aflatoxinas son las técnicas inmunológicas, basadas en los procedimientos de enzimoimmunoanálisis (ELISA) o radioinmunoanálisis (RIA) para la detección y cuantificación. Los estudios en este campo se han centrado en la producción de anticuerpos, preferentemente monoclonales, frente a las aflatoxinas, así como en el establecimiento de protocolos de ELISA y RIA aplicables al análisis de sustratos contaminados de forma natural [Chu, 1986; Pestka, 1988; Frémy y Chu, 1989; Park y col. 1989a, b; Trucksess y col., 1989; Candlish y col., 1990]. Como hemos mencionado anteriormente, existe también un gran interés en llevar a cabo estudios de colaboración para la validación definitiva de alguno de los métodos propuestos [Frémy y Chu, 1989]. Por otra parte, igual que ocurría con los métodos de análisis químico, la necesidad de realizar ensayos rápidos para detectar aflatoxinas ha motivado el desarrollo de sistemas comerciales de detección basados en técnicas inmunológicas, fundamentalmente ELISA.

Por último, se están incorporando a las técnicas de análisis de aflatoxinas varias metodologías que incluyen técnicas químicas e inmunológicas combinadas. Se trata del empleo de columnas de inmunoafinidad para la separación de aflatoxinas, con detección posterior mediante CL u otros procedimientos [Groopman y col., 1985; Groopman y Donahue, 1988; Nahm, 1990; Scott, 1992; Sharman y Gilbert, 1991; Farjam y col., 1992].

I. 3. 2. Métodos de análisis de AF M₁ en leche y productos lácteos

I. 3. 2. 1. Métodos cromatográficos

Las primeras técnicas cromatográficas para el análisis de AF M₁ datan de

1967 y su aplicación estaba destinada normalmente al análisis de leche en polvo [Purchase y Steyn, 1967; Masri y col., 1968; Roberts y Allcroft, 1968]. Hasta 1971, con un trabajo de Jacobson y col., no se estableció el primer método para leche líquida. Este método fue adoptado como método oficial por la AOAC y la IUPAC en 1973, junto con el propuesto por Purchase y Steyn en 1967 para el análisis de leche en polvo [AOAC, 1973; Stubblefield y col., 1973].

Posteriormente, Pons y col. [1973] propusieron un nuevo método, que fue modificado por Stubblefield y Shannon [1974] y que permitía el análisis de AF M₁ en leche, leche en polvo, queso, nata y mantequilla a un nivel de 0'1 µg/Kg. Esta metodología se convirtió en método oficial de la AOAC en 1974 [Scott, 1990a].

En todas las metodologías mencionadas la extracción de la AF M₁ se realiza mediante el empleo de mezclas de solventes orgánicos en forma de extracciones convencionales líquido-líquido. La utilización de este tipo de sistema de extracción presenta como problema principal la formación de precipitados proteicos que arrastran la aflatoxina, por lo que era necesario incluir en las metodologías un paso de desproteización [Stubblefield y Van Egmond, 1989].

El primer método que evitaba el paso anterior de desproteización fue el de Schuller y col. [1973], que consistía en mezclar la muestra de leche con Celite® y empacar el sólido resultante en una columna.

En 1979 Stubblefield realizó una serie de modificaciones del método original, eliminando los pasos de desproteización de las muestras y simplificando considerablemente el proceso. Este método, aprobado en 1980, está aún reconocido oficialmente por la IUPAC, la AOAC y la IDF (International Dairy Federation) [Scott, 1990a]. En este caso la desproteización se evitaba mediante la partición de la leche con cloroformo en un embudo de decantación y la adición de cloruro de sodio para evitar la formación de emulsiones [Stubblefield, 1979]. No obstante, éste era un problema que aparecía con relativa frecuencia, por lo que se desarrollaron otros métodos de extracción basados en el empleo de columnas con matrices de diversa

naturaleza: tierra de diatomeas, gel de sílice y otros preparados comerciales [Gauch y col., 1979; Stubblefield y Van Egmond, 1989]. La metodología de extracción por columna más empleada ha sido la propuesta por Fukayama y col. en 1980, utilizada en muchas ocasiones como alternativa al método de Stubblefield ya que las recuperaciones son equivalentes.

En 1987, Domínguez y col. desarrollaron una técnica de análisis de aflatoxinas en leche y derivados en la que no era necesario el empleo de columnas para la extracción si los niveles de aflatoxina eran superiores a 0'1 µg/Kg. La técnica se basaba en la adición a las muestras de un 1% de bicarbonato sódico y precipitación posterior con solventes orgánicos, realizando la extracción final con cloroformo. La técnica obtenía un 98'2% de recuperación para la leche y el yogur.

A finales de los años setenta, debido a los avances en las técnicas de detección, fundamentalmente el uso de la cromatografía líquida (CL) en el análisis de aflatoxinas, se desarrollaron nuevas metodologías para la extracción de estas sustancias de forma que los análisis se realizaran en menor tiempo [Blanc, 1979; Stubblefield y Van Egmond, 1989]. Con este fin se elaboraron distintos tipos de cartuchos de extracción de un solo uso, fabricados con plástico y rellenos de matrices diversas, de las cuales la más empleada ha sido la matriz de cadenas carbonadas denominada C₁₈. Las ventajas de las metodologías que incluyen la extracción con cartuchos son la rapidez, la eliminación de la formación de emulsiones, su aplicabilidad a productos diferentes y la posibilidad de realizar la extracción a partir de grandes volúmenes de leche. El empleo de cartuchos de octildecilsilano (ODS) o de C₁₈ fue propuesta por Winterlin y col. [1979] y desde entonces ha sido empleada con éxito por numerosos autores en distintas técnicas analíticas [Chang y De Vries, 1983; Ferguson-Foos y Warren, 1984; Takeda, 1984]. Uno de estos procedimientos, aplicable a la extracción de AF M₁ y AF M₂ en leche y que combina el empleo de cartuchos de C₁₈ con columnas de gel de sílice, forma parte de los métodos oficiales de la AOAC desde 1986 [Scott, 1990a].

Debido a la composición de la leche y sus derivados las técnicas analíticas han requerido casi siempre el empleo de procesos de purificación de los extractos con el fin de eliminar sustancias interferentes en la detección y cuantificación.

El problema de la purificación de los extractos se ha abordado con diferentes metodologías. Las técnicas más antiguas emplearon la CCF para purificar los extractos, eluyendo posteriormente la AF M₁ de la fase estacionaria de las cromatoplasas con diferentes solventes. Estos procedimientos dejaron pronto de utilizarse debido a que el rendimiento de estas técnicas era muy bajo y la recuperación de la aflatoxina complicada [Stubblefield y Van Egmond, 1989].

La mayoría de las técnicas mencionadas hasta el momento emplean para la purificación la partición con diversos solventes [Schuller y col., 1973; Stubblefield y Shannon, 1974; Gauch y col., 1979; Beebe y Takahashi, 1980; Kamimura y col., 1985] o la extracción en fase sólida. Esta última metodología puede llevarse a cabo mediante el empleo de cromatografía en columnas con matriz de tierra de diatomeas [Jacobson y col., 1971], florisil [Kamimura y col., 1985], resinas, alúmina [Lafont y col., 1981], celulosa [Pons y col., 1973] y sobre todo gel de sílice [Stubblefield, 1979] o la utilización de cartuchos comerciales [Cohen y col., 1984; Ferguson-Foss y Warren, 1984; Tyczkowska y col., 1984; Bijl y Van Pethegem, 1985], combinando algunas de las técnicas el uso de más de una de estas posibilidades.

Así por ejemplo, en el método de Stubblefield y Shanon [1974] la purificación de los extractos se realizaba en primera instancia mediante el uso de hexano o éter, cloruro sódico y cloroformo, llevando a cabo una purificación posterior en columnas de celulosa. En la metodología modificada posteriormente por el primero de estos autores, lo más característico era el uso de columnas de gel de sílice más pequeñas y la eliminación de la purificación mediante partición con solventes, lo que reducía sustancialmente el tiempo del análisis [Stubblefield, 1979].

En todos los procedimientos basados en el empleo de columnas, cartuchos o combinación de ambos el método de purificación se desarrollaba eluyendo el extracto depositado en la fase sólida con varios solventes o mezclas de éstos y

recuperando finalmente las sustancias de interés con el solvente adecuado.

Debido a la necesidad de desarrollar métodos rápidos, económicos y reproducibles, algunos autores han recomendado el uso de cartuchos comerciales, dado que evitan las variaciones inherentes a la preparación de las columnas en el laboratorio. No obstante, para otros autores la posibilidad de introducir pequeñas variaciones en las columnas durante su preparación era un aspecto positivo en estas técnicas de purificación.

Más recientemente se están investigando dos procedimientos nuevos para la purificación de extractos en el análisis de AF M₁ en leche y sus derivados. Se trata por una parte del empleo de columnas de inmunoafinidad y por otra de la aplicación de diversas técnicas de diálisis de las que hablaremos más detalladamente en el apartado I.4. de esta introducción.

Con relación al uso de columnas de inmunoafinidad, existen varios métodos descritos hasta el momento y su mayor ventaja es la eliminación de gran cantidad de sustancias interferentes debido a la especificidad de los anticuerpos para fijar exclusivamente la AF M₁ a las columnas. El primer trabajo es el de Mortimer y col. [1987], en el que se emplean varios tipos de columnas, obteniendo para la leche un límite de detección de 50 pg/l. Otros trabajos más recientes sobre el uso de columnas de afinidad para la purificación de productos lácteos son el de Sharman y Gilbert [1991], aplicado a muestras de queso y el de Farjam y col. [1992], aplicado a leche y que combina en forma de sistema automatizado el tratamiento mediante columna de inmunoafinidad y un sistema de diálisis. El límite de detección de esta técnica es de 0'01 µg/l, con una recuperación del 6%.

Los últimos pasos en el análisis de aflatoxinas en productos lácteos son los de separación, detección y cuantificación. En la mayoría de los casos es necesario concentrar en mayor o menor medida los extractos purificados para facilitar la detección, en función de la sensibilidad de la técnica utilizada. Los métodos aplicables a la separación final de la AF M₁ y en general de todas las aflatoxinas son

los siguientes:

- Cromatografía en columnas.
- CCF
- CL
- Cromatografía de gases (CG).

La primera de estas técnicas está en desuso como sistema de separación final de las aflatoxinas, siendo las técnicas más empleadas la CCF y, desde los años setenta, la CL. Con respecto a la CG su aplicabilidad para el análisis de AF M₁ es escasa o nula debido a las características fisicoquímicas de esta sustancia [Stubblefield y Van Egmond, 1989].

La CCF fue el primer sistema utilizado para la separación de las aflatoxinas, desde los primeros estudios sobre estas sustancias y todavía la mayoría de los métodos oficiales de la AOAC continúan empleando este sistema [Stubblefield y Van Egmond, 1989; Scott, 1990a].

El desarrollo de técnicas de separación eficaces basadas en CCF ha requerido estudios sobre la elaboración de patrones de aflatoxinas, solventes de desarrollo, tipos de cromatoplasmas, sistemas para el desarrollo de las cromatoplasmas, etc [Nesheim y Trucksess, 1975; Stubblefield y Van Egmond, 1989]. Hasta 1972, cuando se publica un trabajo de Kiermeier y Mücke, todos los técnicas de CCF descritas empleaban desarrollos cromatográficos en forma monodimensional [Purchase y Steyn, 1967; Masri y col., 1968; Roberts y Allcroft, 1968; Jacobson y col., 1971], siendo el sistema bidimensional incorporado a partir de esa fecha en distintas metodologías, con objeto de obtener límites de detección más bajos [Tuinstra y Bronsgeest, 1975; Bijl y Van Pethegem, 1985; Bijl y col., 1987]. No obstante, los dos métodos oficiales de la AOAC basados en la separación mediante CCF emplean el sistema de desarrollo monodimensional.

Otros procedimientos de CCF se han basado en el desarrollo sucesivo con varios solventes [Gauch y col., 1979] o en desarrollos multidimensionales en diferentes posiciones [Tripet y col., 1981a; Bijl y Van Pethegem, 1985; Bijl y col., 1987].

La detección de la AFM₁ a partir de la separación mediante CCF se realiza por comparación de la fluorescencia emitida por esta sustancia bajo luz UV a determinada longitud de onda y por el diferente factor de migración (R_f) que presenta con cada solvente de desarrollo empleado. En muchas metodologías la detección se ha llevado a cabo visualmente, pero en la actualidad el empleo de densitómetros hace posible la detección y cuantificación con una alta sensibilidad y reproducibilidad [Shotwell, 1986].

Con respecto a la eliminación de falsos positivos mediante confirmación de la identidad de la AF M₁ en técnicas de CCF, se han empleado varios sistemas: desarrollo sucesivo con varios solventes [Serralheiro y Quinta, 1986], cromatografía multidimensional [Tripet y col., 1981a] y formación de derivados [Stack y col., 1972], principalmente por reacción con ácido trifluoroacético (ATF) [Trucksess, 1976; Stubblefield, 1987; Stubblefield y col., 1980], una de cuyas variantes está aprobada como método oficial de la AOAC desde 1984 [Van Egmond y col., 1978; Scott, 1990a].

En relación al empleo de la CL para la separación y detección de la AF M₁ su desarrollo ha sido muy amplio desde los años setenta. Todos los métodos tienen en común el empleo de detectores de fluorescencia y, salvo la técnica de Ferguson-Foos y Warren desarrollada en 1984, en la que se emplea CL en fase normal, todas las restantes metodologías se basan en la CL en fase reversa con columnas de matriz C₁₈ (excepto la técnica de Chang y De Vries [1983], que utiliza columnas de matriz C₈). La confirmación de la identidad de la AF M₁ al emplear métodos de CL se ha llevado a cabo mediante CCF, derivatización con ATF o espectrometría de masas [Kiermeier y col., 1978; Nesheim y Bumley, 1981].

I. 3. 2. 2. Métodos inmunológicos para el análisis de AF M₁ en leche y productos lácteos

Los métodos inmunológicos para la detección de aflatoxinas no se desarrollaron hasta finales de los años setenta. Como paso previo para el desarrollo de estos procedimientos ha sido necesaria la preparación de estas sustancias como

inmunógenos, ya que debido a su bajo peso molecular se comportan como haptenos, no siendo capaces por sí solas de inducir la formación de anticuerpos [Frémy y Chu, 1989; Chu, 1986].

El siguiente paso ha sido la producción de anticuerpos [Frémy y Chu, 1989]. En el caso de la AF M₁ hay diversos estudios sobre la producción de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales frente a esta toxina, aunque en la mayoría de los casos son frecuentes las reacciones cruzadas con otras aflatoxinas [Woychik y col., 1984; Kaveri y col., 1987; Dixon-Holland y col., 1988].

Una vez superados estos requisitos se han puesto a punto diversas técnicas de determinación. En este sentido hay trabajos sobre el empleo de RIA y ELISA, siendo esta última metodología y concretamente el ELISA competitivo directo el sistema más difundido [Pestka y col., 1981; Frémy y Chu, 1984; Martlbauer y Terplan, 1985]. Estas técnicas pueden ser aplicadas tanto a leche como a otros productos lácteos, con pasos previos de purificación normalmente basados en el empleo de cartuchos de fase normal o reversa. Los límites de detección para estas técnicas aplicadas a leche oscilan entre 0'005 [Martlbauer y Terplan, 1985] y 0'25 µg/Kg [Pestka y col., 1981], 0'01 µg/Kg en el caso del yogur [Frémy y Chu, 1984] y 0'05 µg/Kg en técnicas aplicadas en queso [Frémy y Chu, 1984].

I. 3. 2. 3. Validación y comparación entre los métodos de análisis de AF M₁ en leche y productos lácteos

Hemos comentado con anterioridad que diversos organismos (AOAC, IDF, IUPAC...) llevan a cabo de forma periódica estudios de colaboración con objeto de validar el empleo de diversos métodos de análisis. Los aspectos que se tienen en cuenta en estos estudios son: sensibilidad, especificidad, límite de detección, reproductibilidad, repetitividad, coste, tiempo de ejecución y sencillez.

La mayor parte de estos estudios se han desarrollado sobre técnicas de CCF y CL, habiendo finalizado en 1992 un estudio de colaboración preliminar propuesto

por la IDF, sobre la determinación de AF M₁ empleando columnas de inmunoafinidad [Scott, 1992]. Existen numerosos estudios de este tipo sobre técnicas de inmunoanálisis en otros productos y en el caso de los productos lácteos hay varios trabajos sobre la comparación entre técnicas cromatográficas e inmunológicas, así como entre varios procedimientos inmunológicos [Frémy y Chu, 1989; Stubblefield y Van Egmond, 1989].

Otro aspecto importante en la validación de métodos son los estudios interlaboratoriales, entre los que destacan por su importancia el Programa de Análisis de AF M₁ de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) [Friesen, 1989] y los métodos de análisis llevados a cabo por la Oficina de Referencia de la Comunidad Europea (BCR), uno de cuyos proyectos más importantes ha sido la elaboración de materiales de referencia (leche en polvo contaminada con AF M₁ de forma natural a distintos niveles) para su empleo en la comprobación de métodos analíticos [Van Egmond y Wagstaffe, 1986, 1988].

I. 3. 3. Métodos de análisis de otras aflatoxinas en leche y productos lácteos

A pesar de la mayor importancia del análisis de la AF M₁ en productos lácteos, se han desarrollado algunas metodologías para la detección de otras aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, y G₂), fundamentalmente en queso. Pocos de estos procedimientos abarcan exclusivamente la detección de esas cuatro aflatoxinas, siendo la mayoría aplicables también al análisis de la AF M₁ [Scott, 1989].

Los pasos de extracción y purificación en los primeros métodos publicados se realizaban mediante partición con solventes orgánicos, llevando a cabo la detección mediante CCF [Scott, 1989].

En 1976, Kiermeier y Weiss publicaron un método rápido para el análisis de las cinco aflatoxinas mencionadas en varios productos lácteos. La extracción se llevaba a cabo con cloroformo añadiendo una solución de ácido sulfosalicílico para romper las emulsiones. La purificación se realizaba con columna cromatográfica de

gel de sílice y la detección mediante CCF y densitometría.

La metodología desarrollada por Domínguez y col. [1987] (ver apartado I.3.2.1.) aplicable a leche, yogur y queso, también permite el análisis de varias aflatoxinas (M_1 y B_1), con unos porcentajes de recuperación elevados.

En 1985, Kamimura y col. pusieron a punto un método basado en la detección mediante cromatografía en capa fina de alta eficacia (CCFAE), aplicable al análisis de las cinco aflatoxinas en queso y otros productos, con un límite de detección de 0'10-0'20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Con el desarrollo de los sistemas de CL también se han propuesto métodos para el análisis de varias aflatoxinas en derivados lácteos. Asimismo, existen algunos trabajos sobre el uso de técnicas inmunológicas para este tipo de análisis [Scott, 1989].

I. 3. 4. Métodos comerciales para el análisis rápido de la AF M_1 sola o en combinación con otras aflatoxinas

Los sistemas comerciales disponibles hasta el momento para el análisis rápido de aflatoxinas en alimentos se basan principalmente en técnicas inmunológicas: ELISA o columnas de inmunoafinidad. Las características de estos sistemas se detallan en la Tabla I.6 [Lee, 1989]. Por otro lado, las minicolumnas de afinidad también se emplean para la purificación de extractos previa a la detección mediante CL, incluyéndose también en la tabla los sistemas comerciales disponibles actualmente para ese fin.

Tabla I.6. Relación de los sistemas comerciales disponibles en la actualidad para el análisis rápido de aflatoxinas en alimentos así como de los métodos comerciales aplicables a la purificación de extractos [Lee, 1989].

Sistema	AF	Tipo de sistema	Nivel de detección	Tiempo	Aplicación
Aflatoxin M ₁ test	M ₁	ELISA micro-titulación	0'01 µg/Kg	40 ^b	Semicuantitativo
AgriScreen	B ₁ , B ₂ , G ₁ , M ₁	ELISA micro-titulación	1 ^a 0'2 AF M ₁ ^a	12 ^b	Visual, instrumental, semicuantitativo, cuantitativo
Aflatoxin M ₁	M ₁	Columna de afinidad	< 0'1 ^a	30 ^b	Visual y semicuantitativo
Aflatest-P	B ₁ , G ₁ , B ₂ , G ₂ , M ₁	Columna de afinidad	2 ^a 0'1 AF M ₁ ^a	7 ^b	Instrumental, semicuantitativo
Aflatest-P	B ₁ , G ₁ , B ₂ , G ₂ , M ₁	Columna de afinidad		5 ^c	Purificación para CL
Easi-Extract M ₁	M ₁	Columna de afinidad		17 ^c	Purificación para CL

^a medido en mg/Kg.

^b medido en min/muestra.

^c tiempo de purificación en min.

I. 3. 5. Métodos empleados para el análisis de aflatoxinas en leche y productos lácteos según las reglamentaciones oficiales

Una de las consecuencias prácticas del desarrollo de métodos de análisis y de los estudios de validación de éstos es la adopción por parte de autoridades nacionales o supranacionales de una determinada metodología como método oficial. En el estudio realizado por Van Egmond en 1989 sobre la situación de la reglamentación acerca de los niveles de aflatoxinas en alimentos en los distintos países, se aprecia que todavía pocos cuentan con métodos oficiales y en otros casos los métodos están en fase de propuesta. En los países que cuentan con metodología oficial ésta se basa en técnicas de CCF o CL, a menudo según los métodos oficiales de la AOAC o modificaciones sobre éstos [Van Egmond, 1989a] (Tabla I.7.)

Tabla I.7. Situación actual sobre los métodos de análisis de aflatoxinas en productos lácteos en diferentes países [Van Egmond, 1989a].

País	Productos	Metodología		
		Carácter	Tipo	Referencia
Argentina	Leche	Oficial	CCF	Stoloff y Scott, 1984
	Leche en polvo	Oficial	CCF	Stoloff y Scott, 1984
	Alimentos infantiles	Propuesto	CCF	Stubblefield, 1979
Austria	Todo tipo de productos lácteos	Oficial	CCF y CL	Grupo de Trabajo, 1985 ^a
Antigua Checoslovaquia	Todo tipo de productos lácteos	Oficial		Métodos de la AOAC publicados en el Acta Hygienica
EEUU	Leche entera, desnatada y leche en polvo	Oficial	CCF y CL	Stoloff y Scott, 1984
Francia	Leche en polvo para alimentos infantiles	Oficial	CCF	Arreté 20/10/85 Journal Officiel de la République Française, 20/11/85
Holanda	Leche, leche en polvo, queso, mantequilla y alimentos infantiles	Propuesto	CCF y CL	Stubblefield, 1979 modificado
Suecia	Productos lácteos líquidos		CL	Métodos Oficiales de la AOAC con modificación para CL según De Vries y Chang, 1882
Suiza	Leche, leche en polvo, crema, leche condensada, mantequilla y queso	Oficial	CCF y CL	Grupo de Trabajo, 1982
Antigua URSS	Leche y otros productos	Oficial		Methodic documents Minszdrav USSR 2273-80 (10/12/80) y 4082-86 (20/03/86)

^a publicación que incluye tres métodos: el de Gauch y col., (1979), el de Steiner y Battaglia, (1983) y el Método del Laboratorio Cantonal de Zurich.

I. 4. TECNICAS DE MEMBRANA PARA LA EXTRACCION Y SEPARACION DE SUSTANCIAS

I. 4. 1. Antecedentes

La tecnología de membranas se viene aplicando en la industria alimentaria y farmacológica desde hace más de tres décadas. Los procesos más empleados son ultrafiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis, microfiltración, etc [Leiva, 1992; Prasad y Sirkar, 1989]. No obstante, la necesidad de encontrar sistemas de extracción y separación de residuos de interés sanitario y ambiental en alimentos, agua, fluidos orgánicos y otros sustratos, ha hecho que se investigue el uso de estas tecnologías en el campo del análisis de residuos tóxicos, incluidas las micotoxinas [Tuinstra y col., 1989, 1990; Aerts y col., 1990].

El fin que se persigue en estos casos es la eliminación de sustancias que interfieran en la posterior detección de los analitos y la concentración de éstos. Por otro lado, con el empleo en varias técnicas desarrolladas recientemente de sistemas de detección sofisticados y de coste elevado (columnas separadoras para CL, precolumnas de inmunoafinidad, etc), se está probando el empleo de sistemas basados en el uso de membranas, que permitan obtener un alto grado de purificación de los extractos, de modo que se asegure el mejor mantenimiento y eficacia de los equipos [Aerts y col., 1990; Farjam y col., 1992].

Dentro de la investigación de los procedimientos de membrana para el análisis de residuos los estudios se han centrado en las técnicas de diálisis, que solventan en gran medida los problemas ocasionados por los procedimientos tradicionales de extracción líquido-líquido.

La extracción líquido-líquido convencional ha formado parte de numerosas metodologías para extraer micotoxinas desde los primeros análisis de estos compuestos. En la extracción líquido-líquido el compuesto de interés tiende a distribuirse rápidamente entre los dos líquidos o solventes puestos en contacto,

según su solubilidad relativa en ambos. Los dos líquidos suelen ser inmiscibles y forman dos fases distintas que pueden ser separadas fácilmente mediante decantación. No obstante, y al encontrarse las dos fases íntimamente unidas, es frecuente la formación de dispersiones de un solvente en el otro, que pueden ser bastante estables y dificultar la recuperación de las sustancias de interés. Otros problemas que se derivan del empleo de esta metodología cuando las muestras son muy complejas (alimentos, fluidos orgánicos, etc), es la formación de precipitados de proteínas o la formación de micelas de lípidos, que pueden interferir en la detección o "secuestrar" los analitos disminuyendo su recuperación [Sirkar, 1990].

El empleo de membranas porosas para la separación de los dos líquidos resuelve en parte estos problemas ya que el contacto entre ambos sólo es posible a través de los poros, con lo cual se reduce la formación de dispersiones. Además, si el tamaño de los poros es el adecuado, se evita la formación de emulsiones lipídicas y precipitados, llegando a establecerse el paso selectivo de sustancias de un lado al otro de la membrana [Sirkar, 1990].

A continuación se describen algunos de los sistemas de membrana propuestos por varios autores para la extracción de diferentes tipos de sustancias.

En 1984, Kiani y col. desarrollaron el empleo de un sistema de extracción con una fase acuosa y otra orgánica separadas por una membrana porosa hidrofóbica de polipropileno. Esta membrana se humedecía previamente con uno de los líquidos, de forma que los poros se rellenaran con el solvente, disponiendo a continuación el otro líquido en la parte opuesta de la membrana. En estas condiciones uno de los dos líquidos, que era considerado como el líquido humectante, tendía a desplazar al otro fluyendo a través de la membrana y creando dispersiones en el otro solvente. Por este motivo, la interfase tenía que ser estabilizada manteniendo una mayor presión en el líquido no humectante, de forma que se creaban dos fases inmóviles a través de las cuales se producía el intercambio de solutos sin formarse dispersiones de un líquido en otro. La mayor influencia en el rendimiento del proceso la ejercía la propia membrana debido a sus característi-

cas geométricas y sus propiedades de porosidad, tortuosidad y espesor. La aplicación de la técnica detallada en este trabajo era la extracción de ácido acético presente en una solución acuosa a otra solución de xileno.

Cussler y col., en 1987, patentaron un aparato para la extracción líquido-líquido mediante separación a través de una membrana porosa, con objeto de mejorar los rendimientos de los sistemas anteriores. En este trabajo se especificaban las características que debían tener las membranas y los solventes empleados en la extracción, de forma que se recomendaba que el solvente que humedeciera la membrana fuera aquél en el que el analito presentase una mayor solubilidad.

Posteriormente, y siguiendo la misma línea de trabajo anterior, Prasad y Sirkar [1989] desarrollaron un sistema difásico para la extracción de ácido mevinolínico a partir de caldos de cultivo de *Aspergillus terreus*, empleando membranas porosas asimétricas formadas por una capa hidrofílica y otra hidrofóbica.

En 1990, Sirkar diseñó un equipo para la extracción industrial de forma automática de varias sustancias de interés farmacológico, basado en el procedimiento anterior. El sistema desarrollado por Sirkar en esta patente pretendía subsanar algunos de los problemas que se planteaban con la metodología descrita por Kiani y col., en 1984. El principal problema era que el proceso anterior requería el empleo de un controlador que asegurara el mantenimiento de la diferencia de presión necesaria durante la diálisis. En la mayoría de los casos esos aparatos eran costosos y daban lugar a pequeñas variaciones de presión que alteraban el proceso de extracción. En la patente de Sirkar de 1990 se proponía el uso de varios tipos de membranas asimétricas (con una cara hidrofílica y otra hidrofóbica), que permitían el mantenimiento estable de la interfase entre los dos líquidos (uno miscible con agua y el otro inmisible), de forma que no era necesario el control de la presión.

Actualmente uno de los aspectos de más interés en el desarrollo de sistemas analíticos es su posibilidad de automatización. En relación a las técnicas de detección uno de los procedimientos más empleados en el análisis de residuos de

interés sanitario y ambiental es la CL. Esta técnica se presta mejor que otras a la adaptación de sistemas de preparación de las muestras totalmente automatizados con las ventajas en la reducción de tiempo y mano de obra que ello supone [Cooper y col., 1988].

En este sentido hay varios trabajos sobre la aplicación de diferentes módulos de diálisis automáticos, combinados con sistemas de CL, para la purificación y concentración de residuos con vistas a la preparación de numerosos tipos de muestras.

Así, Aerts y Beek [1988] desarrollaron un sistema automático, empleando un bloque dializador comercial de flujo continuo, para el análisis de sulfonamidas en carne, huevos y leche. Posteriormente, este grupo de trabajo ha adaptado el mencionado sistema para el análisis de compuestos nitrofuránicos [Aerts y col., 1990].

Con respecto a la aplicación de técnicas de membrana dentro del análisis de micotoxinas las primeras referencias son de 1965, empleándose un proceso de diálisis para la purificación de extractos obtenidos mediante sistemas convencionales de extracción líquido-líquido [Jayaraman y col., 1965]. Roberts y Patterson, en 1975, publicaron un trabajo en el que se incorporaba durante la fase de purificación un procedimiento de diálisis con volúmenes muy reducidos, con el fin de eliminar pigmentos y lípidos de los extractos, para la detección posterior de varias micotoxinas en diferentes alimentos. Posteriormente, en 1981, Howell y Taylor emplearon este mismo sistema de purificación en el desarrollo de una técnica de multiextracción de micotoxinas en piensos. La diálisis se efectuaba a partir del extracto obtenido empleando un cartucho de purificación tipo Sep-Pak® y la detección se realizaba por CCF o CL. Asimismo, Eller y col. [1985] desarrollaron un sistema de pretratamiento de las muestras para el análisis de patulina, mediante adición de ácido ascórbico y dialización posterior.

En el caso de las aflatoxinas, aparte de los trabajos mencionados anteriormente, Patterson y Roberts, en 1975, adaptaron el procedimiento de diálisis para la

purificación de extractos de leche con el fin de detectar AF M₁. Más recientemente, Tuinstra y col. [1989, 1990] han empleado un equipo dializador automático, combinado con un sistema para la concentración de residuos, en la preparación de muestras de leche descremada para el análisis de AF M₁ mediante CL. La aplicación de este sistema presenta las ventajas de no requerir ningún solvente orgánico para la preparación de las muestras de leche y de que el tiempo de realización de los análisis es reducido. El porcentaje de recuperación obtenido por estos autores es del 50% y el límite de detección de 50 ng/Kg.

Otra aplicación de los sistemas de diálisis automáticos aparece en un trabajo de Farjam y col. [1992]. Estos autores han empleado varios sistemas de diálisis en el tratamiento de muestras de leche para el análisis de AF M₁. La finalidad de este proceso de diálisis era purificar las muestras para su paso posterior a través de una columna de inmovinofinidad, de forma que fuera posible conseguir la reutilización de las columnas, que pierden efectividad rápidamente con los procesados normales de las muestras debido a la degradación de los anticuerpos por acción de las enzimas proteolíticas de la leche.

I. 4. 2. Diálisis difásica

I. 4. 2. 1. Fundamento de la técnica

Una de las técnicas más sencillas dentro de los procesos de diálisis para la extracción de residuos de diverso origen es la denominada diálisis difásica (DD), desarrollada y patentada en nuestro laboratorio [Domínguez y col., 1991, 1992].

El proceso se basa en la separación de dos líquidos inmiscibles mediante el empleo de tubos de diálisis elaborados a partir de una membrana semipermeable de celulosa regenerada. En esas condiciones el paso de los analitos de un solvente a otro viene determinado por el coeficiente de partición entre ambos y por la capacidad de atravesar los poros de la membrana. Según esto, a partir de la elección adecuada de los solventes y de la membrana, es posible obtener la recuperación de

los analitos con una gran selectividad [Blanco y col., 1991; Domínguez y col., 1991, 1992].

Los residuos de interés sanitario y medioambiental, donde se incluyen las micotoxinas, son normalmente compuestos que cumplen dos propiedades: poseer un bajo peso molecular y ser más solubles en solventes orgánicos que en soluciones acuosas. A esto hay que añadir que estos compuestos a menudo se encuentran presentes de forma natural en soluciones acuosas, ya sean alimentos (leche, zumos...) o fluidos orgánicos (orina, suero, etc). Por este motivo, las aplicaciones de la DD desarrolladas posteriormente en nuestro laboratorio utilizan como líquido extractante diferentes solventes orgánicos, que se colocan en el interior de los tubos de diálisis. La membrana empleada es resistente a la acción de los solventes y presenta un tamaño de poro pequeño, de forma que se consigue el paso de las sustancias de interés mientras la mayoría de los compuestos interfirientes de alto peso molecular permanecen en la fase acuosa. La ventaja principal que se deriva de la DD es que se trata de un sistema simultáneo de extracción y purificación, que no requiere un control sobre la presión y que en la mayoría de sus aplicaciones permite la detección directa de los analitos en el extracto orgánico sin necesidad de otros pasos de purificación [Blanco y col., 1991; Domínguez y col., 1991, 1992].

Brevemente, podemos describir el procedimiento de DD de la siguiente forma: una vez preparados, los tubos de diálisis se introducen en un matraz que contiene la matriz acuosa con el analito y el conjunto se incuba en agitación orbital con temperatura controlada durante un periodo de tiempo variable. Finalizada la extracción, la fase orgánica contenida dentro del tubo se procesa mediante técnicas convencionales [Blanco y col., 1991; Domínguez y col., 1991, 1992].

Como hemos mencionado en párrafos anteriores, el rendimiento de la extracción mediante DD depende del coeficiente de partición del compuesto en las dos fases, siendo la transferencia (cuando se emplean volúmenes iguales de líquidos) superior al 50% en muchos de los casos. En este sentido, igual que ocurre en los procesos de diálisis convencional, la eficacia de la transferencia puede variar si se modifican los parámetros de realización de la diálisis [Blanco y col., 1991; Domínguez

y col., 1991, 1992].

Según los resultados obtenidos en los diferentes estudios se ha comprobado que la modificación de los parámetros y la determinación de las condiciones óptimas de realización de la técnica varían en función de la sustancia investigada.

Las condiciones básicas para optimizar el sistema son las siguientes: naturaleza del solvente orgánico, relación de volumen entre la fase acuosa y la orgánica, tiempo y temperatura de extracción, pH de las muestras y preparación de las mismas en el caso de tratarse de matrices sólidas [Blanco y col., 1991; Domínguez y col., 1991, 1992].

I. 4. 2. 2. Aplicaciones de la DD

La técnica de DD desarrollada en nuestro laboratorio presenta numerosas aplicaciones, algunas de las cuales se encuentran todavía en fase de experimentación. Las más destacadas son:

- Análisis de patulina en zumos de manzana y alimentos infantiles, con posterior detección mediante CCF o CL de fase reversa [Prieta y col., 1992, 1993; Prieta, 1993].

- Extracción de cloranfenicol en leche con detección por CL de fase reversa [Bayo y col., 1992, 1993].

- Análisis de clenbuterol en orina de bóvido, con detección mediante CCFAE [Cámara y col., 1992].

- Extracción de heptacloro en muestras de agua, con posterior detección mediante CCFAE [Domínguez y col., 1992].

- Análisis de ocratoxina A en trigo, con detección por CCFAE, de esterigmatocistina en zumos de frutas con detección mediante CCF, de avermectina en medios de cultivo microbiológicos (detección por CL de fase reversa) y de hidrocarburos poliaromáticos en agua y suelo (detección por CL de fase reversa). Todas estas aplicaciones se encuentran actualmente en fase de investigación en nuestro laboratorio (resultados no publicados).

I. 4. 2. 3. Ventajas generales de la técnica de DD

En todas las aplicaciones de la técnica de DD desarrolladas hasta el momento ha sido posible comprobar una serie de ventajas frente a los procedimientos alternativos empleados para la extracción de residuos.

En primer lugar podemos destacar que la aplicación de la técnica es muy sencilla, no requiriendo personal especializado. Asimismo, otra ventaja importante es su economía, tanto en material general como en el específico para la realización de la DD. La economía de tiempo en cuanto al periodo de ocupación de los técnicos también es notable. A todo esto hay que sumar que, en los casos en que no se requieren procedimientos añadidos de purificación, la sencillez y reducción en el tiempo del análisis es aún mayor [Domínguez y col., 1991, 1992].

Por último, una ventaja importante desde el punto de vista de la seguridad en el laboratorio y del riesgo de contaminación medioambiental es el poco volumen de solventes orgánicos tóxicos necesario para realizar las extracciones [Domínguez y col., 1991, 1992].

I. 4. 2. 4. Posibilidades futuras de la técnica de DD

Dentro de las posibilidades que encierra el empleo de la DD como técnica analítica se encuentra su adaptación como sistema para la extracción simultánea de varios compuestos distintos en una misma muestra. El desarrollo de sistemas de multiextracción es un aspecto importante del análisis de residuos, debido a que

supone la simplificación de las tecnologías, la reducción de los costes y la posibilidad de obtener de forma unificada información sobre la presencia de grupos de compuestos de interés en un mismo tipo de muestra.

Por otro lado, hemos mencionado con anterioridad la tendencia actual creciente sobre la puesta a punto de metodologías de análisis de forma total o parcialmente automatizadas. Desde este punto de vista la automatización del proceso de DD supondría el paso de un sistema estático a uno de flujo continuo, con el que se podría conseguir la máxima extracción en un periodo de tiempo menor.

Asimismo, y relacionado con el punto anterior, es posible pensar en la aplicabilidad de la DD para la extracción de compuestos de interés industrial, tales como antibióticos a partir de los procesos de fermentación. El empleo de metodologías de este tipo ya ha sido sugerido por otros autores como Prasad y Sirkar en 1989 o Sirkar en 1990.

En resumen, podemos decir que las posibilidades analíticas de la DD son en principio muy extensas, siempre que las sustancias que se analicen sean compuestos de bajo peso molecular y con mayor solubilidad en solventes orgánicos que en soluciones acuosas.

Objetivos

II. 1. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO

El presente trabajo se encuadra dentro de una línea de investigación orientada a la puesta a punto de nuevos métodos de análisis de micotoxinas y otros contaminantes ambientales en alimentos y muestras biológicas.

Las técnicas modernas para el análisis de residuos se caracterizan por su sensibilidad, especificidad, rapidez y posibilidades de automatización, siendo otros aspectos no menos importantes la sencillez de realización, la disminución en el gasto de material y reactivos y la preocupación por reducir la contaminación medioambiental y el contacto del personal de laboratorio con solventes tóxicos.

Asimismo, otro punto de interés es el desarrollo de técnicas analíticas aplicables a sustratos diferentes y a varias micotoxinas u otros residuos simultáneamente, de modo que se pueda obtener información sobre la presencia de estos compuestos empleando la misma metodología, con las ventajas de reducción de tiempo y gastos que esto conlleva.

No obstante, los avances en las técnicas analíticas no han favorecido por igual a todas las fases del proceso, siendo la propia extracción de los residuos en la parte del análisis en la que se han efectuado menos mejoras. En este sentido, aunque existen algunos trabajos recientes sobre el desarrollo de nuevas técnicas aplicables en esta fase del proceso analítico, persiste la necesidad de investigar metodologías de extracción de residuos que se ajusten a las características mencionadas de sencillez, economía y seguridad.

El objetivo de este trabajo es desarrollar una técnica nueva de análisis de aflatoxinas en leche y productos lácteos prestando especial atención a la fase de extracción. Esta técnica se basará en el empleo del sistema de diálisis difásica que se está investigando en nuestro laboratorio y que es aplicable a la extracción de compuestos de bajo peso molecular más solubles en solventes orgánicos que en soluciones acuosas.

Esta técnica se pretende adaptar a cuatro sustratos diferentes: leche, leche en polvo, yogur y queso, con objeto de comprobar su versatilidad.

Por otro lado, y a pesar de que el mayor interés en la contaminación de productos lácteos por aflatoxinas radica en el análisis de la AF M₁, se estudiará también la eficacia de la DD para la extracción simultánea de la AF B₁ y AF G₁ a partir de los mismos productos. De esta forma se pretende preparar la técnica como un sistema multiextracción para evaluar la contaminación tanto de tipo indirecto como directo de estos alimentos por aflatoxinas.

Una vez desarrolladas las distintas técnicas analíticas, los estudios se centrarán en comprobar la validez de la DD para la extracción de AF M₁ en muestras de leche comercial. El propósito de este estudio será también conocer la incidencia de AF M₁ en este producto, ya que los trabajos sobre este tema en España son muy escasos.

Por último, este trabajo se completará con un estudio en el que se empleará leche en polvo contaminada con AF M₁ de forma natural, suministrada por la Oficina de Referencia de la Comunidad Europea (BCR), con objeto de comprobar la eficacia de la metodología de DD desarrollada para la extracción de AF M₁ en este producto lácteo.

En resumen, los objetivos del presente trabajo son:

1. Desarrollo de una nueva técnica de extracción de micotoxinas en alimentos basada en un procedimiento de diálisis como fase de extracción.
2. Aplicación de la técnica para la extracción de AF M₁ de leche, leche en polvo, yogur y queso, con detección posterior mediante un sistema de cromatografía en capa fina.

3. Aplicación de la DD para la extracción de otras aflatoxinas (AF G₁ y AF B₁) de los productos lácteos mencionados.

4. Estudio de la incidencia de AF M₁ en leche comercializada en la Comunidad de Madrid.

5. Empleo de materiales de referencia con objeto de validar la técnica desarrollada para la extracción de AF M₁ de leche en polvo.

Material y Métodos

III. 1. MATERIAL

III. 1. 1. Aflatoxinas

- Patrones. Se emplearon aflatoxinas en forma cristalina suministradas en viales de 1 mg -AF B₁ y AF G₁- y 0'01 mg -AF M₁- (Sigma Chemical).

- Soluciones de trabajo. A partir de los patrones se elaboraron soluciones de cada una de las aflatoxinas a diferentes concentraciones, empleando triclorometano, acetonitrilo y medio de cultivo de hongos de Adye y Mateles [1964] (AM) como solventes.

III. 1. 2. Aparatos de uso general

- Rotavapor tipo VV-1 (Heidolph Selecta).
- Bomba de vacío A-C motor n° 1276 (General Electric).
- Balanza monoplato modelo 126 MP (Sartorius).
- Medidor de pH modelo 414 (Crison).
- Agitador de tubos (Selecta).
- Agitador de vaivén (Heron).
- Secador de cabello (Braun).
- Vitrina de extracción de gases.
- Lámpara de luz UV Camag Standard n° 29200, con luz UV de 366 nm Sylvania FBTS/BLB y de 254 nm S Germicidal GBTS.
- Baño termostático modelo 401 (Univeba).
- Autoclave (Selecta).
- Cámara de incubación a 37 °C.
- Estufas de cultivo a 42° C.
- Arcón congelador de -20 °C.
- Cámara de refrigeración.
- Horno regulable entre 0 y 250 °C (Heraeus).
- Ordenador personal COP 486 (Comelta).
- Ordenador personal Olivetti PCS 386sx.
- Programas informáticos Word Perfect 5.1., Harvard Graphics 3.0. y Endnote.
- Espectrofotómetro Hitachi 150-20 Spectrophotometer, equipado con procesador de datos Hitachi 150-20 Data Processor.
- Homogeneizador de espas (Fediya).

- Agitador incubador con temperatura y agitación orbital ajustables Modelo G25 (New Brunswick Scientific).
- Agitador incubador con temperatura y agitación orbital ajustables Lab-line Orbit Environ-Shaker (Lab-line Instruments).

III. 1. 3. Material de vidrio

- Pipetas Pasteur.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml.
- Probetas de 10, 25, 50, 100 y 250 ml.
- Embudos de decantación cónicos de 250 y 500 ml, con llave de teflón y tapón de polietileno.
- Embudos de vástago corto.
- Matraces Erlenmeyer de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Matraces en forma de pera de 500 ml especiales para rotavapor.
- Tubos de centrifuga cónicos de 10 ml graduados y sin graduar.
- Viales color ámbar de 5 y 10 ml con tapón de rosca.
- Miniviales de 2 ml con tapón de rosca.
- Matraces aforados de 10 y 100 ml de capacidad.
- Frascos de vidrio con tapón de rosca, de distinta capacidad (Pyrex).

III. 1. 4. Reactivos (Grado analítico).

- Triclorometano.
- Diclorometano.
- Acetato de etilo.
- Acetona.
- Metanol.
- Alcohol isopropílico.
- Acetonitrilo.
- Sulfato sódico anhidro.
- Éter etílico.
- Éter dietílico.
- Solución de NaOH 1M.
- Solución de HCl 1N.
- Solución de lejía comercial al 10%.
- Solución de NaHCO₃ al 0'3%.
- Solución de Na₂HPO₄ al 0'3%.

- Solución para la preparación de las muestras de queso [Tuinstra y col., 1989].

Composición:

. $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10'0 g
. ClNa	4'5 g
. NaN_3	1'0 g
. Agua destilada	100'0 ml

III. 1. 5. Medios de cultivo

- Medio AM

Composición:

. Glucosa	50'00 g
. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3'00 g
. KPO_4H_2	10'00 g
. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2'00 g
. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0'70 mg
. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0'50 mg
. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10'00 mg
. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	17'60 mg
. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0'11 mg
. $\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0'30 mg
. Agua destilada	1000'00 ml

Preparación:

Se elaboraban dos soluciones de sales con el fin de evitar la precipitación de algunas de ellas. La primera con los compuestos de hierro y zinc y otra con las sales de boro, molibdeno, manganeso y cobre. Estas soluciones se añadían una vez disueltos el resto de los componentes y en la proporción de 1 ml/l. El medio así preparado se esterilizaba en el autoclave a 110 °C durante 10 min., siendo su pH final de 4'5.

III. 1. 6. Material para diálisis difásica (DD)

- Tubo de diálisis Visking de celulosa regenerada con tamaño de poro 20/32 y un límite de exclusión de 8.000 a 15.000 daltons (Serva). La circunferencia del tubo es de 5 cm y la superficie aproximada por cada 10 cm de longitud es de 50 cm².

III. 1. 7. Material para cromatografía en capa fina de alta eficacia (CCFAE)

- Microjeringa de 50 μ l modelo 700 (Hamilton Bonaduz Schweiz).
- Dispensador repetitivo adaptable a la microjeringa (Hamilton).
- Peine trazador divisor de placas (Applied Science).
- Cromatoplasmas de gel de sílice 60 sin indicador de fluorescencia, de 10 x 10 cm (Merck 5631) y 10 x 20 cm (Merck 5641).
- Bastidor de cromatoplasmas (Desaga).
- Desecador de vidrio con gel de sílice como agente desecante (Desaga).
- Cámaras de desarrollo cromatográfico vertical (Desaga).
- Cámaras de desarrollo cromatográfico lineal para cromatoplasmas de 10 x 10 cm (Camag).
- Aplicador automático para cromatoplasmas Linomat IV (Camag).
- Densitómetro lector de CCF Camag TLC/HPTLC Scanner II, equipado con el programa informático Cats 3 para el procesado de los datos (Camag).

III. 1. 8. Otros materiales

- Tapones de goma para matraces y tubos de centrifuga.
- Micropipetas de 1 ml con puntas desechables (Gilson).
- Tubos de goma adaptados para bomba de vacío.
- Papel parafinado (Parafilm).
- Papel para filtrado rápido de 9 cm de diámetro (Whatman 40, Albet 240 o similares).
- Guantes de goma.
- Tubos de plástico estériles de 3 ml.
- Recipientes de plástico estériles de 100 ml para toma de muestras.
- Vasos de precipitado de diferente capacidad (Pyrex).
- Peras de Richardson y chupetes de goma para llenado de pipetas.
- Soporte de pie para sujeción de embudos de decantación.
- Tijeras.
- Papel de aluminio.
- Cubetas de plástico para espectrofotometría.
- Cartuchos Sep Pak de gel de sílice nº 51900 (Waters).
- Jeringas de 10 ml tipo Luer Lok.

III. 1. 9. Alimentos empleados en los diferentes estudios

- Leche comercial entera (3'3% de grasa bruta), envasada en Tetra Brik® y tratada mediante el sistema UHT.
- Yogur natural comercial envasado en cartón.
- Queso comercial semicurado (40% de grasa bruta) tipo Manchego.
- Leche en polvo comercial (0'3% de grasa bruta).
- Material de referencia: muestras de leche en polvo contaminadas con AF M₁ de forma natural, CRM n° 282, 283, 284 y 285 (BCR).

III. 2. METODOS

III. 2. 1. Precauciones y normas de manejo de las aflatoxinas

Debido a la elevada toxicidad de las aflatoxinas y al riesgo de contaminación que implica su utilización en el laboratorio, es obligado tomar una serie de precauciones en el manejo de estas sustancias. Estas medidas de precaución fueron ya establecidas en los años sesenta con el inicio de los estudios sobre las aflatoxinas y se emplean usualmente en los laboratorios dedicados a su investigación [Fischbach y Campbell, 1965; Stoloff y Trager, 1965; Ciegler y Lillehoj, 1968].

En este sentido, todas las manipulaciones que implicaban el manejo de material contaminado con aflatoxinas, ya fuera la preparación de soluciones de trabajo, contaminación de las muestras de alimentos o manejo de los extractos una vez realizada la técnica de DD, se llevaban a cabo en una cámara de extracción de gases y empleando guantes de goma.

Cualquier material de vidrio que había estado en contacto con las aflatoxinas se sumergía antes de ser lavado en una solución de lejía comercial (5-6% de hipoclorito sódico) al 10%, donde se mantenía al menos durante una hora. Los miniviales y tubos de centrífuga que habían contenido soluciones de aflatoxinas más concentradas se detoxificaban mediante la aplicación de lejía sin diluir en su interior [Natarajan y col., 1975; Yang, 1972].

III. 2. 2. Modo de empleo de las soluciones patrón de aflatoxinas

III. 2. 2. 1. Soluciones de trabajo y condiciones de almacenamiento

Las aflatoxinas comerciales se disolvían en triclorometano (20 ml en el caso de las aflatoxinas B₁ y G₁ y 10 ml para la AF M₁). La concentración de las soluciones obtenidas era de 50 µg/ml para las aflatoxinas B₁ y G₁ y de 1 µg/ml para la solución de AF M₁. Estas soluciones se conservaban en matraces aforados envueltos en papel de aluminio, tapados y sellados con papel parafinado, a temperatura de refrigeración (4 °C) y se empleaban para obtener soluciones de trabajo menos concentradas o en otros solventes.

Las soluciones de trabajo que se utilizaban para la contaminación directa de las muestras de alimentos y como patrón en la detección de las aflatoxinas mediante CCFAE se preparaban a un grado de concentración de 0'50 y 0'05 µg/ml (AF B₁ y AF G₁) y 0'10 µg/ml (AF M₁). En el caso de precisarse soluciones aún menos concentradas se realizaban las diluciones adecuadas de las soluciones de trabajo, que se empleaban en las experiencias que lo requerían y que posteriormente se desechaban. Todas las soluciones de trabajo se mantenían en miniviales color ámbar tapados y sellados con papel parafinado, en congelación a -20 °C.

Las soluciones de aflatoxina en acetonitrilo, empleadas para varias pruebas de contaminación en leche y yogur, se preparaban a partir de las soluciones madre en triclorometano más concentradas, evaporando este solvente mediante una corriente de aire y redisolviendo posteriormente en la cantidad adecuada de acetonitrilo. Estas soluciones se mantenían igualmente en viales color ámbar en congelación a -20 °C.

III. 2. 2. 2. Calibración de las soluciones patrón

La calibración de las soluciones patrón se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en el Método Oficial de Análisis de Aflatoxinas de la AOAC nº 971.22 [Scott, 1990a]. Las condiciones generales para la calibración de las soluciones patrón de cada aflatoxina han sido las siguientes:

- Se tomaban 0'5 ml de la solución patrón de la aflatoxina que se deseaba calibrar y se pasaban a un tubo de centrifuga graduado de 10 ml, donde se evaporaba totalmente el triclorometano mediante una corriente suave de aire.

- El residuo obtenido se redisolvió en 2 ml de metanol absoluto.

- Posteriormente se llevaba a cabo la valoración de la solución mediante espectrofotometría. El valor cero correspondía al metanol absoluto. Seguidamente, se realizaba una valoración de la pureza de la solución mediante la obtención del espectro desde 330 a 370 nm. La valoración de la concentración de aflatoxina se llevaba a cabo por medida de la absorción a la longitud de onda de 350 nm (zona de absorción máxima de las aflatoxinas en solución de metanol absoluto).

- Finalmente, el cálculo de la concentración se hacía resolviendo la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g de aflatoxina/ml} = (A \times \text{PM} \times 1000) / \epsilon$$

Donde:

A = Unidades de absorbancia

PM = Peso molecular de la aflatoxina

ϵ = coeficiente de extinción molar de la aflatoxina en solución de metanol a 350 nm.

Los valores de PM y ϵ para cada aflatoxina son los siguientes [Scott, 1990a]:

Aflatoxina	PM	ϵ
M ₁	328	18.815
G ₁	328	17.100
B ₁	312	19.800

III. 2. 2. 3. Mantenimiento y uso de los patrones

Antes del empleo de las soluciones patrón se esperaba a que éstas alcanzaran la temperatura ambiente.

Con objeto de comprobar las posibles modificaciones en la concentración de los patrones debidas a la evaporación del solvente por el uso o el almacenamiento, se realizó un control que consistía en el pesado de las soluciones de trabajo a temperatura ambiente y en una balanza de precisión, antes de su empleo e inmediatamente después [Scott, 1990a]. Con este sistema se pudo comprobar que la concentración de las soluciones patrón se mantenía prácticamente constante.

Todas las manipulaciones de los patrones de aflatoxinas se realizaban en el menor tiempo posible con la finalidad de evitar la evaporación de los solventes y no se mantenían viales con poca cantidad de solución, debido a su mayor inestabilidad.

Siempre que era necesario preparar soluciones de trabajo a partir de las soluciones iniciales de aflatoxinas se llevaba a cabo la calibración de éstas últimas, comprobando de este modo que la concentración y la pureza de la solución no se había visto alterada.

III. 2. 3. Desarrollo de la técnica de DD aplicada a la extracción de aflatoxinas en leche con detección mediante CCFAE

III. 2. 3. 1. Planteamiento del trabajo

El plan de trabajo ha consistido en la puesta a punto de un método para la extracción de aflatoxinas M_1 , G_1 y B_1 en leche aplicando la técnica de DD desarrollada en nuestro laboratorio, con detección posterior mediante CCFAE.

El estudio realizado en esta tesis doctoral se ha basado originalmente en algunas experiencias preliminares realizadas en nuestro laboratorio, que han servido para el establecimiento de una pauta inicial en la puesta a punto de la técnica de DD para el análisis de leche y productos lácteos. Estos estudios concluyeron en la elección de un tipo determinado de membrana de diálisis, investigando también otros factores como la disposición del solvente de extracción y la muestra con respecto al tubo de diálisis y la diferencia entre el empleo de un solvente de extracción puro o mezclas de varios solventes en distinta proporción, concretamente triclorometano y mezclas de éste con acetona.

Posteriormente se han estudiado otros parámetros de extracción: tiempo de diálisis, influencia del pH de la muestra de leche, empleo de diferentes volúmenes de muestra y temperatura de diálisis, con objeto de encontrar aquellas condiciones en las que se lograsen los porcentajes de recuperación más elevados y los límites de detección y determinación más bajos.

Asimismo, y conforme iban avanzando los estudios desarrollados en nuestro laboratorio en otras aplicaciones de la técnica de DD, se hizo necesario comprobar la posibilidad de emplear otros solventes, con objeto de adecuar la técnica de DD a la extracción simultánea de varios compuestos en una misma muestra.

Por otra parte, se han establecido las condiciones cromatográficas más adecuadas para la detección de las aflatoxinas con el sistema de densitometría con

que cuenta nuestro laboratorio. En este sentido se han investigado diversos solventes de desarrollo y sistemas de desarrollo de las placas de cromatografía, así como la comparación entre la CCF y CCFAE en la separación y posterior detección de las aflatoxinas en estudio.

III. 2. 3. 2. Preparación de las muestras de leche

Todos los estudios iniciales se han llevado a cabo empleando leche entera UHT, correspondiente a un mismo lote de envasado y antes de cumplirse la fecha de caducidad del producto.

Los volúmenes de muestra se medían en probetas graduadas y la leche restante se almacenaba sellada con papel adhesivo a temperatura de 4 °C. La leche procedente de un mismo envase no se empleaba para las experiencias en más de tres días sucesivos, con objeto de evitar cualquier alteración del producto que afectase a los análisis.

En el estudio se han empleado volúmenes de leche de 50, 250 y 1000 ml, que se distribuían en matraces Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad, salvo en el caso del volumen de muestra de 1000 ml, que se disponía en un matraz de 2000 ml.

También se ha investigado la influencia del pH de la leche en la eficacia del método de extracción de las aflatoxinas mediante DD. El pH normal de la leche oscilaba entre 6'5 y 6'8, probándose además valores de 3'7, 4'7, 5'7, 7'7 y 8'7. En estos casos el pH de las muestras de leche se ajustaba empleando soluciones de HCl 1N y NaOH 1M.

La mayoría de las experiencias se han realizado contaminando las muestras con 0'05 µg/l de cada aflatoxina como se describe en los apartados siguientes.

En todas las experiencias se ha incluido la realización de la técnica de DD en una muestra control de leche del mismo lote a la estudiada y sin contaminar

con aflatoxinas.

III. 2. 3. 3. Contaminación de las muestras de leche con solución acuosa de aflatoxinas

La contaminación se efectuaba con una solución acuosa de las aflatoxinas en estudio, empleando como solvente el medio AM y añadiendo con ayuda de una micropipeta directamente a la muestra contenida en el matraz la cantidad de solución necesaria para obtener el nivel de contaminación deseado.

III. 2. 3. 3. 1. Preparación de la solución acuosa de aflatoxinas en medio AM

Esta solución se preparaba contaminando un matraz Erlenmeyer completamente seco con la cantidad adecuada de solución patrón de la aflatoxina y dejando que el triclorometano se evaporase en su totalidad. Posteriormente se añadía al matraz 50 ml de medio AM y se mantenía en agitación a temperatura ambiente por un periodo de 30 min. La solución obtenida de esta forma se distribuía en tubos de plástico para congelación, a razón de 3 ml por tubo.

Estas soluciones se preparaban individualmente para cada aflatoxina y se conservaban en congelación a -80 °C hasta su utilización.

III. 2. 3. 3. 2. Análisis de la concentración de aflatoxinas en la solución de medio AM

A. Extracción de las aflatoxinas de la solución acuosa

La cantidad de aflatoxina presente en la solución acuosa contaminante se calculaba mediante extracción de la toxina con triclorometano.

Esta extracción se efectuaba simultáneamente para las tres aflatoxinas

estudiadas. Para ello, se añadía un volumen de 1 ml de cada solución de medio AM a un matraz Erlenmeyer de 100 ml que contenía 50 ml de triclorometano. La mezcla se mantenía en agitación energética a temperatura ambiente durante un periodo de 30 min.

Una vez transcurrido este tiempo el contenido del matraz se vertía en un embudo de decantación, dejándolo en reposo hasta conseguir la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa se descartaba y la fase orgánica se filtraba a través de un papel de filtro con sulfato sódico anhidro (4 g), con el fin de eliminar restos acuosos.

El filtrado se recogía directamente en un matraz en forma de pera y se concentraba mediante rotavapor hasta un volumen aproximado de 2 ml que se recogía en un tubo de centrifuga de 10 ml. La concentración final se realizaba por medio de una corriente suave de aire y manteniendo los tubos en un baño con agua a 45 °C. El volumen final del extracto se ajustaba a 0'4 ml.

En todos los pasos se añadía al material de vidrio que había contenido aflatoxinas una cantidad adicional de triclorometano, que después se incorporaba al resto del extracto, con el fin de recuperar restos de las toxinas que hubieran podido quedar adsorbidas al vidrio.

B. Separación y detección de las aflatoxinas de la solución acuosa

La separación y detección se llevaba a cabo mediante CCFAE, empleando cromatoplasmas de gel de sílice de 10 x 10 cm sin indicador de fluorescencia. Las condiciones de realización de las cromatografías eran las siguientes:

- División de las cromatoplasmas en 10 franjas de 1 cm de anchura por medio de un peine trazador, de las cuales no se utilizaban las dos externas.

- Activación de las cromatoplasmas a 110 °C durante 30 min.

- Marcado de la situación que habían de ocupar los extractos problema y los patrones, establecida a 1 cm de la base de las cromatoplacas.

- Limitación del recorrido del solvente de desarrollo mediante el marcado con un punzón de una línea situada a 1 cm de la parte superior de la cromatoplaca. Esto significaba que el solvente recorría un espacio de 9 cm.

- Colocación de los volúmenes de muestra y de patrón (ambos por duplicado), mediante aplicación manual con ayuda de una microjeringa de 50 μ l. Los volúmenes de muestra eran de 20 μ l y en el caso de los patrones de aflatoxina de 4 μ l para la AF M₁ (correspondiente a 0'4 ng) y 8 μ l en el caso de las AF B₁ y AF G₁ (correspondientes también a 0'4 ng de toxina). Los volúmenes de patrón correspondientes a cada aflatoxina se disponían conjuntamente en las calles reservadas para ello.

- Desarrollo de las cromatoplacas en cámaras de desarrollo vertical en las que se añadían unos 10 ml del solvente. Para el análisis de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ en extractos de medio AM era posible la utilización de varios de los solventes de desarrollo descritos en la literatura. En nuestro estudio se ha empleado la mezcla cloroformo/metanol en la proporción 95/5 (v/v).

- Empleo del sistema de cámara insaturada, dejando que el frente del solvente alcanzase la altura marcada y retirando en ese momento la cromatoplaca, que se colocaba en una vitrina de extracción de gases hasta estar completamente seca.

La detección de las aflatoxinas presentes en las cromatoplacas se realizaba mediante el empleo de un densitómetro, capaz de medir la intensidad de fluorescencia emitida por las aflatoxinas cuando son excitadas con luz UV a una longitud de onda determinada. En nuestro caso la lectura se efectuaba por un haz de luz UV con una longitud de onda de excitación de 350 nm y colocando el valor cero a 3 mm por debajo del punto de aplicación de los extractos. El resto de los

parámetros de la lectura, tales como la sensibilidad, ajuste de la zona de medida, amplitud del haz de luz UV o amplificación de la señal emitida eran seleccionados de acuerdo a las características de las cromatoplasmas y de los extractos dispuestos en ellas.

La detección se realizaba por comparación entre los valores de R_f de las aflatoxinas dispuestas en las calles patrón y en los extractos problema.

Debido a que no aparecía ningún tipo de sustancia interfiriente en los extractos de medio AM no fue necesario emplear ningún sistema para la confirmación de las aflatoxinas.

C. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en la solución acuosa

La cuantificación de las aflatoxinas se llevó a cabo por densitometría, en las condiciones señaladas en el apartado anterior.

El cálculo de la cantidad de aflatoxinas presentes en las cromatoplasmas se realizaba automáticamente, a partir de la lectura del densitómetro y de los datos sobre la cantidad en ng de aflatoxina patrón dispuesta en la cromatoplasma. La cuantificación se efectuaba por comparación entre las áreas respectivas de la sustancia problema y el patrón correspondiente.

Finalmente, la cantidad total de aflatoxina en la muestra se obtenía resolviendo la siguiente ecuación:

$$\text{ng de AF/ml} = C \times V/V_1,$$

donde: C = cantidad de aflatoxina en ng calculada automáticamente.

V = volumen total del extracto en μl .

V_1 = volumen de extracto depositado en la cromatoplasma en μl .

La calibración de las soluciones en medio AM de aflatoxinas se efectuaba semanalmente, con objeto de comprobar que no existieran variaciones en la

concentración de las mismas.

III. 2. 3. 4. Contaminación de las muestras de leche con solución patrón de aflatoxinas en triclorometano

En las experiencias en las que se ha empleado la contaminación de leche con solución de aflatoxinas en triclorometano, ésta se añadía directamente a la leche con ayuda de una microjeringa y en la cantidad necesaria para obtener el nivel de contaminación deseado, cantidad que nunca excedía de 50 µl para la suma de las tres aflatoxinas. A continuación, la leche contaminada se mantenía en un horno a 60-65 °C durante 15 min con la finalidad de eliminar el triclorometano, esperando a que alcanzase de nuevo la temperatura ambiente para continuar con la extracción.

III. 2. 3. 5. Preparación de los tubos de diálisis

Las membranas de diálisis utilizadas en este estudio se suministran comercialmente en forma de rollos de 30 m. La medida del tubo dependía del volumen de solvente que fuera a contener, siendo la longitud empleada en nuestro estudio de 60 cm para un contenido de solvente de 70 ml.

Una vez cortadas, las membranas se sumergían en agua corriente para su hidratación y facilitar su manejo, lavándolas varias veces por el interior y el exterior para conseguir abrirlas y comprobar su integridad.

Seguidamente se anudaba uno de sus extremos, colocando en el interior del extremo libre el vástago de un embudo de vidrio y rellenando el tubo de diálisis con el volumen de solvente medido previamente en una probeta graduada.

Finalmente, se eliminaba el aire contenido en el tubo y se anudaba el extremo libre restante.

A continuación, el tubo de diálisis se introducía en el matraz que contenía el volumen de leche de forma que existiese la mayor superficie de contacto posible entre el tubo y el líquido.

El rollo de membrana de diálisis se conservaba envuelto en papel de aluminio y a 4 °C, preservándolo de la desecación y de posibles roturas o pérdida de flexibilidad. Este tipo de membranas no debían dejarse secar tras haber sido humedecidas debido a que podían producirse cambios en su porosidad.

A pesar de que las membranas de diálisis utilizadas no requerían ningún tipo especial de preparación, se han realizado algunas pruebas hirviendo las tripas en agua bidestilada durante 30 min, para comprobar si se producía algún efecto en la capacidad de recuperación de las aflatoxinas.

III. 2. 3. 6. Extracción de las aflatoxinas

Los matraces preparados con la muestra y el tubo de diálisis se colocaban en un agitador incubador, realizándose la extracción mediante agitación orbital a 150 rpm.

Se ha estudiado la influencia de la temperatura en el proceso de diálisis, realizando extracciones a 4, 15, 25, 37 y 45 °C.

Asimismo, se ha estudiado la posible influencia del tiempo de diálisis en la capacidad de recuperación de las aflatoxinas, llevando a cabo extracciones de 1, 2, 3, 5, 8 y 18 horas con tres volúmenes distintos de muestra (50, 250 y 1000 ml).

Prácticamente en todos los casos el solvente de extracción utilizado fue triclorometano (70 ml), aunque también se han realizado pruebas con el mismo volumen de acetato de etilo .

Una vez transcurrida la diálisis se retiraba la membrana del matraz,

lavándola con agua corriente y secándola ligeramente con un papel de filtro. A continuación se cortaba uno de sus extremos y el contenido de la membrana se llevaba a un embudo de decantación, dejándolo en reposo hasta producirse la separación de fases. La fase acuosa se descartaba y la fase orgánica (inferior) se filtraba a través de un papel de filtro con aproximadamente 4 g de sulfato sódico anhidro, para eliminar los restos acuosos. El extracto se recogía directamente en un matraz en forma de pera y se procedía a su concentración como se ha descrito en el apartado III.2.3.3.2.A. El volumen final de extracto era de 0'2 ml.

III. 2. 3. 7. Separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos

La separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos de leche se ha realizado mediante CCFAE, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.2.3.3.2.B. en cuanto a las características, preparación de las cromatoplasmas y condiciones de desarrollo.

Los volúmenes de extracto problema y extracto control sin contaminar dispuestos en las cromatoplasmas eran de 20 µl y la cantidad de patrón era de 0'4 ng de cada aflatoxina. Todos los extractos y patrones se colocaban por duplicado, disponiendo siempre dos calles para la colocación de patrones internos, es decir, calles con extracto control sin contaminar sobre el cual se depositaban 0'4 ng de cada aflatoxina.

En nuestro estudio también se han realizado pruebas empleando un aplicador automático para la disposición de los volúmenes de extracto en las cromatoplasmas. Asimismo, se ha probado el uso de un sistema de desarrollo horizontal (Camag).

Las mezclas de compuestos ensayadas como solventes de desarrollo han sido las que se citan a continuación:

- Triclorometano/acetona (85/15) (v/v).

- Triclorometano/metanol (85/15).
- Triclorometano/metanol (95/5).
- Triclorometano/acetona/isopropanol (70/20/10).

La detección de las aflatoxinas se realizaba como se ha descrito en el apartado III.2.3.3.2.B, teniendo en cuenta la localización de las posibles aflatoxinas de los extractos problema en función de la separación obtenida en las calles con patrón interno y comparando con el desarrollo de los extractos control sin contaminar.

III. 2. 3. 8. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en los extractos de leche

La cuantificación de las aflatoxinas se realizó conforme a lo expuesto en el apartado III.2.3.3.2.C, comparando las áreas correspondientes a cada aflatoxina en los extractos problema y en las calles con patrón interno.

III. 2. 3. 9. Cálculo del límite de determinación de la técnica para el análisis de leche

En todos los estudios se ha considerado el límite de determinación como el nivel mínimo de contaminación artificial detectable con la metodología de CCFAE empleada, después de la extracción mediante la técnica de DD.

En el caso de la aplicación de la DD a la extracción de aflatoxinas en muestras de leche, el límite de determinación se ha calculado empleando muestras de leche contaminada con solución acuosa en medio AM (ver apartado III.2.3.3.), a razón de 0'10 µg/l de cada aflatoxina y realizando diferentes diluciones a partir de la leche contaminada, para obtener niveles de contaminación decrecientes.

La extracción se realizaba en las siguientes condiciones: 70 ml de triclorometano como solvente y extracción durante 5 horas a 37 °C con una agitación de

150 rpm. Tanto la extracción como la detección y cuantificación posterior se llevaban a cabo como se ha expuesto en los apartados correspondientes (III.2.3.6-7- y 8)

III. 2. 3. 10. Cálculo del límite de detección de la técnica de DD en muestras de leche

El cálculo del límite de detección se ha realizado siguiendo las indicaciones reflejadas por la Comisión Europea para el análisis de residuos en productos alimenticios [Commission of the European Communities, 1992].

Según lo indicado en este manual, el límite de detección de una técnica para un determinado analito es la cantidad más pequeña del compuesto en estudio capaz de ser detectada y a partir de la cual es posible deducir la presencia del analito con una certeza estadística razonable. Su cálculo se realiza a partir de la aplicación de la técnica sobre veinte muestras representativas en las que el analito no se encuentre presente (blancos). El límite de detección usando este método se expresa como el valor medio de las determinaciones (\bar{x}) más el triple de la desviación estándar (σ).

Para realizar el cálculo del límite de detección se llevaba a cabo la extracción mediante DD de 20 muestras de leche de 50 ml sin contaminar y en las condiciones especificadas en el apartado anterior. Todos los pasos de extracción, detección y cuantificación se han realizado tal y como se ha mencionado en los apartados correspondientes. La metodología de CCFAE empleada en cuanto a las condiciones densitométricas de lectura de las placas, integración de las áreas correspondientes a las aflatoxinas patrón y problema y condiciones de calibración han sido siempre las mismas a las utilizadas en el resto de las experiencias.

Las determinaciones se han hecho tomando como referencia el valor de R_f de las aflatoxinas patrón en el que aparecía el valor máximo de fluorescencia, calculando la medida en las calles con extracto sin contaminar en ese mismo punto.

III. 2. 4. Desarrollo de la técnica de DD aplicada a la extracción de aflatoxinas en leche en polvo con detección mediante CCFAE

III. 2. 4. 1. Planteamiento del trabajo

El plan de trabajo ha consistido en la puesta a punto de un método para la extracción de aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ en leche en polvo aplicando la técnica de DD desarrollada en nuestro laboratorio, con detección posterior por CCFAE.

La adaptación a este producto se ha basado en los resultados obtenidos en las experiencias de extracción de aflatoxinas en leche como punto de partida. No obstante, al tratarse de un producto sólido, las primeras pruebas necesarias han sido para averiguar la cantidad de muestra adecuada para asegurar la detección de las aflatoxinas. Asimismo, la forma de contaminación de las muestras ha tenido que adaptarse a las características del producto al igual que el nivel de contaminación, debido a que los resultados han de referirse a µg/Kg sobre el producto sólido.

III. 2. 4. 2. Preparación de las muestras de leche en polvo

Todos los estudios se han llevado a cabo empleando leche en polvo comercial con un 0'3% de materia grasa y siguiendo las indicaciones del fabricante para su conservación.

En los estudios preliminares se emplearon varias cantidades de leche en polvo: 6'25, 12'50 y 25'00 g, que se disolvían en 50 ml de agua destilada. Para el resto de los estudios se partía de una muestra de 6'25 g, que era la cantidad aproximada recomendada por el fabricante para su disolución en el volumen de agua que se pensaba utilizar (50 ml).

La contaminación de las muestras de leche en polvo se efectuaba directamente sobre el producto, añadiendo con ayuda de una microjeringa la

cantidad necesaria de patrón de cada aflatoxina en triclorometano para alcanzar el nivel de contaminación deseado. A continuación las muestras se introducían en una estufa a 65 °C durante 15 min con objeto de eliminar el solvente.

Una vez transcurrido este tiempo, la muestra de leche en polvo se depositaba en un matraz Erlenmeyer de 1 l con ayuda de un embudo de plástico de vástago ancho, añadiendo sobre ella lentamente 50 ml de agua destilada y agitando a la vez el matraz de forma suave.

En todas las experiencias se ha incluido la realización de la técnica de DD en una muestra control de leche en polvo del mismo lote de la estudiada y sin contaminar con aflatoxinas.

III. 2. 4. 3. Preparación de los tubos de diálisis

La preparación de las membranas de diálisis se ha llevado a cabo conforme a lo reflejado en el apartado II.2.3.5.

III. 2. 4. 4. Extracción de las aflatoxinas

En el presente estudio, y como ya se hizo en el caso de la leche, se ha comprobado la influencia de la temperatura en el proceso de diálisis, realizando extracciones a 4, 15, 25, 37 y 45 °C. Asimismo, se ha investigado la influencia del tiempo de diálisis en la recuperación de las aflatoxinas mediante esta técnica, llevando a cabo extracciones de 5, 8 y 18 horas y con diferentes niveles de contaminación: 0'4, 0'5, 0'8, 1'0 y 1'9 µg/Kg, correspondientes a 2'50, 3'12, 5'00, 6'24 y 11'87 ng de cada aflatoxina.

Con objeto de comprobar el efecto de la adición de la solución de preparación de muestras empleada por Tuinstra y col [1989] en una técnica analítica, se realizaron experiencias comparando la eficacia de la extracción de muestras de leche en polvo disueltas en agua destilada y otras en las que se añadía al agua la

solución preparatoria a razón de 1 ml/10 ml.

Una vez que la diálisis había transcurrido, los pasos siguientes de la extracción se realizaban según lo expresado en el apartado III.2.3.6.. El volumen final del extracto también correspondía a 0'2 ml.

III. 2. 4. 5. Separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos de leche en polvo

La separación y detección de las aflatoxinas se ha realizado mediante CCFAE y siguiendo la metodología descrita en el apartado III.2.3.7. En este caso se ha utilizado como único solvente de desarrollo para la CCFAE la mezcla cloroformo/metanol, 95/5 (v/v).

III. 2. 4. 6. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en los extractos de leche en polvo

El cálculo se ha efectuado como se ha descrito en el apartado III.2.3.8.

III. 2. 4. 7. Cálculo del límite de determinación de la técnica para el análisis de leche en polvo

Para llevar a cabo el cálculo del límite de determinación se han efectuado extracciones empleando muestras de leche en polvo contaminadas con cantidades decrecientes de aflatoxinas, tal y como se ha explicado en el apartado III.2.4.2.

Las condiciones de realización de la diálisis han sido: 70 ml de triclorometano como solvente de extracción, periodo de diálisis de 5 horas, temperatura de 37 °C y agitación a 150 rpm, (para el resto de condiciones ver apartado III.2.3.9.)

III. 2. 4. 8. Cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de aflatoxinas de leche en polvo

El cálculo del límite de detección se ha realizado de igual forma a la descrita en el apartado III.2.3.10.

III. 2. 5. Desarrollo de la técnica de DD aplicada a la extracción de aflatoxinas en yogur con detección mediante CCFAE

III. 2. 5. 1. Planteamiento del trabajo

El plan de trabajo ha consistido en la puesta a punto de una metodología para la extracción de AF M₁, AF G₁ y AF B₁ en yogur aplicando la técnica de DD desarrollada en nuestro laboratorio, con detección posterior por CCFAE.

Los estudios realizados para este producto lácteo se han basado también en los resultados previos obtenidos en la aplicación de la DD para el análisis de aflatoxinas en muestras de leche.

En el caso del yogur se han probado varias formas de contaminación con aflatoxinas, empleando la solución acuosa de aflatoxinas en medio AM y los patrones de aflatoxinas en solventes orgánicos, así como yogur comercial y yogur elaborado en nuestro laboratorio.

III. 2. 5. 2. Preparación de las muestras de yogur

En todas las experiencias se han empleado muestras de 50 g de yogur, que se pesaban directamente sobre el matraz donde se iba a realizar la extracción. En cada ensayo se incluía la realización de la técnica de DD en una muestra control de yogur sin contaminar con aflatoxinas y de las mismas características de las muestras contaminadas.

III. 2. 5. 2. 1. Preparación de las muestras de yogur elaborado en nuestro laboratorio

A. Elaboración del yogur

El yogur era preparado en el laboratorio a partir de leche comercial de las mismas características a la empleada en las experiencias llevadas a cabo con este producto.

Para la elaboración de cada yogur se partía de un volumen de 90 ml de leche. La leche se sometía a un calentamiento previo a 40 °C durante 5 min y una vez transcurrido este tiempo se depositaba en un recipiente de plástico para toma de muestras de 100 ml de capacidad y con tapón de rosca. A continuación se añadían a la leche 4 g de leche en polvo comercial, con la finalidad de incrementar la cantidad total de materia seca del yogur elaborado y 6 g de cultivo iniciador (yogur natural comercial).

La mezcla se removía suavemente con una cuchara y posteriormente se incubaba en una estufa a 45 °C por espacio de 6 a 8 horas, manteniéndose los yogures ya elaborados en refrigeración a 4 °C hasta la realización de las pruebas.

De esta forma se obtenía una cantidad ligeramente superior a 100 g de yogur en cada recipiente, que servía para realizar dos análisis.

B. Contaminación del yogur

La contaminación del yogur con aflatoxinas se efectuaba sobre la leche de partida. En este estudio se han llevado a cabo experiencias contaminando tanto con solución acuosa de medio AM como con las soluciones de aflatoxinas en solventes orgánicos, realizando la contaminación de la leche como se ha expuesto en los apartados III.2.3.3 y III.2.3.4.

En este caso el nivel de contaminación tenía que ajustarse al volumen final del yogur elaborado. En la mayoría de las experiencias se ha añadido a cada recipiente con 90 ml de leche una cantidad bruta de cada aflatoxina correspondiente a 5 ng; teniendo en cuenta la cantidad de leche en polvo y cultivo iniciador agregada posteriormente a la leche, el nivel de contaminación final de cada muestra de yogur correspondía a 0'045 µg/Kg de cada aflatoxina.

II. 2. 5. 2. Preparación de las muestras de yogur comercial

Para los estudios realizados empleando como muestras yogur comercial se han utilizado muestras de 50 g de producto.

La contaminación de estas muestras se realizaba empleando las soluciones de aflatoxinas en solventes orgánicos y añadiendo directamente al yogur, previamente pesado en el matraz, la cantidad necesaria de solución para obtener el nivel de contaminación deseado. En este caso el nivel de contaminación para la mayoría de las experiencias era de 0'050 µg/Kg de cada aflatoxina en estudio.

Una vez añadidas las aflatoxinas las muestras se mantenían en un horno a 60-65 °C durante 15 min con el fin de evaporar el solvente orgánico.

III. 2. 5. 3. Preparación de las membranas de diálisis

La preparación de las membranas ha sido igual a la expuesta en el apartado III.2.3.5.

III. 2. 5. 4. Extracción de las aflatoxinas de las muestras de yogur

Los matraces preparados con la muestra y el tubo de diálisis se colocaban en una agitador incubador, realizándose la extracción mediante agitación orbital a 150 rpm.

Se ha estudiado la influencia de la temperatura en el proceso de diálisis, llevando a cabo extracciones a 15, 25, 37 y 45 °C.

Asimismo, se ha investigado la influencia del tiempo en la capacidad de recuperación de las aflatoxinas, realizando extracciones de 2, 3, 5, 8 y 18 horas de duración.

Una vez transcurrida la diálisis el resto de la metodología de extracción ha sido igual a lo descrito en el apartado III.2.3.6., obteniendo un volumen final de extracto de 0'2 ml.

III. 2. 5. 5. Separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos

La separación y detección de las aflatoxinas se ha realizado mediante CCFAE y siguiendo lo mencionado en el apartado III.2.3.7. Al igual que en el caso de la detección de aflatoxinas en muestras de leche en polvo, el solvente de desarrollo utilizado ha sido la mezcla triclorometano/metanol 95/5 (v/v).

III. 2. 5. 6. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en los extractos de yogur

El cálculo se ha efectuado de igual forma a la descrita en el apartado III.2.3.8.

III. 2. 5. 7. Cálculo del límite de determinación de la técnica para el análisis de yogur

Para llevar a cabo el cálculo del límite de determinación se han efectuado extracciones empleando yogur elaborado en el laboratorio con leche contaminada con solución de aflatoxina en medio AM y realizando a partir de esta leche diferentes diluciones para obtener niveles de contaminación decrecientes.

Las condiciones de realización de la DD han sido: 70 ml de triclorometano como solvente y extracción de 5 horas de duración, a 37 °C y agitación a 150 rpm. El resto de las condiciones para el cálculo del límite de determinación han sido las reflejadas en el apartado III.2.3.9.

III. 2. 5. 8. Cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de aflatoxinas de yogur

Para el cálculo del límite de detección se han empleado muestras de yogur comercial, realizando la determinación conforme a lo que se ha expuesto en el apartado III.2.3.10.

III. 2. 6. Desarrollo de la técnica de DD aplicada a la extracción de aflatoxinas en queso, con detección mediante CCFAE

III. 2. 6. 1. Planteamiento del trabajo

El plan de trabajo ha consistido en la puesta a punto de una metodología para la extracción de aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ en queso aplicando la técnica de DD desarrollada en nuestro laboratorio, con detección posterior por CCFAE.

Estos estudios han tomado como base los resultados obtenidos en las experiencias realizadas con otros productos lácteos, teniendo como variante fundamental la forma de preparación de las muestras de queso.

En el trabajo realizado sobre este producto se ha probado el empleo de diferentes soluciones para conseguir una muestra homogénea, de consistencia semilíquida y que facilitara la extracción posterior de las aflatoxinas.

También se ha investigado el uso de cartuchos tipo Sep Pak® para la purificación de los extractos de queso.

III. 2. 6. 2. Preparación de las muestras de queso

En todas las experiencias se ha utilizado queso comercial, semicurado (40% de grasa bruta), tomando como muestra cantidades de 50 g de producto. El queso restante se conservaba envuelto en papel de aluminio y a temperatura de refrigeración (4 °C).

La contaminación del queso se llevaba a cabo aplicando directamente sobre las muestras la cantidad necesaria de solución de cada aflatoxina en triclorometano para obtener el nivel de contaminación deseado. La aplicación de las soluciones patrón se realizaba con ayuda de una microjeringa, en una vitrina de extracción de gases y dirigiendo hacia la muestra una corriente suave de aire caliente por medio de un secador de cabello. En la mayoría de las experiencias este nivel correspondía a 0'2 µg/Kg de cada aflatoxina.

Como forma de control negativo, en todas las experiencias se ha incluido la aplicación de la técnica de DD sobre una muestra de queso sin contaminar con aflatoxinas.

Después de la contaminación, las muestras de queso se mantenían en un horno a 60-65 °C un periodo de 15 min con objeto de evaporar el solvente y ablandar el producto para facilitar su tratamiento posterior. Seguidamente, las muestras se depositaban en el vaso de acero inoxidable de un homogeneizador de brazo vertical, añadiendo 50 ml de una solución de bicarbonato sódico al 0'3% [Domínguez y col., 1987] y batiendo la mezcla hasta conseguir una pasta uniforme y de consistencia semisólida.

La pasta de queso resultante se vertía en un matraz Erlenmeyer de 1 l y se añadía al vaso una cantidad adicional de 20 ml de solución de bicarbonato. Esta solución se batía de nuevo con el fin de recoger los restos de muestra que pudieran quedar en el vaso. De esta forma se lograba recuperar prácticamente la totalidad de la pasta de queso formada.

Por otro lado, también se han realizado pruebas homogeneizando muestras de queso con una solución de fosfato bisódico tal y como se ha descrito anteriormente.

Asimismo, se han llevado a cabo extracciones añadiendo a la mezcla de queso y solución de bicarbonato la cantidad correspondiente a 1 ml/10 ml de muestra de solución preservadora empleada por Tuinstra y col. [1989]. Con objeto de no variar el volumen final de muestra se añadían en estos casos 5 ml de la solución preservadora y 65 ml de solución de bicarbonato, realizando el tratamiento de la muestra de la forma descrita con anterioridad.

Las soluciones para preparar las muestras de queso se elaboraban en el momento de realizar las pruebas.

III. 2. 6. 3. Preparación de las membranas de diálisis

Ver apartado III.2.3.5.

III. 2. 6. 4. Extracción de las aflatoxinas de las muestras de queso

En este estudio se ha comprobado la influencia de la temperatura en los procesos de diálisis, realizando extracciones a 4, 15, 25, 37 y 45 °C.

De igual forma se ha investigado la influencia del tiempo en la eficacia de la extracción mediante DD, empleando periodos de 1, 2, 3, 5, 8 y 18 horas y un nivel de contaminación de 0'10 µg/Kg de cada aflatoxina.

La extracción se realizaba de forma similar a la indicada en el apartado III.2.3.6., pero los extractos se concentraron a 0'2 ó 0'5 ml según las experiencias.

Asimismo, se ha ensayado un proceso de purificación adicional de los extractos de queso usando cartuchos Sep Pak® de gel de sílice y empleando el

siguiente protocolo [Bijl y col., 1987]:

- Preparación de los eluyentes inmediatamente antes de su uso.
- Colocación del cartucho en una jeringa de vidrio de 10 ml.
- Acondicionamiento del cartucho mediante elución con 5 ml de diclorometano.
- Adición de la muestra en solución de diclorometano (1ml).
- Elución dos veces consecutivas con 1 ml de diclorometano.
- Elución con 5 ml de éter dietílico.
- Elución con 8 ml de la mezcla triclorometano/acetona 4/1 (v/v). Esta fracción se recogía en un tubo de centrifuga y se concentraba hasta 0'5 ml para proceder a la detección.

III. 2. 6. 5. Separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos de queso

La separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos se llevó a cabo como se ha indicado en el apartado III.2.3.7. En este caso se han probado dos mezclas de solventes para el desarrollo de las cromatoplasas:

- triclorometano/metanol 95/5 (v/v).
- triclorometano/metanol 90/10 (v/v).

III. 2. 6. 6. Cuantificación de las aflatoxinas presentes en los extractos

Se ha realizado según la pauta descrita en el apartado III.2.3.8.

III. 2. 6. 7. Cálculo del límite de determinación de la técnica para el análisis del queso

Para realizar el cálculo del límite de determinación se han efectuado extracciones empleando muestras de queso contaminadas con cantidades decrecientes de aflatoxina, tal y como se ha explicado en el apartado III.2.6.2., y utilizando en su preparación 65 ml de solución de bicarbonato sódico al 0'3% y 5 ml de solución preservadora.

Las condiciones de desarrollo de la DD han sido las siguientes: 70 ml de triclorometano como solvente, extracción a temperatura de 37 °C durante 18 horas y con agitación a 150 rpm. El volumen final de extracto correspondía a 0'5 ml. El resto de condiciones han sido las mismas detalladas con anterioridad (ver apartado III.2.3.9.).

III. 2. 6. 8. Cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de aflatoxinas de queso

El cálculo del límite de detección se ha llevado a cabo según lo expuesto en el apartado III.2.3.10., pero teniendo en cuenta que el periodo de diálisis era de 18 horas y el volumen final de cada extracto de 0'5 ml. La preparación de las muestras se realizaba conforme a lo descrito en el apartado anterior.

III. 2. 7. Desarrollo de una técnica de mini-DD aplicada a la extracción de aflatoxina M₁ en muestras de leche

III. 2. 7. 1. Planteamiento del trabajo

La técnica de mini-DD es una variante de la DD normal, que ha sido desarrollada en nuestro laboratorio y que se caracteriza por reducir sustancialmente la cantidad de materiales y solventes empleados en el proceso de diálisis [Prieta, 1993].

El planteamiento de este trabajo ha sido adaptar una técnica de mini-DD a la extracción de aflatoxina M₁ en muestras de leche, con detección posterior mediante CCFAE. Para ello el principal factor estudiado ha sido la influencia del tiempo de diálisis en la capacidad de recuperación de esta aflatoxina.

III. 2. 7. 2. Preparación de las muestras de leche

Para las pruebas de mini-DD se ha empleado leche entera cuyas característi-

cas se han descrito en el apartado III.2.3.1.

En este caso partíamos de un volumen de muestra de 10 ml, que se contaminaba con solución de aflatoxina M_1 en medio AM tal y como se ha indicado en el apartado III.2.3.3., empleando diferentes niveles de contaminación: 0'03, 0'04, 0'05, 0'08 y 0'10 $\mu\text{g/l}$ que correspondían a 0'15, 0'20, 0'25, 0'40 y 0'50 ng de aflatoxina.

Asimismo, se han realizado experiencias contaminando las muestras de leche directamente con solución patrón de AF M_1 en acetonitrilo de forma que la cantidad de AF M_1 presente en las muestras de leche fuera de 0'50 ng (0'08 $\mu\text{g/l}$).

Las muestras se colocaban en un matraz Erlenmeyer de 50 ml de capacidad.

En todas las experiencias se realizaba la extracción simultánea mediante mini-DD de una muestra de leche sin contaminar con aflatoxina.

III. 2. 7. 3. Preparación de las membranas de diálisis

Las membranas se preparaban tal y como se ha referido en el apartado III.2.3.5. En este caso se cortaba la membrana con una longitud de 20 cm y se rellenaba con un volumen de 14 ml de triclorometano.

III. 2. 7. 4. Extracción de la aflatoxina M_1

La extracción se llevaba a cabo a una temperatura de 37 °C y en agitación orbital a 150 rpm. Con respecto al tiempo de duración de la técnica se han ensayado extracciones de 1, 2, 3, 4 y 5 horas, empleando los niveles de contaminación referidos en el apartado anterior.

Una vez transcurrida la diálisis el contenido de las membranas se pasaba directamente a un tubo de centrífuga, filtrándolo previamente a través de una

de filtro con una cantidad aproximada de 2 g de sulfato sódico anhidro.

El extracto resultante se concentraba sin llegar a sequedad, manteniéndolo el tubo en un baño con agua a 45 °C y aplicando en su interior una corriente suave de aire. A continuación se añadía el volumen necesario de triclorometano para alcanzar un volumen final de extracto de 80 µl.

III. 2. 7. 5. Separación y detección de la aflatoxina M₁ en los extractos de leche

La separación y detección de la aflatoxina M₁ se realizaba mediante CCFAE de igual forma a la que se ha expuesto en el apartado III.2.3.7. En este caso se colocaba en cada calle asignada a la muestra un volumen de 20 µl de extracto, reservando otras dos calles para la colocación de patrón interno. La cantidad de AF M₁ patrón dispuesta en cada calle correspondiente era de 0'2 ng.

El solvente de desarrollo empleado ha sido la mezcla triclorometano/metanol 95/5 (v/v).

III. 2. 7. 6. Cuantificación de la AF M₁

Se ha seguido la metodología descrita en el apartado III.2.3.8.

III. 2. 7. 7. Cálculo del límite de determinación de la técnica de mini-DD para el análisis de leche

El límite de determinación se calculó directamente a partir de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de extracción empleando varios niveles de contaminación.

III. 2. 8. Incidencia de aflatoxina M₁ en leche comercial

El trabajo ha consistido en elaborar un estudio de incidencia de AF M₁ a partir de los datos obtenidos en un muestreo de leche comercial realizado sobre un total de 100 muestras.

III. 2. 8. 1. Toma de muestras

Para realizar el muestreo se han adquirido un total de 100 unidades de leche en un mismo centro comercial de Madrid y correspondientes a 11 marcas y lotes diferentes. Ocho de las marcas analizadas correspondían a leche entera UHT envasada en cartón, otras dos marcas correspondían a leche entera pasteurizada (una de ellas procedente de una Granja Diplomada y la otra de una marca con una distribución más amplia), siendo la última marca analizada correspondiente a leche semidesnatada (1,51% de materia grasa), UHT, envasada en cartón y producida fuera de España.

Las muestras se recogieron en un periodo de seis meses comprendido entre enero y junio de 1993, recolectando al azar dos unidades de cada marca y lote. El número total de fases de las que ha constado el muestreo ha sido de seis.

Los análisis se efectuaban en los tres días sucesivos a la adquisición de la leche, conservando la leche restante en refrigeración al menos dos días después de realizar las determinaciones por si era necesario confirmar algún resultado.

III. 2. 8. 2. Análisis de AF M₁

Las muestras se han analizado siguiendo el procedimiento de DD desarrollado para la extracción de aflatoxinas en leche, con detección posterior mediante CCFAE.

Las condiciones de extracción han sido las siguientes: 70 ml de tricloromet-

no como solvente y extracción durante 5 horas a 37 °C con agitación a 150 rpm.

La separación, detección y cuantificación de la AF M₁ se ha llevado a cabo de la forma referida en los apartados III.2.3.5.-6-7 y 8.

III. 2. 9. Empleo de material de referencia para la validación de la técnica de DD desarrollada para la extracción de AF M₁ en leche en polvo

El trabajo ha consistido en la utilización de muestras de leche en polvo contaminadas de forma natural con varios niveles de AF M₁, a partir de las cuales se realizaba la extracción mediante la técnica de DD desarrollada para este producto lácteo.

III. 2. 9. 1. Preparación de las muestras

Los materiales certificados se suministran empaquetados al vacío en sobres de aluminio, con una cantidad de muestra de 25 g y se recomienda que, una vez abiertos, los análisis se efectúen en el menor tiempo posible [Van Egmond y Wagstaffe, 1986].

En nuestro estudio tomábamos una cantidad de leche en polvo contaminada de 6'25 g, que se redisolvió en un volumen de 50 ml de agua destilada (se recomienda que la muestra sea disuelta en un volumen de agua entre 8 y 10 veces la cantidad elegida de leche en polvo), tal y como se ha indicado en el apartado III.2.4.2. Para lograr la solubilización completa de la muestra, el agua destilada se añadía tras ser calentada a 60 °C, vertiéndola lentamente en el matraz que contenía la leche en polvo y agitando éste a la vez de forma suave. La muestra preparada de esta forma se mantenía en reposo durante 15 min con objeto de solubilizar la totalidad de las partículas.

En todos los análisis se efectuaba simultáneamente la extracción de una muestra de leche en polvo comercial sin contaminar, del mismo tipo a la empleada

en el apartado III.2.4.

III. 2. 9. 2. Extracción de la AF M₁ mediante DD

La preparación de los tubos de diálisis se ha realizado conforme a lo expuesto en el apartado III.2.3.5. Las condiciones de extracción mediante DD han sido las siguientes: 70 ml de triclorometano como solvente de extracción, duración de la diálisis 5 horas, temperatura de extracción de 37 °C y con agitación orbital a 150 rpm.

Los pasos siguientes de la metodología de extracción han sido iguales a los señalados en el apartado III.2.3.6., siendo el volumen final de extracto de 0'2 ml.

III. 2. 9. 3. Separación, detección y cuantificación de la AF M₁

Se ha realizado siguiendo la pauta descrita en los apartados III.2.3.6, III.2.4.7 para la separación y detección y III.2.3.8 con respecto a la cuantificación.

III. 2. 9. 4. Pruebas especificadas por la BCR para la validación de técnicas analíticas a partir de materiales de referencia

Para la validación de una técnica mediante el empleo de materiales de referencia es preciso comprobar que la repetitividad del método es comparable a la obtenida en los laboratorios de certificación. Con este objeto, en las instrucciones para el uso de materiales certificados se especifican dos pruebas, a saber [Van Egmond y Wagstaffe, 1986]:

1. Debe verificarse que el error estandar (EE) del valor medio de AF M₁ detectado empleando la técnica en prueba sea menor que la desviación estandar (σ_c) especificada para cada tipo de material certificado.
2. Debe comprobarse si la media de concentración de AF M₁ en $\mu\text{g}/\text{Kg}$,

obtenida con la técnica en prueba y corregida en función del porcentaje de recuperación estimado para la técnica ($\bar{\chi}$), se encuentra en un intervalo cuyos límites son el valor medio de AF M₁ en µg/Kg especificado para cada material $(\bar{\chi}_c) \pm 2 \times \sigma_c$.

III. 2. 10. Tratamiento de los resultados

Con los resultados obtenidos en la detección de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ durante la puesta a punto de los distintos métodos de DD y que se expresan como cantidad bruta recuperada (en ng) o como concentración de AF (en µg/l o µg/Kg) se ha calculado la media aritmética ($\bar{\chi}$), el rango y el coeficiente de variación (CV), con la finalidad de comprobar la repetitividad de los datos.

En el caso concreto de la validación por medio del empleo de materiales de referencia de la técnica desarrollada para la leche en polvo, ha sido necesario expresar los resultados como la media aritmética con los límites del intervalo de incertidumbre (IC) correspondiente a un nivel de confianza del 95%, forma en la que vienen expresados los resultados en las especificaciones de estos materiales. Asimismo, se ha calculado el error estándar (EE) correspondiente al valor medio de AF M₁ obtenido aplicando la técnica de DD a las muestras de material certificado.

Las fórmulas empleadas para el tratamiento de los resultados en este trabajo han sido:

(1) Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n_x}$$

(2) Desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$$

(3) Coeficiente de variación

$$CV(\%) = \frac{100\sigma}{\bar{x}}$$

(4) Error estándar

$$EE = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

Resultados

IV. 1. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN LECHE CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

En primer lugar se mostrarán los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas en el caso del desarrollo de la DD para la extracción de AF M₁ en leche, describiendo posteriormente los resultados obtenidos con respecto a la extracción de las aflatoxinas G₁ y B₁ conjuntamente. No obstante, los resultados obtenidos para el límite de detección de la técnica de DD se muestran conjuntamente para las tres aflatoxinas estudiadas en la Tabla IV.9 (pag. 115), así como las condiciones del método definitivo de análisis (Figura IV.22, pag. 156)

En relación al establecimiento de las condiciones de detección, los estudios preliminares realizados empleando el sistema de CCF, con placas de gel de sílice, desarrollo vertical y las mezclas de solventes: triclorometano/acetona (85/15), triclorometano/acetona/isopropanol (85/10/5), triclorometano/metanol (95/5) y triclorometano/metanol (85/15), no mostraron resultados aceptables en cuanto a la separación de las tres aflatoxinas estudiadas. Por este motivo se llevaron a cabo diferentes pruebas empleando la técnica de CCFAE con placas de gel de sílice. Las experiencias realizadas con sistemas de desarrollo horizontal y las mezclas de solventes anteriores, así como con el empleo de un sistema de aplicación automático de las muestras tampoco ofrecieron resultados positivos, ya que no se conseguía la separación de las aflatoxinas de otras sustancias e incluso había dificultades para lograr la separación de las aflatoxinas G₁ y B₁ entre sí.

En definitiva, las pruebas que mostraron los mejores resultados en la separación de las tres aflatoxinas estudiadas fueron las realizadas empleando CCFAE con un sistema de desarrollo vertical y la mezcla triclorometano/metanol (95/5) como solvente de desarrollo. Con este sistema no se presentaron interferencias con ninguna otra sustancia presente en las cromatoplacas, considerándose por ello como sistema de elección para la separación y detección de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ en extractos de leche obtenidos mediante DD. La Figura IV.8 (pag. 116)

presenta algunos cromatogramas obtenidos a partir de extractos de leche aplicando este sistema.

Con respecto a la influencia del tratamiento previo de preparación de las membranas de diálisis en la eficacia de recuperación de las aflatoxinas, las pruebas realizadas comparando el uso de membranas hidratadas por inmersión en agua durante 15 min y membranas a las que se sometió a un tratamiento de ebullición en agua bidestilada durante 30 min, no dieron lugar a diferencias significativas, obteniéndose los mismos porcentajes de recuperación en el caso de las aflatoxinas G₁ y B₁ -75% y 50% respectivamente-. En relación a la AF M₁ el porcentaje de recuperación con membranas no sometidas al tratamiento fue ligeramente superior -74% con membranas no tratadas y 65% con membranas tratadas-.

Experiencias preliminares realizadas en nuestro laboratorio sobre la disposición del solvente orgánico y la muestra con respecto a la membrana de diálisis mostraron los mejores resultados cuando el solvente se colocaba en el interior de las membranas, por lo que las pruebas para el desarrollo de la técnica de DD se han realizado utilizando esta disposición. Asimismo, también se comprobó que los resultados eran mejores cuando se empleaba como solvente de extracción un único compuesto (triclorometano) que mezclas de solventes.

Todas las pruebas realizadas para comprobar el efecto de diferentes parámetros en la eficacia de recuperación de las aflatoxinas mediante DD se han llevado a cabo empleando para la contaminación de las muestras solución de cada aflatoxina en medio AM. Asimismo, se ha utilizado como solvente de extracción triclorometano (70 ml) y la velocidad de agitación ha sido 150 rpm en todos los casos.

IV. 1. 1. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF M₁

En la Figura IV.1 se muestran los resultados de las experiencias realizadas para comprobar la influencia del tiempo de extracción en diferentes volúmenes de

leche contaminados con una concentración de AF M₁ de 0'050 µg/l. Los mejores resultados se obtuvieron con un periodo de DD de 5 horas en el caso de volúmenes de muestra de 50 ml, siendo este tiempo de 18 horas para volúmenes de 250 y 1000 ml de leche.

El siguiente parámetro estudiado fue la temperatura de DD. Los resultados se muestran en la Figura IV.2, donde se aprecia que el porcentaje de recuperación más alto (79'3%) se consiguió a 37 °C, empleando muestras de 50 ml de leche y 5 horas de extracción.

El efecto del valor de pH de la muestra de leche en el porcentaje de recuperación de AF M₁ mediante DD se representa en la Figura IV.3. El valor de pH más adecuado para la realización de la técnica resultó ser el valor normal del producto (entre 6'5 y 6'7) con el que se consiguió una recuperación media del 96%.

La Tabla IV.1 muestra los resultados obtenidos empleando las condiciones más adecuadas para la realización de la DD (37 °C, pH normal de la leche y 5 horas de extracción) en muestras de 50 ml de leche contaminadas con 0'050 y 0'100 µg/l de AF M₁. En el primer caso el porcentaje de recuperación medio obtenido es del 96'3% y en el segundo caso del 88'5%.

También se realizaron pruebas empleando en la contaminación de la leche solución de AF M₁ en acetonitrilo para obtener distintos niveles de contaminación. Los resultados aparecen en la Tabla IV.2 donde se aprecia que los porcentajes de recuperación obtenidos para los niveles de contaminación de 0'050 y 0'100 µg/l son inferiores (70% y 78% respectivamente) a los correspondientes a la contaminación con solución en medio AM.

Asimismo, se comparó la eficacia en la recuperación de AF M₁ empleando como solventes triclorometano y acetato de etilo (Tabla IV.3). Los resultados fueron muy similares con los dos solventes y en ambos casos la recuperación se situó en el 90%, para un nivel de contaminación de 0'050 µg/l.

En cuanto al límite de determinación, los resultados se muestran en la Tabla IV.4. El intervalo establecido como límite de determinación se encuentra entre 0'01 y 0'02 $\mu\text{g}/\text{l}$.

IV. 1. 2. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁

En las Figuras IV.4 y IV.5 se muestran los resultados de las experiencias realizadas para analizar la influencia del tiempo de extracción en volúmenes de leche de 50, 250 y 1000 ml contaminados con 0'050 $\mu\text{g}/\text{l}$ de AF G₁ y 0'050 $\mu\text{g}/\text{l}$ de AF B₁. En el caso de volúmenes de leche de 250 y 1000 ml los porcentajes de recuperación fueron más altos a las 18 horas para las dos aflatoxinas estudiadas. Cuando se emplearon muestras de leche de 50 ml la recuperación de AF B₁ fue claramente más alta a las 5 horas (60'1%), mientras que para la AF G₁ no se encontraron diferencias considerables entre 5 y 8 horas de DD (59'4 y 60'1% respectivamente). En cualquier caso, las recuperaciones más altas se lograron empleando muestras de 50 ml de leche.

Con respecto a la temperatura de DD (Figura IV.6) los mejores resultados se obtuvieron a 37 °C para las dos aflatoxinas (94'3% para la AF G₁ y 68'3% para la AF B₁), empleando un nivel de contaminación de 0'050 $\mu\text{g}/\text{l}$ y 5 horas de extracción.

En relación a la influencia del valor de pH de la leche (Figura IV.7), los porcentajes de recuperación más altos correspondieron al valor de pH normal de la leche.

Las Tablas IV.5 y IV.6 muestran los resultados obtenidos en las condiciones más adecuadas para la realización de la DD (muestras de 50 ml de leche, 5 horas de extracción y 37 °C) en muestras contaminadas con 0'050 y 0'100 $\mu\text{g}/\text{l}$ de cada aflatoxina. En ambos casos el porcentaje de recuperación fue mayor para la AF G₁ (entre 70 y 80%), mientras que para la AF B₁ osciló entre el 60 y 65%.

La Tabla IV.7 presenta los resultados de la comparación entre el empleo de triclorometano y acetato de etilo como solventes de extracción. Sólo se aprecian diferencias considerables en el caso de la recuperación de AF B₁ ya que el porcentaje obtenido cuando se empleó triclorometano fue del 55'6%, aumentando a un 89'2% con acetato de etilo.

En cuanto al límite de determinación, los resultados se muestran en la Tabla IV.8. El límite establecido se encuentra entre 0'01 y 0'02 µg/l para las dos aflatoxinas.

IV. 1. 3. Método definitivo desarrollado

Los resultados obtenidos permiten la aplicación de la DD a la extracción conjunta de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ en leche y las condiciones definitivas para la realización del método son las siguientes:

- Muestras de leche de 50 ml con su valor de pH normal (entre 6'5 y 6'7).
- 70 ml de triclorometano en el interior de una membrana de diálisis de 60 cm de longitud.
- Tiempo de extracción de 5 horas.
- Temperatura de extracción de 37 °C.
- Agitación a 150 rpm.

Figura IV.1. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación de 0'05 $\mu\text{g/l}$ de AF M₁ en tres volúmenes distintos de leche (50 ml -línea continua-, 250 ml -línea discontinua- 1000 ml -línea de puntos- mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada tiempo de extracción ensayado.

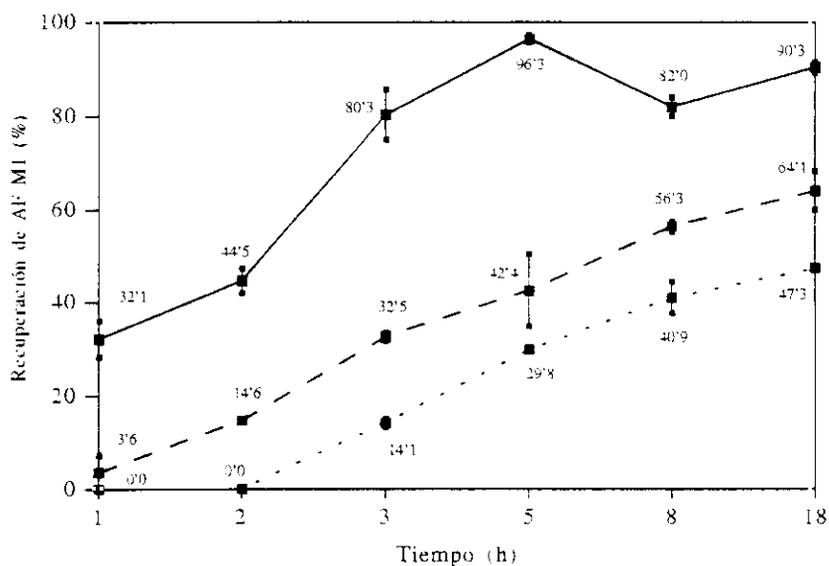


Figura IV.2. Efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'05 $\mu\text{g/l}$ de AF M₁ en leche mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: 50 ml de leche, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada temperatura ensayada.

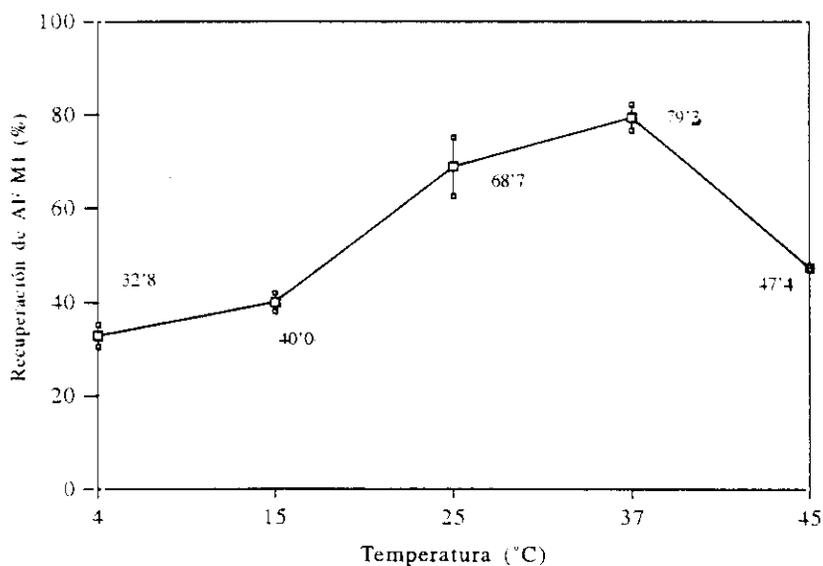
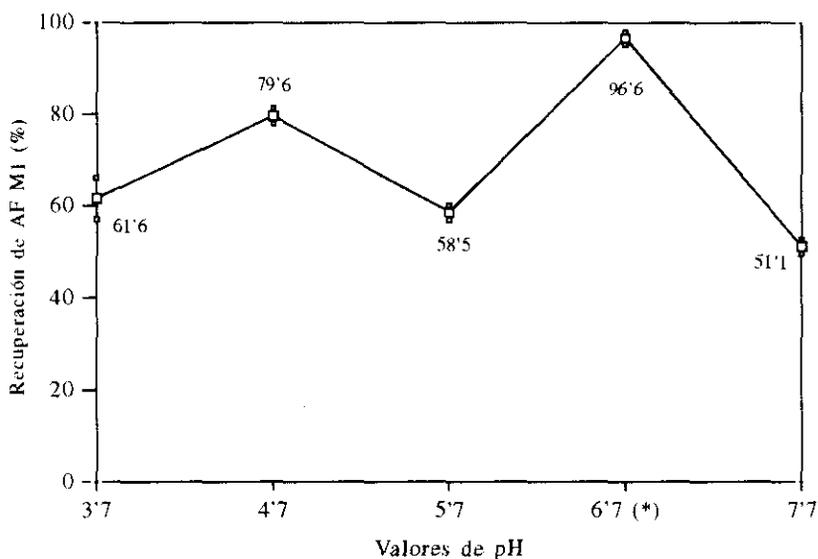


Figura IV.3. Efecto del valor de pH de la muestra de leche en la recuperación de 0'05 µg/l de AF M₁ en leche mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 ml de leche, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada valor de pH ensayado.



(*) valor de pH normal de la leche

Tabla IV.1. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de AF M₁ en muestras de 50 ml de leche contaminadas con solución de AF M₁ en medio AM con dos concentraciones distintas (0'050 y 0'100 µg/l). Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		Rango		(%) recup. (\bar{x})	CV
(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)		
0'050	2'500	0'048	2'407	0'044-0'055	2'230-2'750	96'28	9'3 (n=8)
0'100	5'000	0'088	4'424	4'110-5'500	0'082-0'110	88'48	13'6 (n=5)

Tabla IV.2. Recuperación de AF M₁ mediante DD en muestras de 50 ml de leche contaminadas con patrón de AF M₁ en acetonitrilo a distintos niveles: 0'050, 0'100, 0'200, 0'500 y 1'000 µg/l. Las condiciones de extracción fueron: 70 ml de triclorometano como solvente, 37 °C, 5 horas y agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida (ng)	AF M ₁ detectada (ng)		% rec. (\bar{x})	CV (n=3)
	\bar{x}	Rango		
1'25	1'05	1'00-1'09	84'0	3'5
2'50	1'75	1'56-1'78	70'0	8'2
5'00	3'90	3'75-4'10	78'0	3'8
10'00	9'18	8'10-10'96	91'8	13'7
25'00	16'80	15'70-17'57	67'2	4'7
50'00	39'15	35'60-42'50	78'3	7'2

Tabla IV.3. Efecto del solvente de extracción en la recuperación de 0'050 µg/l de AF M₁ mediante DD en muestras de 50 ml de leche, contaminada con solución de AF M₁ en medio AM. Las condiciones de extracción fueron: 70 ml de solvente (triclorometano o acetato de etilo), 37 °C, 5 horas y agitación a 150 rpm.

Solvente de extracción	AF M ₁ añadida (ng)	AF M ₁ detectada (ng)		AF M ₁ detectada (\bar{x})	% recup. (\bar{x})
		1ª experiencia	2ª experiencia		
Triclorometano	2'50	2'29	2'26	2'27	90'8
Acetato de etilo	2'50	2'37	2'33	2'35	94'0

Tabla IV.4. Límite de determinación de la técnica de DD para la extracción de AF M₁ en muestras de 50 ml de leche contaminadas con solución de AF M₁ en medio AM. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		% positivos	(%) recup. (\bar{x})	CV (n=4)
($\mu\text{g/l}$)	(ng)	($\mu\text{g/l}$)	(ng)			
0'010	0'50	0'009	0'49	50	99'0	-
0'020	1'00	0'020	1'01	100	101'0	11'6
0'030	1'50	0'025	1'26	100	84'0	6'1
0'050	2'50	0'043	2'35	100	86'0	7'4

Figura IV.4. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación de 0'05 $\mu\text{g/l}$ de AF G₁ en tres volúmenes distintos de leche (50 ml -línea continua-, 250 ml -línea discontinua- 1000 ml -línea de puntos- mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada tiempo de extracción ensayado.

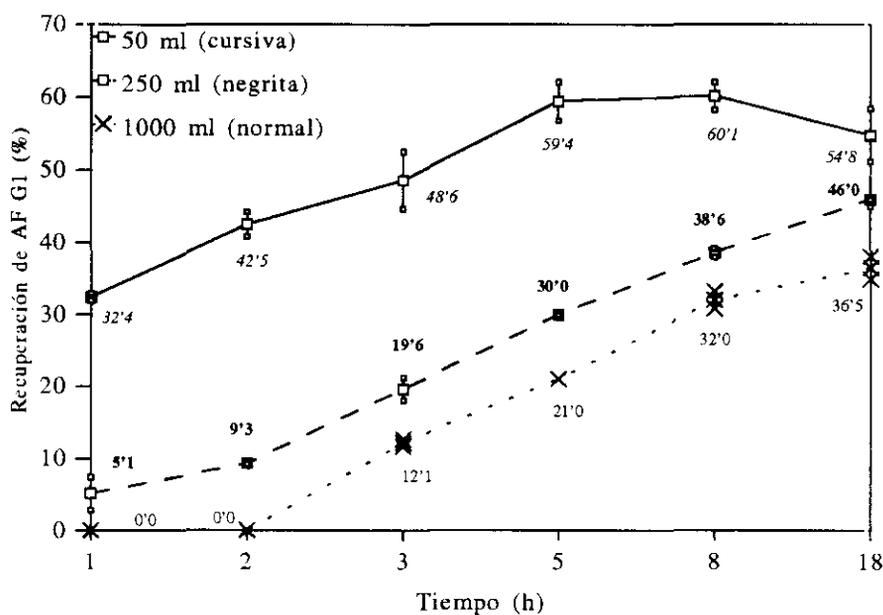


Figura IV.5. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación de 0'05 µg/l de AF B₁ en tres volúmenes distintos de leche (50 ml -línea continua-, 250 ml -línea discontinua- 1000 ml -línea de puntos- mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada tiempo de extracción ensayado.

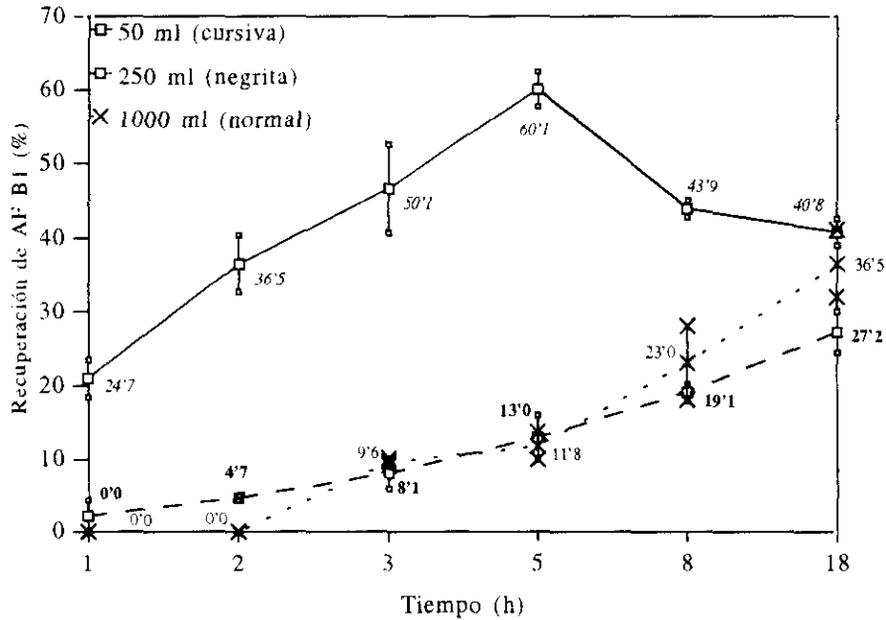


Figura IV.6. Efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'05 µg/l de AF G₁ (línea continua) y 0'05 µg/l de AF B₁ (línea discontinua) en leche mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: 50 ml de leche, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada temperatura ensayada.

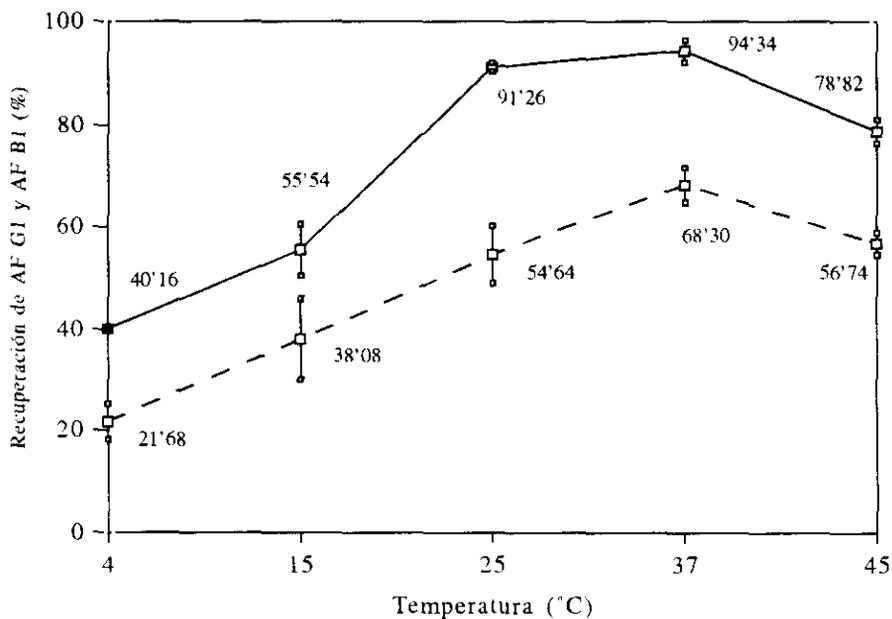
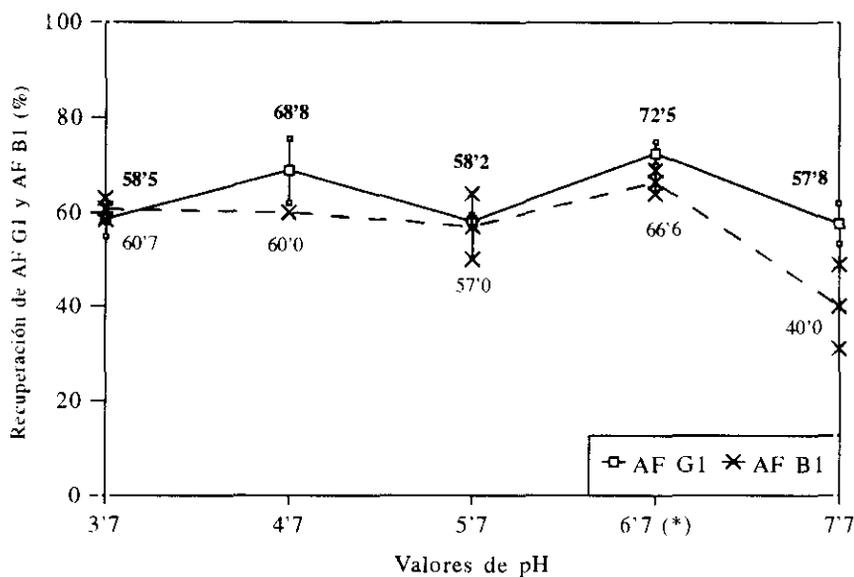


Figura IV.7. Efecto del valor de pH de la muestra de leche en la recuperación de 0'05 µg/l de AF G₁ y 0'05 µg/l de AF B₁ en leche mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 ml de leche, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras -negrilla para la AF G₁ y normal para la AF B₁-), máximo y mínimo obtenidos para cada valor de pH ensayado.



(*) valor de pH normal de la leche

Tabla IV.5. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de AF G₁ en muestras de 50 ml de leche contaminadas con solución de AF G₁ en medio AM con dos concentraciones distintas (0'050 y 0'100 µg/l). Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF G ₁ añadida		AF G ₁ detectada (\bar{x})		Rango		(%) recup. (\bar{x})	CV
(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)		
0'050	2'500	0'036	1'811	0'030-0'047	1'500-2'390	72'44	15'7 (n=8)
0'100	5'000	0'079	3'984	0'068-0'097	3'410-4'860	79'68	16'1 (n=5)

Tabla IV.6. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de AF B₁ en muestras de 50 ml de leche contaminadas con solución de AF B₁ en medio AM con dos concentraciones distintas (0'050 y 0'100 µg/l). Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF B ₁ añadida		AF B ₁ detectada (\bar{x})		Rango		(%) recup. (\bar{x})	CV
(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)		
0'050	2'500	0'032	1'618	0'025-0'038	1'250-1'900	64'72	11'8 (n=8)
0'100	5'000	0'060	3'046	0'053-0'074	2'660-3'700	60'92	12'3 (n=5)

Tabla IV.7. Efecto del solvente de extracción en la recuperación de 0'050 µg/l de AF G₁ y 0'050 µg/l de AF B₁ mediante DD en muestras de 50 ml de leche, contaminadas con solución de cada aflatoxina en medio AM. Las condiciones de extracción fueron: 70 ml de solvente (triclorometano o acetato de etilo), 37 °C, 5 horas y agitación a 150 rpm.

Solvente de extracción	AF añadida (ng)	AF M ₁ detectada (ng)		AF detectada (\bar{x})	% recup. (\bar{x})
		1ª experiencia	2ª experiencia		
Triclorometano	2'50 (AF G ₁)	2'30	2'34	2'32	92'8
	2'50 (AF B ₁)	1'25	1'53	1'39	55'6
Acetato de etilo	2'50 (AF G ₁)	2'50	2'38	2'44	97'6
	2'50 (AF B ₁)	2'25	2'21	2'23	89'2

Tabla IV.8. Límite de determinación de la técnica de DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁ en muestras de 50 ml de leche contaminadas con solución de cada aflatoxina en medio AM. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF añadida		AF detectada (\bar{x})		% positivos	(%) recup. (\bar{x})	CV (n=4)
($\mu\text{g/l}$)	(ng)	($\mu\text{g/l}$)	(ng)			
0'010 (AF G ₁)	0'50	0'010	0'53	25	106'0	-
0'010 (AF B ₁)	0'50	0'009	0'48	25	96'0	-
0'020 (AF G ₁)	1'00	0'018	0'89	75	89'0	-
0'020 (AF B ₁)	1'00	0'016	0'80	75	80'0	-
0'030 (AF G ₁)	1'50	0'021	1'07	100	71'3	6'2
0'030 (AF B ₁)	1'50	0'020	1'01	100	67'3	3'6
0'050 (AF G ₁)	2'50	0'035	1'77	100	70'8	4'2
0'050 (AF B ₁)	2'50	0'031	1'58	100	63'2	5'0

Tabla IV.9. Resultados del cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de AF M₁, AF G₁ y AF B₁ en leche. En la tabla se expresa el valor en ng con su media aritmética (\bar{x}) y su desviación estandar (σ), obtenidos a partir de veinte muestras de 50 ml de leche sin contaminar con aflatoxinas (blancos) en las que se realizaba la extracción mediante DD en las condiciones siguientes: 70 ml de cloroformo como solvente de extracción, duración de la DD cinco horas a la temperatura de 37 °C y con agitación orbital de 150 rpm. La detección se efectuaba mediante CCFAE, comprobando el valor de R_f de las aflatoxinas patrón en el que se detectaba el máximo de fluorescencia a 350 nm y realizando el cálculo del valor en ng correspondiente a la señal detectada en el mismo punto de R_f en las calles de los extractos problema.

Blanco	(a)	(b)	(c)
1	0'05	0'15	0'09
2	0'01	0'11	0'09
3	0'03	0'07	0'02
4	0'03	0'02	0'03
5	0'06	0'18	0'07
6	0'06	0'10	0'06
7	0'03	0'03	0'09
8	0'05	0'10	0'06
9	0'06	0'12	0'06
10	0'04	0'08	0'09
11	0'08	0'21	0'10
12	0'09	0'14	0'16
13	0'05	0'19	0'03
14	0'04	0'16	0'03
15	0'02	0'13	0'03
16	0'03	0'07	0'08
17	0'03	0'02	0'07
18	0'03	0'05	0'19
19	0'04	0'05	0'03
20	0'05	0'07	0'10
\bar{x}	0'044	0'103	0'075
σ	0'019	0'054	0'042

(a) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF M₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaca.

(b) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF G₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaca.

(c) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF B_1 en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaqa.

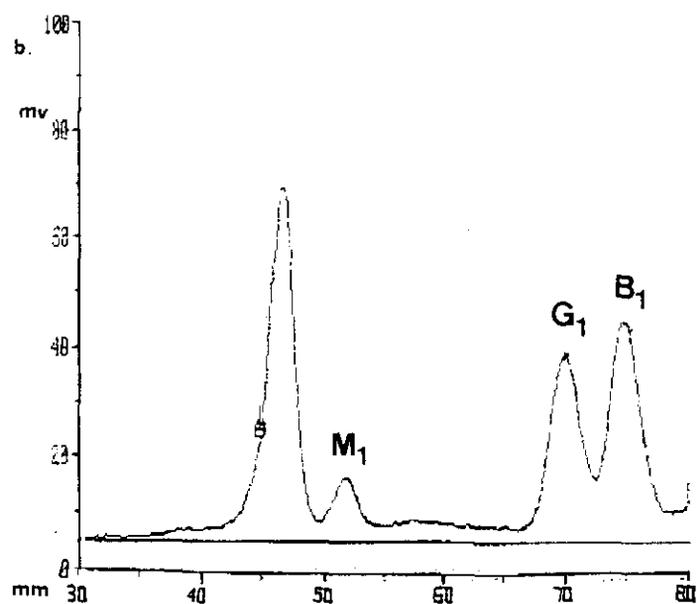
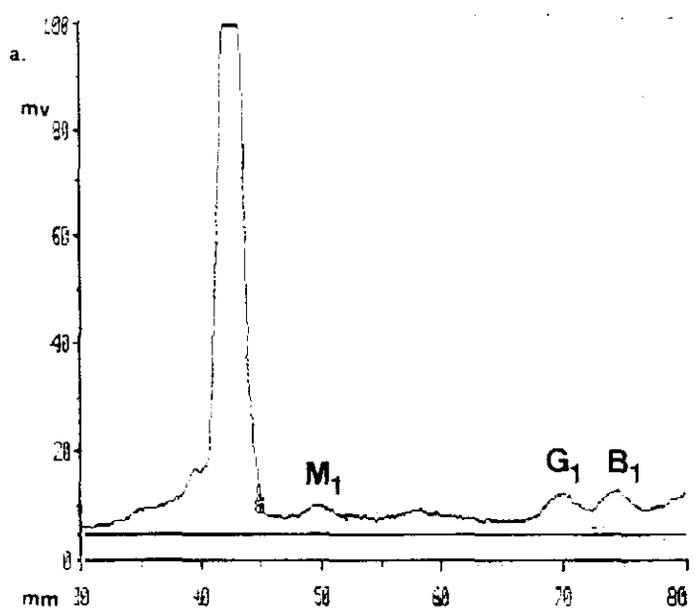
Cálculo: L. D. = $\bar{\chi} + 3 \times \sigma$

L. D. (AF M_1) = $0'044 + 3 \times 0'019 = 0'101$ ng, que corresponden a $0'0020$ $\mu\text{g/l}$.

L. D. (AF G_1) = $0'103 + 3 \times 0'054 = 0'265$ ng, que corresponden a $0'0053$ $\mu\text{g/l}$.

L. D. (AF B_1) = $0'075 + 3 \times 0'042 = 0'201$ ng, que corresponden a $0'0040$ $\mu\text{g/l}$.

Figura IV.8. Cromatogramas correspondientes a extractos de leche obtenidos mediante extracción por DD. (a) extracto de leche contaminada con aflatoxinas M_1 , G_1 y B_1 , (b) calle correspondiente a un extracto contaminado con patrón interno de las aflatoxinas.



IV. 2. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN LECHE EN POLVO CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

En primer lugar se mostrarán los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas en el caso del desarrollo de la DD para la extracción de AF M₁ en leche en polvo, describiendo posteriormente los resultados obtenidos con respecto a la extracción de las aflatoxinas G₁ y B₁ conjuntamente. No obstante, los resultados obtenidos para el límite de detección de la técnica de DD se muestran conjuntamente para las tres aflatoxinas estudiadas en la Tabla IV.20 (pag. 129), así como las condiciones del método definitivo de análisis (Figura IV.22, pag. 156).

En relación al establecimiento de las condiciones de detección, en las experiencias realizadas empleando el sistema de detección aplicado a los extractos de leche, es decir, CCFAE con un sistema de desarrollo vertical y la mezcla triclorometano/metanol (95/5) como solvente de desarrollo, se probó su validez para la separación de las tres aflatoxinas estudiadas en los extractos de leche en polvo. La Figura IV.11 (pag. 130) presenta algunos cromatogramas obtenidos a partir de extractos de este producto aplicando este sistema.

Todas las pruebas para el desarrollo de la técnica de DD en leche en polvo se han realizado utilizando 70 ml de triclorometano colocado en el interior de las membranas de diálisis. Las muestras se contaminaron con solución de cada aflatoxina en triclorometano y en todos los casos la velocidad de agitación empleada durante la DD fue de 150 rpm.

IV. 2. 1. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF M₁

En la Tabla IV.10. se muestran los resultados de las experiencias realizadas para comprobar la influencia de la cantidad de leche en polvo tomada como muestra y disuelta en 50 ml de agua destilada sobre la recuperación de 0'80 µg/Kg de AF M₁. Los mejores resultados se obtuvieron con 6'25 g de leche en polvo (76%)

disminuyendo un 20% si la muestra era de 12'50 g y un 40% aproximadamente si la muestra era de 25'00 g.

El siguiente parámetro estudiado fue la temperatura de DD. Los resultados aparecen en la Figura IV.9, donde se aprecia que el porcentaje de recuperación más alto (89'6%) se consiguió a 37 °C, empleando muestras de 6'25 g de leche en polvo y 5 horas de extracción.

El efecto del tiempo de extracción en el porcentaje de recuperación de distintas concentraciones de AF M₁ mediante DD se muestra en la Tabla IV.11. Los porcentajes más altos se obtuvieron a las 5 horas y dentro de ellos los valores más elevados (82'0 y 94'4%) correspondieron a los niveles de contaminación de 0'4 y 0'5 µg/Kg de AF M₁ respectivamente.

En la Tabla IV.12 se presenta el porcentaje de recuperación de la técnica empleando las condiciones definitivas (6'25 g de leche en polvo disueltos en 50 ml de agua destilada, 70 ml de triclorometano y extracción de 5 horas a 37 °C y 150 rpm), para un nivel de contaminación de 0'50 y 0'80 µg/Kg. Los porcentajes obtenidos fueron de un 83'0% y un 73'4% respectivamente.

Los resultados de las pruebas realizadas para el cálculo del límite de determinación se muestran en la Tabla IV.13. El límite establecido se encuentra entre 0'3 y 0'4 µg/Kg.

IV. 2. 2. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁

En la Tabla IV.14. se muestran los resultados de las experiencias realizadas para estudiar la influencia de la cantidad de leche en polvo tomada como muestra y disuelta en 50 ml de agua destilada sobre la recuperación de 0'80 µg/Kg de AF G₁ y 0'80 µg/Kg de AF B₁. Los mejores resultados se obtuvieron con 6'25 g de leche en polvo (97'0% para la AF G₁ y 69'8% para la AF B₁), disminuyendo la

efectividad al emplear cantidades mayores del producto, aunque de forma menos marcada en el caso de la AF B₁.

Con respecto a la temperatura de DD, los resultados se exponen en la Figura IV.10, donde se aprecia que el porcentaje de recuperación más alto para las dos aflatoxinas (96'3% para la AF G₁ y 81'6% para la AF B₁) se consiguió a 37 °C, empleando muestras de 6'25 g de leche en polvo y 5 horas de extracción.

El efecto del tiempo de extracción en el porcentaje de recuperación de distintas concentraciones de AF G₁ y AF B₁ mediante DD se muestra en la Tablas IV.15 y IV.16. En este caso los porcentajes de recuperación no experimentaron variaciones muy notables entre los distintos tiempos estudiados, considerándose 5 horas como periodo de DD más adecuado.

Las Tablas IV.17 y IV.18 muestran los resultados obtenidos en las condiciones más adecuadas para la realización de la DD (muestras de 6'25 g de leche en polvo, 70 ml de triclorometano, 5 horas de extracción y 37 °C) para los niveles de contaminación de 0'50 y 0'80 µg/Kg de cada aflatoxina. En ambos casos el porcentaje de recuperación fue mayor para la AF G₁, no apreciándose diferencias significativas entre los dos niveles de contaminación empleados.

En cuanto al límite de determinación, los resultados se exponen en la Tabla IV.19. El límite establecido para las dos aflatoxinas se encuentra entre 0'3 y 0'4 µg/Kg.

IV. 2. 3. Método definitivo desarrollado

Los resultados obtenidos permiten la aplicación de la DD a la extracción simultánea de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ en leche en polvo siendo las condiciones definitivas para la realización del método las siguientes:

- Muestras de leche en polvo de 6'25 g disueltas en 50 ml de agua destilada.

- 70 ml de triclorometano en el interior de una membrana de diálisis de 60 cm de longitud.
- Tiempo de extracción de 5 horas.
- Temperatura de extracción de 37 °C.
- Agitación a 150 rpm.

Tabla IV.10. Efecto de la cantidad de muestra de leche en polvo sobre la recuperación de AF M₁ mediante DD. El nivel de contaminación utilizado fue de 0'80 µg/Kg de AF M₁. Las extracciones se realizaron empleando 50 ml de agua para disolver la leche en polvo y 70 ml de triclorometano como solvente de extracción. La DD se efectuó a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

Leche en polvo (g)	AF M ₁ añadida (ng)	AF M ₁ Recuperada (\bar{x})	
		(ng)	(%)
6'25	5'00	3'80	76'00
12'50	10'00	5'02	50'20
25'00	20'00	4'52	22'60

Figura IV.9. Efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'5 µg/kg de AF M₁ en leche en polvo mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 6'25 g de leche en polvo disueltas en 50 ml de agua destilada, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada temperatura ensayada.

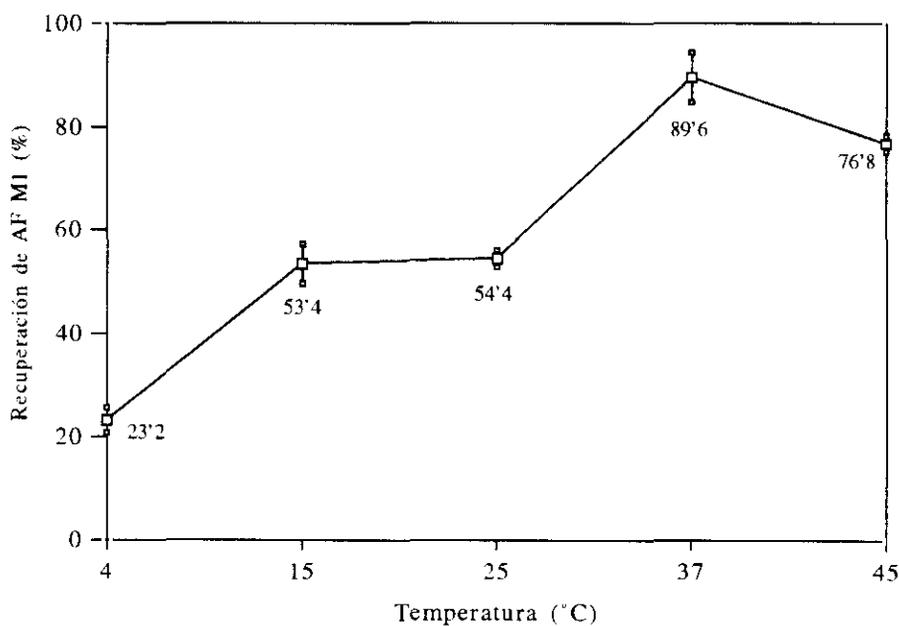


Tabla IV.11. Efecto del tiempo de DD en la extracción de diferentes concentraciones de AF M₁ (0'4, 0'5, 0'8, 1'0 y 1'9 µg/Kg) en muestras de 6'25 g de leche en polvo. Las condiciones de extracción fueron: 50 ml de agua para disolver la leche en polvo, 70 ml de triclorometano como solvente de extracción, 37 °C y agitación a 150 rpm. Los periodos de DD ensayados fueron 5, 8 y 18 horas.

Tiempo (h)	AF M ₁ añadida (ng)	AF M ₁ detectada (ng)		AF M ₁ detectada (%)	
		(ng)	Rango	\bar{x}	CV (n=4)
5	2'50	2'05	1'50-2'80	82'00	23'4
	3'12	2'36	1'91-2'50	94'40	11'6
	5'00	3'36	2'85-3'90	67'20	14'2
	6'24	4'04	3'62-4'57	64'74	9'5
	11'87	8'55	7'12-10'06	72'03	12'3
8	2'50	1'54	1'40-1'68	61'60	6'8
	3'12	1'82	1'50-1'87	58'33	1'5
	5'00	3'07	2'50-3'70	61'40	14'7
	6'24	4'35	3'99-4'94	69'71	8'4
	11'87	6'67	6'23-7'20	56'19	5'9
18	2'50	1'21	0'90-1'45	48'40	16'6
	3'12	2'01	1'66-2'39	64'40	12'8
	5'00	2'78	2'33-3'40	55'60	14'8
	6'24	4'30	4'05-4'51	68'91	3'9
	11'87	7'41	6'21-8'21	62'42	10'0

Tabla IV.12. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de AF M₁ en muestras de 6'25 g de leche en polvo contaminadas con solución de AF M₁ en triclorometano con dos concentraciones distintas (0'500 y 0'800 µg/Kg). Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		Rango		(%) recup. (\bar{x})	CV
(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)		
0'500	3,12	0'415	2'59	0'306-0'500	1'91-3'12	83'0	12'4 (n=9)
0'800	5'00	0'588	3'67	0'456-0'641	2'85-4'00	73'4	12'3 (n=9)

Tabla IV.13. Límite de determinación de la técnica de DD para la extracción de AF M₁ en muestras de 6'25 g de leche en polvo contaminadas con solución de AF M₁ en triclorometano. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		% positivos	(%) recup. (\bar{x})	CV (n=4)
(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)			
0'200	1'25	-	-	-	-	-
0'300	1'87	0'212	1'32	50	70'6	-
0'400	2'50	0'350	2'19	100	87'6	16'5

Tabla IV.14. Efecto de la cantidad de muestra de leche en polvo sobre la recuperación de AF G₁ y AF B₁ mediante DD. El nivel de contaminación utilizado fue de 0'80 µg/Kg de AF G₁ y AF B₁. Las extracciones se realizaron empleando 50 ml de agua para disolver la leche en polvo y 70 ml de triclorometano como solvente de extracción. La DD se efectuó a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

Leche en polvo (g)	AF añadida (ng)	AF Recuperada (\bar{x})	
		(ng)	(%)
6'25	5'00 (AF G ₁)	4'85	97'00
	5'00 (AF B ₁)	3'49	69'80
12'50	10'00 (AF G ₁)	7'04	70'40
	10'00 (AF B ₁)	6'00	60'00
25'00	20'00 (AF G ₁)	5'57	27'85
	20'00 (AF B ₁)	8'08	40'40

Número de experimentos (n=2).

Figura IV.10. Efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'5 µg/kg de AF G₁ y 0'5 µg/Kg de AF B₁ en leche en polvo mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 6'25 g de leche en polvo disueltas en 50 ml de agua destilada, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras -negrilla para la AF G₁ y normal para la AF B₁-), máximo y mínimo obtenidos para cada temperatura ensayada.

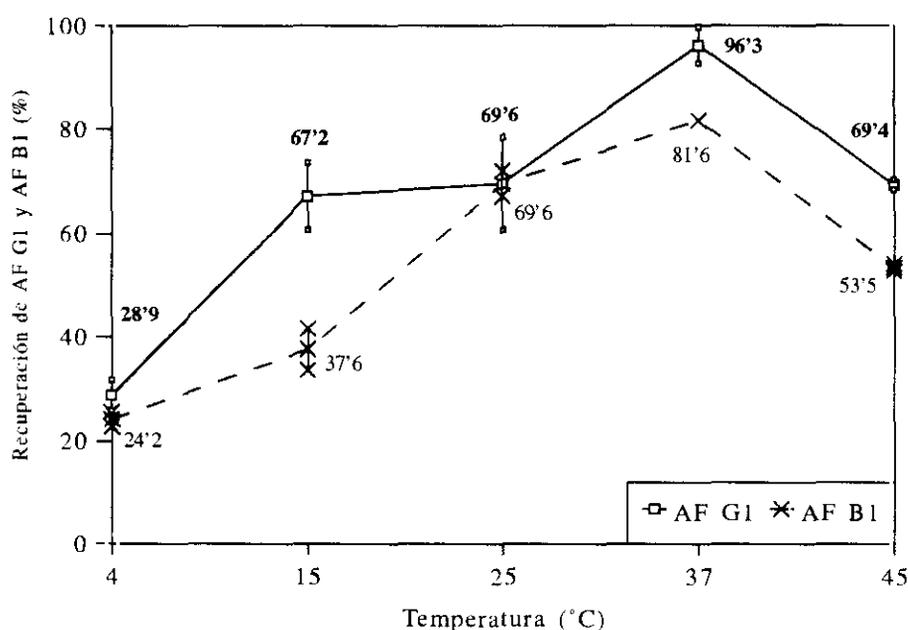


Tabla IV.15. Efecto del tiempo de DD en la extracción de diferentes concentraciones de AF G₁ (0'4, 0'5, 0'8, 1'0 y 1'9 µg/Kg) en muestras de 6'25 g de leche en polvo. Las condiciones de extracción fueron: 50 ml de agua para disolver la leche en polvo, 70 ml de triclorometano como solvente de extracción, 37 °C y agitación a 150 rpm. Los periodos de DD ensayados fueron 5, 8 y 18 horas.

Tiempo (h)	AF G ₁ añadida (ng)	AF G ₁ detectada (ng)		AF G ₁ detectada (%)	
		(ng)	Rango	\bar{x}	CV (n=4)
5	2'50	1'91	1'50-2'40	76'40	19'6
	3'12	2'64	2'38-2'99	84'61	8'2
	5'00	4'50	3'43-5'10	90'00	14'3
	6'24	5'03	3'87-5'82	80'60	15'6
	11'87	10'33	9'38-11'20	87'02	6'6
8	2'50	2'00	1'91-2'10	80'00	3'3
	3'12	2'23	2'01-2'28	71'47	1'3
	5'00	3'99	3'70-4'25	79'80	5'2
	6'24	5'22	4'94-5'49	83'00	4'3
	11'87	8'79	8'15-9'49	74'05	6'3
18	2'50	1'55	1'30-1'75	62'00	10'4
	3'12	2'28	2'06-2'55	73'07	8'7
	5'00	4'45	4'12-5'40	89'00	12'4
	6'24	4'87	4'46-5'26	78'08	6'4
	11'87	9'11	8'33-9'97	76'74	6'6

Tabla IV.16. Efecto del tiempo de DD en la extracción de diferentes concentraciones de AF B₁ (0'4, 0'5, 0'8, 1'0 y 1'9 µg/Kg) en muestras de 6'25 g de leche en polvo. Las condiciones de extracción fueron: 50 ml de agua para disolver la leche en polvo, 70 ml de triclorometano como solvente de extracción, 37 °C y agitación a 150 rpm. Los periodos de DD ensayados fueron 5, 8 y 18 horas.

Tiempo (h)	AF B ₁ añadida (ng)	AF B ₁ detectada (ng)		AF B ₁ detectada (%)	
		(ng)	Rango	\bar{x}	CV (n=4)
5	2'50	1'92	1'61-2'20	76'80	11'0
	3'12	2'41	2'18-2'78	77'24	9'2
	5'00	3'43	2'80-4'31	68'60	16'0
	6'24	3'25	2'69-3'93	52'00	15'1
	11'87	8'74	8'01-9'40	73'63	5'7
8	2'50	1'58	1'45-1'68	63'20	5'2
	3'12	1'83	1'73-1'91	58'65	3'7
	5'00	2'76	2'60-3'00	55'20	5'4
	6'24	3'63	3'50-3'75	58'17	1'9
	11'87	6'86	6'12-7'53	57'79	7'5
18	2'50	0'97	0'90-1'10	38'80	8'6
	3'12	1'79	1'60-1'99	57'37	7'7
	5'00	3'30	2'62-3'70	66'00	12'8
	6'24	4'03	3'39-4'46	64'50	9'7
	11'87	8'07	7'33-8'90	67'98	7'2

Tabla IV.17. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de AF G₁ en muestras de 6'25 g de leche en polvo contaminadas con solución de AF G₁ en triclorometano con dos concentraciones distintas (0'500 y 0'800 µg/Kg). Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF G ₁ añadida		AF G ₁ detectada (\bar{x})		Rango		(%) recup. (\bar{x})	CV
(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)		
0'500	3,12	0'435	2'72	0'381-0'498	2'38-3'11	87'2	8'5 (n=9)
0'800	5'00	0'723	4'52	0'548-0'816	3'43-5'10	90'4	11'9 (n=9)

Tabla IV.18. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de AF B₁ en muestras de 6'25 g de leche en polvo contaminadas con solución de AF B₁ en triclorometano con dos concentraciones distintas (0'500 y 0'800 µg/Kg). Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF B ₁ añadida		AF B ₁ detectada (\bar{x})		Rango		(%) recup. (\bar{x})	CV
(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)	(µg/l)	(ng)		
0'500	3,12	0'371	2'32	0'250-0'445	1'56-2'78	74'3	14'6 (n=9)
0'800	5'00	0'574	3'59	0'448-0'689	2'80-4'31	71'8	13'1 (n=9)

Tabla IV.19. Límite de determinación de la técnica de DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁ en muestras de 6'25 g de leche en polvo contaminadas con solución de cada aflatoxina en trichlorometano. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de trichlorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF añadida		AF detectada (\bar{x})		% positivos	(%) recup. (\bar{x})	CV (n=4)
($\mu\text{g/l}$)	(ng)	($\mu\text{g/l}$)	(ng)			
0'200 (AF G ₁)	1'25	-	-	-	-	-
0'200 (AF B ₁)	1'25	-	-	-	-	-
0'300 (AF G ₁)	1'87	0'218	1'36	50	72'7	-
0'300 (AF B ₁)	1'87	0'190	1'19	25	63'6	-
0'400 (AF G ₁)	2'50	0'374	2'34	100	93'6	11'4
0'400 (AF B ₁)	2'50	0'254	1'59	100	63'6	14'5

Tabla IV.20. Resultados del cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de AF M₁, AF G₁ y AF B₁ en leche en polvo. En la tabla se expresa el valor en ng con su media aritmética (\bar{x}) y su desviación estandar (σ), obtenidos a partir de veinte muestras de 6'25 g de leche en polvo sin contaminar con aflatoxinas (blancos) en las que se realizaba la extracción mediante DD en las condiciones siguientes: 50 ml de agua para disolver las muestras, 70 ml de cloroformo como solvente de extracción, duración de la DD cinco horas a la temperatura de 37 °C y con agitación orbital de 150 rpm. La detección se efectuaba mediante CCFAE, comprobando el valor de R_f de las aflatoxinas patrón en el que se detectaba el máximo de fluorescencia a 350 nm y realizando el cálculo del valor en ng correspondiente a la señal detectada en el mismo punto de R_f en las calles de los extractos problema.

Blanco	(a)	(b)	(c)
1	0'03	0'03	0'03
2	0'02	0'02	0'04
3	0'02	0'12	0'05
4	0'03	0'04	0'04
5	0'04	0'04	0'03
6	0'05	0'03	0'07
7	0'04	0'03	0'04
8	0'02	0'03	0'05
9	0'07	0'11	0'03
10	0'05	0'07	0'04
11	0'07	0'08	0'07
12	0'10	0'16	0'04
13	0'07	0'08	0'03
14	0'08	0'03	0'02
15	0'07	0'10	0'02
16	0'12	0'14	0'02
17	0'14	0'10	0'03
18	0'11	0'06	0'02
19	0'14	0'07	0'03
20	0'07	0'07	0'04
\bar{x}	0'067	0'070	0'037
σ	0'037	0'039	0'014

(a) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF M₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaqa.

(b) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF G₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaqa.

(c) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del

patrón de AF B₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaca.

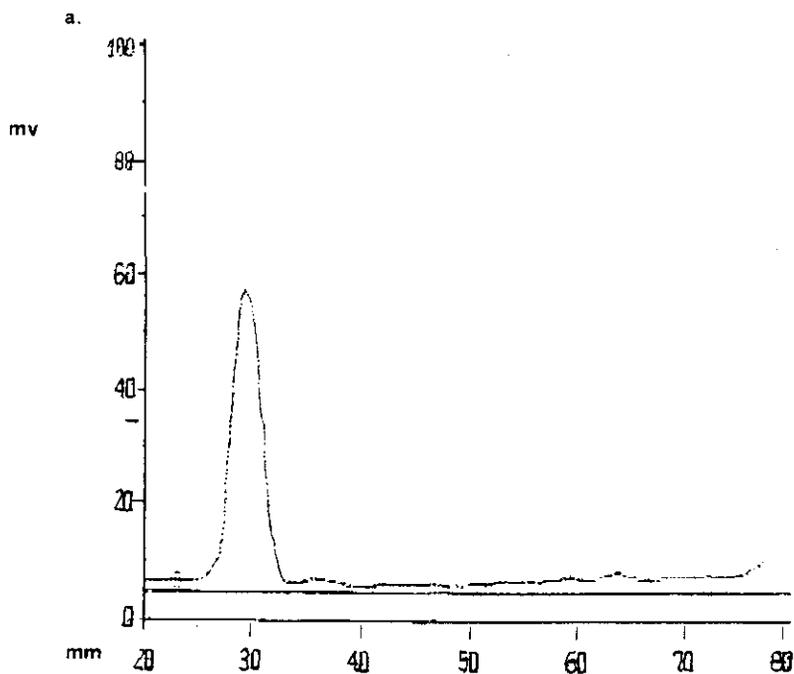
Cálculo: L. D. = $\bar{x} + 3 \times \sigma$

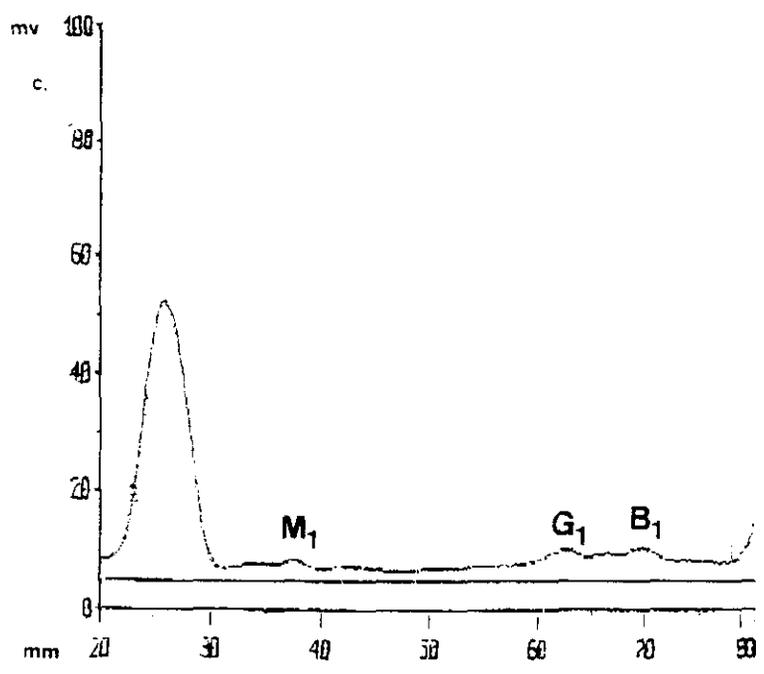
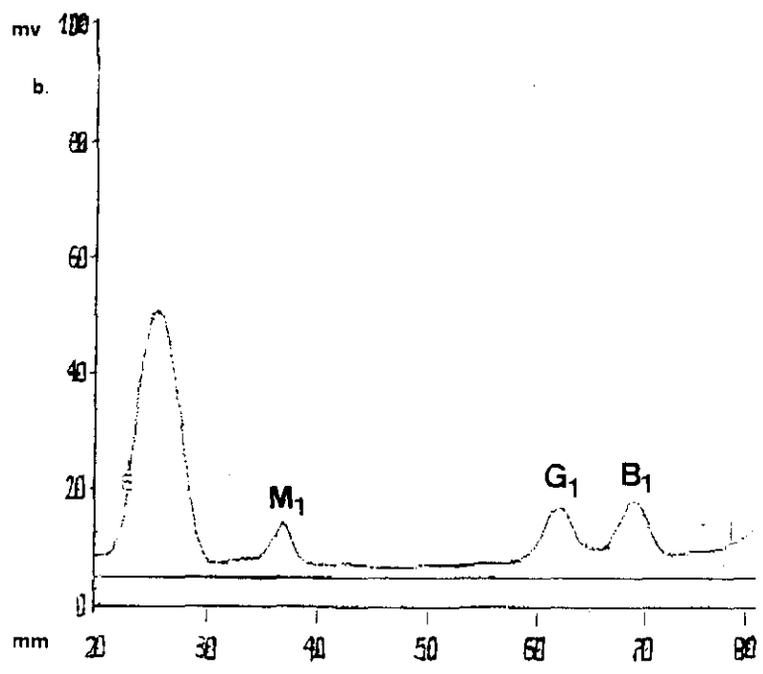
L. D. (AF M₁) = $0'067 + 3 \times 0'037 = 0'178$ ng, que corresponden a $0'0280$ µg/Kg.

L. D. (AF G₁) = $0'070 + 3 \times 0'039 = 0'187$ ng, que corresponden a $0'0299$ µg/Kg.

L. D. (AF B₁) = $0'037 + 3 \times 0'014 = 0'079$ ng, que corresponden a $0'0126$ µg/Kg.

Figura IV.11. Cromatogramas correspondientes a extractos de leche en polvo obtenidos mediante DD. (a) extracto de leche en polvo sin contaminar con aflatoxinas, (b) extracto de leche en polvo contaminada con 1'9 µg/Kg de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁, (c) extracto de leche en polvo contaminada con 0'4 µg/Kg de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁.





IV. 3. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN YOGUR CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

En primer lugar se expondrán los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas en el caso del desarrollo de la DD para la extracción de AF M₁ en yogur, describiendo posteriormente los resultados obtenidos con respecto a la extracción de las aflatoxinas G₁ y B₁ conjuntamente. No obstante, los resultados obtenidos para el límite de detección de la técnica de DD se muestran conjuntamente para las tres aflatoxinas estudiadas en la Tabla IV.28 (pag. 142), así como las condiciones del método definitivo de análisis (Figura IV.22, pag. 156).

Las condiciones de detección empleadas han sido las mismas utilizadas para el caso de la leche y leche en polvo: CCFAE con un sistema de desarrollo vertical y la mezcla triclorometano/metanol (95/5) como solvente de desarrollo. La Figura IV.16 (pag. 143) presenta un cromatograma obtenido a partir de extractos de yogur aplicando este sistema.

En todas las experiencias se ha utilizado como solvente de extracción triclorometano (70 ml) colocado en el interior de membranas de diálisis de 60 cm de longitud y la velocidad de agitación ha sido a 150 rpm en todos los casos.

IV. 3. 1. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF M₁

La Figura IV.12 representa los resultados obtenidos en las pruebas realizadas para comprobar la influencia de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'045 µg/Kg de AF M₁ en yogur. Para estas pruebas se emplearon muestras de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de AF M₁ en acetonitrilo. En la gráfica se observa que los mejores resultados se obtuvieron realizando la DD a 37 °C.

En la Figura IV.13 aparecen los resultados de las experiencias realizadas

para comprobar la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de 0'045 µg/Kg de AF M₁ en yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de la aflatoxina en acetonitrilo. Asimismo, la Tabla IV.21 presenta los resultados correspondientes al mismo tipo de pruebas pero empleando muestras de yogur comercial contaminadas con 0'050 µg/Kg de AF M₁ a partir de solución de la toxina en triclorometano. Los mejores resultados se obtuvieron con un periodo de DD de 5 horas en ambos casos, si bien, la recuperación fue mayor cuando se utilizó yogur comercial (84'8%) frente al 74'4% obtenido a partir del yogur elaborado en el laboratorio. En ambos casos y en las extracciones de 8 y 18 horas, aparecieron sustancias interfirientes en las cromatoplasmas, que impidieron la cuantificación de la AF M₁.

La Tabla IV.22 muestra los resultados correspondientes a la recuperación de 0'045 µg/Kg de AF M₁ en muestras de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con tres soluciones diferentes de la aflatoxina: en medio AM, en acetonitrilo y en triclorometano. Las extracciones se realizaron durante un periodo de 5 horas a 37 °C y 150 rpm. El porcentaje de recuperación más elevado correspondió a los yogures elaborados con leche contaminada con solución de AF M₁ en medio AM (88'0%), recuperándose aproximadamente un 10% menos en el caso de la solución de triclorometano y un 20% menos en el caso de la solución de acetonitrilo.

En la Tabla IV.23 aparecen los resultados correspondientes al porcentaje de recuperación obtenido a partir de muestras de 50 g de yogur comercial contaminadas a un nivel de 0'050 µg/Kg con solución de AF M₁ en triclorometano. En este caso el porcentaje de recuperación fue de un 83'6%.

Con respecto al límite de determinación los resultados aparecen en la Tabla IV.24. El límite establecido se encuentra entre 0'010 y 0'020 µg/Kg.

IV. 3. 2. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁

En la Figura IV.14 se representan los resultados de las experiencias realizadas para comprobar la influencia de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'045 µg/Kg de cada aflatoxina. Para estas pruebas se emplearon muestras de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con soluciones de AF G₁ y AF B₁ en acetonitrilo. En la gráfica se observa que los mejores resultados para la AF B₁ se obtuvieron al realizar la DD a 37 °C. En el caso de la AF G₁, aunque se logró una recuperación mayor a 45 °C, aparecieron sustancias interfirientes en las cromatoplacas, que dificultaban la cuantificación de ambas aflatoxinas.

En la Figura IV.15 se muestran los resultados de las experiencias realizadas para comprobar la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de 0'045 µg/Kg de cada aflatoxina, en yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con soluciones de AF G₁ y de AF B₁ en acetonitrilo. Asimismo, la Tabla IV.25. presenta los resultados correspondientes al mismo tipo de pruebas pero empleando muestras de yogur comercial contaminadas a un nivel de 0'050 µg/Kg de cada aflatoxina en solución de triclorometano. Los mejores resultados se obtuvieron con un periodo de DD de 5 horas en ambos casos, si bien, la recuperación fue mayor cuando se utilizó yogur comercial (93'2% -AF G₁- y 57'2% -AF B₁) que cuando se empleó yogur elaborado en el laboratorio (59'5% -AF G₁- y 35'3% -AF B₁-). En ambos casos y en las extracciones de 8 y 18 horas, aparecieron sustancias interfirientes en las cromatoplacas, que impidieron la cuantificación de ambas aflatoxinas.

En la Tabla IV.25 aparecen los resultados correspondientes a la recuperación de 0'045 µg/Kg de cada aflatoxina en muestras de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con tres soluciones de la aflatoxina diferentes: en medio AM, en acetonitrilo y en triclorometano. Las extracciones se realizaron durante un periodo de 5 horas a 37 °C y 150 rpm. El porcentaje de

recuperación más bajo correspondió a los yogures elaborados con leche contaminada con solución de AF G₁ en acetonitrilo, siendo en el caso de las otras dos soluciones de un 85% aproximadamente. En relación a la AF B₁ el porcentaje de recuperación más alto correspondió a los yogures elaborados a partir de leche contaminada con solución de la aflatoxina en medio AM (78'2%).

En la Tabla IV.26 aparecen los resultados correspondientes al porcentaje de recuperación obtenido a partir de muestras de 50 ml de yogur comercial contaminadas a un nivel de 0'050 µg/Kg con soluciones de AF G₁ y AF B₁ en triclorometano. En este caso el porcentaje de recuperación fue de un 58'8% para la AF G₁ y de un 40'8% para la AF B₁.

Con respecto al límite de determinación los resultados aparecen en la Tabla IV.27. El límite establecido se encuentra entre 0'010 y 0'020 µg/Kg para las dos aflatoxinas.

IV. 3. 3. Método definitivo desarrollado

Los resultados obtenidos permiten la aplicación de la DD a la extracción simultánea de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ en yogur y las condiciones definitivas para la realización del método son las siguientes:

- Muestras de yogur de 50 g.
- 70 ml de triclorometano en el interior de una membrana de diálisis de 60 cm de longitud.
- Tiempo de extracción de 5 horas.
- Temperatura de extracción de 37 °C.
- Agitación a 150 rpm.

Figura IV.12. Efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'045 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF M₁ en yogur mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 ml de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de AF M₁ en acetonitrilo, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada temperatura ensayada.

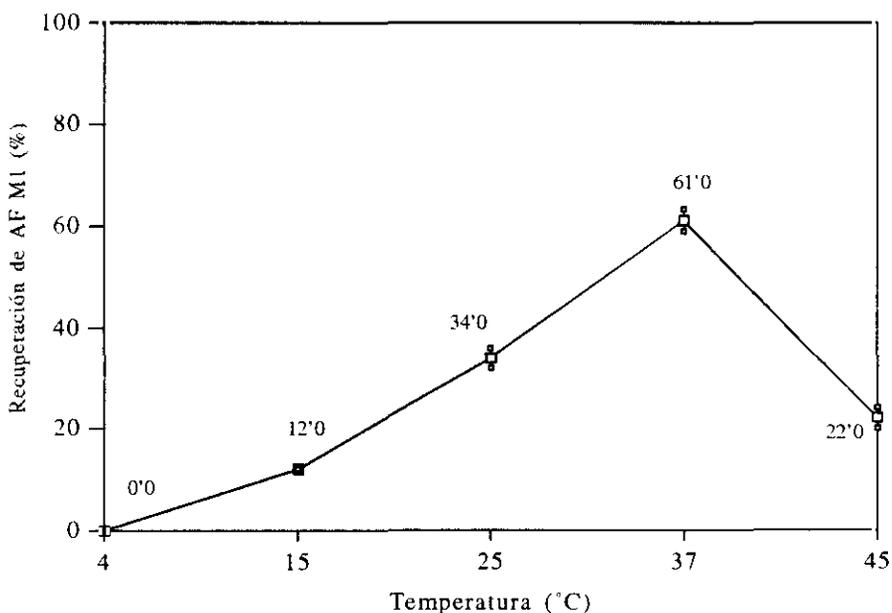


Figura IV.13. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación de 0'045 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF M₁ en yogur mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 ml de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de AF M₁ en acetonitrilo, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción a 37 °C y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada tiempo ensayado.

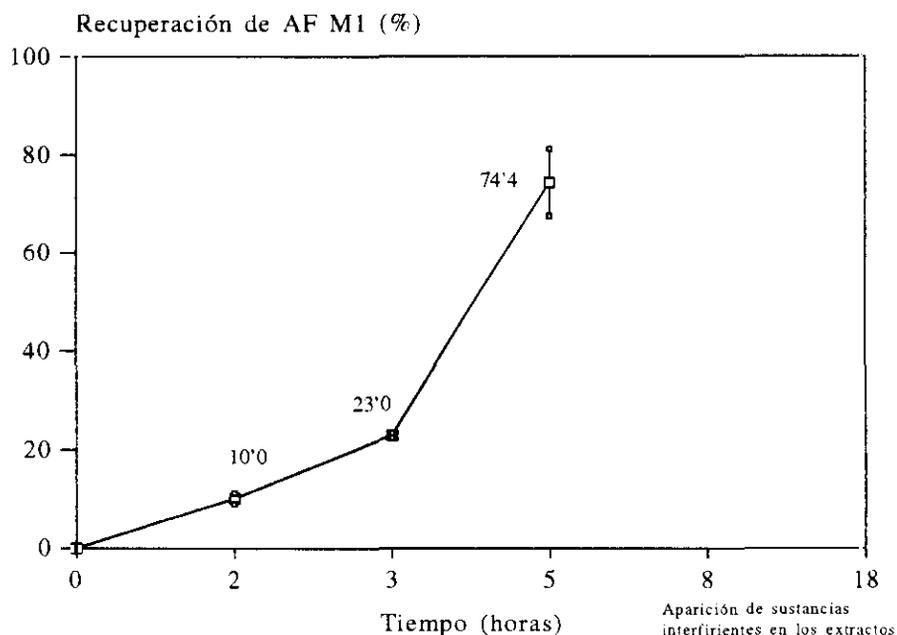


Tabla IV.21. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación de 0'050 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF M₁ de yogur mediante DD. Las extracciones se realizaron en las condiciones siguientes: muestras de 50 ml de yogur comercial contaminado con solución de AF M₁ en cloroformo, 70 ml de triclorometano, 37 °C y 150 rpm.

Tiempo (h)	AF M ₁ añadida (ng)	AF M ₁ detectada (ng)	Rango	% rec. (\bar{x})	CV (n=4)
2	2'50	1'14	1'08-1'27	45'6	6'5
3	2'50	1'41	1'33-1'53	56'4	5'4
5	2'50	2'12	1'83-2'40	84'8	10'6
8	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-

Tabla IV.22. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de 0'045 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF M₁ en muestras de 50 ml de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con distintas soluciones de AF M₁. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

Sol. de AF M ₁ empleada en la contaminación	AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		Rango		(%) rec. (\bar{x})	CV (n=5)
	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng		
Medio AM	0'045	2'25	0'039	1'98	0'033-0'044	1'64-2'20	88'0	10'3
Acetonitrilo	0'045	2'25	0'030	1'50	0'025-0'040	1'26-1'98	66'6	16'7
Cloroformo	0'045	2'25	0'034	1'72	0'029-0'044	1'44-2'18	76'4	16'4

Tabla IV.23. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de 0'050 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF M₁ en muestras de 50 ml de yogur comercial contaminado con solución de AF M₁ en cloroformo. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		Rango		(%) rec. (\bar{x})	CV (n=5)
$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng		
0'050	2'50	0'042	2'09	0'035-0'048	1'74-2'39	83'6	10'5

Tabla IV.24. Límite de determinación de la técnica de DD para la extracción de AF M₁ en muestras de 50 g de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de AF M₁ en medio AM. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		% positivos	(%) recup. (\bar{x})	CV (n=4)
$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng			
0'011	0'55	0'010	0'54	50	98'8	-
0'022	1'10	0'021	1'04	75	94'5	-
0'045	2'25	0'038	1'03	100	85'7	4'8

Figura IV.14. Efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'045 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF G₁ (línea continua) y 0'045 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF B₁ (línea discontinua) en yogur mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 ml de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de cada aflatoxina en acetonitrilo, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada temperatura ensayada.

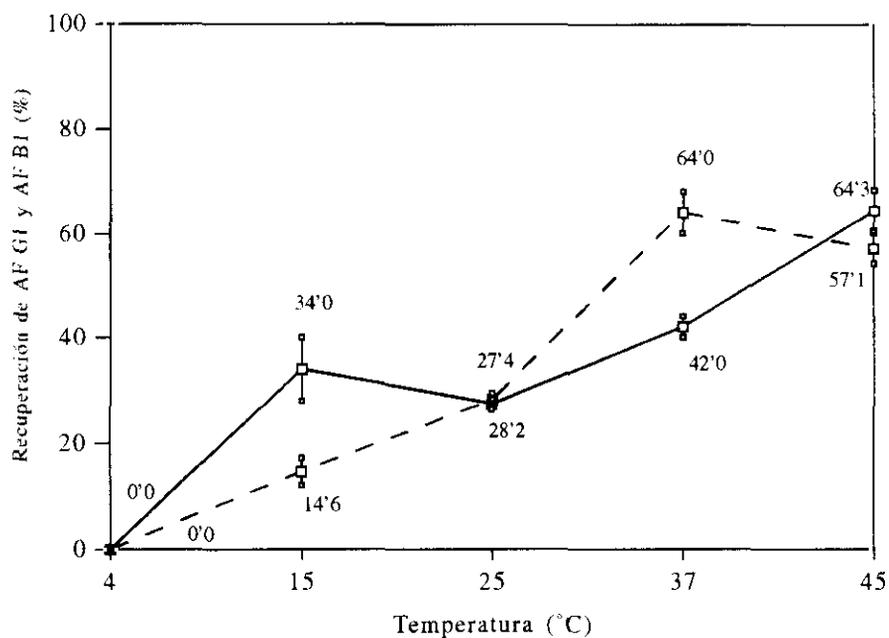


Figura IV.15. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación de 0'045 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF G₁ (línea continua) y 0'045 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF B₁ (línea discontinua) en yogur mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 ml de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de cada aflatoxina en acetonitrilo, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción a 37 °C y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada tiempo ensayado.

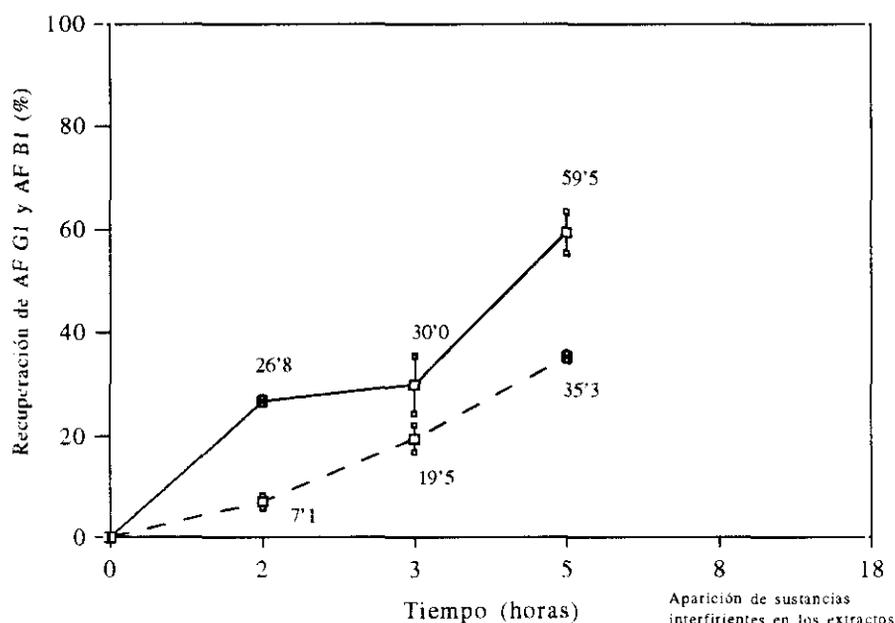


Tabla IV.25. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de 0'045 µg/Kg de AF G₁ y 0'045 µg/Kg de AF B₁ en muestras de 50 ml de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con distintas soluciones de cada aflatoxina. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

Sol. de AF empleada en la contaminación	AF añadida		AF detectada (\bar{x})		Rango		(%) rec. (\bar{x})	CV (n=5)
	µg/Kg	ng	µg/Kg	ng	µg/Kg	ng		
Medio AM	0'045 (G ₁)	2'25	0'038	1'90	0'031-0'043	1'57-2'15	84'4	14'0
	0'045 (B ₁)	2'25	0'035	1'76	0'030-0'037	1'51-2'08	78'2	14'1
Acetonitrilo	0'045 (G ₁)	2'25	0'028	1'40	0'024-0'034	1'22-1'71	62'2	12'7
	0'045 (B ₁)	2'25	0'018	0'89	0'017-0'022	0'86-1'08	39'5	17'9
Cloroformo	0'045 (G ₁)	2'25	0'039	1'96	0'038-0'041	1'89-2'03	87'1	2'5
	0'045 (B ₁)	2'25	0'021	1'08	0'017-0'030	0'87-1'48	48'0	23'0

Tabla IV.26. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de 0'050 µg/Kg de AF G₁ y 0'050 µg/Kg de AF B₁ en muestras de 50 ml de yogur comercial contaminado con solución de cada aflatoxina en cloroformo. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF añadida		AF detectada (\bar{x})		Rango		(%) rec. (\bar{x})	CV (n=5)
µg/Kg	ng	µg/Kg	ng	µg/Kg	ng		
0'050 (G ₁)	2'50	0'029	1'47	0'027-0'034	1'35-1'69	58'8	8'3
0'050 (B ₁)	2'50	0'020	1'02	0'020-0'021	0'99-1'07	40'8	2'6

Tabla IV.27. Límite de determinación de la técnica de DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁ en muestras de 50 g de yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de AF G₁ y solución de AF B₁ en medio AM. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 5 horas y en agitación a 150 rpm.

AF añadida		AF detectada (\bar{x})		% positivos	(%) recup. (\bar{x})	CV (n=4)
$\mu\text{g/Kg}$	ng	$\mu\text{g/Kg}$	ng			
0'011 (AF G ₁)	0'55	0'012	0'59	50	107'2	-
0'011 (AF B ₁)	0'55	0'011	0'54	25	98'2	-
0'022 (AF G ₁)	1'10	0'021	1'05	75	95'4	-
0'022 (AF B ₁)	1'10	0'019	0'96	75	87'2	-
0'045 (AF G ₁)	2'25	0'037	1'85	100	82'2	5'3
0'045 (AF B ₁)	2'25	0'036	1'81	100	80'4	4'8

Tabla IV.28. Resultados del cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de AF M₁, AF G₁ y AF B₁ en yogur. En la tabla se muestra el valor en ng con su media aritmética (\bar{x}) y su desviación estandar (σ), obtenidos a partir de veinte muestras de 50 g de yogur comercial sin contaminar con aflatoxinas (blancos) en las que se realizaba la extracción mediante DD en las condiciones siguientes: 70 ml de cloroformo como solvente de extracción, duración de la DD cinco horas a la temperatura de 37 °C y con agitación orbital de 150 rpm. La detección se efectuaba mediante CCFAE, comprobando el valor de R_f de las aflatoxinas patrón en el que se detectaba el máximo de fluorescencia a 350 nm y realizando el cálculo del valor en ng correspondiente a la señal detectada en el mismo punto de R_f en las calles de los extractos problema.

Blanco	(a)	(b)	(c)
1	0'20	0'07	0'08
2	0'16	0'08	0'04
3	0'20	0'15	0'23
4	0'18	0'05	0'02
5	0'11	0'12	0'10
6	0'09	0'10	0'09
7	0'12	0'07	0'15
8	0'22	0'20	0'03
9	0'14	0'27	0'06
10	0'09	0'32	0'10
11	0'04	0'27	0'05
12	0'13	0'12	0'03
13	0'09	0'09	0'06
14	0'07	0'10	0'06
15	0'06	0'03	0'10
16	0'06	0'03	0'06
17	0'07	0'07	0'05
18	0'07	0'04	0'04
19	0'06	0'21	0'09
20	0'19	0'03	0'03
\bar{x}	0'117	0'126	0'073
σ	0'055	0'065	0'047

(a) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF M₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaca.

(b) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF G₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaca.

(c) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF B_1 en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaca.

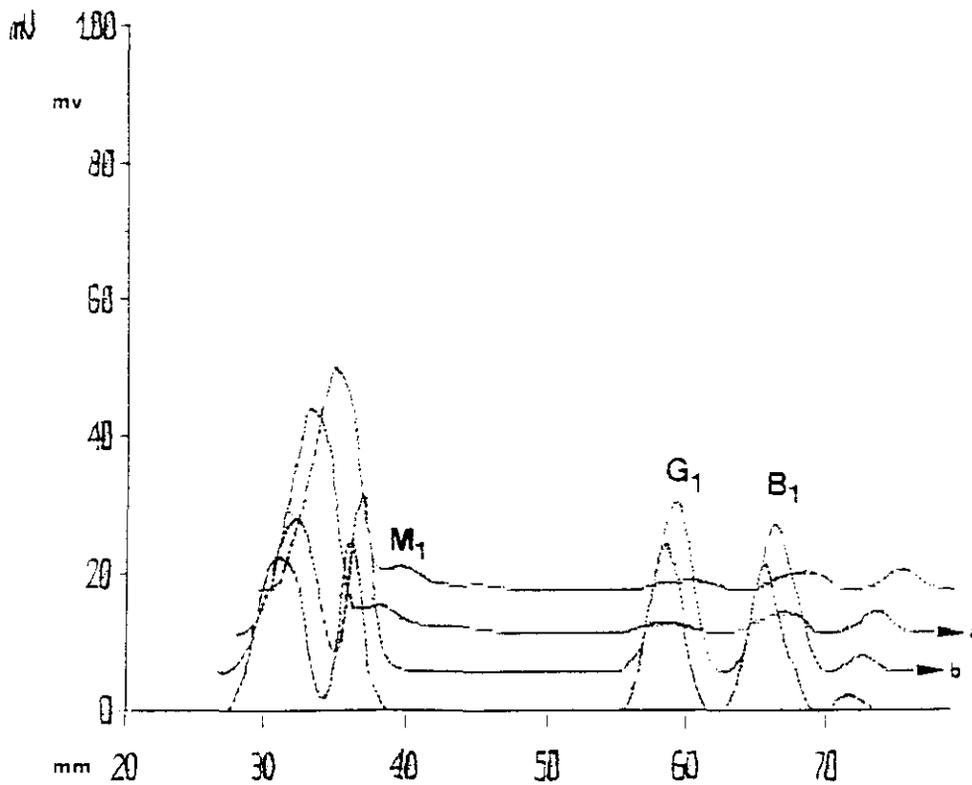
Cálculo: L. D. = $\bar{\chi} + 3 \times \sigma$

L. D.(AF M_1) = $0'117 + 3 \times 0'055 = 0'282$ ng que corresponden a $0'0056$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

L. D.(AF G_1) = $0'126 + 3 \times 0'065 = 0'321$ ng que corresponden a $0'0064$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

L. D.(AF B_1) = $0'073 + 3 \times 0'047 = 0'214$ ng que corresponden a $0'0043$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Figura IV.16. Cromatograma correspondiente a extractos de yogur obtenidos mediante DD. (a) extracto de yogur elaborado a partir de leche contaminada con $0'011$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de las aflatoxinas M_1 , G_1 y B_1 , (b) el mismo extracto anterior con patrón interno de las tres aflatoxinas.



IV. 4. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS EN QUESO CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

En primer lugar se expondrán los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas en el caso del desarrollo de la DD para la extracción de AF M₁ en queso, describiendo posteriormente los resultados obtenidos en la extracción de las aflatoxinas G₁ y B₁ conjuntamente. No obstante, los resultados obtenidos para el límite de detección de la técnica de DD se muestran conjuntamente para las tres aflatoxinas estudiadas en la Tabla IV.35 (pag. 154), así como las condiciones del método definitivo de análisis (Figura IV.22, pag. 156).

Con respecto a la forma de preparación de las muestras de queso, inicialmente se ensayó el empleo de una solución de bicarbonato sódico y una solución de fosfato bisódico, obteniéndose los mejores resultados al emplear la primera de ellas (para un nivel de contaminación de 0'200 µg/Kg de cada aflatoxina). Las extracciones se realizaron a 37 °C durante 5 horas. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron:

- Empleando 70 ml de solución de bicarbonato sódico: 58% (AF M₁), 51% (AF G₁) y 25% (AF B₁).
- Empleando 70 ml de solución de fosfato bisódico: 0% (AF M₁), 23% (AF G₁) y 23% (AF B₁).

A la vista de los resultados, las muestras de queso se prepararon con 70 ml de solución de bicarbonato sódico.

Las condiciones de detección utilizadas fueron en principio las mismas empleadas en los productos lácteos estudiados anteriormente: CCFAE con un sistema de desarrollo vertical y la mezcla triclorometano/metanol (95/5) como solvente de desarrollo. No obstante, al aparecer en las cromatoplasmas sustancias interfirientes con la AF M₁ y no conseguirse en ocasiones la separación completa de la AF G₁ y la AF B₁, lo cual dificultaba su cuantificación, se ensayó el uso de la mezcla triclorometano/metanol (90/10), con la que se obtenía una mejor

resolución, sobre todo cuando el nivel de contaminación de aflatoxinas era $\leq 0'100$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La Figura IV.21 (pag. 155) presenta un cromatograma obtenido a partir de extractos de queso aplicando este sistema.

Por otro lado, y aunque se realizaron algunas pruebas empleando para la fase de detección y cuantificación extractos de 200 μl (volumen final de extracto en el resto de productos lácteos estudiados), se obtuvieron mejores resultados a partir de un volumen de final de extracto de 500 μl ya que se reducía el efecto de la presencia de algunas sustancias interfirientes.

También se probó en uso de cartuchos Sep Pak® de gel de sílice para la purificación de los extractos de queso. Los cromatogramas obtenidos a partir de los extractos purificados con este sistema presentaban menor cantidad de sustancias interfirientes; no obstante, el porcentaje de recuperación de la AF M₁ (para un nivel de contaminación de 0'100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y realizando extracciones de 18 horas a 37 °C), fue mucho menor (40%). Asimismo, en los extractos purificados no se detectó AF G₁ ni AF B₁. A la vista de estos resultados se desestimó el uso de los cartuchos Sep Pak® para la purificación de los extractos.

Las restantes condiciones del método fueron las mismas señaladas en los apartados precedentes: 70 ml de triclorometano como solvente de extracción, colocado en el interior de membranas de diálisis de 60 cm de longitud y velocidad de agitación de 150 rpm.

IV. 4. 1. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF M₁

La Figura IV.17 representa los resultados obtenidos en las pruebas realizadas para comprobar la influencia de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF M₁ en queso, llevando a cabo la DD durante un periodo de 5 horas. En la gráfica se observa que los mejores resultados se obtuvieron realizando la DD a 45 °C. No obstante, los cromatogramas obtenidos empleando esta temperatura presentaban gran cantidad de sustancias interfirientes, siendo por

tanto más difícil realizar una cuantificación correcta.

En la Figura IV.18 se muestran los resultados de las experiencias realizadas para comprobar la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de 0'200 µg/Kg de AF M₁ en queso, realizando las extracciones a 37 °C. Los mejores resultados se obtuvieron con un periodo de DD de 18 horas (92'7%), aunque los resultados correspondientes a las extracciones de ocho horas también mostraron recuperaciones elevadas (86'5%). El porcentaje de recuperación obtenido a las cinco horas de extracción fue del 62'8%, presentando menos sustancias interfirientes los cromatogramas correspondientes a este periodo.

La Tabla IV.29 muestra los resultados correspondientes al estudio del efecto de la adición de 5 ml de solución preservadora durante la fase de preparación de las muestras de queso sobre la recuperación de 0'200 µg/Kg de AF M₁. Las extracciones se realizaron durante un periodo de 5 y 18 horas a 37 °C y 150 rpm. El porcentaje de recuperación más elevado correspondió en todos los casos a las muestras preparadas con solución preservadora, obteniéndose un incremento en la recuperación de aproximadamente un 10% con respecto a las muestras a las que no se añadió esta solución. Asimismo, se comprobó que la muestra preparada de esta forma mantenía una consistencia uniforme a lo largo de todo el periodo de DD, no produciéndose precipitados. A la vista de los resultados, se decidió emplear en todas las experiencias realizadas posteriormente 65 ml de solución de bicarbonato sódico al 0'3% y 5 ml de solución preservadora para la preparación de las muestras de queso.

En la Tabla IV.30 aparecen los resultados correspondientes al porcentaje de recuperación obtenido a partir de muestras de 50 g de queso contaminadas a un nivel de 0'100 µg/Kg de AF M₁. Las extracciones se realizaron a 37 °C durante 18 horas. El porcentaje de recuperación fue de un 89'4%.

Con respecto al límite de determinación los resultados aparecen en la Tabla IV.31. El límite establecido se encuentra entre 0'060 y 0'080 µg/Kg.

IV. 4. 2. Resultados del desarrollo de la DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁

En la Figura IV.19 se muestran los resultados de las experiencias realizadas para estudiar la influencia de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'200 µg/Kg de cada aflatoxina en muestras de 50 g de queso. En la gráfica se observa que los mejores resultados para estas dos aflatoxinas se obtuvieron al realizar la DD a 37 °C (60'0 y 38'5% respectivamente).

En la Figura IV.20 aparecen los resultados de las experiencias realizadas para comprobar la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de 0'200 µg/Kg de cada aflatoxina en queso. Los mejores resultados se obtuvieron con un periodo de DD de 18 horas en ambos casos (90'6 y 59'3% respectivamente).

La Tabla IV.32 muestra los resultados correspondientes al estudio del efecto de la adición de 5 ml de solución preservadora durante la fase de preparación de las muestras de queso sobre la recuperación de 0'200 µg/Kg de cada aflatoxina. Las extracciones se realizaron durante un periodo de 5 y 18 horas a 37 °C y 150 rpm. En el caso de la AF G₁ el porcentaje de recuperación más elevado correspondió a las muestras preparadas con solución preservadora, aunque las diferencias no fueron muy considerables. En el caso de la AF B₁ no aparecieron diferencias en las extracciones de 5 horas, recuperándose a las 18 horas menor cantidad de aflatoxina (5% menos) a partir de las muestras preparadas con solución preservadora. No obstante, a partir de este momento se decidió emplear 5 ml de esta solución junto con 65 ml de bicarbonato sódico al 0'3% para la preparación de las muestras utilizadas en el resto de las experiencias cuyos resultados se detallan a continuación.

La Tabla IV.33 muestra los resultados correspondientes a la recuperación de 0'100 µg/Kg de AF G₁ y 0'100 µg/Kg de AF B₁ en muestras de queso. Las extracciones se realizaron durante un periodo de 18 horas a 37 °C y 150 rpm. El porcentaje de recuperación más bajo correspondió a la AF B₁ (65'0%) frente al

73'2% obtenido para la AF G₁.

Con respecto al límite de determinación los resultados aparecen en la Tabla IV.34. El límite establecido se encuentra entre 0'040 y 0'060 µg/Kg para las dos aflatoxinas.

IV. 4. 3. Método definitivo desarrollado

Los resultados obtenidos permiten la aplicación de la DD a la extracción conjunta de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ en queso, si bien puede ser necesario emplear distintas proporciones de la mezcla triclorometano/metanol, para obtener la resolución adecuada. Las condiciones definitivas para la realización del método son las siguientes:

- Muestras de queso de 50 g.
- Preparación de las muestras con 65 ml de bicarbonato sódico al 0'3% y 5 ml de solución preservadora.
- 70 ml de triclorometano en el interior de una membrana de diálisis de 60 cm de longitud.
- Tiempo de extracción de 18 horas.
- Temperatura de extracción de 37 °C.
- Agitación a 150 rpm.

Figura IV.17. Efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF M₁ en queso mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 g de queso, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada temperatura ensayada.

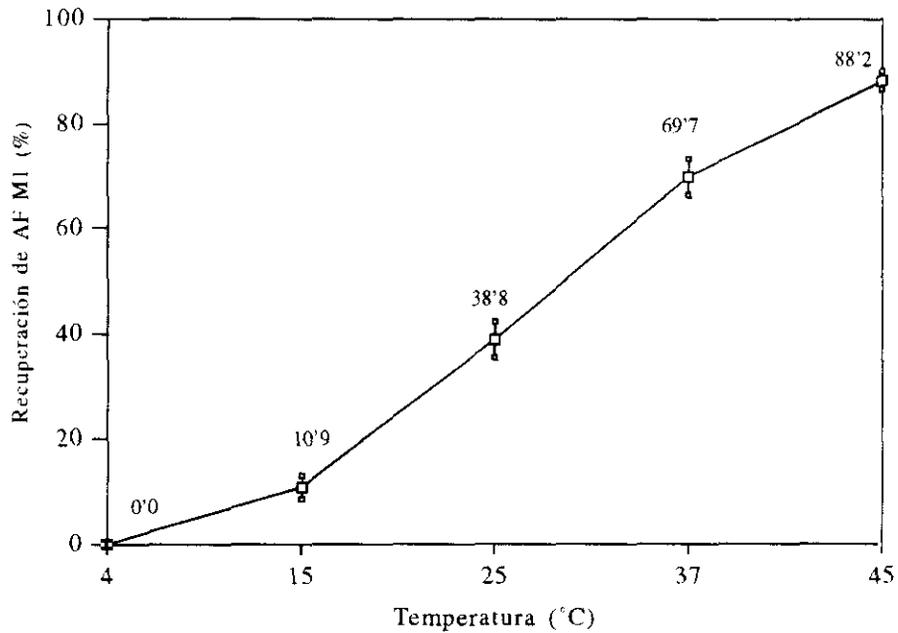


Figura IV.18. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación de 0'20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AF M₁ en queso mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 g de queso, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción a 37 °C y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada tiempo ensayado.

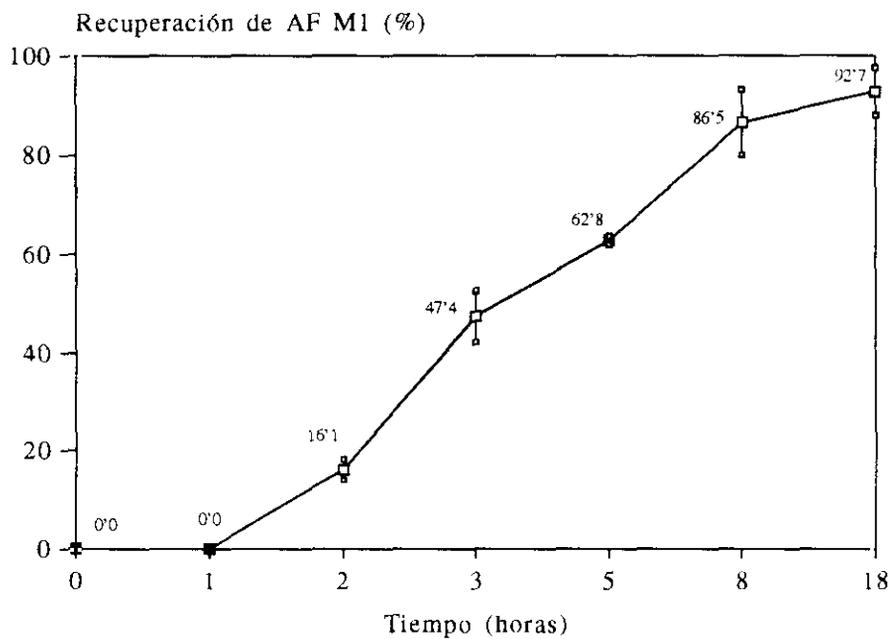


Tabla IV.29. Efecto de la adición de solución preservadora (5 ml) a las muestras de queso, en la recuperación de 0'200 µg/Kg de AF M₁ mediante DD. Las condiciones de extracción fueron: 70 ml de triclorometano como solvente, 37 °C, 5 y 18 horas de extracción y agitación a 150 rpm.

Preparación de las muestras	Tiempo (h)	AF M ₁ añadida (ng)	AF M ₁ detectada (ng)		AF M ₁ detectada (\bar{x})	% rec. (\bar{x})
			1ª experiencia	2ª experiencia		
Sin solución preservadora	5	10'00	3'53	3'23	3'38	33'8
	18	10'00	5'65	6'66	6'15	61'5
Con solución preservadora	5	10'00	5'11	4'45	4'79	47'9
	18	10'00	7'36	8'09	7'72	77'2

Tabla IV.30. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de AF M₁ en muestras de 50 g de queso (preparadas con 65 ml de solución de bicarbonato sódico y 5 ml de solución preservadora), contaminadas a una concentración de 0'100 µg/Kg. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 18 horas y en agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		Rango		% rec. (\bar{x})	CV
µg/Kg	ng	µg/Kg	ng	µg/Kg	ng		
0'100	5'00	0'089	4'47	0'070-0'110	3'50-5'50	89'4	17'1 (n=5)

Tabla IV.31. Límite de determinación de la técnica de DD para la extracción de AF M₁ en muestras de 50 g de queso (preparadas con 65 ml de sol. de bicarbonato y 5 ml de sol. preservadora). Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 18 h y en agitación a 150 rpm.

AF M ₁ añadida		AF M ₁ detectada (\bar{x})		% positivos	% rec (\bar{x})	CV (n=3)
µg/kg	ng	µg/Kg	ng			
0'040	2'00	-	-	-	-	-
0'060	3'00	0'054	2'69	33'3	89'6	-
0'080	4'00	0'075	3'75	99'9	93'7	4'7
0'100	5'00	0'082	4'10	99'9	82'0	11'1

Figura IV.19. Efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de 0'20 µg/Kg de AF G₁ (línea continua) y 0'20 µg/Kg de AF B₁ (línea discontinua) en queso mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 g de queso, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción de 5 horas y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada temperatura ensayada.

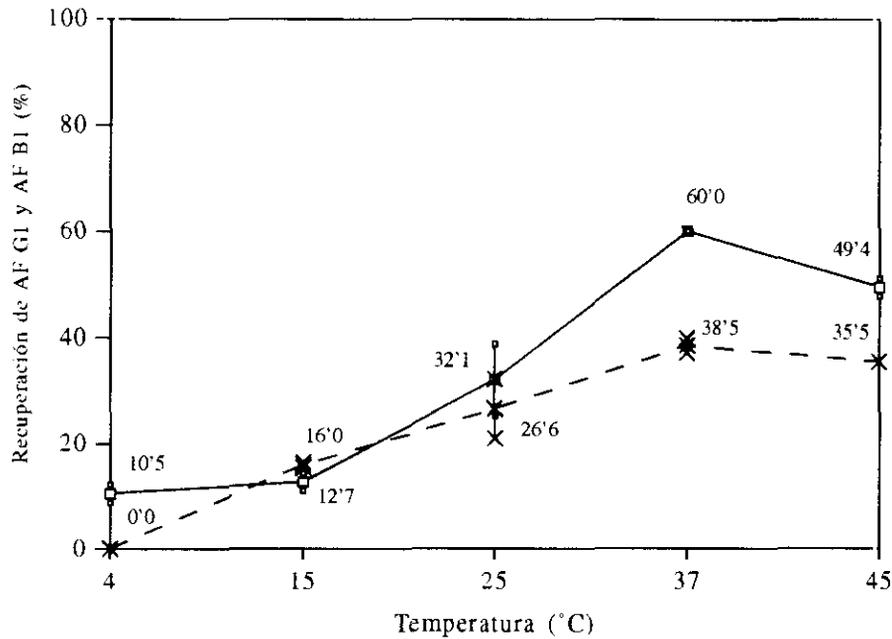


Figura IV.20. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación de 0'20 µg/Kg de AF G₁ (línea continua) y 0'20 µg/Kg de AF B₁ (línea discontinua) en queso mediante extracción por DD. Las condiciones de las experiencias fueron: muestras de 50 g de queso, 70 ml de triclorometano como solvente, extracción a 37 °C y agitación a 150 rpm. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación medio (en cifras), máximo y mínimo obtenidos para cada tiempo ensayado.

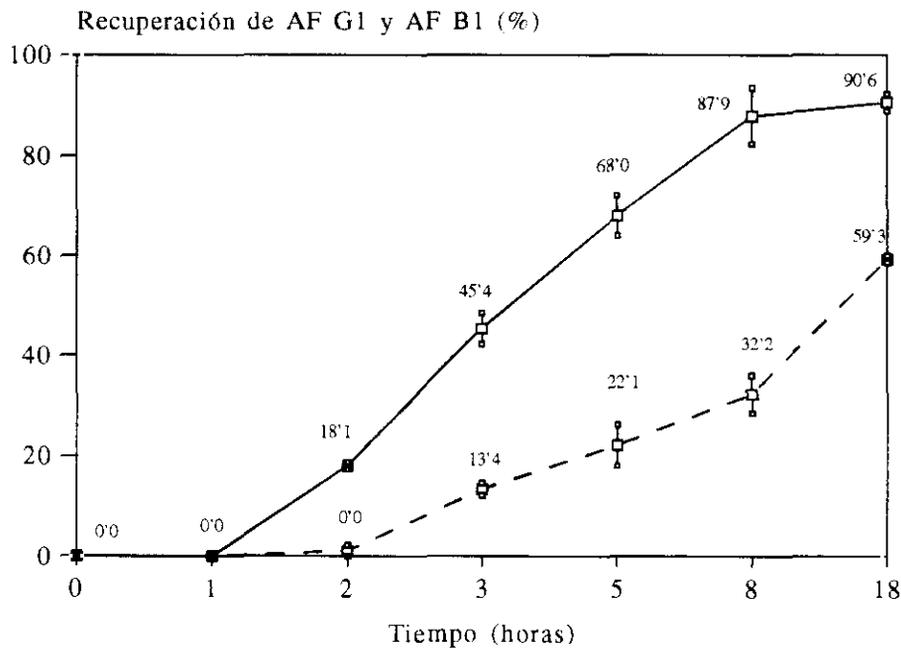


Tabla IV.32. Efecto de la adición de solución preservadora (5 ml) a las muestras de queso, en la recuperación de 0'200 µg/Kg de AF G₁ y 0'200 µg/Kg de AF B₁ mediante DD. Las condiciones de extracción fueron: 70 ml de triclorometano como solvente, 37 °C, 5 y 18 horas de extracción y agitación a 150 rpm.

Preparación de las muestras	Tiempo (h)	AF añadida (ng)	AF detectada (ng)		AF detectada (\bar{x})	% rec. (\bar{x})
			1ª experiencia	2ª experiencia		
Sin solución preservadora	5	10'00 (G ₁)	4'36	3'62	3'99	39'9
		10'00 (B ₁)	2'08	2'66	2'37	23'7
	18	10'00 (G ₁)	7'72	7'77	7'74	77'4
		10'00 (B ₁)	4'90	3'78	4'34	43'4
Con solución preservadora	5	10'00 (G ₁)	4'78	3'91	4'34	43'4
		10'00 (B ₁)	1'95	2'73	2'35	23'4
	18	10'00 (G ₁)	6'38	8'12	8'01	80'1
		10'00 (B ₁)	3'90	2'66	3'28	32'8

Tabla IV.33. Porcentaje de recuperación de la técnica de DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁ en muestras de 50 g de queso (preparadas con 65 ml de solución de bicarbonato sódico y 5 ml de solución preservadora), contaminadas a una concentración de 0'100 µg/Kg de cada aflatoxina. Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 18 horas y en agitación a 150 rpm.

AF añadida		AF detectada (\bar{x})		Rango		% rec. (\bar{x})	CV
µg/Kg	ng	µg/Kg	ng	µg/Kg	ng		
0'100 (G ₁)	5'00	0'073	3'66	0'056-0'079	2'81-3'95	73'2	16'0 (n=5)
0'100 (B ₁)	5'00	0'065	3'25	0'058-0'073	2'93-3'66	65'0	7'3 (n=5)

Tabla IV.34. Límite de determinación de la técnica de DD para la extracción de AF G₁ y AF B₁ en muestras de 50 g de queso (preparadas con 65 ml de sol. de bicarbonato y 5 ml de sol. preservadora). Las extracciones se realizaron empleando 70 ml de triclorometano como solvente, a 37 °C, durante 18 h y en agitación a 150 rpm.

AF añadida		AF detectada (\bar{x})		% positivos	% rec (\bar{x})	CV (n=3)
$\mu\text{g}/\text{kg}$	ng	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	ng			
0'040 (G ₁)	2'00	0'041	2'05	66'6	102'5	-
0'040 (B ₁)	2'00	0'039	1'98	99'9	99'2	4'7
0'060 (G ₁)	3'00	0'051	2'55	99'9	86'6	3'2
0'060 (B ₁)	3'00	0'056	2'78	99'9	92'6	2'5
0'080 (G ₁)	4'00	0'076	3'82	99'9	95'5	5'4
0'080 (B ₁)	4'00	0'059	2'96	99'9	74'0	4'2
0'100 (G ₁)	5'00	0'080	4'07	99'9	81'4	3'1
0'100 (B ₁)	5'00	0'071	3'57	99'9	71'4	14'1

Tabla IV.35. Resultados del cálculo del límite de detección de la DD para la extracción de AF M₁, AF G₁ y AF B₁ en queso. La tabla muestra el valor en ng con su media aritmética (\bar{x}) y desviación estandar (σ), obtenidos a partir de veinte muestras de 50 g de queso comercial sin contaminar con aflatoxinas (blancos) en las que se realizaba la extracción mediante DD en las condiciones siguientes: 70 ml de cloroformo como solvente de extracción, duración de la DD dieciocho horas a la temperatura de 37 °C y con agitación orbital de 150 rpm. La detección se efectuaba mediante CCFAE, comprobando el valor de R_f de las aflatoxinas patrón en el que se detectaba el máximo de fluorescencia a 350 nm y realizando el cálculo del valor en ng correspondiente a la señal detectada en el mismo punto de R_f en las calles de los extractos problema.

Blanco	(a)	(b)	(c)
1	0'23	1'04	0'04
2	0'24	0'44	0'14
3	0'24	0'86	0'29
4	0'23	0'96	0'23
5	0'22	0'22	0'16
6	0'99	0'09	0'06
7	0'53	0'18	0'15
8	0'52	0'18	0'10
9	0'57	0'11	0'16
10	1'30	0'16	0'15
11	0'66	0'18	0'14
12	1'23	0'69	0'40
13	0'06	1'03	0'22
14	0'22	1'51	0'29
15	0'27	0'18	0'10
16	0'40	0'74	0'19
17	0'48	0'20	0'18
18	0'13	0'15	0'05
19	0'23	0'47	0'09
20	0'10	0'08	0'07
\bar{x}	0'442	0'473	0'160
σ	0'349	0'408	0'089

(a) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF M₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaqa.

(b) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF G₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaqa.

(c) cantidad en ng en cada blanco correspondiente a la señal obtenida en el valor de R_f del patrón de AF B₁ en el punto de máxima fluorescencia detectado en la cromatoplaca.

Cálculo: L. D. = $\bar{\chi} + 3 \times \sigma$

L. D.(AF M₁) = $0'442 + 3 \times 0'349 = 1'489$ ng que corresponden a $0'0298$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

L. D.(AF G₁) = $0'473 + 3 \times 0'408 = 1'697$ ng que corresponden a $0'0339$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

L. D.(AF B₁) = $0'160 + 3 \times 0'087 = 0'421$ ng que corresponden a $0'0084$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Figura IV.21. Cromatograma correspondiente a extractos de queso obtenidos mediante DD. (1) registro perteneciente a muestras de queso contaminadas con $0'06$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁, (2) registro de extractos contaminados a los que se añadió patrón interno de las aflatoxinas.

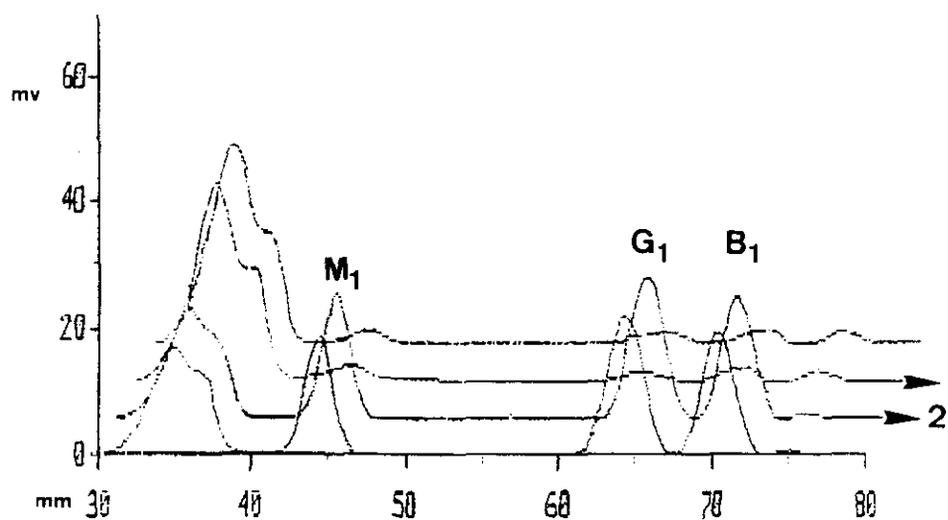
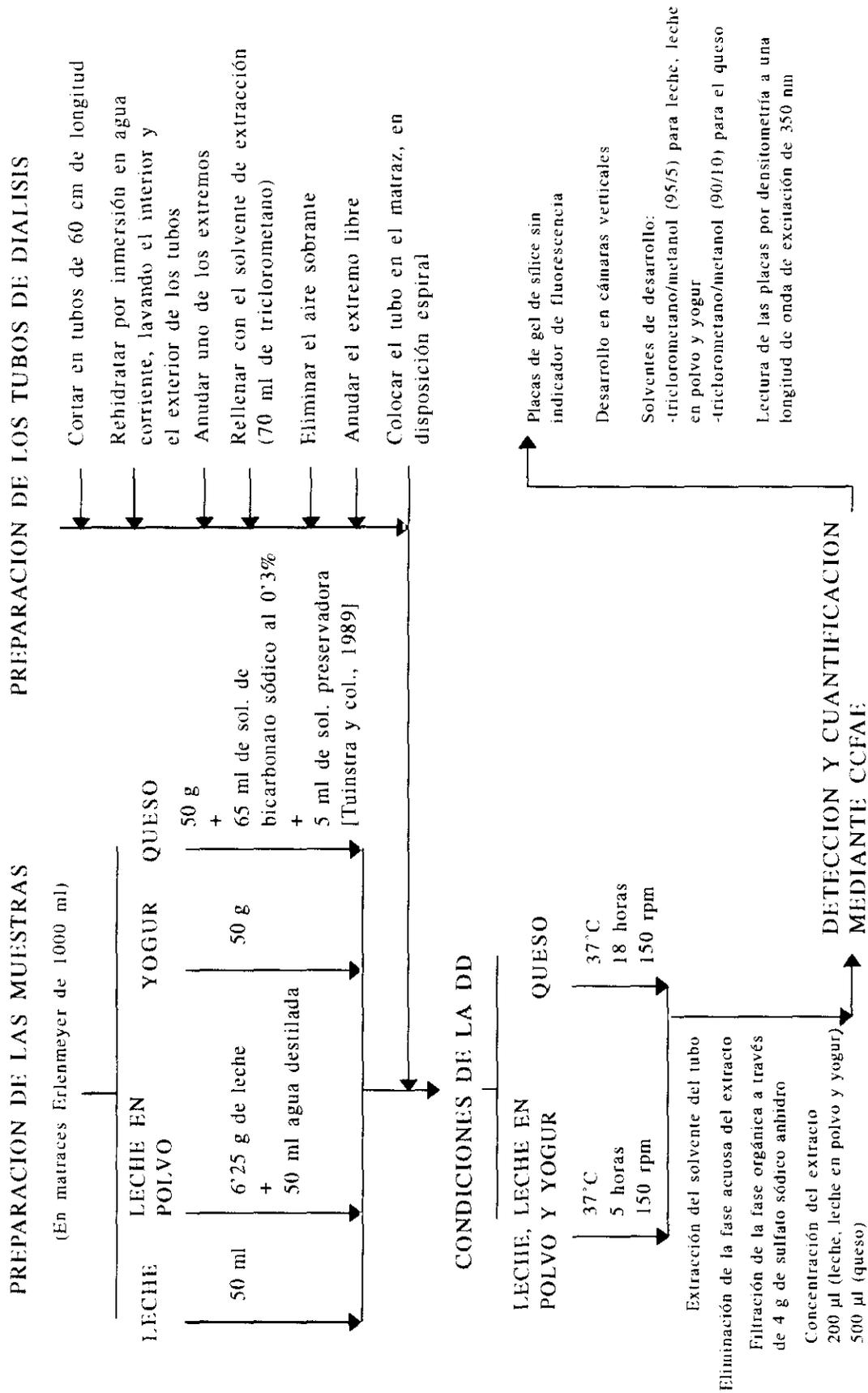


Figura IV.22. Esquema del método definitivo de análisis de aflatoxinas en productos lácteos mediante extracción por DD y detección por CCFAE.



IV. 5. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA TECNICA DE MINI-DD PARA LA EXTRACCION DE AF M₁ EN LECHE CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

En relación al establecimiento de las condiciones de detección, se empleó el sistema aplicado a los extractos de leche obtenidos mediante DD, es decir, CCFAE con un sistema de desarrollo vertical y la mezcla triclorometano/metanol (95/5) como solvente de desarrollo.

Todas las pruebas para la puesta a punto de la técnica de mini-DD en leche se han realizado utilizando 14 ml de triclorometano colocado en el interior de las membranas de diálisis. Las muestras (10 ml de leche) se contaminaron con solución de AF M₁ en medio AM y en todos los casos la velocidad de agitación empleada durante la DD fue de 150 rpm y la temperatura de extracción 37 °C.

El efecto del tiempo de extracción en el porcentaje de recuperación de 0'05 µg/l de AF M₁ mediante mini-DD se muestra en la Tabla IV.36 y en la Figura IV.23, donde se observa que a partir de las 2 horas de extracción el porcentaje se mantiene prácticamente estable (50%).

Los resultados de las pruebas realizadas para el cálculo del límite de determinación de la técnica de mini-DD con extracciones de una y dos horas aparecen en la Tablas IV.37. En ambos casos el límite de determinación se fijó entre 0'04 y 0'05 µg/l.

También se realizaron pruebas para comprobar el efecto de la contaminación de las muestras con solución de AF M₁ en medio AM y acetonitrilo, realizando extracciones de 1 hora. Los resultados aparecen en la Tabla IV.38, no habiendo diferencias significativas entre las dos formas de contaminación analizadas.

A partir de los resultados obtenidos las condiciones definitivas para la realización del método son las siguientes:

- Muestras de leche de 10 ml.
- 14 ml de triclorometano en el interior de una membrana de diálisis de 20 cm de longitud.
- Tiempo de extracción de 2 horas.
- Temperatura de extracción de 37 °C.
- Agitación a 150 rpm.

El protocolo definitivo se muestra en la Figura IV.24.

Tabla IV.36. Influencia del tiempo de extracción sobre el porcentaje de recuperación de AF M₁ en leche, empleando el método de mini-DD como técnica de extracción y CCFAE como sistema de detección. Los experimentos se realizaron empleando muestras de leche de 10 ml contaminadas con un nivel de AF M₁ de 0'05 µg/l (correspondientes a 0'500 ng) y utilizando 14 ml de triclorometano como solvente. Las extracciones se efectuaron a 37 °C, 150 rpm y durante 1, 2, 3, 4 y 5 horas.

Tiempo (h)	AF M ₁ añadida (ng)	(\bar{x}) AF M ₁ detectada (ng)	Rango (ng)	% rec. (\bar{x})	CV (n=4)
1	0'500	0'181	0'166-0'197	36'2	6'3
2	0'500	0'252	0'237-0'264	50'4	4'1
3	0'500	0'247	0'208-0'291	49'4	13'8
4	0'500	0'222	0'166-0'264	44'4	16'4
5	0'500	0'251	0'198-0'318	50'2	19'9

Figura IV.22. Influencia del tiempo de extracción en el porcentaje de recuperación de AF M₁ en muestras de 10 ml de leche contaminadas a un nivel de 0'05 µg/l y realizando la extracción mediante mini-DD. Las extracciones se llevaron a cabo a 37 °C, con agitación a 150 rpm y empleando 14 ml de triclorometano como solvente. En la figura se expresa el porcentaje de recuperación medio (valor en cifras), mínimo y máximo obtenido en 4 experiencias.

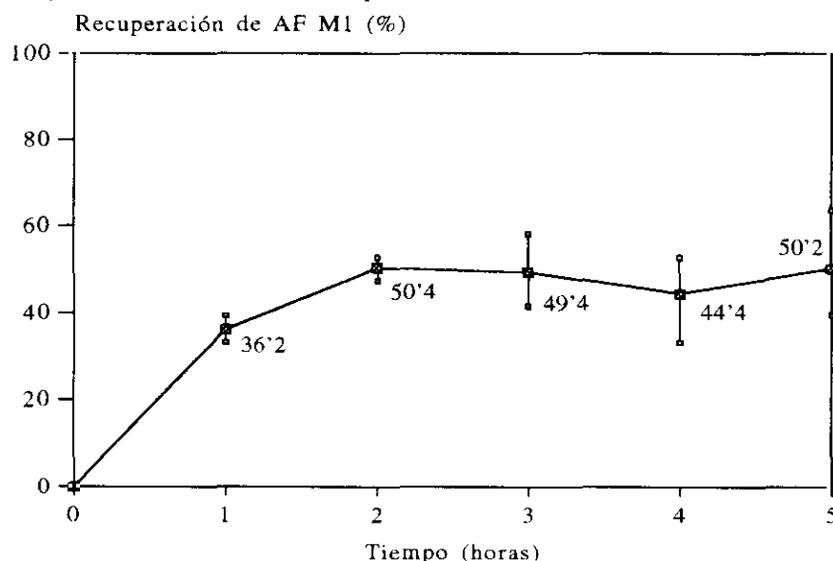


Tabla IV.37. Cálculo del límite de determinación de la técnica de mini-DD para la extracción de AF M₁ en leche. Para las pruebas se tomaron muestras de 10 ml de leche contaminadas con 0'03, 0'04, 0'05, 0'08 y 0'10 µg/l de AF M₁ (correspondientes a 0'3, 0'4, 0'5, 0'8 y 1'0 ng). Las extracciones se realizaron a 37 °C, durante 1 y 2 horas, a 150 rpm y empleando 14 ml de triclorometano como solvente de extracción.

Extracción de 1 hora							
AF M ₁ añadida		% Positivos	AF M ₁ detectada (\bar{x})		Rango (ng)	% rec. (\bar{x})	CV (n=4)
(ng)	(µg/l)		(ng)	(µg/l)			
0'300	0'030	-	-	-	-	-	-
0'400	0'040	50	0'168	0'016	0'147-0'189	42'0	-
0'500	0'050	100	0'181	0'018	0'166-0'197	36'2	6'3
0'800	0'080	100	0'250	0'025	0'184-0'300	31'2	16'9
1'000	0'100	100	0'304	0'030	0'270-0'333	30'4	7'6

El valor medio de AF M₁ detectado, el rango y el valor medio del porcentaje de recuperación están referidos a los experimentos con resultados positivos.

Extracción de 2 horas							
AF M ₁ añadida		% Positivos	AF M ₁ detectada (\bar{x})		Rango (ng)	% rec. (\bar{x})	CV (n=4)
(ng)	(µg/l)		(ng)	(µg/l)			
0'300	0'030	-	-	-	-	-	-
0'400	0'040	50	0'206	0'020	0'198-0'214	51'5	-
0'500	0'050	100	0'252	0'025	0'237-0'264	50'4	4'1
0'800	0'080	100	0'406	0'040	0'377-0'443	50'7	6'1
1'000	0'100	100	0'597	0'059	0'495-0'690	59'7	12'0

El valor medio de AF M₁ detectado, el rango y el valor medio del porcentaje de recuperación están referidos a los experimentos con resultados positivos.

Tabla IV.38. Efecto del tipo de solución de AF M₁ utilizado para la contaminación de muestras de 10 ml de leche al nivel de 0'050 µg/l (correspondientes a 0'500 ng de aflatoxina). La extracción se realizó mediante mini-DD durante un periodo de 1 hora a 37 °C y 150 rpm, empleando 14 ml de triclorometano como solvente.

	AF M ₁ añadida (ng)	(\bar{x}) AF M ₁ de- tectada (ng)	% rec. (\bar{x})	CV (n=3)
AF M ₁ en medio AM	0'500	0'165	33'0	5'8
AF M ₁ en acetonitrilo	0'500	0'180	36'0	2'6

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

(En matraces Erlenmeyer de 100 ml)

10 ml de leche

CONDICIONES DE LA DD

37°C
2 horas
150 rpm

PASOS POSTERIORES A LA DD

Extracción del solvente del tubo

Filtración del extracto a través
de 2 g de sulfato sódico anhidro

Concentración del extracto
a 80 µl

DETECCION Y CUANTIFICACION MEDIANTE CCFAE

PREPARACION DE LOS TUBOS DE DIALISIS

Cortar en tubos de 20 cm de longitud

Rehidratar por inmersión en agua
corriente, lavando el interior y
el exterior de los tubos

Anudar uno de los extremos

Rellenar con el solvente de extracción
(14 ml de triclorometano)

Eliminar el aire sobrante

Anudar el extremo libre

Colocar el tubo en el matraz, en
disposición espiral

Placas de gel de sílice sin
indicador de fluorescencia

Desarrollo en cámaras verticales

Solvente de desarrollo:
-triclorometano/metanol (95/5)

Lectura de las placas por densitometría a una
longitud de onda de excitación de 350 nm

Figura IV.24. Esquema del método definitivo de análisis de AF M₁ en leche mediante extracción por mini-DD y detección posterior por CCFAE.

IV. 6. DETERMINACION DE AF M₁ EN LECHE COMERCIAL MEDIANTE EXTRACCION POR DD Y DETECCION POR CCFAE

Todas las extracciones realizadas en este estudio se han llevado a cabo empleando las condiciones definitivas del método de DD para la extracción de AF M₁ en leche: muestras de 50 ml, 70 ml de triclorometano colocado en el interior de una membrana de diálisis de 60 cm, extracción de 5 horas, a 37 °C y 150 rpm.

En la Figura IV.25 se muestran los resultados globales correspondientes al análisis de 100 muestras de leche comercial correspondientes a 50 lotes diferentes. El porcentaje de muestras positivas fue del 14%, aunque en un 3% de ellas la cantidad de AF M₁ detectada se encontraba en el intervalo correspondiente al límite de determinación establecido para la técnica. En aquellos lotes en que se detectaron muestras positivas, la AF M₁ apareció en todos los casos en las dos unidades analizadas. Es de destacar que en los análisis efectuados sobre leche pasteurizada sólo aparecieron dos muestras positivas (pertenecientes al mismo lote y a la marca de mayor distribución) cuyo contenido en AF M₁ fue de 0'020 y 0'025 µg/l. Por otro lado, no se detectó AF M₁ en ninguna de las 12 muestras de leche semidesnatada UHT analizadas.

La Figura IV.26 presenta los resultados del muestreo en función de la cantidad de AF M₁ detectada. Asimismo, en la Tabla IV.39 se muestran los resultados obtenidos para cada muestra analizada, tanto en cantidad de AF M₁ detectada como cantidad estimada según el porcentaje de recuperación de la técnica (96'3%). El valor medio de AF M₁ detectada corresponde a 0'026 µg/l, siendo el rango entre 0'018 y 0'042 µg/l.

En la Tabla IV.40 se presentan los resultados agrupando las muestras en función de la fecha de adquisición. Como puede observarse, la distribución de muestras positivas fue bastante homogénea a los largo del estudio, destacándose tan solo la ausencia de muestras positivas en los lotes analizados en el mes de marzo. Por otro lado, en la Figura IV.27 aparecen los resultados obtenidos para

cada fabricante, expresados como porcentaje de muestras positivas con respecto al total de positivos detectados y como porcentaje de muestras positivas dentro del total de muestras analizadas de cada fabricante. También se expresa el valor medio de concentración de AF M₁ encontrado en cada marca analizada. De las once marcas analizadas sólo aparecieron muestras positivas en cuatro de ellas, correspondiendo el 57% de las muestras positivas y las de nivel de contaminación más alto al mismo fabricante.

Finalmente, la Figura IV.28 incluye varios cromatogramas en los que aparecen muestras positivas y negativas.

Figura IV.25. Incidencia de AF M₁ en 100 muestras de leche adquiridas en un establecimiento de Madrid y analizadas mediante extracción por DD y detección y cuantificación mediante CCFAE. Las condiciones de extracción fueron: 70 ml de triclorometano como solvente, 37 °C, 5 horas y agitación a 150 rpm.

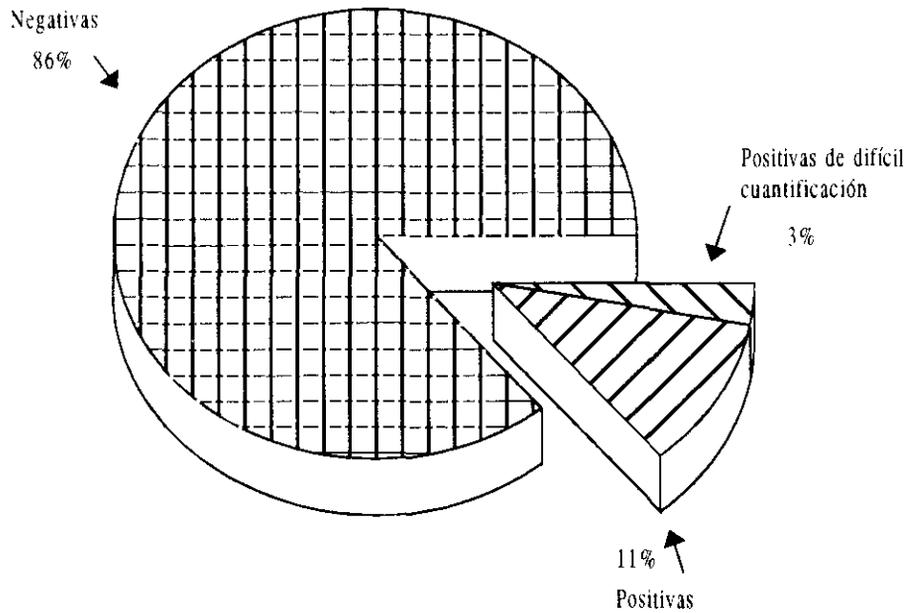


Figura IV.26. Distribución de las muestras analizadas en función del nivel de AF M₁ detectado (µg/l).

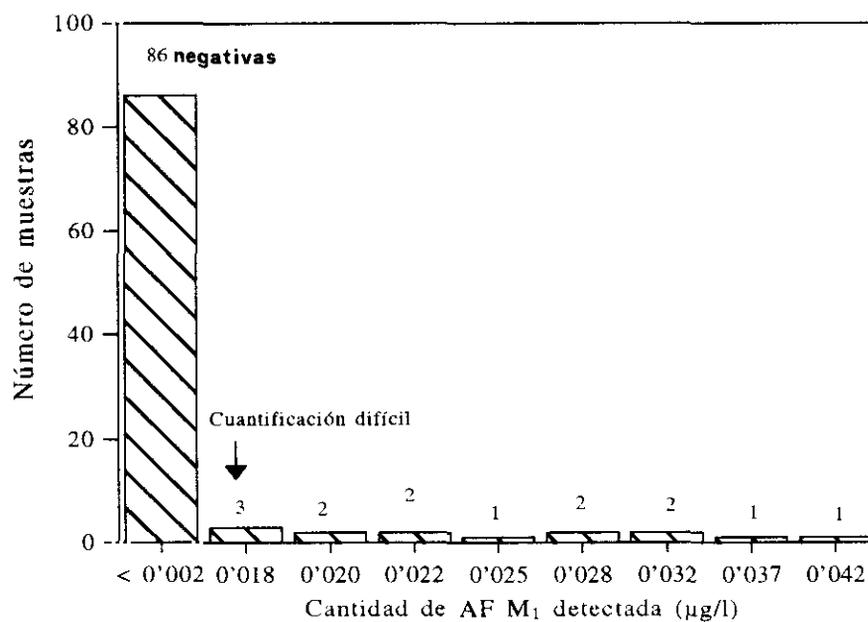


Tabla IV.39. Presencia de AF M₁ en leche comercial (50 lotes diferentes y dos unidades por cada lote), analizados mediante extracción por DD y detección mediante CCFAE. La tabla muestra las cantidades de AF M₁ detectadas y su media aritmética (\bar{x}) en µg/l así como la cantidad de AF M₁ estimada y su media aritmética (\bar{x}) en µg/l, tomando como porcentaje de recuperación de la técnica de DD el valor 96'30%. Las muestras se expresan con un número correspondiente a la fase del muestreo y una letra que corresponde a cada marca analizada.

Muestra	AF M ₁ (µg/l)	
	Detectada	Estimada
1A	-	-
	-	-
1B	-	-
	-	-
1C	-	-
	-	-
1D	-	-
	-	-
1E	-	-
	-	-
1F	-	-
	-	-
1G	0'032	0'033
	0'018	0'019
1H	-	-
	-	-
1I	-	-
	-	-
2A	-	-
	-	-
2B	-	-
	-	-
2C	-	-
	-	-

Muestra	AF M ₁ (µg/l)	
	Detectada	Estimada
2D	-	-
	-	-
2E	-	-
	-	-
2F	-	-
	-	-
2G	0'028	0'029
	0'042	0'043
2H	0'024	0'025
	0'032	0'033
2I	-	-
	-	-
3A	-	-
	-	-
3B	-	-
	-	-
3C	-	-
	-	-
3D	-	-
	-	-
3E	-	-
	-	-
3F	-	-
	-	-

Tabla IV.39. continuación.

Muestra	AF M ₁ (µg/l)	
	Detectada	Estimada
3G	-	-
	-	-
3J	-	-
	-	-
4A	-	-
	-	-
4B	-	-
	-	-
4C	-	-
	-	-
4D	-	-
	-	-
4E	-	-
	-	-
4F	-	-
	-	-
4G	0'018	0'019
	0'018	0'019
4I	-	-
	-	-
4J	-	-
	-	-
5A	-	-
	-	-
5B	-	-
	-	-

Muestra	AF M ₁ (µg/l)	
	Detectada	Estimada
5C	-	-
	-	-
5D	-	-
	-	-
5F	-	-
	-	-
5G	0'022	0'023
	0'037	0'038
5K	0'022	0'023
	0'028	0'029
6A	-	-
	-	-
6B	0'020	0'021
	0'025	0'026
6C	-	-
	-	-
6D	-	-
	-	-
6F	-	-
	-	-
6G	-	-
	-	-
6J	-	-
	-	-
6K	-	-
	-	-
Media	0'026	0'027

Tabla IV.40. Presencia de AFM₁ en muestras de leche comercial agrupando los resultados según la fecha de compra del producto. Las extracciones se realizaron mediante DD en las condiciones siguientes: 37 °C, 5 horas, 150 rpm y empleando 70 ml de triclorometano como solvente. La detección y cuantificación se llevó a cabo por CCFAE.

Fecha	Nº de muestras	% de positivos	$\bar{\chi}$ AF M ₁ (µg/l)
Enero	18	11'1	0'025
Febrero	18	22'2	0'031
Marzo	16	-	-
Abril	18	11'1	0'018
Mayo	14	28'6	0'027
Junio	16	12'5	0'022

Figura IV.27. Presencia de AFM₁ en muestras de leche comercial agrupando los resultados según las distintas marcas analizadas.

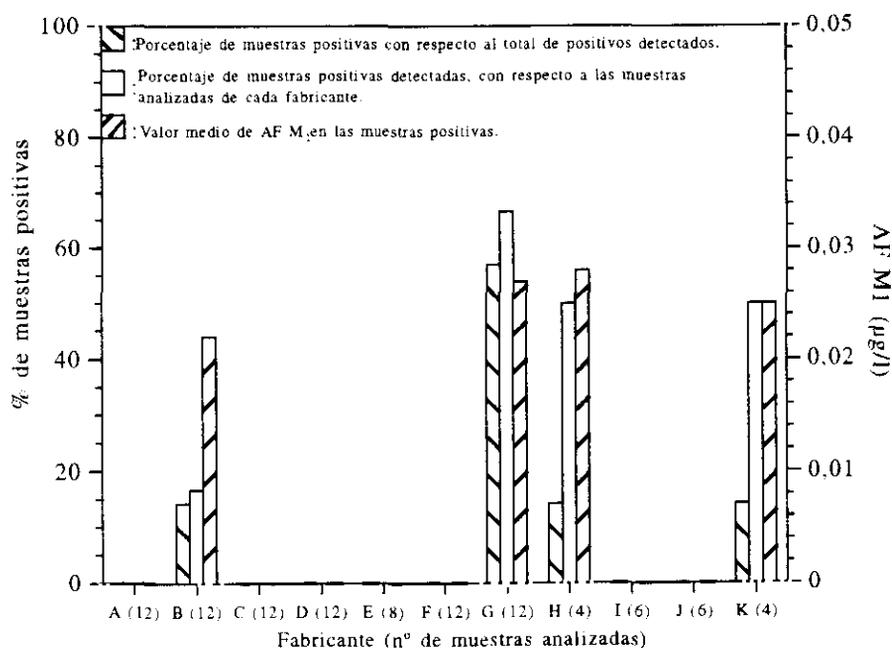
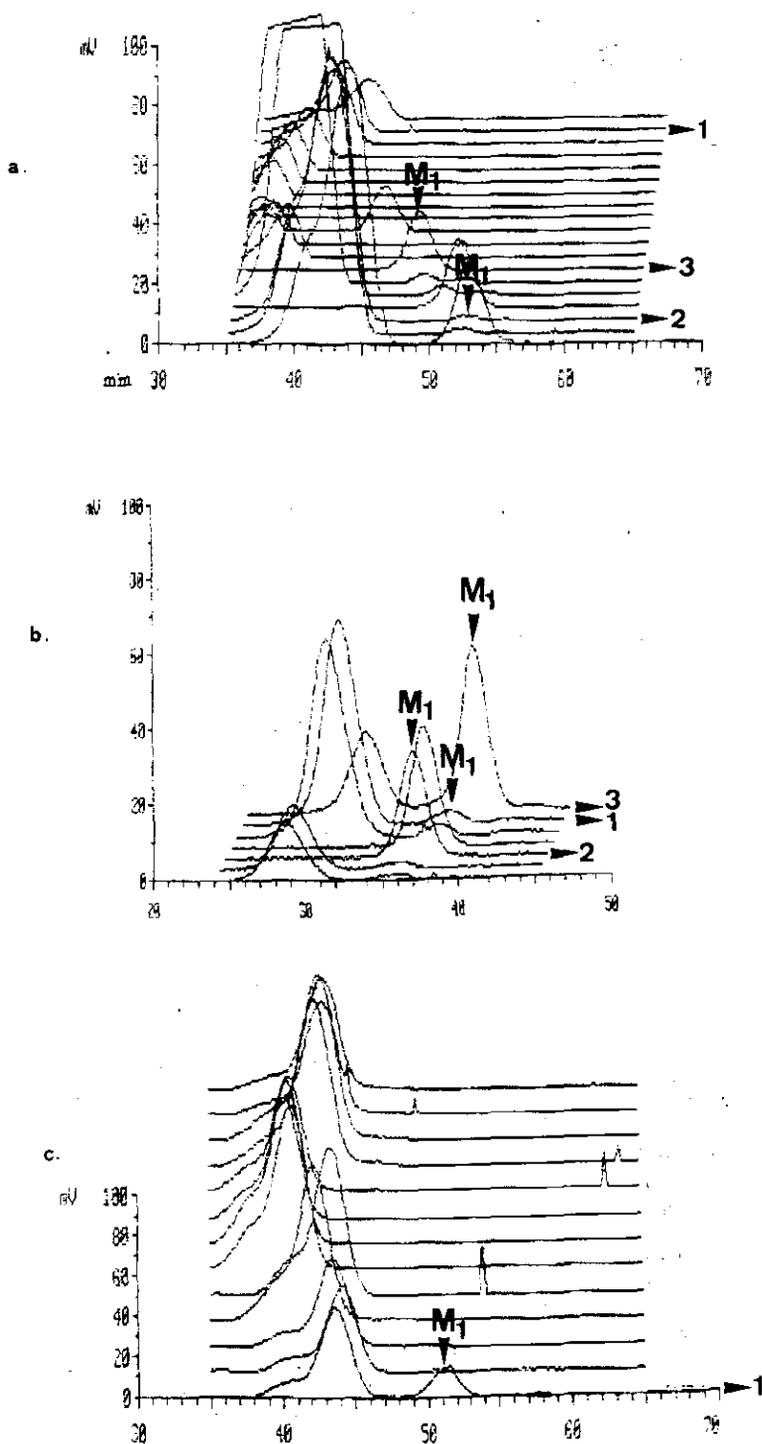


Figura IV.28. Cromatogramas correspondientes a extractos de leche comercial obtenidos mediante DD. En (a) aparecen calles correspondientes a extractos negativos-1-, positivos-2- y calles con patrón interno-3- (extracto problema+sol. patrón de AF M₁). En (b) aparecen calles correspondientes a extractos positivos-1-, calles con patrón-2- y calles con patrón interno-3-. En (c) aparece el resultado de la lectura de una cromatoplaaca en la que todos los extractos fueron negativos y una calle con patrón interno-1-.



IV. 7. RESULTADOS DE LA VALIDACION DE LA TECNICA DE DD DESARROLLADA PARA LA EXTRACCION DE AF M₁ EN LECHE EN POLVO, MEDIANTE EL EMPLEO DE MATERIALES DE REFERENCIA

En la Tabla IV.41 se muestran los resultados obtenidos en la extracción de AF M₁ en los materiales empleados (n° 282, 283, 284 y 285), expresados como cantidad bruta en ng, como concentración en µg/Kg e indicando el rango de concentración detectado, el error estándar (EE) y el coeficiente de variación (CV) correspondiente al número de experimentos realizados. En las experiencias llevadas a cabo con los materiales n°282 y 283 no se detectó AF M₁.

En todos los casos las extracciones se realizaron empleando las condiciones óptimas del método desarrollado para la leche en polvo: 6'25 g de muestra disuelta en 50 ml de agua destilada, 70 ml de triclorometano en el interior de una membrana de diálisis de 60 cm de longitud y extracción durante 5 horas, a 37 °C y 150 rpm.

En la Tabla IV.42 aparecen los resultados correspondientes a los materiales n°284 y 285, expresados como el valor medio de AF M₁ detectado en µg/Kg con los límites del intervalo correspondiente a un grado de confianza del 95%. Asimismo, se muestran los resultados corregidos en función del porcentaje de recuperación estimado para la técnica en los niveles de contaminación correspondientes (82% para 0'40 µg/Kg y 73% para 0'80 µg/Kg), expresando los resultados de la misma manera.

Finalmente, la Tabla IV.43 presenta los resultados de las dos pruebas especificadas por el BCR para la validación de técnicas analíticas a partir del empleo de materiales certificados. Los resultados son válidos para los dos materiales utilizados (n°284 y 285).

La Figura IV.29 incluye cromatogramas correspondientes a extractos de los cuatro materiales empleados.

Tabla IV.41. Resultados de las pruebas realizadas para la validación de la técnica de extracción de AF M₁ mediante DD en material de referencia. Las extracciones se llevaron a cabo con muestras de 6'25 g de los materiales de referencia suministrados por el BCR (n° 282, 283, 284 y 285), que se disolvían en 50 ml de agua destilada. Las condiciones de DD fueron: 37 °C, 5 horas, 150 rpm y 70 ml de triclorometano como solvente. En la tabla se expresa la cantidad media de AF M₁ detectada (en ng y µg/Kg), el rango (µg/Kg), el error estandar y el coeficiente de variación correspondiente al número de experiencias realizadas.

Material de el BCR	n	Contenido de AF M ₁ (µg/Kg)	AF M ₁ detectada (\bar{x})		Rango (µg/Kg)	EE	CV
			µg/Kg	ng			
282	4	<0'050	-	-	-	-	-
283	4	0'090 +0'04/-0'02	-	-	-	-	-
284	4	0'310 ± 0'060	0'318	1'992	0'305-0'331	0'005	3'3
285	6	0'760 ± 0'050	0'624	3'900	0'526-0'691	0'026	10'3

n: número de experiencias

EE: error estandar

Tabla IV.42. Resultados de las pruebas realizadas para la validación de la técnica de extracción de AF M₁ mediante DD en material de referencia suministrado por el BCR (n° 284 y 285). En la tabla se expresan los resultados obtenidos como el valor medio en µg/Kg con el intervalo correspondiente a un grado de confianza del 95%. Los resultados se presentan como cantidad media detectada y como cantidad media corregida según el porcentaje de recuperación de la técnica de DD para los niveles de contaminación de 0'40 µg/Kg -82%- y 0'80 µg/Kg -73%- (para el material n° 284 y 285 respectivamente).

n° material	Contenido de AF M ₁ (valor certificado ± IC del 95%) en µg/Kg	AF M ₁ detectada (\bar{x} ± IC del 95%) en µg/Kg	% de rec. aplicado	AF M ₁ estimada (\bar{x} ± IC del 95%) en µg/Kg
BCR n°284	0'310 ± 0'060	0'318 ± 0'012	82'0	0'387 ± 0'012
BCR n°285	0'760 ± 0'050	0'624 ± 0'053	73'0	0'854 ± 0'053

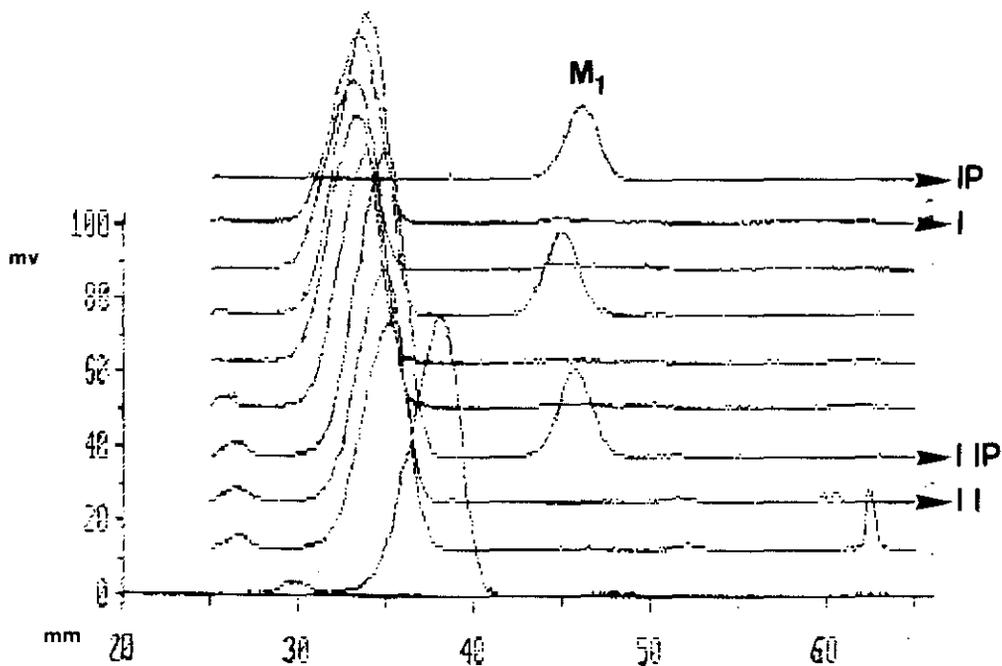
IC: intervalo de confianza

Tabla IV.43. Resultados de las dos pruebas de validación de técnicas de análisis especificadas por el BCR para su comprobación mediante los materiales certificados: (1) el error estandar (EE) del valor medio de recuperación de la técnica debe ser menor que la desviación estandar obtenida para el material de referencia (σ_c), (2) el valor medio de recuperación de la técnica (\bar{x}) en $\mu\text{g/Kg}$ debe encontrarse en el intervalo cuyos límites son $\bar{x}_c (\mu\text{g/Kg}) \pm 2\sigma_c$.

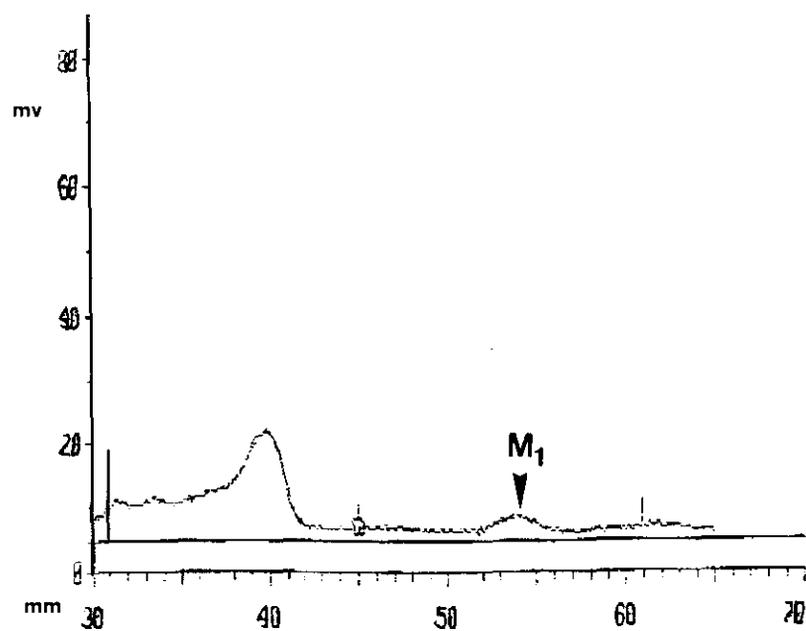
Material de la BCR	\bar{x}_c $\mu\text{g/Kg}$	σ_c	\bar{x} $\mu\text{g/Kg}$	EE	(1) $EE < \sigma_c$	(2) $\bar{x}_c - 2\sigma_c < \bar{x} < \bar{x}_c + 2\sigma_c$
n° 284	0'310	0'085	0'387	0'005	$0'005 < 0'085$	$0'140 < 0'387 < 0'480$
n° 285	0'760	0'063	0'854	0'026	$0'026 < 0'063$	$0'634 < 0'854 < 0'886$

Figura IV.29. Cromatogramas correspondientes a extractos de los distintos materiales de referencia obtenidos mediante DD.

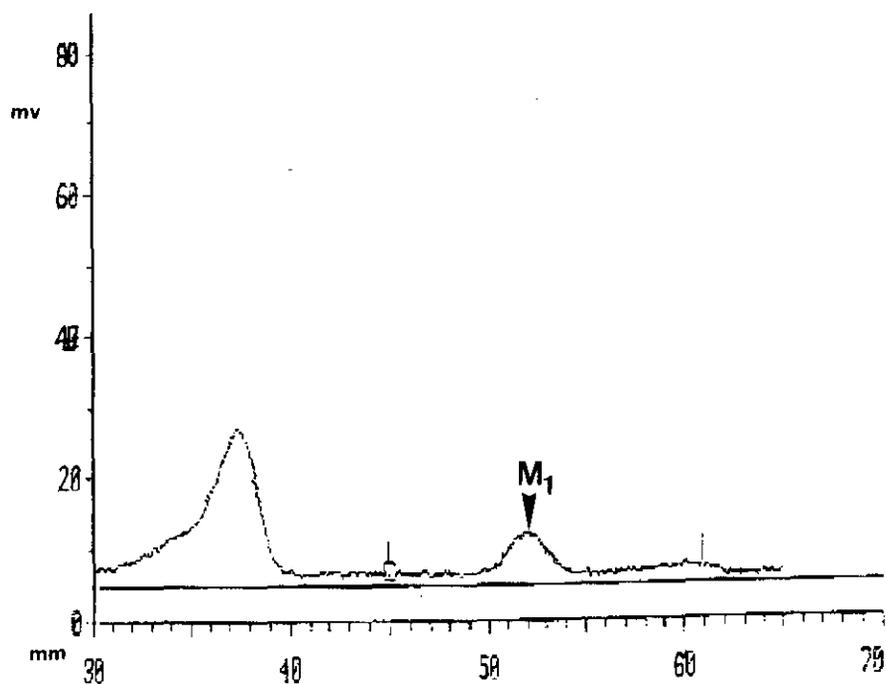
a: Cromatograma obtenido a partir de los extractos de los materiales n° 282 (I) y 283 (II). Las calles IP y IIP corresponden a patrones internos de los mencionados extractos.



b: Cromatograma correspondiente a un extracto de material n° 284.



c: Cromatograma correspondiente a un extracto del material n° 285.



Discusión

V. 1. CONSIDERACIONES INICIALES SOBRE LAS DISTINTAS TÉCNICAS DE DD DESARROLLADAS

V. 1. 1. Discusión del material y métodos empleados

V. 1. 1. 1. Elección de las aflatoxinas

Como ya hemos señalado en la introducción, la AF M₁ es la aflatoxina que puede aparecer con mayor frecuencia en la leche y sus derivados; por ello, el objeto principal del presente trabajo ha sido el desarrollo de una técnica nueva de extracción de esta toxina en distintos productos lácteos. Para los estudios iniciales se decidió emplear la leche, debido a que es el alimento en el que la contaminación por AF M₁ reviste mayor importancia [Blanco y col., 1989a; Van Egmond, 1989a, 1991], siendo además el sustrato sobre el que se han puesto a punto la mayor parte de las metodologías de análisis [Stubblefield y Van Egmond, 1989]. No obstante, y dado que las propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas G₁ y B₁ son muy similares a las de la AF M₁, se decidió comprobar también la efectividad de la metodología desarrollada para su extracción a partir de los mismos alimentos. Estas dos aflatoxinas pueden aparecer en productos lácteos, fundamentalmente queso, por contaminación directa de los mismos con hongos aflatoxigénicos, aunque también es posible encontrar en ocasiones trazas de la AF B₁ en leche y otros productos al ser excretada sin haber sufrido transformación metabólica [Blanco y col., 1989a; Van Egmond, 1989a, 1991].

V. 1. 1. 2. Preparación de los patrones y sistemas de contaminación de los substratos

Las soluciones patrón de cada aflatoxina utilizadas para la preparación del resto de soluciones de trabajo se han elaborado en triclorometano por tratarse del solvente más adecuado para la aplicación de técnicas de CCF. Asimismo, se trata de un solvente ampliamente utilizado en los estudios con aflatoxinas, ya que estas sustancias en solución de triclorometano se mantienen estables durante largo

tiempo [Gauch y col., 1979; Tripet y col., 1981a; Chang y de Vries, 1983; Tyczkowska y col., 1984; Serralheiro y Quinta, 1985; Kamimura y col., 1985]. Las soluciones patrón se calibraban mediante espectrofotometría, siguiendo el método oficial de la AOAC [Scott, 1990a], pues está comprobado que estas soluciones pueden constituir una fuente de error en los estudios sobre técnicas analíticas [Horwitz, 1984].

En el presente trabajo se ha dado gran importancia al efecto de la forma de contaminación de las muestras en la efectividad de la técnica en estudio. Este es un factor que ha sido tratado en varios trabajos sobre la estabilidad de las aflatoxinas durante la elaboración y conservación de los productos lácteos, obteniéndose en algunos casos resultados diferentes en función de la forma de contaminación empleada [Kiermeier y Mashaley, 1977; Wiseman y Marth, 1983a; Yousef y Marth, 1989; Blanco y col., 1989a]. En cambio, en la mayoría de los estudios sobre el desarrollo de técnicas analíticas a partir de muestras contaminadas artificialmente, la forma de contaminación no ha recibido atención especial, empleándose normalmente soluciones de aflatoxinas en solventes orgánicos, sobre todo triclorometano [Gauch y col., 1979; Tripet y col., 1981a; Chang y de Vries, 1983], la mezcla benceno+acetonitrilo [Stubblefield, 1979] o acetonitrilo+agua [Cohen y col., 1984]. No obstante, en algunos trabajos se ha procedido a la contaminación de productos lácteos con soluciones acuosas [Megalla y Hafez, 1982] y en estudios realizados en nuestro laboratorio se ha empleado solución de bicarbonato sódico para la contaminación de leche destinada a la elaboración posterior de yogur y queso [Blanco y col., 1988a, 1993]. Además, hay autores que emplean la contaminación con soluciones de aflatoxinas en solventes orgánicos directamente en los extractos finales obtenidos tras la extracción y purificación [Howell y Taylor, 1981].

El sistema de contaminación empleado en este trabajo ha sido diferente en el caso de los alimentos líquidos y sólidos. En este sentido, la contaminación de la leche en polvo y del queso se ha efectuado con soluciones de las aflatoxinas en triclorometano, mientras que en el caso de la leche y el yogur la mayoría de las pruebas se han realizado utilizando para la contaminación una solución acuosa de las aflatoxinas.

Como ya hemos señalado anteriormente, las primeras pruebas se llevaron a cabo empleando la leche como sustrato. La elección de leche entera esterilizada UHT se basó en su prolongado periodo de conservación ya que todos los estudios iniciales se realizaron con leche procedente de un mismo lote. Asimismo, la posibilidad de conservar en refrigeración el producto una vez abierto durante al menos tres días hacía posible su empleo en análisis sucesivos con la garantía de no haber sufrido alteraciones. La contaminación se llevó a cabo con una solución acuosa de las aflatoxinas, de forma que no se produjeran interferencias en los resultados de la DD motivadas por la presencia de solventes orgánicos en la leche, aún en pequeñas cantidades. La elección del medio de cultivo de hongos AM [A dye y Mateles, 1964] para solubilizar las aflatoxinas se ha basado en estudios desarrollados en nuestro laboratorio en los que se ha comprobado la estabilidad en congelación de las aflatoxinas solubilizadas en este medio, a valores de pH entre 3'5 y 6'5 (su valor de pH normal es 4'5), al menos durante un mes [Liria, 1992]. En estos estudios también se comprobó que la capacidad del medio AM para solubilizar las aflatoxinas G₁ y B₁ adsorbidas al vidrio no es muy elevada; no obstante, dado que en nuestro trabajo la concentración necesaria de aflatoxinas en la solución acuosa era muy reducida, no existía ningún problema para conseguir la solubilización de estas toxinas empleando este método. En las investigaciones realizadas por Liria, no se estudió la capacidad del medio AM para la solubilización de la AF M₁, aunque a lo largo de la realización de este trabajo hemos podido comprobar que en el caso de esta aflatoxina la capacidad de solubilización era ligeramente menor a la de las aflatoxinas G₁ y B₁. Este hecho puede coincidir con los resultados de Rodricks [1969] sobre la adsorción de las aflatoxinas G₁ y B₁ al vidrio, ya que este autor encontró una mayor capacidad de adsorción para la AF G₁, pudiendo suponerse que en el caso de la AF M₁ este valor fuera superior dada la mayor polaridad de la molécula.

Por otra parte, también se realizaron experiencias contaminando la leche con solución de aflatoxinas en acetonitrilo, solvente orgánico miscible con agua, con la finalidad de comprobar si existían diferencias en la recuperación de las aflatoxinas mediante la técnica de DD. Los resultados han mostrado un menor porcentaje de

recuperación en el caso de la contaminación de la leche con solución de las aflatoxinas en acetonitrilo (10-25% según el nivel de contaminación), lo cual confirma la necesidad de considerar el tipo de contaminación como un factor que puede influir de forma importante en los resultados de los estudios sobre técnicas analíticas.

Una vez desarrollada la metodología de DD para la extracción de aflatoxinas en leche se comprobaron los distintos parámetros en el resto de productos lácteos elegidos (leche en polvo, yogur y queso), con el fin de abarcar matrices sólidas y líquidas de características distintas.

Para el desarrollo de la técnica aplicada a leche en polvo se eligió una marca al azar, adquiriendo un envase de 1 Kg, de forma que todas las experiencias pudieran realizarse con el mismo lote de producto. Este alimento, conservado según las indicaciones del fabricante, no mostró en ningún momento signos de alteración ni especialmente de contaminación de origen fúngico.

La contaminación de la leche en polvo se realizó sobre el producto sólido sin reconstituir mediante la adición de un volumen de solución de cada aflatoxina en triclorometano, por tratarse de un solvente volátil que podía eliminarse del substrato sólido fácilmente a temperatura ambiente. No obstante, para asegurar la total eliminación del triclorometano, se calentaron las muestras contaminadas en un horno a 65 °C durante 15 min.

En el caso del yogur se hicieron pruebas elaborando este producto en el laboratorio según la metodología empleada en los estudios de Domínguez y col. [1987], a partir de leche contaminada con aflatoxinas, con objeto de conseguir yogur contaminado de la manera más similar a como se presenta de forma natural. En este sentido, en diversos trabajos se ha demostrado que el proceso de elaboración del yogur no influye en la estabilidad de la AF M₁ [Wiseman y Marth, 1983b; Frémy y Chu, 1984; Blanco y col., 1993], si bien los resultados para la AF G₁ y AF B₁ son contradictorios [Megalla y Hafez, 1982; Rasic y col., 1991; Blanco y col., 1993]. Por este motivo, se decidió

realizar experiencias contaminando con las soluciones de aflatoxinas en solventes orgánicos tanto la leche con la que se elaboraba el yogur en el laboratorio como el yogur comercial.

Finalmente, la elección del queso como sustrato para el desarrollo de una técnica de DD se realizó teniendo en cuenta que es el producto que más dificultades presenta para la extracción de las aflatoxinas, debido a su composición y características físicas. Por otra parte, y aunque es posible encontrar pequeñas trazas de AF B₁ en leche y otros productos debido a contaminación indirecta, es el queso el derivado lácteo en el que tiene interés el análisis de aflatoxinas distintas a la AF M₁, por tratarse del producto más susceptible de presentar contaminación directa por AF B₁ y AF G₁ [Bullerman, 1981; Medina y col., 1984; Blanco y col., 1989a, b].

Para el presente estudio se eligió una marca de queso manchego semicurado de amplia distribución, por corresponder a una variedad intermedia dentro de los diferentes tipos de queso y encontrarse habitualmente presente en el comercio. El producto se adquirió en cantidades no superiores a 500 g con objeto de no mantenerlo conservado mucho tiempo por el riesgo de contaminación fúngica que esto suponía. Otro aspecto que ha influido en la elección del queso Manchego es que se trata de una variedad de elevado consumo en nuestro país.

La contaminación de las muestras se realizó con solución de aflatoxinas en triclorometano, forma elegida para los alimentos sólidos empleados en este estudio. Al igual que ocurría con la leche en polvo, las muestras se calentaban en un horno a 65 °C durante 15 min, con objeto de favorecer la eliminación de la mayor parte del solvente (ya que en este caso se podía esperar su disolución parcial en la grasa del queso) y también para ablandar la muestra y facilitar su preparación posterior. En la mayoría de los estudios sobre la aplicación de técnicas de análisis de AF M₁ en queso este producto ha sido elaborado a partir de leche contaminada de forma natural o artificial [Domínguez y col., 1987; Blanco y col., 1988a; Yousef y Marth, 1989]. De esta manera era de esperar una distribución homogénea de la toxina en el queso preparado, tal como sucede de forma natural. En el caso de la contaminación

directa por AF B₁ y AF G₁ el crecimiento de los hongos suele ocurrir en la superficie del queso, no apareciendo las aflatoxinas distribuidas homogéneamente en todo el producto sino limitadas a la zona de crecimiento del micelio y en un espesor variable según los estudios de distintos autores [Lie y Marth, 1967; Kiermeier y Behringer, 1977; Blanco y col., 1988a]. En este sentido, el método de contaminación elegida en nuestro estudio se aproxima más a lo que sucede con las aflatoxinas G₁ y B₁, aunque la forma de contaminación se ha basado en los objetivos propuestos, es decir, comprobar la posibilidad de la aplicación de una técnica de DD para la extracción de aflatoxinas en queso. Por este motivo, los resultados, fundamentalmente para la AF M₁, podrían variar ligeramente al aplicar la técnica en quesos elaborados con leche contaminada de forma natural, donde además un factor que influye en la recuperación de la toxina es la unión a las caseínas de la leche [Stubblefield y Shannon, 1974; Brackett y Marth, 1982a].

V. 1. 1. 3. Elección de la membrana de diálisis

El tipo de membrana se ha seleccionado en función de la técnica de DD y conforme a las investigaciones preliminares realizadas en nuestro laboratorio (datos no publicados). Debido a que la DD ha sido ideada para la extracción de sustancias de bajo peso molecular, se ha elegido una membrana semipermeable con un tamaño de poro aproximado de 10.000 Da, de forma que la mayoría de compuestos de alto peso molecular quedaran retenidos en la fase acuosa. Entre los tipos disponibles se ha seleccionado una membrana de celulosa regenerada muy resistente a la acción de los solventes orgánicos.

V. 1. 1. 4. Elección del solvente de extracción

La elección del triclorometano como solvente de extracción en el desarrollo de las distintas técnicas de DD presentadas en este trabajo se debe a que se trata de uno de los solvente más utilizados en las metodologías de análisis de aflatoxinas en productos lácteos [Purchase y Steyn, 1967; Tuinstra y Bronsgeest, 1975; Stubblefield, 1979; Fukayama y col., 1980; Tripet y col., 1981a; Chang y de Vries, 1983, Domínguez y col.,

1987], habiéndose comprobado su eficacia para la extracción de estas sustancias y fundamentalmente de la AF M₁ [Van Egmond y Wagstaffe, 1986]. Las pruebas preliminares realizadas con este solvente mostraron resultados más satisfactorios que con el empleo de otros compuestos o sus mezclas -acetonitrilo, acetona y mezclas de triclorometano con acetona o metanol- (datos no publicados).

No obstante, también se ensayó el empleo de acetato de etilo como solvente de extracción con la finalidad de comprobar su rendimiento en una posible técnica de multiextracción de micotoxinas ya que se trata del solvente de elección para la extracción de patulina y ocratoxina A mediante la técnica de DD [Domínguez y col., 1992; Prieta y col., 1992, 1993].

Una ventaja del empleo del triclorometano como solvente de extracción es que se trata de un compuesto compatible para la detección y cuantificación posterior mediante CCFAE. Con ello se evita la concentración a sequedad de los extractos para su redisolución en otro solvente más adecuado, con las posibles pérdidas por adsorción al vidrio o formación de residuos insolubles que esto conlleva. Este problema se ha presentado durante el desarrollo de la técnica de DD para el análisis de patulina, produciéndose pérdidas entre un 6 y un 13% [Prieta, 1993].

V. 1. 1. 5. Elección del sistema de detección por CCFAE

La elección de la técnica para la separación y detección de las aflatoxinas presentes en los extractos ha estado condicionada por el equipamiento de que disponía nuestro laboratorio. No obstante, las técnicas de CCF presentan una serie de ventajas -sencillez, rapidez y economía- que las hacían adecuadas para los objetivos establecidos. Además, en el caso de las sustancias fluorescentes como las aflatoxinas, la sensibilidad que se alcanza con las técnicas de CCF es similar a la obtenida mediante CL [Shotwell, 1986].

La elección de un sistema de CCFAE se ha debido a su mayor poder de

resolución con respecto a la CCF convencional. La CCFAE se caracteriza por la utilización de cromatoplasmas más pequeñas, elaboradas con partículas de gel de sílice de menor tamaño y dispuestas de forma más compacta que en las cromatoplasmas normales. De esta forma se consigue una mayor resolución al separarse mejor las sustancias entre sí y emitir una fluorescencia más intensa [Shotwell, 1986].

Una vez decidido el empleo de la CCFAE se hicieron ensayos con cámaras de desarrollo horizontal y vertical con objeto de elegir el sistema de desarrollo más adecuado, consiguiéndose los mejores resultados con el sistema vertical. Aunque las ventajas del sistema horizontal eran la mayor rapidez del desarrollo y el empleo de volúmenes muy reducidos de solvente no se conseguía la resolución adecuada, debido quizá al poco tiempo en el que se completaba el desarrollo con este sistema.

Otro factor cromatográfico estudiado, ya que influye de forma decisiva en la emisión de fluorescencia por las aflatoxinas retenidas en el soporte de gel de sílice, es la naturaleza de la fase móvil utilizada [Blanc, 1979]. En las experiencias preliminares se emplearon mezclas de solventes orgánicos recomendadas por diversos autores [Jacquet y col., 1971; Gimeno, 1979; Domínguez y col., 1987; Scott, 1990a]. Las mezclas triclorometano/acetona (176/24) y triclorometano/acetona/isopropanol (170/20/10) no han servido para separar las tres aflatoxinas de forma adecuada en ninguno de los casos. La elección de la mezcla triclorometano/metanol en distintas proporciones, a pesar de no ser un solvente muy utilizado en las técnicas de CCF desarrolladas para productos lácteos, se ha debido a que algunos autores han comprobado la eficacia del metanol en proporciones bajas para incrementar la fluorescencia de las aflatoxinas [Blanc, 1979; Chang-Yen y col., 1984]. Concretamente, Blanc [1979] propone como solvente de desarrollo la mezcla diclorometano/metanol (95'5/0'5) para la separación de las aflatoxinas B₁ y G₁, siendo recomendable aumentar la proporción de metanol hasta un 5% en el caso de la AF M₁, al tratarse de una sustancia más polar. En nuestro trabajo hemos podido comprobar que con la mezcla triclorometano/metanol (95/5) se conseguía la separación de las tres aflatoxinas del resto de sustancias, además de favorecerse la detección de la AF M₁,

cuya intensidad de fluorescencia con las otras mezclas empleadas era considerablemente menor. La elección de la mezcla en la proporción 95/5 se ha basado en los estudios de Jacquet y col. [1971] sobre la influencia de distintas fases móviles en la separación de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁ de otras sustancias fluorescentes en diferentes alimentos. El único caso en el que ha sido preciso realizar modificaciones del solvente de desarrollo ha sido en el queso, donde la presencia de sustancias interfirientes era mayor. No obstante, al aumentar la proporción de metanol (90/10 en lugar de 95/5) se consiguió la resolución adecuada.

Asimismo, y a pesar de que en la mayoría de los trabajos consultados la longitud de onda empleada para la excitación de las aflatoxinas es de 366 nm [Gauch y col., 1979; Tripet y col., 1981a; Mortimer y col., 1987; Domínguez y col., 1987], en nuestro caso y tras realizar numerosas determinaciones a distintas longitudes de onda variando las características de sensibilidad del densitómetro, los mejores resultados para las tres aflatoxinas se han obtenido realizando las lecturas a 350 nm.

V. 1. 1. 6. Observaciones generales sobre el método

A continuación se revisan algunas consideraciones relacionadas con la metodología utilizada:

- Los resultados de experiencias preliminares para comprobar la influencia del tamaño de los matraces en la eficacia de la DD demostraron que no había diferencias significativas entre el empleo de recipientes de 500 ó 1000 ml, recuperándose menor cantidad de aflatoxina al utilizar matraces de menor capacidad (datos no publicados). Esto puede deberse a que en recipientes pequeños las membranas adquieren pliegues que favorecen la aparición de compartimentos no comunicados, los cuales pueden disminuir el rendimiento del proceso. Por otro lado, en estos recipientes no se consigue una agitación adecuada y se pierde mucha superficie de intercambio al tener que replegarse la membrana. Por estos motivos se decidió emplear matraces de 1000 ml (salvo para la técnica de mini-DD) ya que de esta forma la disposición de la membrana con relación a la muestra era más

adecuada.

- Durante la fase de extracción mediante DD pasaban al interior de la membrana pequeñas cantidades de matriz acuosa. Este volumen aumentaba al incrementarse el tiempo y la temperatura de extracción, aunque en las condiciones extremas analizadas (45 °C ó 18 horas) lo que se originaba era una pérdida significativa del solvente orgánico, que pasaba a la fase acuosa, no detectándose ésta en el interior de las membranas. Debido a la naturaleza volátil del solvente utilizado no ha sido posible establecer una relación de las pérdidas de solvente con los parámetros estudiados, ya que los volúmenes de solvente extraídos del tubo de diálisis variaban ligeramente en cada experiencia. No obstante, en algunas de las extracciones de 18 horas la reducción del volumen de solvente llegó a ser del 30%.

- Debido a la posible pérdida originada por la adsorción de las aflatoxinas al vidrio [Rodricks, 1969; Liria, 1992], todos los materiales (matraces para rotavapor, matraces Erlenmeyer y embudos de decantación) empleados en el procesado posterior a la DD se lavaban con una cantidad adicional de triclorometano que se añadía después al extracto, con el fin de recuperar las aflatoxinas retenidas.

- En algunas experiencias tuvimos ocasión de comprobar que la detección de las aflatoxinas presentes en los extractos, sobre todo de queso y yogur, se dificultaba considerablemente cuando esta fase del proceso se retrasaba más de un día. En estos casos aparecía un mayor número de sustancias interfirientes en las cromatoplasmas, lo que indicaba la degradación de algunos de los compuestos presentes en los extractos. Por esta causa, la detección se llevaba a cabo el mismo día o a lo sumo al día siguiente de la extracción.

- Por último, hemos comentado con anterioridad que una de las manipulaciones en las que puede originarse una pérdida mayor de los analitos es en la concentración a sequedad de los extractos. En nuestro caso, este procedimiento no era necesario ya que los extractos se encontraban en el solvente adecuado para realizar la separación cromatográfica. La utilización de tubos de centrifuga

graduados de 100 en 100 μl y la posibilidad de controlar la concentración de los extractos con el sistema empleado, hacía posible ajustar los volúmenes finales de forma que si era preciso se tuviera que añadir triclorometano sin llegar a la concentración a sequedad.

V. 1. 2. Influencia de los parámetros de la DD en los resultados

V. 1. 2. 1. Influencia de la naturaleza del solvente y su disposición respecto al tubo de diálisis

Una de las condiciones básicas para la realización de la técnica de DD es que los analitos tengan mayor solubilidad en el solvente orgánico que en la fase acuosa [Domínguez y col.,1991, 1992]. En este sentido, un factor importante en el rendimiento de la técnica es la disposición de la muestra y el solvente con respecto al tubo de diálisis. Las pruebas preliminares realizadas en nuestro laboratorio han indicado la conveniencia de situar el solvente orgánico en el interior del tubo de diálisis ya que de esta forma se conseguían porcentajes de recuperación más elevados (datos no publicados). La causa podría estar relacionada con las menores pérdidas de solvente orgánico debidas a la evaporación, sobre todo en el caso de solventes volátiles como el triclorometano. Por otra parte, la disposición de la muestra en el exterior facilitaría el intercambio de las sustancias de interés de la fase acuosa a la orgánica mediante la agitación [Domínguez y col., 1991, 1992].

La disposición del solvente en el interior del tubo de diálisis ha demostrado ser la más adecuada en todas las aplicaciones de la DD desarrolladas hasta el momento en nuestro laboratorio, independientemente del tipo de analito, muestra o solvente orgánico utilizado [Domínguez y col., 1992; Cámara y col., 1992; Prieta y col., 1992, 1993; Bayo y col., 1993].

V. 1. 2. 2. Influencia de la temperatura de extracción

La temperatura de extracción ejerce una gran influencia en el rendimiento de la DD para la extracción de las tres aflatoxinas estudiadas y en todos los productos lácteos empleados. La temperatura óptima para la extracción ha sido de 37 °C, recuperándose menor cantidad de aflatoxina a temperaturas inferiores y superiores. Esta temperatura ha demostrado ser también la óptima para la extracción de clembuterol [Cámara y col., 1992] y antraceno [inédito], pero no así de otros analitos estudiados. Por ejemplo, para la ocratoxina A [inédito] y el cloranfenicol [Bayo y col., 1993] la temperatura óptima de realización de la DD es de 20 °C, mientras que en el caso de la avermectina las pruebas realizadas han demostrado el mejor rendimiento del proceso de DD cuando las extracciones se llevaban a cabo a 60 °C [inédito]. Por último, la temperatura no ejerce ninguna influencia en la extracción de la patulina mediante DD, por lo que las extracciones pueden realizarse a temperatura ambiente (20-25 °C) [Prieta y col., 1992, 1993; Prieta, 1993],

En el caso de la extracción de aflatoxinas de productos lácteos, la disminución de los porcentajes de recuperación al emplear 45 °C puede deberse a las pérdidas del solvente orgánico por evaporación y por transferencia de un mayor volumen de éste a la fase acuosa, favorecido quizá por la dilatación de los poros de la membrana de diálisis.

El menor rendimiento de la DD a bajas temperaturas podría estar ocasionado por la influencia de la temperatura en la solubilización de las sustancias y en las uniones de las aflatoxinas a algunos compuestos presentes en los productos lácteos [Brackett y Marth, 1982a; Yousef y Marth, 1989].

V. 1. 2. 3. Influencia del tiempo de extracción

Al igual que sucede con la temperatura de extracción, la duración de la diálisis es un factor esencial en el rendimiento de todo este tipo de procesos, apareciendo resultados variables en función de los distintos analitos y matrices

utilizadas [Domínguez y col., 1991, 1992].

En general, la eficacia de la DD aumenta conforme lo hace el tiempo de extracción hasta llegar a una situación de estabilidad y empezar a decrecer si se prolonga la duración del proceso [Domínguez y col., 1991, 1992].

En la mayoría de las sustancias para las que se han desarrollado técnicas de DD es suficiente un tiempo de cinco horas para obtener el máximo rendimiento [Domínguez y col., 1992]. No obstante, en el caso de la extracción de aflatoxinas a partir de queso es necesario llevar a cabo la DD durante 18 horas para lograr porcentajes de recuperación aceptables. Esto puede deberse a la mayor complejidad de la muestra en cuanto a su composición. En este sentido, la mayor concentración de lípidos y proteínas del queso dificulta la extracción de las aflatoxinas, formándose precipitados protéicos y micelas lipídicas que contribuyen también a la reducción en la eficacia de la DD en este producto. La influencia de la complejidad de la muestra en la necesidad de ampliar el periodo de DD para obtener buenos rendimientos tiene su contrapartida en la extracción de hidrocarburos poliaromáticos en muestras de agua. En este caso se han conseguido porcentajes de recuperación de antraceno superiores al 90% con un periodo de DD de sólo una hora [inédito].

Hay que tener en cuenta sin embargo que, aunque la duración del proceso de DD es el principal factor que condiciona el tiempo total del análisis, la ocupación real de tiempo de los técnicos para completarlo no supera la hora y media aproximadamente. Por otro lado, desde el punto de vista de la organización del trabajo de laboratorio las extracciones de 5 ó 18 horas son igualmente convenientes, ya que en el primer caso es posible dar el resultado el mismo día, mientras que en el segundo caso, al dejar transcurrir la DD durante la noche, es posible realizar el resto de las fases del análisis a la mañana siguiente.

V. 1. 2. 4. Influencia del valor de pH de la muestra

La influencia del valor de pH de la muestra en el rendimiento de la DD sólo ha sido estudiada directamente en el caso de la leche. Los resultados obtenidos han demostrado que el valor de pH normal del producto (6'5-6'7) era el más adecuado, lo cual ha contribuído a simplificar aún más la técnica.

En general, en los estudios realizados modificando el valor de pH de la leche los porcentajes de recuperación han sido más altos a valores de pH ácidos lo que puede explicarse por la menor solubilidad de las aflatoxinas en este tipo de soluciones, propiedad demostrada por numerosos autores y aplicada en algunas técnicas analíticas [Gimeno, 1979; Díaz, 1990]. En el caso de la DD, este hecho favorecería la mayor solubilización de estas toxinas en la fase orgánica. No obstante, los porcentajes de recuperación globales obtenidos a valores de pH ácidos pueden deberse a la precipitación de las aflatoxinas (fundamentalmente de la AF M₁) unidas a las caseínas de la leche, como ya comprobaran varios autores [Brackett y Marth, 1982a; Yousef y Marth, 1989]. Por su parte, los resultados obtenidos en condiciones de ligera alcalinidad se corresponden con la mayor solubilidad de las aflatoxinas en soluciones alcalinas [Pohland y col., 1968; Pons y Goldblatt, 1969; Díaz, 1990], lo que dificultaría su extracción mediante DD. Asimismo, cuando se ha alcalinizado la muestra de leche hasta alcanzar un valor de pH de 8'7 o superior, no ha sido posible recuperar aflatoxinas. Este hecho puede deberse a la alteración de las muestras de leche a esos valores de pH así como a la inestabilidad de las aflatoxinas en soluciones fuertemente alcalinas, lo que constituye una de las formas de detoxificación de estas sustancias [Müller, 1983].

En las experiencias realizadas hemos podido comprobar que el efecto del valor de pH de la muestra en la extracción de las aflatoxinas mediante DD es más marcado para la AF M₁ que para las aflatoxinas G₁ y B₁, lo que puede deberse a la mayor polaridad de la molécula de AF M₁. Asimismo, en los trabajos realizados en nuestro laboratorio sobre la solubilidad y estabilidad de las aflatoxinas G₁ y B₁ en diversas soluciones y valores de pH se ha comprobado que, en todos los casos,

el comportamiento de estas dos aflatoxinas es muy similar, lo que se explica por su semejanza estructural [Díaz, 1990; Liria, 1992].

En el resto de productos lácteos estudiados no se ha investigado la influencia del valor de pH de la muestra en el rendimiento de la DD. En el caso de la leche en polvo, y a la vista de los resultados obtenidos para la leche, se ha considerado como óptimo el valor de pH normal del producto. Por su parte, en el desarrollo de la DD para el yogur, dada su acidez normal, tampoco se ha considerado oportuno variar su valor de pH. Finalmente, en el caso del queso se ha decidido el empleo de una solución de bicarbonato sódico al 0'3% para la preparación de las muestras con objeto de favorecer la solubilización de las aflatoxinas del queso en la fase acuosa y evitar su precipitación con las caseínas [Domínguez y col., 1987]. En este sentido hay que señalar que al ensayar el empleo de una solución de fosfato bisódico no se consiguió recuperar aflatoxinas, además de alterarse los extractos de forma considerable.

V. 1. 2. 5. Influencia de la relación de volumen entre la fase acuosa y orgánica

En el proceso de DD, a diferencia de lo que ocurre en las diálisis convencionales, la partición de solutos entre las dos fases separadas por la membrana está condicionada por la solubilidad de los analitos en cada fase, de forma que al elegir el solvente orgánico adecuado el coeficiente de partición se desplaza hacia este último. En este sentido, si se establece una relación de volúmenes de 1:1, el paso de solutos a la fase orgánica es superior al 50% (valor correspondiente a una diálisis convencional). Si la relación de volúmenes se altera a favor de la fase orgánica, se incrementará el rendimiento de la DD [Domínguez y col., 1991, 1992].

Esta premisa se ha demostrado en los experimentos llevados a cabo empleando diferentes volúmenes de leche (50, 250 y 1000 ml), contaminados con el mismo nivel de aflatoxinas y empleando 70 ml de triclorometano para la extracción. Bajo las condiciones teóricamente menos favorables (relación volumétri-

ca muestra:solvente de 1000:70, es decir, 14'3:1) el porcentaje de recuperación de AF M₁ en una extracción de 18 horas ha sido similar al de una diálisis convencional con relación 1:1. Para una relación de 250:70 (3'6:1) se ha obtenido ese porcentaje a las ocho horas, siendo precisas sólo dos horas en el caso de la relación 50:70 (0'7:1), única en la que el volumen de solvente orgánico superaba al de la fase acuosa. La cantidad de AF M₁ recuperada con una relación 3'6:1 ha sido aproximadamente un 14% mayor a la recuperación con la relación 14'3:1, en todos los periodos de tiempo ensayados. Por su parte, en el caso de la relación 0'7:1 se ha obtenido aproximadamente un 30% más de AF M₁ que con la relación 3'6:1, salvo en los periodos de tres y cinco horas, donde la diferencia ha sido de un 50%. Para las aflatoxinas G₁ y B₁ las diferencias en la recuperación al emplear las relaciones 14'3:1 y 3'6:1 han sido muy escasas, apareciendo un incremento notable en la recuperación al emplear la relación favorable al solvente orgánico. Este hecho podría explicarse por el menor rendimiento de la DD para la extracción de las aflatoxinas menos polares observado en todos los casos.

El efecto de la relación volumétrica entre muestra:solvente también ha podido apreciarse en el desarrollo de la DD para la extracción de aflatoxinas en queso. En este producto se ha detectado una disminución en la eficacia de la técnica de DD explicado en parte, como ya se ha mencionado, por la complejidad de la muestra pero también por la alteración en la relación muestra:solvente que se produce al añadir la solución de preparación (70 ml).

V. 2. TÉCNICA DE DD APLICADA A LA LECHE CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

V. 2. 1. Análisis de AF M₁

La técnica propuesta se caracteriza por obtener un porcentaje de recuperación del 96% para un nivel de contaminación de 0'05 µg/l, un límite de determinación entre 0'01 y 0'02 µg/l y un límite de detección de 0'002 µg/l.

En la mayoría de las experiencias realizadas empleando distintos niveles de contaminación en el estudio del rendimiento de la DD, hemos podido constatar que se producía una disminución en los porcentajes de recuperación obtenidos al incrementarse el nivel de contaminación. Esto podría explicarse en parte por la unión de la aflatoxina a las caseínas de la leche, ya que como sugirieron Brackett y Marth, las uniones podrían reforzarse en el caso de aparecer mayores concentraciones de toxina [Brackett y Marth, 1982a].

Desde el descubrimiento de la AF M₁ se han desarrollado numerosas técnicas para el análisis de esta sustancia en productos lácteos basadas en la detección posterior por CCF. Las primeras metodologías tenían como fases comunes la extracción con diversos solventes orgánicos, la desproteínización y eliminación de lípidos de los extractos y la extracción final de la aflatoxina, principalmente con triclorometano. En algunos métodos era necesario realizar procedimientos de purificación basados en técnicas de reparto con solventes orgánicos o extracción en fase sólida a partir de columnas con matrices diversas. Estas metodologías requerían el empleo de grandes volúmenes de solventes, eran lentas y laboriosas y el límite de determinación^(a) más bajo era de 0'1 µg/l [Stubblefield y Van Egmond, 1989]. Este mismo límite se consigue con una de las técnicas reconocidas hasta el momento como método oficial de la AOAC, propuesta por Stubblefield [1979] y que se caracteriza por una reducción sustancial en el tiempo de los análisis. Según este autor, la técnica permite el análisis de seis muestras en menos de 2'5 horas.

Posteriormente, con el desarrollo de nuevas metodologías para la extracción, purificación y detección de la AF M₁, se ha logrado reducir sustancialmente el límite de determinación de esta toxina en leche. Las mejoras más importantes proceden del empleo de sistemas comerciales en forma de cartuchos, que se utilizan en las fases de extracción y purificación, así como del empleo de las técnicas de CL para la separación y detección de las aflatoxinas [Stubblefield y Van

(a) Dada la diferencia entre los conceptos de límite de detección y límite de determinación aplicados en este trabajo, se ha supuesto que las cantidades mínimas de aflatoxina detectadas por otros autores en sus técnicas analíticas y referidos en ellas como límite de detección correspondían realmente al concepto de límite de determinación. Por este motivo las comparaciones entre las distintas técnicas aparecen referidas así en el texto.

La técnica de DD propuesta en este trabajo consigue un límite de determinación comparable o inferior al de la mayoría de las técnicas basadas en la detección por CCF. Numerosas de estas metodologías presentan un límite de determinación de 0'1 µg/l: la técnica de Stubblefield [1979]; la metodología de Fukayama [1980], que se caracteriza por la extracción mediante el uso de una columna comercial elaborada con tierra de diatomeas; la técnica de Jacobson y col. [1971] cuya extracción se basa en el empleo de una mezcla metanol+agua; la metodología de Pons y col. [1973] cuya técnica incluye la extracción con solventes y el empleo de una columna de celulosa y una de las variantes de la técnica de Domínguez y col. [1987] que se basa en la extracción de las aflatoxinas mediante el empleo de una solución alcalina de bicarbonato sódico. Este límite se reduce a 0'02 µg/l en la otra variante de la mencionada técnica, en la que se añade un paso de purificación con columna de gel de sílice. En la técnica de Schuller y col. [1973], que emplea la extracción a partir de una columna de Celite® se consigue un límite de determinación de 0'05 µg/l, mientras que en la metodología de Tuinstra y Bronsgeest [1975], basada en el empleo para la extracción de columnas de gel de sílice, el límite se sitúa en 0'04 µg/l.

Con respecto a las técnicas de CCF cuyo límite de determinación es inferior al de la técnica de DD cabe destacar la metodología de Tripet y col. [1981a] basada en la extracción con una mezcla agua+acetona (1+3), precipitación de las proteínas y fosfolípidos con una sal de plomo, delipidación de la solución mediante adición de hexano y extracción final de la AF M₁ con triclorometano. Esta técnica tiene un límite de determinación de 0'005 µg/l. El mismo límite se alcanza con la metodología de Lafont y col. [1981], que se fundamenta en la extracción de las aflatoxinas con diversos solventes orgánicos y en el paso posterior a través de una columna de alúmina básica. Ambas técnicas tienen, sin embargo, la desventaja del elevado número de pasos y el gasto considerable en material y reactivos. Por otra parte, la técnica propuesta por Gauch y col. [1979] es bastante más simple y su límite de determinación es de 0'005 µg/l. Este método se basa en la precipitación

de las proteínas de la leche con ácido clorhídrico concentrado y dilución posterior con metanol. La mezcla se calienta y se filtra, depositando el filtrado directamente en una columna Extrelut® donde se realiza la elución con una mezcla de diclorometano+tolueno. El extracto finalmente se lava con una solución de hidróxido sódico y ácido clorhídrico. La detección se realiza por CCF bidimensional. Finalmente, otra técnica con un límite de determinación muy bajo (0'001 µg/l) es el procedimiento de Bijl y Van Pethegem [1985], que está basado en la combinación de un cartucho Sep Pak® C₁₈ para la extracción y un cartucho Sep Pak® de gel de sílice para la purificación de los extractos. La detección se realiza por CCF bidimensional.

Igualmente, la metodología de DD propuesta presenta un límite de determinación más bajo que el de varias técnicas basadas en CL para la separación y detección de la aflatoxina. Así por ejemplo, en la técnica de Cohen y col. [1984], que se fundamenta en la extracción con una mezcla de acetonitrilo+agua y en la purificación posterior con cartuchos Sep Pak® C₁₈ y Sep Pak® de gel de sílice, se consigue un límite de 0'08 µg/l. En la técnica de Tyczkowska y col. [1984], modificación del método de la AOAC en el que se sustituye la columna de celulosa por un cartucho Sep Pak® de gel de sílice y la detección mediante CCF por un sistema de CL, se logra detectar 0'1 µg/l de AF M₁. Asimismo, la técnica de DD es comparable a la propuesta por Chang y de Vries en 1983, que modifica el método oficial de la AOAC incorporando una extracción con una solución salina saturada y triclorometano y una técnica de purificación mediante reparto en solventes orgánicos (éter de petróleo y acetonitrilo), para sustituir la utilización de columnas cromatográficas. El límite de determinación obtenido mediante esta técnica es de 0'014 µg/l.

Finalmente, en comparación con dos técnicas desarrolladas recientemente para el análisis de AF M₁ en leche y que se caracterizan por el empleo de distintos procedimientos de diálisis para el tratamiento de las muestras y detección por CL, los resultados son los siguientes. En primer lugar, el método de DD consigue un límite de determinación más bajo que la técnica de Tuinstra y col. [1989, 1990] en la

que se emplea un dializador automático acoplado a un sistema de concentración de residuos y al equipo de CL. Este límite corresponde a 0'05 µg/l. La técnica de Tuinstra presenta la ventaja de la automatización del proceso, pudiendo analizarse hasta 120 muestras por día. No obstante, el coste de material es elevado y pueden producirse pérdidas en la eficacia de la diálisis por la contaminación de las membranas, a pesar del empleo de soluciones preservadoras. Por otro lado, con respecto a la técnica de Farjam y col. [1992] el procedimiento de DD obtiene un límite de determinación considerablemente más alto. Esta técnica se basa en el empleo de un sistema de diálisis automático para la preparación de las muestras con vistas al empleo de columnas de inmunoafinidad para la separación de la AF M₁. Debido a la alta sensibilidad del sistema y a la especificidad de las columnas para fijar sólo la AF M₁ se consigue eliminar la mayoría de las sustancias interfirientes, lográndose detectar hasta 0'001 µg/l, a pesar de que el porcentaje de recuperación no supere el 6%. Esta técnica tiene como desventaja el coste de los equipos y su mantenimiento.

En general, la técnica de DD descrita en este trabajo presenta varias ventajas con respecto al resto de las técnicas descritas. La primera de ellas es que las muestras de leche no requieren ningún tipo de preparación ya que es la membrana de diálisis la que se encarga de la separación de las aflatoxinas de otras sustancias interfirientes de alto peso molecular, como lípidos o proteínas. Esto hace que en realidad se trate de un sistema de extracción y purificación combinado, de forma que no se requiere ningún procedimiento de purificación posterior, pudiendo aplicarse el extracto directamente en la detección tras ser deshidratado y concentrado. En segundo lugar, la combinación de la técnica de DD con la metodología de CCFAE monodimensional desarrollada permite la separación, detección y cuantificación de la AF M₁ en un corto espacio de tiempo. En general, la técnica de DD es más simple y más económica que el resto de técnicas descritas, puesto que el gasto de material y reactivos es muy reducido. Por otra parte, se trata de una metodología rápida, puesto que el tiempo total empleado en el análisis (sin incluir el periodo de DD) no supera las dos horas para un total de seis a ocho muestras.

Un aspecto práctico importante de los resultados sobre el desarrollo de técnicas de análisis de compuestos tóxicos es su aplicabilidad en función de las normas establecidas por los diferentes países sobre los contenidos máximos permitidos de este tipo de compuestos. En el caso de la presencia de AF M₁ en leche líquida no destinada a la alimentación infantil, la técnica de DD sería aplicable en la totalidad de los países que cuentan con cantidades mínimas permitidas. No obstante, la DD no sería aplicable en el análisis de leche destinada a alimentos infantiles en Austria, Suiza y la República Federal de Alemania, donde el contenido máximo de AF M₁ permitido es de 0'01 µg/l [Van Egmond,1989a, b].

V. 2. 2. Análisis de AF G₁ y AF B₁

La técnica descrita en este trabajo presenta un porcentaje de recuperación del 72% para la AF G₁ y un 64% para la AF B₁ a un nivel de contaminación de 0'05 µg/l, el límite de determinación para las dos aflatoxinas oscila entre 0'01 y 0'02 µg/l y el límite de detección es de 0'0053 µg/l (AF G₁) y 0'0040 µg/l (AF B₁).

Los resultados han indicado que la técnica de DD es menos eficaz para la extracción de la AF B₁ en todas las condiciones ensayadas. El único factor que ha demostrado ser útil para incrementar la recuperación de la toxina mediante esta técnica ha sido el empleo de acetato de etilo como solvente de extracción. Esto podría deberse a la menor polaridad del solvente, que lo haría más eficaz en la recuperación de aflatoxinas menos polares.

Con respecto a otras técnicas analíticas, hemos señalado con anterioridad que son pocas las metodologías desarrolladas para el análisis de aflatoxinas distintas de la AF M₁ en leche, debido a que la contaminación por otras aflatoxinas no es relevante. No obstante, algunas de las técnicas descritas tienen aplicación en el análisis, fundamentalmente de la AF B₁, sobre todo en el caso de métodos para distintos productos lácteos. Así por ejemplo, las dos variantes de la técnica de Domínguez y col. [1987] pueden aplicarse al análisis de AF B₁, obteniendo un límite de determinación de 0'02 µg/l y un porcentaje de recuperación superior al 90%.

El método de Jacobson y col. [1971] también puede ser utilizado para el análisis de AF B₁ en leche y su límite de determinación es de 0'1 µg/l.

En relación a las normas legislativas, tan solo en Argentina se especifica el contenido en otras aflatoxinas distintas a la AF M₁ en productos lácteos, siendo el nivel máximo permitido de 0'5 µg/l para la suma de las aflatoxinas M₁, B₁, B₂, G₁ y G₂, nivel detectable mediante DD. Por otro lado, en Suiza, la legislación sobre leche destinada a alimentos infantiles establece un máximo de 0'01 µg/l para la suma de la AF M₁ y la AF B₁. Teniendo en cuenta el bajo nivel permitido y que la concentración de AF B₁ en leche es, caso de aparecer, considerablemente menor a la de AF M₁, la sensibilidad de los métodos de análisis tendría que ser en este caso muy elevada [Van Egmond, 1989a, b].

V. 3. TÉCNICA DE DD APLICADA A LA LECHE EN POLVO CON DETECCIÓN POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

V. 3. 1. Análisis de AF M₁

La técnica descrita presenta un porcentaje de recuperación del 83% para un nivel de contaminación de 0'5 µg/Kg, un límite de determinación situado entre 0'3 y 0'4 µg/Kg y un límite de detección de 0'0280 µg/Kg.

Las puebas realizadas para comprobar el efecto de la cantidad de leche en polvo más adecuada para la preparación de la muestra han demostrado que la cantidad recomendada por el fabricante para el volumen de agua utilizado (50 ml) era la más satisfactoria. Esto podría explicarse por la dificultad en la solubilización de cantidades mayores de leche en polvo, lo que impediría la recuperación de las aflatoxinas. La importancia de una correcta solubilización de todas las partículas de leche en polvo en la eficacia de recuperación de cualquier método analítico ya ha sido descrita por Van Egmond y Wagstaffe [1986] en un trabajo sobre el empleo de materiales de referencia para la validación de técnicas analíticas. En este trabajo se recomienda asimismo que el volumen de agua empleado para la reconstitución

de la leche en polvo sea entre ocho y diez veces la cantidad de muestra utilizada, lo que se corresponde con nuestra metodología.

Con respecto a los parámetros de realización de la DD se pensó en principio que serían equivalentes a los de la técnica aplicada a leche líquida, como efectivamente ha ocurrido. Las diferencias en cuanto al porcentaje de recuperación y límite de determinación entre las dos técnicas se deben a la menor cantidad de muestra que se emplea en el caso de la leche en polvo (6'25 g en comparación con 50 ml de leche líquida) así como a los problemas derivados de la solubilización de la leche en polvo.

Asimismo, las diferencias observadas en los porcentajes de recuperación al emplear distintos niveles de contaminación podrían deberse a las interacciones entre los componentes de la leche en polvo y las aflatoxinas, así como a la mayor dificultad en la solubilización de cantidades mayores de las toxinas en la fase acuosa [Yousef y Marth, 1989].

No obstante, mediante la técnica de DD es posible detectar cantidades brutas de AF M₁ algo menores de 2 ng, lo que correspondería a 0'04 µg/l en el caso de leche líquida.

Como se ha mencionado en la introducción, las primeras técnicas desarrolladas para el análisis de AF M₁ se aplicaban a leche en polvo. De entre ellas destaca la metodología de Purchase y Steyn [1967], elegida como primer método oficial de la AOAC junto con la técnica de Jacobson y col. [1971]. El método de Purchase y Steyn al igual que otros métodos iniciales era lento y laborioso, no detectando cantidades de AF M₁ menores de 1 µg/Kg o incluso superiores. En estas técnicas la extracción se realizaba mediante el empleo de solventes orgánicos y soluciones acuosas y su principal problema era la formación de emulsiones que dificultaban la recuperación de la aflatoxina [Stubblefield y Van Egmond, 1989]. Otra metodología posterior basada en la extracción líquido-líquido es la de Serralheiro y Quinta [1985], cuyo límite de determinación es de 0'5 µg/Kg.

La eficacia de las técnicas analíticas aumentó al suprimirse los procedimientos de extracción líquido-líquido y comenzar a emplearse metodologías de extracción en fase sólida, además de la separación y detección mediante CL [Shotwell, 1986; Stubblefield y Van Egmond, 1989]. En este sentido la técnica de Tuinstra y Bronsgeest [1975], modificada para la leche en polvo, alcanza un límite de $0'5 \mu\text{g}/\text{Kg}$, la técnica de Fukayama y col. [1980] para la leche en polvo presenta un límite de determinación de $0'20 \mu\text{g}/\text{Kg}$, la de Gauch y col. [1979] $0'10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ y la metodología de Bijl y van Pethagem [1985] $0'05 \mu\text{g}/\text{Kg}$.

A la vista de los resultados, la técnica de DD puede situarse en un lugar intermedio entre las metodologías citadas, destacando como ventajas principales su sencillez y economía. Por otro lado, con respecto a las normativas establecidas en los distintos países sobre el contenido máximo permitido en AF M_1 para la leche en polvo, la DD podría aplicarse en todos los países salvo Bélgica, Holanda y Suiza cuyos límites son $0'1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ (Bélgica) y $0'05 \mu\text{g}/\text{Kg}$ (Holanda y Suiza). En el caso de Francia el contenido establecido ($0'2 \mu\text{g}/\text{Kg}$) se refiere a leche en polvo destinada a alimentos infantiles [Van Egmond, 1989, 1989b].

V. 3. 2. Análisis de AF G_1 y AF B_1

La técnica de DD presenta un porcentaje de recuperación superior al 90% (AF G_1) y al 70% (AF B_1), un límite de determinación entre $0'3$ y $0'4 \mu\text{g}/\text{Kg}$ para las dos aflatoxinas y un límite de detección de $0'0299 \mu\text{g}/\text{Kg}$ (AF G_1) y $0'0126 \mu\text{g}/\text{Kg}$ (AF B_1).

Teniendo en cuenta que la contaminación directa de la leche en polvo por parte de hongos aflatoxigénicos es rara y que las cantidades de aflatoxina derivadas de este tipo de contaminación suelen ser considerablemente más altas que en el caso de la contaminación indirecta por AF M_1 [Blanco y col., 1989a; Van Egmond, 1991; Kuiper-Goodman, 1991], la técnica de DD sería adecuada para el análisis de aflatoxinas en estos casos.

Con relación a la legislación en los distintos países, tan solo Argentina establece la limitación en el contenido de aflatoxinas distintas a la AF M₁ en leche en polvo. Este límite, para las aflatoxinas M₁, B₁, B₂, G₁ y G₂, es de 5 µg/Kg, cantidad perfectamente detectable mediante DD.

V. 4. TECNICA DE DD APLICADA AL YOGUR CON DETECCION POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

V. 4. 1. Análisis de AF M₁

La técnica de DD desarrollada para este producto se caracteriza por obtener un porcentaje medio de recuperación del 78%, para un nivel de contaminación de 0'045 µg/Kg, con ligeras diferencias en función del tipo de muestra y de la forma de contaminación empleada. El límite de determinación de la técnica oscila entre 0'010 y 0'020 µg/Kg mientras que el límite de detección es de 0'0056 µg/Kg.

Con respecto a las experiencias realizadas para comprobar el efecto de la temperatura en el rendimiento de la DD cabe destacar que en el yogur se ha producido el nivel mínimo de recuperación a 45 °C (22%). A esta temperatura se incrementaba considerablemente el número de sustancias interfirientes en los extractos, lo cual puede deberse en gran medida a la composición del yogur, más rico que la leche en sustancias de menor peso molecular. Asimismo, esta temperatura favorece el crecimiento de la flora propia del yogur con la consiguiente degradación de compuestos, ya que de hecho se trata de la temperatura utilizada en el proceso de elaboración de los yogures.

Un efecto similar, aunque más acusado, ocurría al prolongar el tiempo de DD a 8 ó 18 horas, no pudiendo detectarse AF M₁ en ninguno de los dos casos, por la presencia de concentraciones elevadas de otras sustancias en los extractos. Esta circunstancia se produjo tanto en las pruebas realizadas con yogur comercial contaminado con solución de AF M₁ en triclorometano, como en las experiencias en las que se empleó leche contaminada con solución de la aflatoxina en

acetonitrilo para la elaboración posterior del yogur. No obstante, el mayor porcentaje de recuperación obtenido, en todos los tiempos estudiados, al utilizar yogur comercial contaminado con solución de AF M₁ en triclorometano puede deberse a que una cantidad de la toxina podría encontrarse solubilizada en los restos del triclorometano, lo que favorecería su recuperación más rápida mediante DD.

Con respecto a las experiencias realizadas empleando para la elaboración del yogur leche contaminada con solución de AF M₁ en solventes orgánicos (triclorometano y acetonitrilo), las diferencias observadas en los porcentajes de recuperación (un 10% superior en el caso de contaminar con solución de triclorometano) no son muy significativas. La recuperación de AF M₁ en las pruebas realizadas contaminando la leche con solución acuosa de la toxina en medio AM ha sido ligeramente más alta (88% frente al 76% de la solución de triclorometano y al 66% de la solución de acetonitrilo), aunque estas diferencias tampoco se consideran excesivamente importantes.

Hay que destacar que los cromatogramas obtenidos a partir de yogur elaborado en el laboratorio y de yogur comercial eran muy similares, por lo que se utilizaron muestras de éste último para realizar el cálculo del límite de detección.

Nuestros resultados parecen indicar que el proceso de elaboración del yogur no afecta a la estabilidad de la AF M₁, ya que se han obtenido porcentajes de recuperación similares al utilizar para la elaboración del yogur leche contaminada con AF M₁ (vehiculada en medio AM o triclorometano) o yogur comercial contaminado directamente con la aflatoxina en solución de triclorometano. Estos resultados coinciden con los de otros trabajos realizados en nuestro laboratorio [Blanco y col., 1993] y con los de varios autores que estudiaron la estabilidad de las aflatoxinas durante el procesado y almacenamiento del yogur [Wisseman y Marth, 1983b; Frémy y Chu, 1984]. No obstante, en este tipo de estudios hay que tener en cuenta tanto la forma de preparación de las muestras de yogur como las distintas técnicas

analíticas empleadas, fundamentalmente en lo que se refiere a su sensibilidad, porcentaje de recuperación y a la eficacia en la purificación de los extractos [Yousef y Marth, 1989]. En este sentido la técnica de DD actúa como un sistema de purificación eficaz, no apareciendo en los cromatogramas sustancias interferentes con la AF M₁ que dificulten su detección.

En relación a la comparación entre la DD y otras técnicas aplicables al análisis de AF M₁ en yogur, podemos mencionar la metodología de Kiermeier y Weiss [1976], basada en la extracción mediante cloroformo y en la adición de ácido sulfosalicílico con el fin de evitar la formación de emulsiones. Seguidamente se realiza una purificación mediante cromatografía en columnas de gel de sílice. La formación de precipitados durante el proceso de extracción se reduce mediante la adición de urea. Esta técnica tiene un nivel de recuperación superior al 90% aunque en el trabajo consultado no se especifica el límite de determinación de la técnica. Por otra parte, la metodología de Domínguez y col. [1987] aplicada al yogur presenta también una recuperación del orden del 90% con un límite de determinación de 0'02 µg/kg. Otras técnicas descritas son teóricamente aplicables al análisis de yogur, con las modificaciones oportunas en cuanto a la preparación de las muestras [Stubblefield, 1979; Fukayama y col., 1980; Tripet y col., 1981].

La técnica de DD presenta en este caso todas las ventajas mencionadas en los apartados anteriores, no siendo necesario realizar ningún tipo de preparación de las muestras de yogur para realizar la extracción.

Finalmente, en lo que se refiere a la aplicabilidad de la DD con relación a las normas vigentes en los distintos países sobre los contenidos máximos de AF M₁ en yogur, este producto no tiene en ningún país una referencia específica sino que se incluye en algunos de ellos dentro de un nivel mínimo permitido para productos lácteos que oscila entre 0'05 µg/Kg (Austria, Holanda, Suiza) y 5 µg/Kg (Antigua Checoslovaquia) [Van Egmond, 1989a].

V. 4. 2. Análisis de AF G₁ y AF B₁

La técnica de DD presenta un porcentaje de recuperación entre el 60-87% para un nivel de contaminación de AF G₁ de 0'045 µg/Kg, dependiendo los valores del tipo de contaminación empleado. En el caso de la AF B₁ estos valores oscilan entre el 40 y 70%. El límite de determinación para las dos aflatoxinas (obtenido empleando yogur elaborado en el laboratorio a partir de leche contaminada con solución de las aflatoxinas en medio AM, forma de contaminación con la que se obtuvieron los porcentajes de recuperación más elevados) se encuentra entre 0'01 y 0'02 µg/Kg. El límite de detección de la técnica es de 0'0064 µg/Kg para la AF G₁ y 0'0043 µg/Kg para la AF B₁.

Con respecto a los resultados de los parámetros de temperatura y tiempo en la eficacia de la DD para la recuperación de la AF G₁ y AF B₁ la tendencia se ha mostrado similar a lo ocurrido en otros productos lácteos. No obstante, al prolongar la DD a periodos de 8 ó 18 horas no pudo detectarse ninguna de las dos aflatoxinas, debido a la presencia de sustancias interfirientes, tal y como ocurría en el análisis de AF M₁.

El tipo de solución empleada para la contaminación de las muestras ha supuesto una variación ligeramente superior de los porcentajes de recuperación obtenidos para la AF G₁, en comparación con lo ocurrido para la AF M₁. En el caso de la AF B₁ el efecto ha sido más marcado ya que los valores se encontraban entre el 40 y el 50% en las pruebas realizadas utilizando solución de la aflatoxina en solventes orgánicos, mientras que en las contaminaciones realizadas con solución en medio AM la recuperación fue del 78%. Este hecho podría estar relacionado con las diferencias estructurales de las moléculas de las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁, la distinta solubilidad de estas sustancias en solventes acuosos y orgánicos, así como a las diferentes interacciones entre las aflatoxinas, los solventes en que se encuentran vehiculados y los componentes de la leche y el yogur.

A la vista de los resultados parece ser que la AF G₁ y la AF B₁ permanece-

rían estables durante el proceso de elaboración del yogur, ya que la recuperación obtenida fue incluso mayor al emplear yogur elaborado en el laboratorio que con yogur comercial contaminado directamente con las aflatoxinas. Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro laboratorio en un estudio sobre la estabilidad de las aflatoxinas durante el procesado y almacenamiento en refrigeración del yogur [Blanco y col., 1993]. No obstante, otros autores han referido incluso la degradación total de la AF B₁ a su derivado AF B_{2a} por las condiciones ácidas presentes en el yogur [Megalla y Hafez, 1982; Rasic y col., 1991].

En relación a la comparación entre la DD y otras técnicas analíticas, es válido lo comentado en el apartado anterior con respecto al análisis de AF M₁, ya que los resultados de las técnicas expuestas ([Kiermeier y Weiss, 1976; Domínguez y col., 1987]), son similares para las aflatoxinas M₁, G₁ y B₁.

Finalmente, no existe en ningún país una normativa sobre el contenido máximo permitido de AF G₁ y AF B₁ en productos lácteos distintos a la leche. Esto es debido a que la presencia de estas aflatoxinas en los mencionados alimentos no es frecuente, salvo por contaminación directa, lo que no supone un riesgo importante de intoxicación por implicar para ello, normalmente, el consumo de productos enmohecidos [Van Egmond, 1989a].

V. 5. TÉCNICA DE DD APLICADA AL QUESO CON DETECCIÓN POSTERIOR MEDIANTE CCFAE

V. 5. 1. Análisis de AF M₁

La técnica se caracteriza por obtener un porcentaje de recuperación del 89% para un nivel de contaminación de 0'100 µg/Kg, un límite de determinación entre 0'06 y 0'08 µg/Kg y un límite de detección de 0'0298 µg/Kg.

Uno de los aspectos más importantes en cuanto a la puesta a punto de la metodología de DD en este producto ha sido la preparación de las muestras. En

este sentido, para que la DD pudiera realizarse correctamente, era preciso obtener a partir del queso una matriz lo más líquida posible, de modo que se estableciera el contacto adecuado entre la muestra y el solvente orgánico del interior del tubo de diálisis [Domínguez y col., 1991, 1992]. Para ello, y tras varias pruebas con diferentes volúmenes de agua para comprobar la consistencia final de la muestra, se decidió el empleo de 70 ml de una solución alcalina de bicarbonato sódico al 0'3%. Su uso se ha basado en la capacidad de las soluciones alcalinas para favorecer la solubilización de las aflatoxinas, hecho aplicado en algunas técnicas de análisis de estas sustancias [Domínguez y col., 1987]. Por su parte, la relación queso:solución 50:70 es similar a la utilizada por otros autores en la preparación de muestras de queso para la extracción de aflatoxinas mediante diferentes técnicas analíticas [Tripet y col., 1981a; Scott, 1990a].

Con respecto a las condiciones de la DD, la necesidad de aumentar el periodo de extracción para conseguir incrementar el rendimiento del proceso puede estar relacionado con las características fisicoquímicas del queso, principalmente al tratarse de una matriz sólida, así como con las posibles interacciones entre las aflatoxinas y los componentes del queso (caseínas) [Brackett y Marth, 1982a]. No obstante, este último aspecto ha sido estudiado en el caso de quesos elaborados a partir de leche contaminada con AF M₁ de forma natural o artificial, donde las interacciones se producen en esta materia prima [Stubblefield y Shannon, 1974; Yousef y Marth, 1989]. Por este motivo, pensamos que al contaminar directamente el queso con una solución de la aflatoxina en triclorometano, como se ha realizado en nuestro estudio, las interacciones entre toxina y caseínas no debían tener gran influencia en el rendimiento de la DD. Sin embargo, sí ha de tenerse en cuenta la influencia de la modificación en la relación muestra:solvente que se establece en el queso, ya que esta relación se desplaza a favor de la muestra al añadir la solución de bicarbonato.

A pesar de que los resultados obtenidos empleando extracciones de ocho horas han sido aceptables (86% de recuperación), se ha tomado como definitivo un periodo de DD de 18 horas, dado que las extracciones de ocho horas no son muy

viables desde el punto de vista de organización del trabajo laboratorial.

En cuanto a los resultados de las pruebas sobre el efecto de la temperatura de extracción en el rendimiento de la DD, las recuperaciones más elevadas se obtuvieron a 45 °C si bien, a esta temperatura aumentaba en gran medida la aparición de sustancias interferentes en los extractos, de modo que la detección y sobre todo la cuantificación de la AF M₁ se veía dificultada. Debido a que este hecho afectaría más en la detección de niveles menores de AF M₁ a los empleados en las pruebas, se decidió utilizar extracciones de 37 °C en las que los extractos aparecían más limpios.

El efecto del aumento del tiempo y la temperatura de extracción en el paso de mayor cantidad de solutos a través del tubo de diálisis ha sido más marcado en el queso que en el resto de productos estudiados. El incremento de sustancias interfirientes en los extractos conforme aumentaba la temperatura puede explicarse por una mayor solubilización de sustancias y por la posible dilatación de los poros de la membrana. Por su parte en las extracciones de 18 horas puede producirse la degradación de algunos compuestos, apareciendo más sustancias en los extractos.

Con el fin de reducir en lo posible la aparición de compuestos que pudieran interferir en la detección de la AF M₁ y dado que en las extracciones de 18 horas se formaban precipitados que podían suponer una pérdida en la recuperación de la toxina, se ensayó el empleo de la solución preservadora utilizada por Tuinstra y col. [1989] en sus estudios. Estos autores utilizan una solución acuosa compuesta de citrato sódico, cloruro sódico y azida de sodio en la preparación de muestras de leche, para su dialización posterior mediante un sistema automático acoplado a un sistema de concentración de extractos y a un cromatógrafo líquido. La adición de citrato sódico mejora la solubilización de las sustancias y evita la formación de precipitados protéicos; el cloruro sódico favorece los procesos de diálisis y la azida de sodio actúa como conservante, evitando el crecimiento microbiano y la degradación de compuestos. Los resultados de nuestros estudios muestran un efecto positivo en la recuperación de la AF M₁ al emplear la solución preservadora,

permaneciendo la muestra preparada con una consistencia semilíquida y homogénea durante todo el proceso de DD.

Por otro lado, y también con la finalidad de reducir la presencia de sustancias interferentes se optó por una concentración menor del extracto (500 μ l en lugar de los 200 μ l del resto de productos lácteos estudiados), siendo asimismo necesario modificar la proporción de los componentes del solvente de desarrollo (triclorometano/metanol 90/10 en lugar de 95/5) para mejorar la resolución de la AF M₁. Con respecto a los resultados de los ensayos realizados con cartuchos Sep Pack® de gel de sílice para la purificación de los extractos, la disminución en la recuperación de la AF M₁ (40%) puede deberse a la necesidad de concentrar a sequedad el extracto obtenido de la DD para redisolverlo posteriormente en diclorometano, según indica el protocolo seguido [Bijl y Van Pethegem, 1985]. Hay que tener en cuenta que la posible pérdida de sustancias debida a la concentración a sequedad es mayor cuando el extracto presenta una composición más compleja, como ocurre en el queso. Asimismo, la menor solubilidad de algunas sustancias en diclorometano puede contribuir a dificultar la solubilización de la toxina en este último solvente. En la metodología de Bijl y Van Pethegem, también es necesario realizar la concentración a sequedad del extracto en acetonitrilo obtenido a partir del uso de un cartucho Sep Pack® C₁₈ y su redisolución en diclorometano para la purificación [Bijl y Van Pethegem, 1985; Bijl y col., 1987]. No obstante, la mayor recuperación obtenida por estos autores puede deberse a la diferente composición del extracto con respecto al obtenido mediante DD, así como a la secuencia de solventes empleada.

Un aspecto importante en cuanto a la puesta a punto de la técnica de DD para la extracción de AF M₁ en queso es que, a diferencia de lo que ocurre con el resto de productos lácteos estudiados, las condiciones de la DD así como de la preparación de las muestras pueden variar sustancialmente dependiendo del tipo de queso sobre el que se aplique la técnica. Esto podría traducirse en la aparición de resultados diferentes en cuanto a los porcentajes de recuperación y límites obtenidos, como han reflejado otros autores en diferentes técnicas analíticas

[Stubblefield, 1979; Tripet y col., 1981a].

La comparación de los resultados de la DD con diferentes metodologías desarrolladas para el queso también está sujeta al tipo de alimento empleado, aunque en muchos estudios no se especifican las características del producto. En general, la técnica de DD presenta un límite de determinación equivalente al de otras técnicas. Así, la metodología de Frémy y Boursier [1981] obtiene un límite de 0'10 µg/Kg, empleando la purificación con cartuchos de gel de sílice con detección posterior mediante CL e igual límite se alcanza en las técnicas de Polzhofer [1973] (modificación del método de Schuller y col. [1973] y que se basa en la extracción mediante solventes y Celite® con purificación posterior a través de una columna de gel de sílice), así como en la metodología de Kamimura y col. [1985], que se fundamenta en la extracción con triclorometano+agua y en la purificación mediante columnas de Florisil®. En la técnica de Polzhofer la detección se realiza mediante CCF mientras que para el método de Kamimura y col. se emplea la CL de fase reversa. Otra técnica basada en la extracción con solventes orgánicos y la purificación mediante columnas o placas de gel de sílice es la de Kiermeier y Weiss [1976], aunque con esta metodología el límite de determinación es de 2'50 µg/Kg. La técnica de Stubblefield [1979] aplicada al queso permite detectar 0'10 µg/Kg. Por su parte una de las variantes de la metodología de Domínguez y col. [1987] (basada en el empleo de una solución alcalina para la extracción) presenta un límite de determinación de 0'40 µg/Kg. La otra variante de esta técnica, en la que se añade un paso de purificación por columna de gel de sílice, disminuye este límite a 0'05 µg/Kg. Finalmente, otras técnicas con mayor sensibilidad que la DD son la de Tripet y col. [1981a] (0'03 µg/Kg) y la de Bijl y col. [1987] (0'01 µg/Kg): la primera de ellas basada en la extracción con diversos solventes y la segunda en el uso de cartuchos comerciales de tipo Sep Pack®.

La técnica de DD desarrollada para el queso presenta como ventajas su sencillez y economía en el gasto de materiales. Con respecto al tiempo de ejecución de la técnica, las extracciones de 18 horas (una noche) permiten la organización adecuada del trabajo de laboratorio ya que el tiempo de ocupación de los técnicos

es similar al de las otras aplicaciones, pudiendo obtenerse el resultado del análisis al día siguiente de iniciar la extracción.

Con relación a las normas establecidas sobre la cantidad máxima tolerada de AF M₁ en queso, la DD sería efectiva en todos los países (salvo los que presenta niveles de tolerancia cero), ya que las cantidades establecidas oscilan entre 0'20 y 0'50 µg/Kg [Van Egmond, 1989a].

V. 5. 2. Análisis de AF G₁ y AF B₁

La técnica desarrollada presenta un porcentaje de recuperación del 73% para la AF G₁ y del 65% para la AF B₁, a un nivel de contaminación de 0'100 µg/Kg. El límite de determinación oscila entre 0'040 y 0'060 µg/Kg para las dos aflatoxinas y el límite de detección es de 0'0339 µg/Kg para la AF G₁ y 0'0084 µg/Kg para la AF B₁.

Al igual que ocurría en el caso de la AF M₁ ha sido necesario aumentar el periodo de extracción para obtener porcentajes de recuperación elevados, sobre todo de AF B₁, ya que con esta toxina sólo se obtenía un 22% de recuperación en extracciones de cinco horas, aumentando únicamente un 10% en extracciones de ocho horas. No obstante, a pesar de que las recuperaciones de AF B₁ han sido inferiores a las otras toxinas, el límite de detección ha resultado considerablemente menor ya que la aparición de sustancias interferentes con la AF B₁ era prácticamente nula, lo que permitía una detección y cuantificación de la toxina más clara con niveles de contaminación bajos. El empleo de cartuchos Sep Pak® de gel de sílice para la purificación de los extractos no permitió recuperar ninguna de las dos aflatoxinas con el protocolo seguido [Bijl y Van Pethegem, 1985]. Esto puede deberse a la menor polaridad de estas sustancias y a la necesidad de concentrar a sequedad los extractos de la DD para su redisolución en diclorometano, como ya mencionamos anteriormente.

Por otro lado, la adición de la solución preservadora no parece afectar

significativamente a la recuperación de estas aflatoxinas, aunque disminuyó de forma ligera el porcentaje de recuperación de la AF B₁.

Las técnicas de análisis referidas en el apartado anterior son en su mayoría aplicables a las aflatoxinas G₁ y B₁. Entre ellas la técnica de Domínguez y col. [1987] presenta un porcentaje de recuperación del 91% para un nivel de contaminación de 1'0 µg/Kg y un límite de determinación de 0'4 µg/Kg; en la metodología de Kamimura y col. [1985] la recuperación de AF G₁ y AF B₁ entre 10 y 30 µg/Kg es del 91% y el límite de determinación para las dos aflatoxinas corresponde a 0'2 µg/Kg. Muchos de los métodos de análisis de aflatoxinas distintas de la AF M₁ en queso se han utilizado fundamentalmente en los estudios sobre la producción y estabilidad de estas toxinas en el alimento ya que, como hemos comentado con anterioridad, el queso es el derivado lácteo más susceptible de presentar contaminación directa por aflatoxinas [Bullerman, 1981]. No obstante, no existe un riesgo importante en este caso, debido al rechazo por parte de los consumidores del queso enmohecido, lo que podría explicar la ausencia de normas legislativas en cuanto a la presencia de AF G₁ y AF B₁ en este alimento.

V. 6. EXTRACCION DE AF M₁ MEDIANTE mini-DD Y DETECCION POSTERIOR POR CCFAE

Para el desarrollo de la técnica de mini-DD se partió de volúmenes de muestra y solvente que cumplieran la relación 0'7:1, establecida como la más adecuada en el caso de la técnica de DD para la leche. La única condición estudiada fue el tiempo de extracción ya que se suponía que el resto de los parámetros continuarían siendo los más adecuados.

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto del tiempo en el porcentaje de recuperación de AF M₁ mediante mini-DD contrastan con los de Prieta [1993] en el desarrollo de una metodología similar para el análisis de patulina en zumo de manzana. En nuestro estudio se observa que a las dos horas de extracción se alcanza el máximo de recuperación (50-60%), porcentaje que se mantiene al menos

hasta un periodo de extracción de 5 horas. El porcentaje de recuperación en extracciones de una hora oscila entre el 30 y el 40%. Por el contrario, en el estudio de Prieta la recuperación máxima (63%) se consigue en extracciones de una noche (16-18 horas). A las cinco horas de extracción el porcentaje es de un 50% y en extracciones de una a tres horas oscila entre el 30 y el 38%.

Con respecto al límite de determinación de la técnica de mini-DD desarrollada en este estudio (0'04-0'05 µg/l), su valor coincide con el de numerosas técnicas analíticas frecuentemente utilizadas o es incluso menor. Así, en la técnica de Pons y col. [1973] el límite de determinación es de 0'10 µg/l e igual valor corresponde a las técnicas de Fukayama y col. [1980] y a una de las variantes de la técnica propuesta por Domínguez y col. [1987]. En el caso de la técnica de Cohen y col. [1984] el límite corresponde a 0'08 µg/l, en la técnica de Stubblefield [1979] es de 0'5 µg/l y para la técnica de Tuinstra y col. [1989, 1990] en la que se emplea un dializador automático en el análisis de AF M₁ en leche descremada, el límite de determinación es de 0'05 µg/l.

Estos resultados contrastan también con los de Prieta [1993], ya que en el caso del análisis de patulina en zumo de manzana la técnica de mini-DD obtiene el límite de determinación más bajo conocido para esta sustancia. Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos para la técnica de mini-DD desarrollada en el presente trabajo pueden deberse a la forma de procesamiento del extracto obtenido después de la diálisis, con respecto al procesado en la técnica de DD normal. En las dos técnicas se toma la totalidad del extracto obtenido de la membrana para su concentración y aplicación en la técnica de CCFAE. El resultado es que con la técnica de mini-DD se reduce el número de sustancias que aparecen en los cromatogramas aunque no se mejora el límite de determinación. En cambio, en el caso del análisis de patulina en zumo de manzana se emplea para la detección un sistema de CL; dada la mayor sensibilidad del sistema de detección, cuando se realiza la DD sólo se toma una alícuota del extracto, mientras que al emplear la técnica de mini-DD se utiliza la totalidad del mismo. El resultado es una reducción sustancial en el límite de determinación, aunque con aparición de

más sustancias en los cromatogramas.

En resumen, podemos decir que la técnica de mini-DD desarrollada en este trabajo para el análisis de AF M₁ en leche puede servir, comparativamente con la técnica de DD, como sistema de análisis semicuantitativo rápido, ya que el tiempo de análisis completo no excede de las tres o cuatro horas. La ventaja principal de esta metodología es su gran economía en materiales y solventes pues sólo se precisa un tubo de diálisis de 20 cm y unos 20 ml de triclorometano para la totalidad del proceso.

V. 7. DETERMINACION DE AF M₁ EN LECHE COMERCIAL

Para la realización de este estudio sobre la incidencia de la AF M₁ en leche comercial se decidió tomar 100 muestras correspondientes a todas las marcas de leche entera UHT presentes en un establecimiento de una cadena de supermercados de implantación nacional situado a las afueras de Madrid. De esta forma se pretendía obtener una idea aproximada del nivel de exposición a la AF M₁ en los consumidores que habitualmente adquirieran la leche en el mencionado establecimiento o en otro de similares características. Además, tuvimos ocasión de comprobar que a lo largo de todo el muestreo apenas se producían cambios en las marcas de leche disponibles en este comercio (Tabla V.1.), lo que, en el caso de presentarse una mayor incidencia de AF M₁ en marcas determinadas, supondría la ingestión reiterada de la toxina en los consumidores habituales de esas marcas.

A pesar de que la mayoría de las muestras analizadas correspondieron a leche entera UHT (8 marcas), también se procedió al análisis de muestras pertenecientes a dos marcas de leche fresca pasterizada (una de ellas procedente de una granja Diplomada-A- y otra de una central-B-) además de leche semidesnatada UHT correspondiente a una marca extranjera-F-. La elección de la leche fresca pasterizada se tomó por considerarse el producto en el que se podía tener un control más claro en cuanto a su fecha de elaboración, ya que en el caso de la leche UHT sólo se contaba con la fecha de caducidad del producto. Por otro lado, y a

pesar de que el análisis de muestras de una sola marca extranjera no es muy representativo, se consideró interesante completar el muestreo con estos análisis.

Tabla V.1. Relación de marcas de leche recogidas en cada fase del muestreo.

Marca/fase	F1	F2	F3	F4	F5	F6
A	*	*	*	*	*	*
B	*	*	*	*	*	*
C	*	*	*	*	*	*
D	*	*	*	*	*	*
E	*	*	*	*		
F	*	*	*	*	*	*
G	*	*	*	*	*	*
H	*	*				
I	*	*		*		
J			*	*		*
K					*	*

Los datos obtenidos señalan que el 14% de las muestras analizadas contenían AF M₁ en cantidades detectables y cuantificables (entre 0'018 y 0'042 µg/l) si bien, en un 3% de estas muestras positivas, correspondientes al nivel de 0'018 µg/l, aunque esta cantidad era detectable, estaba situada en el intervalo correspondiente al límite de determinación de la técnica.

Los resultados no permitieron el establecimiento de diferencias en cuanto a la incidencia de AF M₁ con relación a la fecha de compra en ninguno de los casos ya que del análisis de las 24 muestras correspondientes a leche fresca pasteurizada sólo aparecieron dos muestras positivas.

La comparación de estos resultados con los obtenidos en otros estudios realizados sobre la incidencia de AF M₁ en leche es difícil, principalmente, y como ya se mencionara en la Introducción, por los diferentes porcentajes de recuperación y límites de determinación de las técnicas analíticas utilizadas.

Con respecto a los estudios llevados a cabo en España con muestras de leche esterilizada y empleando para la detección técnicas de CCF, hay que destacar que Jodral no encontró contaminación alguna por AF M₁ en el análisis de 330 muestras de este producto, analizadas en 1977 [Jodral, 1977; Jodral y col., 1984]. Por su parte Burdaspal [1983], en un estudio realizado sobre 97 muestras correspondientes a leche natural (13), esterilizada (46), pasterizada (30) y concentrada (6) encontró un 7'3% de muestras positivas, con un nivel de AF M₁ entre 0'020 y 0'040 µg/l. Estos resultados coinciden con los nuestros en cuanto al nivel de contaminación detectado; no obstante, al no especificarse las diferencias entre los distintos tipos de leche analizada, no es posible establecer una comparación con este autor en cuanto a los resultados globales.

En el estudio realizado por Blanco y col., sobre 47 muestras de leche UHT recogidas a lo largo de un año en una central de León que recibía la leche de una misma zona de la provincia, se obtuvo un porcentaje de muestras positivas próximo al 30%, con niveles de contaminación entre 0'020 y 0'100 µg/l [Blanco, 1986; Blanco y col., 1988b]. Las diferencias encontradas entre estos resultados y los obtenidos en el presente trabajo pueden deberse a varios factores, el principal de los cuales es la diferente procedencia de las muestras analizadas, ya que en el caso de grandes centrales la mezcla de leche de diferente procedencia origina la dilución de la concentración de AF M₁ al mezclarse leche contaminada y no contaminada.

Finalmente, los porcentajes de muestras positivas obtenidos en este estudio contrastan con los resultados de Macho y col. [1992], realizados sobre un total de 33 muestras de leche UHT. Estos autores encontraron AF M₁ en la totalidad de las muestras analizadas, si bien los niveles de concentración en todas las muestras oscilaron entre valores <0'010 y 0'025 µg/l. Para este estudio Macho y col. emplearon la técnica de Mortimer y col. [1987] basada en la utilización de columnas de inmunoafinidad y un sistema de CL cuyo límite de detección se encuentra en 50 pg/l.

Es de destacar que del 14% de muestras positivas detectadas en nuestro

estudio, el 57% correspondieron a una misma marca, siendo además en la que aparecieron las muestras con el nivel de contaminación más alto. Esto puede suponer que esta central reciba la leche de localizaciones más concretas en donde el ganado vacuno consume alimentos contaminados con AF B₁. No obstante, no es posible afirmar que la cantidad de AF B₁ en las raciones consumidas por estos animales supera la normativa establecida en nuestro país, que establece un contenido máximo de esta aflatoxina de 20 µg/Kg [BOE, 1976].

En cuanto a la legislación vigente en los distintos países que regulan el contenido de AF M₁ en leche, los resultados obtenidos en este estudio muestran que los niveles de contaminación encontrados no exceden ninguna de estas normativas (exceptuando la normativa rumana que especifica un contenido nulo de AF M₁).

Hay que destacar que en los resultados de los estudios sobre la incidencia de AF M₁ en productos lácteos efectuados en los últimos años influyen al menos dos factores. En primer lugar, el cumplimiento de las medidas legislativas en cuanto a los niveles máximos tolerados, tanto de AF M₁ en productos lácteos como de AF B₁ en los alimentos destinados al ganado vacuno lechero, lo que ha conllevado la reducción en el número de muestras positivas con niveles altos de AF M₁. En segundo lugar, se debe tener en cuenta que el desarrollo de técnicas analíticas de mayor sensibilidad ha permitido en algunos casos que se incrementara el número de muestras positivas aunque con niveles de concentración considerablemente bajos [Van Egmond, 1989a, 1991], como sucede en el estudio de Macho y col [1992].

V. 8. VALIDACION DE LA TECNICA DE DD PARA LA EXTRACCION DE AF M₁ DE LECHE EN POLVO A PARTIR DE MATERIALES DE REFERENCIA

Para la realización de este estudio se dispuso de los cuatro materiales certificados elaborados por la Oficina de Referencia Comunitaria [Van Egmond y Wagstaffe, 1986, 1988], con objeto de comprobar la eficacia de la técnica y el límite de determinación establecido (porcentaje de recuperación de la AF M₁ del 82% para un nivel de contaminación de 0'5 µg/Kg y del 73% para un nivel de 0'8 µg/Kg, siendo el límite de determinación entre 0'3 y 0'4 µg/Kg).

Cabe destacar que en ninguno de los análisis efectuados a partir de los materiales n°282 y 283 se pudo detectar AF M₁, lo que confirma que el contenido de la aflatoxina en estos materiales (n°282= <0'050 µg/Kg y n°283= 0'090+0'04/-0'02 µg/Kg) se encuentra por debajo del límite de determinación de la técnica de DD desarrollada (0'3-0'4 µg/Kg).

Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de los materiales n°284 y 285 se corresponden con las cantidades certificadas (n°284= 0'310±0'060 µg/Kg y n°285= 0'760±0'050 µg/Kg), siendo el intervalo de confianza equivalente (n°285) e incluso menor (n° 284). En el caso de las cantidades estimadas una vez aplicado el porcentaje de recuperación establecido para la técnica de DD, los valores se encuentran ligeramente por encima de las cantidades certificadas. Esto puede deberse a las diferencias existentes en los porcentajes de recuperación de la técnica de DD cuando se empleaban distintas concentraciones de AF M₁, así como a las posibles diferencias en cuanto a la eficacia de la técnica para la extracción de la aflatoxina en muestras contaminadas de forma natural y artificial.

Los aspectos principales de los estudios de validación a partir de materiales de referencia son la comprobación de la efectividad, sensibilidad y repetitividad de las técnicas que se prueban [Van Egmond y Wagstaffe, 1986]. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran la efectividad de la técnica de DD desarrollada para

la extracción de AF M₁ a partir de leche en polvo. En este sentido, uno de los problemas que se producen en las extracciones convencionales sobre todo cuando se utiliza triclorometano es la formación de emulsiones con la leche reconstituida [Van Egmond y Wagstaffe, 1986]. En el proceso de DD este problema se evita por la separación física del solvente y la fase acuosa a través de la membrana de diálisis [Domínguez y col., 1991, 1992].

Por otra parte, en las especificaciones sobre estos materiales se indica la posibilidad de aparición de sustancias adyacentes a la AF M₁, que pueden ocasionar interferencias en la detección mediante técnicas de CCF, sobre todo en los materiales con menor contenido en AF M₁. Por este motivo se recomienda el empleo de sistemas de desarrollo bidimensional y la aplicación de patrones internos para diferenciar la aflatoxina de las sustancias interfirientes [Van Egmond y Wagstaffe, 1986]. En este trabajo el empleo de patrones internos ha sido una constante en el desarrollo de todas las técnicas analíticas, debido a su gran utilidad para la identificación de las aflatoxinas. Con relación al presente estudio, en algunas de las cromatoplasmas elaboradas a partir de los extractos de materiales de referencia se ha producido la aparición de una sustancia con R_f próximo a la AF M₁, pero en ningún caso su presencia ha interferido la detección y/o cuantificación de esta aflatoxina, ya que la separación obtenida con el solvente de desarrollo empleado era satisfactoria y la cantidad de la sustancia interfiriente muy pequeña. Por lo demás los cromatogramas eran iguales a los obtenidos a partir de la leche en polvo utilizada en el resto de las experiencias.

Varios autores han empleado en sus estudios materiales de referencia con objeto de validar técnicas analíticas o comparar los resultados obtenidos a partir de estos materiales con otros tipos de muestras. En 1987, Mortimer y col. realizaron un estudio para comprobar la efectividad de una técnica de análisis de AF M₁ en leche en polvo, basada en la extracción de la toxina empleando columnas de afinidad comerciales tipo Easi-Extract® y aplicando para la detección un sistema de CL. Los resultados obtenidos por este autor concuerdan con las cantidades certificadas, al igual que ocurre en el estudio realizado por Macho y col. [1992]

empleando la misma técnica. No obstante, en ninguno de los dos casos aparecen los resultados corregidos en función del porcentaje de recuperación estimado para la técnica, sino que se calcula el porcentaje de recuperación a partir de los resultados obtenidos con estos materiales.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

- PRIMERA** El análisis de aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos puede realizarse con gran eficacia, sensibilidad, sencillez y economía de medios utilizando el método de diálisis difásica desarrollado en el presente trabajo. Este método puede ser aplicado igualmente para el análisis de otras aflatoxinas en los mismos productos.
- SEGUNDA** Las condiciones generales más favorables para la realización de la diálisis difásica en estas aplicaciones son las siguientes: relación de volumen entre muestra y solvente 1:1'4, triclorometano como solvente de extracción colocado en el interior del tubo de diálisis e incubación durante cinco horas a 37° C y con una velocidad de agitación de 150 rpm.
- TERCERA** Las variaciones más notables en los parámetros de trabajo se dan en el análisis de aflatoxinas en queso. En este caso, las muestras deben prepararse con una solución de bicarbonato sódico y una solución preservadora, el tiempo de extracción es de 18 horas y el solvente cromatográfico más adecuado es la mezcla triclorometano/metanol (90/10).
- CUARTA** Teniendo en cuenta los límites de detección y determinación obtenidos en los distintos productos cuando se analizan aflatoxinas mediante la técnica de diálisis difásica, esta metodología sería aplicable en la mayoría de los países que cuentan en su legislación con una normativa sobre niveles de tolerancia de aflatoxinas en leche y productos lácteos.
- QUINTA** La variante de la diálisis difásica denominada mini-diálisis difásica puede emplearse como sistema de análisis semicuantitativo rápido de la aflatoxina M_1 en leche.
- SEXTA** Los resultados obtenidos a partir del muestreo indican que sería conveniente establecer en nuestro país una reglamentación sobre los límites de aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos, así como vigilar el cumplimiento de la reglamentación sobre el contenido máximo de aflatoxina B_1 en los alimentos destinados al ganado lechero.

SEPTIMA La utilización de materiales de referencia certificados ha permitido validar de forma muy satisfactoria la técnica de diálisis difásica para el análisis de aflatoxina M₁ en leche en polvo.

Resumen

VII. 1. RESUMEN

El presente trabajo se ocupa principalmente del desarrollo de una nueva técnica de membranas para la extracción de AF M₁ de leche y productos lácteos, empleando para la detección y cuantificación posterior un sistema de cromatografía en capa fina de alta eficacia (CCFAE). Además, esta técnica se ha aplicado igualmente para la extracción de las aflatoxinas G₁ y B₁ de los mismos productos.

La técnica desarrollada, denominada diálisis difásica (DD), se fundamenta en dos propiedades características de la mayoría de los residuos de interés sanitario y mediambiental: bajo peso molecular y mayor solubilidad de estos compuestos en solventes orgánicos que en soluciones acuosas. La extracción de sustancias de interés mediante esta técnica se realiza a partir de matrices acuosas (en este caso leche, yogur, solución de leche en polvo en agua y una mezcla obtenida a partir de las muestras de queso con una solución de bicarbonato sódico). Esta matriz acuosa se encuentra separada del solvente de extracción (triclorometano) por medio de una membrana semipermeable y porosa, que se dispone en forma de tubo de diálisis y en cuyo interior se coloca el solvente. El conjunto, es decir, la muestra y el tubo de diálisis, se colocan en un matraz, que se incuba en agitación orbital a temperatura controlada durante un periodo de tiempo variable. La eficacia del proceso de DD depende de la relación entre el volumen de muestra y solvente, tiempo de extracción, temperatura de extracción, pH de la muestra y velocidad de agitación.

Los métodos desarrollados en este trabajo son los que se describen a continuación:

1. Extracción de aflatoxinas a partir de leche. Las condiciones consideradas como más favorables son: un volumen de muestra de 50 ml con su valor de pH normal, 70 ml de triclorometano como solvente de extracción, colocado en el interior de un tubo de diálisis de 60 cm de longitud. La incubación se lleva a cabo durante 5 horas a 37 °C y 150 rpm. La detección se efectúa con un sistema de cromatografía de desarrollo vertical y empleando como solvente la mezcla triclorometano/metanol (95/5). En esas condiciones el porcentaje de recuperación de la técnica, para un nivel de contaminación de 0'050 µg/l, es del 96% (AF M₁), 72% (AF G₁) y 64% (AF B₁). El límite de determinación se encuentra entre 0'01 y 0'02 µg/l para las tres aflatoxinas y el límite de detección corresponde a 0'0020 µg/l (AF M₁), 0'0053 µg/l (AF G₁) y 0'0040 µg/l (AF B₁).

2. Extracción de aflatoxinas a partir de leche en polvo. Para realizar la DD se parte de una cantidad de muestra de 6'25 g que se disuelve en 50 ml de agua destilada. La extracción se realiza en las mismas condiciones que en el método anterior, al igual que la detección y cuantificación por CCFAE. En esas condiciones el porcentaje de recuperación de la técnica, para un nivel de contaminación de 0'50 µg/Kg, es del 83% (AF M₁), 87% (AF G₁) y 74% (AF B₁). El límite de determinación se encuentra entre 0'30 y 0'40 µg/Kg para las tres aflatoxinas y el límite de detección corresponde a 0'0280 µg/Kg

(AF M₁), 0'0299 µg/Kg (AF G₁) y 0'0126 µg/Kg (AF B₁).

3. Extracción de aflatoxinas a partir de yogur. En este caso la extracción se realiza a partir de una muestra de 50 g de yogur y en las mismas condiciones citadas anteriormente. El porcentaje de recuperación de la técnica, para un nivel de contaminación de 0'045 µg/Kg, es entre 66 y 88% (AF M₁), 62 y 87% (AF G₁) y 48 y 78% (AF B₁), dependiendo de la solución de aflatoxinas empleada en la contaminación. El límite de determinación se encuentra entre 0'01 y 0'02 µg/Kg para las tres aflatoxinas y el límite de detección corresponde a 0'0056 µg/Kg (AF M₁), 0'0064 µg/Kg (AF G₁) y 0'0043 µg/Kg (AF B₁).

4. Extracción de aflatoxinas a partir de queso. Las condiciones más favorables son: una cantidad de muestra de 50 g que se homogeneiza con 65 ml de solución de bicarbonato sódico al 0'3% y 5 ml de solución preservadora [Tuinstra y col., 1989]. La extracción se realiza empleando 70 ml de triclorometano en el interior de un tubo de diálisis de 60 cm de longitud y la incubación es de 18 horas a 37 °C y 150 rpm. La detección se lleva a cabo con un sistema de desarrollo vertical y empleando como solvente las mezclas triclorometano/metanol (95/5 ó 90/10). En esas condiciones el porcentaje de recuperación de la técnica, para un nivel de contaminación de 0'100 µg/Kg es del 89% (AF M₁), 73% (AF G₁) y 65% (AF B₁). El límite de determinación se encuentra entre 0'06 y 0'08 µg/Kg para la AF M₁ y entre 0'04 y 0'06 µg/Kg para las aflatoxinas G₁ y B₁. El límite de detección corresponde a 0'0298 µg/Kg (AF M₁), 0'0339 µg/Kg (AF G₁) y 0'0088 µg/Kg (AF B₁).

Asimismo, se ha desarrollado una técnica de mini-DD para la extracción de AF M₁ en leche. Esta técnica se caracteriza por el uso de volúmenes muy reducidos de muestra (10 ml) y solvente (14 ml). La extracción se realiza a 37 °C y 150 rpm. El porcentaje de recuperación, para niveles de contaminación comprendidos entre 0'04 y 0'10 µg/l se encuentra entre el 30 y el 40% en extracciones de una hora, y entre el 50 y 60% para extracciones de dos horas. El límite de determinación se sitúa entre 0'04 y 0'05 µg/l de AF M₁.

Una vez desarrolladas las técnicas analíticas, se realizó un estudio de presencia de AF M₁ en leche comercial. Se analizaron 100 muestras adquiridas en un establecimiento de la Comunidad de Madrid, entre enero y junio de 1993. Los resultados mostraron un total de muestras positivas del 14%, con una media de 0'026 µg/l.

Finalmente, este trabajo incluye un estudio en el que se emplean materiales de referencia suministrados por la Oficina de Referencia Comunitaria (BCR) con objeto de la validación de la técnica de DD desarrollada para el análisis de AF M₁ en leche en polvo. Los resultados obtenidos a partir de la realización de las pruebas especificadas por el BCR, muestran la gran efectividad de la técnica de DD desarrollada, sirviendo a la vez para la comprobación de los límites de determinación establecidos en el método.

La técnica de DD presentada en este trabajo tiene numerosas ventajas frente a otros procedimientos de extracción, destacando entre ellas la sencillez y la economía de material y tiempo de trabajo, además de ser un sistema de extracción y purificación simultáneo, pudiendo emplearse los extractos obtenidos directamente para la detección de las aflatoxinas sin pasos adicionales de purificación de los extractos.

VII. 2. SUMMARY

The main objective of the present work is to develop a new membrane technique for the extraction of aflatoxin M₁ in dairy products, following detection and quantification by an HPTLC system. This technique has been also applied to the extraction of aflatoxins G₁ and B₁ in the same products.

The technique developed in this work, named diphasic dialysis (DD), is based in two common characteristics of most of the interesting environmental and sanitary residues: low molecular weight and better solubility in organic solvents than in aqueous solutions. The extraction by this technique is carried out from aqueous substrates (milk, yoghurt, milk powder dissolved into water, and samples of cheese prepared with a sodium bicarbonate solution). This aqueous substrate is separated from the extraction solvent (trichlorometane) by a porous semi-permeable membrane, which is prepared as a dialysis tube containing the solvent. Both sample and dialysis tube are placed into a flask which is incubated with orbital shaking. The efficiency of the DD technique depends on the sample to solvent volume ratio, the extraction time and temperature, the sample pH value, and the shaking speed.

The methods developed in this work are described next:

1. Extraction of aflatoxins from milk: the best performance is obtained with a sample volume of 50 ml of milk, and using 70 ml of trichlorometane placed into a dialysis tube of 60 cm length. The extraction is performed during 5 hours, at 37 °C, and 150 rpm. Plates are developed with trichlorometane/methanol (95/5) and detection and quantification are carried out by means of a densitometer. In these conditions the recovery at the 0.050 µg/l level is 96% (AF M₁), 72% (AF G₁), and 64% (AF B₁). The determination limit is between 0.010 and 0.020 µg/l for the three aflatoxins, and the detection limit established is 0.0020 µg/l (AF M₁), 0.0053 µg/l (AF G₁), and 0.0040 µg/l (AF B₁).

2. Extraction of aflatoxins from milk powder: the best results are obtained with samples of 6.25 g of milk powder dissolved in 50 ml of distilled water, and performing the DD under the same conditions mentioned above. The recovery at the 0.50 µg/Kg level is 83% (AF M₁), 87% (AF G₁), and 74% (AF B₁). The determination limit is between 0.30 and 0.40 µg/Kg for the three aflatoxins, and the detection limit established is 0.0280 µg/Kg (AF M₁), 0.0299 µg/Kg (AF G₁), and 0.0126 µg/Kg (AF B₁).

3. Extraction of aflatoxins from yoghurt: the best performance of the technique is obtained with samples of 50 g of yoghurt. The DD is carried out in the same way as milk and milk powder. In these conditions the recovery at the 0.045 µg/Kg level is between 66 and 88% (AF M₁), 62 and 87% (AF G₁), and 48 and 78% (AF B₁), depending on the aflatoxin solution used for the contaminations. The determination limit is between 0.010 and 0.020 µg/Kg for the three aflatoxins, and the detection limit established is 0.0056 µg/Kg (AF M₁), 0.0064 µg/Kg (AF G₁), and 0.0043 µg/Kg (AF B₁).

4. Extraction of aflatoxins from cheese: the better conditions to perform the DD technique are obtained with samples of 50 g of cheese prepared with 65 ml of a 0.3% sodium bicarbonate solution and 5 ml of a preservative solution [Tuinstra *et al.*, 1989], and using 70 ml of trichlorometane placed into a dialysis tube of 60 cm length. The extraction is performed during 18 hours, at 37 °C, and 150 rpm. Plates are developed with trichlorometane/methanol (95/5 or 90/10), and detection and quantification are carried out by densitometry. In these conditions the recovery at the 0.100 µg/Kg level is 89% (AF M₁), 73% (AF G₁), and 65% (AF B₁). The determination limit is between 0.06 and 0.08 µg/Kg for AF M₁ and between 0.04 and 0.06 µg/Kg for AF G₁ and AF B₁. The detection limit is 0.0298 µg/Kg (AF M₁), 0.0339 µg/Kg (AF G₁) and 0.0088 µg/Kg (AF B₁).

In this work, it has been also developed a mini-DD method for the extraction of AF M₁ in milk. This technique requires the use of small volumes of sample (10 ml) and solvent (14 ml). The extraction is performed at 37 °C and 150 rpm. The recovery, at levels from 0.04 to 0.10 µg/l, is between 30 and 40% in one-hour extractions, and between 50 and 60% in two-hours extractions. The determination limit is established between 0.04 and 0.05 µg/l.

Once the different methods were developed, a survey of AF M₁ in commercial milk was carried out by using the DD technique to analyze one hundred samples acquired in a store in Madrid, from January to June of 1993. The results show the presence of AF M₁ in 14% of the samples, with a concentration average of 0.026 µg/l and a range between 0.018 to 0.042 µg/l.

Besides, with the aim of validate the DD method developed for the extraction of AF M₁ in powder milk, this work includes a study carried out with certified reference materials supplied by the Community Bureau of Reference (BCR). The results of the assays performed from these materials show the effectivity of the DD as extraction method. Moreover, this materials have been also useful to check the determination limit established in the method.

The DD technique presented in this work has some advantages over other extraction methods, mainly simplicity and economy in materials and working time. Furthermore, this technique is at the same time an extraction and purification method, that allows the detection of the residues present in the extracts without previous steps.

Bibliografía

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Adye, J. and R.I. Mateles. (1964). Incorporation of labeled compounds into aflatoxins. *Biochim. Biophys. Acta*, **86**:418-420.
- Aerts, M.M.L. and W.M.J. Beek. (1988). Monitoring of veterinary drug residues by a combination of continuous flow techniques and column-switching high-performance liquid chromatography. I. Sulphonamides in egg, meat and milk using post-column derivatization with dimethyl-amino-benzaldehyde. *J. Chromatogr.*, **435**:97-112.
- Aerts, M.M.L., W.M.J. Beek, and U.A.T. Brinkman. (1990). On-line combination of dialysis and column-switching liquid chromatography as a fully automated sample preparation technique for biological samples determination of nitrofurans residues in edible products. *J. Chromatogr.*, **500**:453-468.
- Allcroft, R. and R.B.A. Carnaghan. (1963). Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet. Rec.*, **75**:259-263.
- Allcroft, R., H. Rogers, G. Lewis, B. Nabney, and P.E. Best. (1966). Metabolism of aflatoxin in sheep. Excretion of the "milk-toxin". *Nature*, **209**:154-155.
- AOAC. (1973). Changes in methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**:485-486.
- Applebaum, R.S. and E.H. Marth. (1982). Inactivation of aflatoxin M₁ in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase. *J. Food Prot.*, **45**:567-560.
- Asao, T., G. Buchi, M.N. Abdel-Kader, S.B. Chang, E.L. Wick, and G.N. Wogan. (1963). Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**:1706-1707.
- Asplin, F.D. and R.B.D. Carnaghan. (1961). The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect of ducklings and chickens. *Vet. Rec.*, **23**:12-15.
- Austwick, P.K.C. (1984). Human mycotoxicoses: past, present and future. *Chem. Industry*, **15**:547-551.
- Autfray, Y. and P. Boutibonnes. (1986). Evaluation of the genotoxic activity of some mycotoxins using *E. coli* in the SOS spot test. *Mutation Res.*, **171**:79-82.

- Autrup, H., J. Wakhisi, K. Vahakangas, A. Vasunna, and C.C. Harris. (1985). Detection of 8,9-dihydro-(7-guanyl)-9-hydroxyafatoxin B₁ in human urine. *Environ. Health Perspect.*, **62**:105-108.
- Autrup, H., T. Seremet, J. Wakhisi, and A. Wasunna. (1987). Aflatoxin exposure measured by urinary excretion of aflatoxin B₁-guanine adduct and hepatitis B virus infection in areas with different liver cancer incidence in Kenya. *Cancer Res.*, **47**:3430-3433.
- Balachandran, C. and T. Ramakrishnan. (1988). Influence of dietary aflatoxin on certain serum enzyme levels in broiler chickens. *Mycopathologia*, **101**:65-67.
- Bayo, J., M.A. Moreno, S. Díaz, J. Prieta y L. Domínguez. Diálisis difásica: nuevo método de membrana para la extracción de antibióticos en alimentos. *I Congreso Iberoamericano en Ciencias y Tecnología de Membranas*. Septiembre de 1992. Murcia (España).
- Bayo, J., M.A. Moreno, J. Prieta, S. Díaz, G. Suárez, and L. Domínguez. (1993). Chloramphenicol extraction from milk using the diphasic dialysis method and liquid chromatographic determination. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, (en prensa).
- Beebe, R.M. and D.M. Takahashi. (1980). Determination of aflatoxin M₁ by high-pressure liquid chromatography using fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, **28**:481-482.
- Bennett, J.W. and R. Bentley. (1989). What's in a name? - Microbial secondary metabolism. *Adv. Appl. Microbiol.*, **34**:1-28.
- Bijl, J.P. and C.H. Van Pethegem. (1985). Rapid extraction and sample clean-up for the fluorescence densitometric determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder. *Anal. Chim. Acta*, **170**:149-152.
- Bijl, J.P., C.H. Van Pethegem, and D.A. Dekeyser. (1987). Fluorimetric determination of aflatoxin M₁ in cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**:472-475.
- Bijlsma, F. (1981). Malignant tumours in Mozambican Africans with special reference to primary liver carcinoma. *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**:451-454.
- Blanc, M. (1979). Application de la chromatographie liquide haute-performance avec détection spectrophotométrique, ultra-violette et fluorimétrique au dosage des aflatoxines. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **72**:427-440.

- Blanco, J.L. (1986). Investigación y problemática de la presencia de aflatoxinas en leche y productos lácteos fermentados (yogur y queso). Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
- Blanco, J.L., L. Domínguez, E. Gómez-Lucía, J.F.F. Garayzabal, J. Goyache, and G. Suárez. (1988a). Behavior of aflatoxin during the manufacturing, ripening and storage of Manchego-type cheese. *J. Food. Sci.*, **53**:1373-1376.
- Blanco, J.L., L. Domínguez, E. Gómez-Lucía, J.F.F. Garayzabal, J.A. García, and G. Suárez. (1988b). Presence of aflatoxin M₁ in commercial ultra-high-temperature treated milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:1622-1623.
- Blanco, J.L., L. Domínguez y G. Suárez. (1989a). Problemática de la presencia de aflatoxinas en leche y productos lácteos. I. *Alimentaria*, **Septiembre**:43-53.
- Blanco, J.L., L. Domínguez y G. Suárez. (1989b). Problemática de la presencia de aflatoxinas en leche y productos lácteos. II. *Alimentaria*, **Octubre**:35-46.
- Blanco, J.L., L. Domínguez, M.A. Moreno, S. Díaz, J. Prieta y G. Suárez. Diálisis difásica: nueva tecnología de extracción de micotoxinas en alimentos. *XIII Congreso Nacional de Microbiología*. Julio de 1991. Salamanca (España).
- Blanco, J.L., B.A. Carrión, N. Liria, S. Díaz, M.E. García, L. Domínguez, and G. Suárez. (1993). Behavior of aflatoxins during manufacture and storage of yogurt. *Milchwissenschaft*, (**en prensa**).
- Blount, W.P. (1961). "Turkey X" disease and the labelling of poultry foods. *Vet. Rec.*, **73**:227.
- BOE de 6 de septiembre de 1976. Orden del 23 de junio. Autorización y registro de las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de animales. pp. 17366-17392.
- Brackett, R.E. and E.H. Marth. (1982a). Association of aflatoxin M₁ with casein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **174**:439-441.
- Brackett, R.E. and E.H. Marth. (1982b). Fate of aflatoxin M₁ in cheddar cheese and process cheese spread. *J. Food Prot.*, **45**:549-552.
- Bruce, R.D. (1990). Risk assessment for aflatoxin. II: Implications of human epidemiology data. *Risk Analysis*, **10**:561-569.

- Buckle, A.E. and M.F. Sanders. (1990). An appraisal of bioassay methods for the detection of mycotoxins - A review. *Lett. Appl. Microbiol.*, **10**:155-160.
- Buchi, G.H., P.M. Muller, B.D. Roebuck, and G.N. Wogan. (1974). Aflatoxin Q₁: a major metabolite of aflatoxin B₁ produced by human liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **8**:585-591.
- Bullerman, L.M. (1981). Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. *J. Dairy Sci.*, **64**:2439-2452.
- Burdaspal, P.A., T.M. Legarda y I. Pinilla. (1983). Incidencia de la contaminación por aflatoxina M₁ en leche. *Rev. Agroquim. Tecnol. Alim.*, **23**:287-290.
- Burdaspal, P.A. Aspectos socio-económicos de la contaminación por micotoxinas. 2^a Reunión de Micología. Mayo de 1984. Barcelona (España). p. 146-152.
- Burg, W.R. and O.L. Shotwell. (1984). Aflatoxin levels in airborne dust generated from contaminated corn during harvest and at an elevator in 1980. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**:309-312.
- Burnside, J.E., W.L. Sippel, J. Forqacs, W.T. Carll, M.B. Atwood, and E.R. Doll. (1957). A disease of swine and cattle caused by eating moldy corn. Experimental production with pure cultures of molds. *Am. J. Vet. Res.*, **18**:817-824.
- Butler, W.H. Aflatoxicoses in laboratory animals. En: *Aflatoxins*, L.A. Goldblatt, (Ed.). 1969, Academic Press: New York. p. 223-234.
- Butler, W.H. Aflatoxins. En: *Mycotoxins*, I.F.H. Purchase, (Ed.). 1974, Elsevier: Amsterdam. p. 1-28.
- Butler, W.H. (1984). Pathological aspects of mycotoxicoses. *Chem. Industry*, **15**:541-542.
- Cámara, J.M., J.L. Blanco, M.T. Cutuli, G. Suárez y L. Domínguez. (1992). Determinación de residuos de clembuterol en orina de animales de abasto mediante diálisis difásica. *Alimentaria*, **junio**:25-31.
- Campbell, T.C., J.P. Caedo, J. Bulatao-Jayme, L. Salamat, and R.W. Engel. (1970). Aflatoxin M₁ in human urine. *Nature*, **227**:403-404.
- Campbell, T.C. and L. Stoloff. (1974). Implication of mycotoxins for human health. *J. Agric. Food. Chem.*, **22**:1006-1015.

- Candlish, A.A.G., J.E. Smith, and W.H. Stimson. (1990). Aflatoxin monoclonals: academic development to commercial production. *Lett. Appl. Microbiol.*, **10**:167-169.
- Ciegler, A. and E.B. Lillehoj. (1968). Mycotoxins. *Adv. Appl. Microbiol.*, **10**:155-219.
- Codifer, L.P., G.E. Mann, and F.G. Dollear. (1976). Aflatoxin inactivation: treatment of peanut meal with formaldehyde and calcium hidroxide. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **53**:204-206.
- Cohen, H., M. Lapointe, and J. Fremy. (1984). Determination of aflatoxin M₁ in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**:49-51.
- Cole, R.J., H.G. Cutler, and J.W. Dorner. Biological screening methods for mycotoxins and toxigenic fungi, en: *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins*, R.J. Cole, (Ed.), 1986, Academic Press: London. p. 1-23.
- Commision of the European Communities: Report EUR 14126EN. (1992). Residues in food-producing animals and their products: reference materials and methods. Heitzman, R.J. (Ed.). Luxemburgo.
- Cooper, J.D.H., D.C. Turnell, B. Green, and F. Venllon. (1988). Automated sequential trace enrichment of dialysates and robotics. A technique for the preparation of biological samples prior to high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **456**:59-69.
- Coppedge, R.L. Aflatoxin control in Arizona. *Food Research Institute. Annual Spring Meeting*. 1983.
- Corrier, D.N. (1991). Mycotoxicosis: mechanisms of immunosupresion. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **30**:73-87.
- Coulter, J.B.S., S.M. Lamplugh, G.I. Suliman, M.I.A. Omer, and R.G. Hendrickse. (1984). Aflatoxin in human breast milk. *Am. Trop. Paed.*, **4**:61-66.
- Cova, L., C.P. Wild, R. Mehrotra, V. Turusov, T. Shirai, V. Lambert, C. Jaquet, L. Tomatis, C. Trépo, and R. Montesano. (1990). Contribution of aflatoxin B₁ and hepatitis B virus infection in the induction of liver tumors in ducks. *Cancer Res.*, **50**:2156-2163.
- Croy, R.G., J.M. Essigmann, V.N. Reinhold, and G.N. Wogan. (1978). Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:1745-1749.
- Cullen, J.M., B.H. Ruebbler, L.S. Hsieh, D.M. Hyde, and D.S.P. Hsieh. (1987). Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fisher rats compared to aflatoxin B₁. *Cancer Res.*, **47**:1913-1917.

- Cussler, E.L., P.R.J. Alexander, and R.W. Callaham, *European patent application 87304204.8 (12/5/87)*. 1987, Celanese corporation 1211 Avenue of the Americas. New York 10036 (US).
- Chang, H.L. and J.N. De Vries. (1983). Rapid high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk and nonfat dry milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**:913-917.
- Chang-Yen, I., A.A. Stoute, and J.B. Felmine. (1984). Effect of the solvent composition on aflatoxin fluorescence. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**(2):306-307.
- Chu, F.S. Immunoassays for mycotoxins. En: *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins*, R.J. Cole, (Ed.). 1986, Academic Press: London. p. 207-237.
- Chu, F.S. (1991). Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutation Res.*, **259**:291-306.
- De Vries, H.R., S.M. Maxwell, and R.G. Hendrickse. (1990). Aflatoxin excretion in children with kwashiorkor or marasmic kwashiorkor- a clinical investigation. *Mycopathologia*, **110**:1-9.
- Deger, G.E. (1976). Aflatoxin-human colon carcinogenesis. *Ann. Int. Med.*, **85**:204.
- Di Paolo, J.A., J. Ellis, and H. Erwin. (1967). Teratogenic response by hamsters, rats and mice to aflatoxin B₁. *Nature*, **215**:638-639.
- Díaz, S. (1990). Solubilidad de las aflatoxinas B₁ y G₁ en soluciones acuosas a distintos valores de pH. Tesina de licenciatura. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
- Dickens, J.W. and T.B. Whitaker. Sampling and sample preparation methods for mycotoxin analysis. En: *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins*, R.J. Cole, (Ed.). 1986, Academic Press: London. p. 29-47.
- Dirr, H.W. (1987). Effects of hydrogen ion and fatty acid concentrations on the binding of aflatoxin B₁ to human albumin. *Biochem. Inter.*, **14**:727-733.
- Dixon-Holland, J.J. Pestka, B.A. Bidigare, W.L. Casezle, R.L. Warner, B.P. Ram, and L.P. Hart. (1988). Production of sensitive monoclonal antibodies to aflatoxin B₁ and aflatoxin M₁ and their application to ELISA of naturally contaminated food. *J. Food Prot.*, **51**:201-204.

- Domínguez, L., J.L. Blanco, E. Gómez-Lucía, E.F. Rodríguez, and G. Suárez. (1987). Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products contaminated at low levels. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**:470-472.
- Domínguez, L., J.L. Blanco, M.A. Moreno y G. Suárez. (1991). Procedimiento para la extracción de sustancias de bajo peso molecular presentes en productos naturales y sintéticos. *Patente española número 9100649*.
- Domínguez, L., J.L. Blanco, M.A. Moreno, S. Díaz, J. Prieta, J.M. Cámara, J. Bayo, and G. Suárez. (1992). Diphasic dialysis: a new membrane method for a selective and efficient extraction of low molecular weight organic compounds from aqueous solutions. *J. AOAC Internat.*, **75**:854-857.
- Draughon, F.A. and E.A. Childs. (1982). Chemical and biological evaluation of aflatoxins after treatment with sodium hypochlorite and ammonium hydroxide. *J. Food Prot.*, **45**:703-706.
- Dvorackova, I. (1976). Aflatoxin and alveolar cell carcinoma. *Br. Med. J.*, **3**:691.
- Eller, K.I., L.V. Maximenko, and V.S. Sobolev. (1985). Patulin determination in food using sample pretreated with ascorbic acid and dialysed before extraction, extract purification and chromatography. *Patente europea número 85-037217*.
- Essigman, J.M., R.G. Croy, A.M. Nadzan, W.E. Busby, V.N. Reinhold, G. Buchi, and G.N. Wogan. (1977). Structural identification of the major DNA adduct formed by AF-B₁ *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:1870-1874.
- Farjam, A., N.C.V.d. Merbel, A.A. Nieman, H. Lingeman, and U.H.T. Brinkman. (1992). Determination of aflatoxin M₁ using a dialysis-based immunoaffinity sample pretreatment system coupled on-line to liquid chromatography-reusable immunoaffinity columns. *J. Chromatogr.*, **589**:141-149.
- Ferguson-Foos, J. and J.D. Warren. (1984). Improved clean-up for liquid chromatographic analysis and fluorescence detection of aflatoxins M₁ and M₂ in fluid milk products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**:1111-1114.
- Fischbach, H. and A.D. Campbell. (1965). Note on detoxification of the aflatoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **48**:28.
- Frémy, J.M. and B. Boursier. (1981). Rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **219**:156-161

- Frémy, J.M. and F.S. Chu. (1984). Direct ELISA for determining AFM₁ at picograms in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**:1098-1101.
- Frémy, J.M. and P. Quillardet. (1985). The "carry over" of aflatoxin into milk of cows fed ammoniated rations: use of an HPLC method and a genotoxicity test for determining milk safety. *Food Addit. Contam.*, **2**:201-207.
- Frémy, J.M. and F.S. Chu. Immunochemical methods of analysis of aflatoxin M₁. En: *Mycotoxins in dairy products*, H.P. Van Egmond, (Ed.). 1989, Elsevier Applied Science: London. p. 97-126.
- Friesen, M.D. (1989). The international mycotoxin check sample programme. *J. Toxicol. - Toxin Reviews*, **8**:363-373.
- Fukayama, M., W. Winterlin, and D.P.H. Hsieh. (1980). Rapid method for analysis of aflatoxin M₁ in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**:927-930.
- Gan, L.S., P.L. Skipper, X. Peug, J.D. Groopman, J.S. Chen, G.N. Wogan, and S.R. Tannenbaum. (1988). Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B₁ intake and urinary excretion of aflatoxin M₁. *Carcinogenesis*, **9**:1323-1325.
- GAO, (Ed.). Food safety and quality. Existing detection and control programs minimize aflatoxin. 1991, Report to the Chairman, Subcommittee on Wheat, Soybeans and Food Grains, Committee on Agriculture, House of Representatives. GAO/RCED-91-109.p. 47. Washington.
- Gardner, H.K. (1971). Inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals by ammoniation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **48**:70-73.
- Gauch, R., U. Leuenberger, and E. Baumgartner. (1979). Rapid and simple determination of aflatoxin M₁ in milk in the low parts per 10¹² range. *J. Chromatogr.*, **178**:543-549.
- Gimeno, A. (1979). Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin, and penitrem A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**: 579-585.
- Gorelick, N.J. (1990). Risk assessment for aflatoxin: I. Metabolism of aflatoxin B₁ by different species. *Risk Analysis*, **10**:539-559.
- Goto, T. (1990). Mycotoxins: current situation. *Food Reviews International*, **6**:265-290.

- Groopman, J.D., P.R. Donahue, J. Zhu, J. Chen, and G.N. Wogan. (1985). Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:6492-6496.
- Groopman, J.D. and K.F. Donahue. (1988). Aflatoxin, a human carcinogen: determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**:861-867.
- Halver, J.E. Aflatoxicosis and trout hepatoma. En: *Aflatoxins*, L.A. Goldblatt, (Ed.). 1969, Academic Press: New York. p. 265-304.
- Harington, J.S., E.M. Bradshaw, and N.D. McGlashan. (1983). Changes in primary liver and oesophageal cancer rates among black goldminers. *S. Afr. Med. J.*, **64**:650-651.
- Harris, C.C. and T. Sun. (1984). Multifactorial etiology of humor liver cancer. *Carcinogenesis*, **5**:697-701.
- Harvey, B., W.E. Huff, L.F. Kuberna, and T.D. Phillips. (1989). Evaluation of diets cocontaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs. *Am. J. Vet. Res*, **50**:1400-1405.
- Heimbecher, S.K., K.V. Jorgensen, and R.L. Price. (1988). Interactive effects of duration of storage and addition of formaldehyde on levels of aflatoxin M₁ in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**:285-287.
- Helferich, W.G., R.L. Baldwin, and D.P.H. Hsieh. (1986). [¹⁴C]-Aflatoxin B₁ metabolism in lactating goats and rats. *J. Anim. Sci.*, **62**:697-705.
- Hernández, E. y V. Sanchis. Mohos y micotoxinas: presente y futuro. *VIII Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos*. Septiembre de 1990. Barcelona (España).
- Holzappel, C.W., P.S. Steyn, and I.F.H. Purchase. (1966). Isolation and structure of aflatoxin M₁ and M₂. *Tetrahedron Lett.*, **25**:2799-2803.
- Horwitz, W. (1984). Control of systematic errors of methods of analysis through collaborative studies. *Proceedings Conf. Challenge to the contemporary dairy analytical techniques*. Reading (UK).
- Howell, M.W. and P.W. Taylor. (1981). Determination of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**:1356-1363.

- Hsieh, D.P.H., Cancer risks posed by mycotoxins in foods. En: *Phytochemical Ecol.*, C.H. Chow and G.R. Waller (Eds.) Vol. 9. 1989, Taipei. p. 343-353.
- Hsieh, D.P.H., L.M. Beltran, M.Y. Fukayama, D.W. Rice, and J.J. Wong. (1986). Production and isolation of aflatoxin M₁ for toxicological studies. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**:510-512.
- Hsieh, L.L., S.W. Hsu, D.S. Chen, and R. Santella. (1988). Immunological detection of aflatoxin B₁-DNA adducts formed *in vivo*. *Cancer Res.*, **48**:6328-6331.
- Jacobson, W.C., W.C. Harmeyer, and H.G. Wiseman. (1971). Determination of aflatoxin B₁ and M₁ in milk. *J. Dairy Sci.*, **54**:21-24.
- Jacquet, J. et P. Boutibonnes. (1970). Researches on flavacoumarins (flavotoxins or aflatoxins). *Rev. Immunol. Paris*, **34**:245-274.
- Jacquet, J., P. Boutibonnes et A. Teherani. (1970). Sur la présence des aflatoxines dans les aliments des animaux et dans les aliments d'origine animale destinés a l'homme. *Bull. Acad. Vét.*, **43**:35-43.
- Jacquet, J., P. Boutibonnes et A. Teherani. (1971). Recherche des flavacoumarines par chromatographie en couche mince. Importance de la discrimination des autres taches fluorescentes. *Bull. Acad. Vet.*, **43**:263-275.
- Jayaraman, A., V. Sreenivasamurthy, and H.A.B. Parpia. (1965). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **48**:1256-1260.
- Jewers, K., R.D. Coker, B.D. Jones, J. Cornelius, M.J. Nagler, N. Bradburn, K. Tomlins, V. Medlock, P. Dell, G. Blunden, O.G. Roch, and A.J. Sharkey. (1989). Methodological developments in the sampling of foods and feeds for mycotoxin analysis. *J. Appl. Bacteriol.*, **Symp. Suppl.**:105S-116S.
- Jodral, M. (1977). Investigaciones sobre aflatoxinas; influencia de condiciones ambientales en la contaminación de piensos y presencia en leche natural y esterilizada. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de Cordoba.
- Jodral, M., G. Zurena, R. Jordano, L.M. Polo y R. Pozo. (1984). Investigación de aflatoxinas en leche natural, esterilizada y en polvo. *Arch. Zootec.*, **33**:189-198.
- Jordano, R., M. Jodral, P. Martínez, J. Salmerón, and R. Pozo. (1989). Aflatoxin-producing strains

Aspergillus flavus in yogurt. *J. Food Prot.*, **52**:823-824.

Kamimura, H., M. Nishijima, K. Yasuda, H. Ushiyama, S. Tabata, S. Matsumoto, and T. Nishima. (1985). Simple, rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**:458-461.

Kaveri, S.V., J.M. Frémy, C. Lapeyre, and A.D. Strosberg. (1987). Immunodetection and immunopurification of aflatoxins using a high affinity monoclonal antibody to AFB₁. *Lett. Appl. Immunol.*, **4**:71-75.

Kiani, A., R.R. Bheave, and K.K. Sirkar. (1984). Solvent extraction with immobilized interfaces in a microporous hydrophobic membrane. *J. Memb. Sci.*, **20**:125-145.

Kiermeier, F. und W. Mücke. (1972). Über den Nachweis von aflatoxin M in milch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **150**:137-140.

Kiermeier, F. (1973). Aflatoxin residues in fluid milk. *Pure Appl. Microbiol.*, **35**:271-273.

Kiermeier, F. und G. Weiss. (1976). [Investigations of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ and M₁ in milk and milk products]. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **160**:337-344.

Kiermeier, F. und R. Mashaley. (1977). [Influence of raw milk processing on the aflatoxin M₁ content of milk products]. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **164**:183-187.

Kiermeier, F., G. Weiss, G. Behringer, und M. Miller. (1977). Über das vorkommen und den gehalt von aflatoxin M₁ in molkerei anlieferungsmilch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **163**:171-174.

Kiermeier, F. und G. Behringer. (1977). [Influence of cooling temperatures on aflatoxin formation in milk products]. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **164**:283-285.

Kiermeier, F., M. Miller, G. Weiss, und G. Behringer. (1978). [Possibilities of interference in the identification of aflatoxin M₁]. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **166**:274-279.

Krogh, P., B. Hald, E. Hasselager, A. Madsen, H.P. Mortensen, A.E. Larsen, and A.D. Campbell. (1973). Aflatoxin residues in bacon pigs. *Pure Appl. Chem.*, **35**:275-281.

Krogh, P. (1989). The role of mycotoxins in disease of animal and man. *J. Appl. Microbiol.*, **Sym. Suppl.**: 99S-104S.

- Kuiper-Goodman, T. (1991). Risk assessment to humans of mycotoxins in animal- derived food products. *Vet. Hum. Toxicol.*, **33**:325-333.
- Kumagai, S. (1989). Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **97**:88-97.
- Lafont, P., M. Siriwardana, J. Jacquet, M. Gaillardin, and J. Sarfati. (1981). Assay method for aflatoxin in milk. *J. Chromatogr.*, **219**:162-166.
- Lafont, P., N. Platzer, M.G. Siriwardana, J. Sarfati, J. Mercier et J. Lafont. (1986a). Un nouvel-hydroxy-dérivé de l'aflatoxine B₁: l'aflatoxine M₄. I. Production *in vitro* - structure. *Microbiol. Alim. Nut.*, **4**:65-74.
- Lafont, P., M.G. Siriwardana, J. Sarfati, J.P. Debeauvais et J. Lafont. (1986b). Un nouvel hydroxy-dérivé de l'aflatoxine B₁: l'aflatoxine M₄. II. Méthode de dosage - Mise en évidence de contaminations de laits commerciaux. *Microbiol. Alim. Nut.*, **4**:141-145.
- Lee, L.S. (1989). Aflatoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**:1398-1413.
- Leiva, M.L. La tecnología de membranas aplicada en la industria de alimentos: posibilidades y realidades. *I Congreso Iberoamericano en Ciencias y Tecnologías de Membranas*. Septiembre de 1992. Murcia (España).
- Lie, J.L. and E.H. Marth. (1967). Formation of aflatoxin in cheddar cheese by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Dairy Sci.*, **50**:1708-1710.
- Lieu, F.Y. and L.B. Bullerman. (1977). Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates. *J. Food Sci.*, **42**:222-225.
- Liria, N. (1992). Influencia de distintos factores en la solubilización y conservación de aflatoxinas en soluciones acuosas. Tesina de licenciatura. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
- Liu, Z., W. Tu, D. Li, Y. Li, C. Xue, Y. Yang, and B. Qin. (1990). A new method for the quantitation of aflatoxin M₁ in urine by high performance liquid chromatography and its application of the etiologic study of hepatoma. *Biomed. Chromatogr.*, **4**:83-86.
- Loosmore, R.M. and J.D.J. Harding. (1961). A toxic factor in brazilian groundnut causing liver damage in pigs. *Vet. Rec.*, **73**:1362-1364.

- Mabee, M.S. and J.R. Chipley. (1973). Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B₁-¹⁴C in broiler chickens. *Appl. Microbiol.*, **25**:763-769.
- Macho, M.L., P. Muñoz, and I. Eguilear. (1992). Aflatoxin M₁ analysis of milk and dairy products of total diet in the basque country, en: *Food safety and quality assurance: applications of immunoassay systems*. Morgan M.R.A., C.J. Smith, and P.A. Williams (Eds.) Elsevier Applied Science: London. p.115-118.
- Martlbauer, E. und G. Terplan. (1985). [Specific heterologous enzyme immunoassay for aflatoxin M₁ in milk and milkpowder]. *Arch. für Lebensmit.*, **36**:53-55.
- Masri, M.S., J.R. Page, and V.C. García. (1968). Analysis for aflatoxin M in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **51**:594-600.
- Mateos, A. and G. Suárez. (1984). Contaminating mycoflora in yogurt: general aspects and special reference to the genus *Penicillium*. *J. Food Prot.*, **47**:629-636.
- Mckinney, J.D., G.C. Cavanaugh, J.T. Bell, A.S. Hoversland, D.M. Nelson, J.P. Pearsons, and R.J. Selkirk.(1973). Effects of ammoniation of aflatoxins in rations fed lactating cows. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **50**:79-84.
- Medina, M., P. Gaya y M. Núñez. (1984). Micotoxinas en queso. 1. Aflatoxina M₁ y metabolitos producidos por mohos contaminantes durante la maduración. *Rev. Esp. Lech.*, **132**:123-131.
- Megalla, S.E. and A.H. Hafez. (1982). Detoxification of aflatoxin B₁ by acidogenous yoghurt. *Mycopathologia*, **77**:89-91.
- Megalla, S.E. and M.A. Mohran. (1984). Fate of aflatoxin B₁ in fermented dairy products. *Mycopathologia*, **88**:27-29.
- Morgan, M.R.A. (1989). Mycotoxin immunoassays (with special reference to ELISAs). *Tetrahedron*, **45**:2237-2249.
- Mortimer, D.N., J. Gilbert, and M. Shepherd. (1987). Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milks using an affinity column cleanup. *J. Chromatogr.*, **407**:393-398.
- Moss, M.O. (1991). Economic importance of mycotoxins - Recent incidence. *International Biodeterioration*, **27**:195-204.

- Moss, M.O. (1992). Secondary metabolism and food intoxication-moulds. *J. Appl. Bacteriol. Sym. Suppl.* 73:805-88S.
- Müller, H. (1983). A survey of methods of determining mycotoxins. *An. Res. Develop.*, 19:7-38.
- Nahm, K.H. (1990). Conditions for mould grow and aflatoxin production in feedstuffs. *Pig News and Information*, 11:349-352.
- Natarajan, K., K.C. Rhee, C.M. Cater, and K.F. Mattil. (1975). Destruction of aflatoxins in peanut protein isolates by sodium hypochlorite. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 52:161-163.
- Nesheim, S. and M.W. Trucksess, Thin Layer Chromatography/ High Performance Thin Layer Chromatography as a tool for mycotoxin determination. En: *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins*, R.J. Cole, (Ed.). 1975, Academic Press: London. p. 239-264.
- Nesheim, S. and W.C. Bumley. Confirmation of identity of aflatoxins. *JAOAC -W.J. Pons, Jr., Memorial Symposium on Mycotoxins*, December 1981:945A-948A.
- Newberne, J.W., W.S. Bailey, and H.R. Seibold. (1955). Notes on a recent outbreak and experimental reproduction of "hepatitis X" in dogs. *Am. J. Vet. Med. Assoc.*, 127:59-62.
- Norred, W.P. and R. Morrissey. (1983). Effects of long-term feeding of ammoniated aflatoxin-contaminated corn to Fisher 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 70:96-104.
- Odugbesan, E.A., O.A. Osowole, and A.O. Uwarfo. (1988). Effect of antiserum against aflatoxin B₁-bovine serum albumin complex on aflatoxin induced lysogenesis. *Mutation Res.*, 209:7-11.
- Okaye, Z.S.C., J. Riley, D.J. Judah, and G.E. Neal. (1990). The *in vivo* site of formation of a carcinogen-serum albumin adduct. *Biochem. Pharmacol.*, 40:2560-2562.
- Palmgren, M.S. and A.W. Hayes. Aflatoxins in foods. En: *Mycotoxins in food*, P. Krogh, (Ed.). 1987, Academic Press: London. p. 65-95.
- Panangala, V.N., J.J. Giambrone, U.L. Diener, N.D. Davis, F.J. Hoerr, A. Mitra, R.D. Schultz, and G.R. Wilt. (1986). Effects of aflatoxin on the growth performance and immune responses of weanling swine. *Am. J. Vet. Res.*, 47:2062-2067.
- Park, D.L. (1984). Distribution of ammonia-related aflatoxin reaction products in cottonseed meal.

- J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**:1071-1074.
- Park, D.L., B.M. Miller, L.P. Hart, G. Yang, J. McVey, S.M. Page, J. Pestka, and L.H. Brown. (1989a). Enzyme-linked immunosorbent assay for screening aflatoxin B₁ in cotton seed products and mixed feed: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**:326-332.
- Park, D.L., B.M. Miller, S. Nesheim, M.W. Trucksess, A. Verich, B. Bidigare, J.L. McVey, and L.H. Brown. (1989b). Visual and semiquantitative spectrophotometric ELISA screening method for aflatoxin B₁ in corn and peanut products: follow-up collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**:638-643.
- Park, D.L. and H. Njapau. (1989). Contamination issues, technology. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**:1404-1407.
- Patterson, D.S.P. and B.A. Roberts. (1975). An improved semi-quantitative method for the estimation of aflatoxin M₁ in liquid milk. *Food Cosmet. Toxicol.*, **13**:542-542.
- Patterson, D.S.P., E.M. Glancy, and B.A. Roberts. (1980). The carry-over of aflatoxin M₁ into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁. *Food. Cosmet. Toxicol.*, **18**:35-37.
- Peers, F., X. Bosch, J. Kaldar, A. Linsell, and M. Pluijmen. (1987). Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *Int. J. Cancer*, **39**:545-553.
- Pestka, J.J., Y. Li, W.O. Harder, and F.S. Chu. (1981). Comparison of RIA and ELISA for determining aflatoxin M₁ in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**:294-301.
- Pestka, J.J. (1988). Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**:1075-1081.
- Pestka, J.J. and G.S. Bondy. (1990). Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **68**:1009-1016.
- Pohland, A.E., M.E. Cushmac, and P.J. Andrellos. (1968). Aflatoxin B₁ hemiacetal. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **51**:907-910.
- Pohland, A.E. and G.E. Wood. Occurrence of mycotoxins in food. En: *Mycotoxins in food*, P. Krogh, (Ed.). 1987, Academic Press: London. p. 35-64.

- Polzhofer, K.P. (1977). Aflatoxinbestimmung in milch und milchprodukten. *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **163**:175-177.
- Pons, W.A.Jr. and L.A. Goldblatt. Assay of Aflatoxins. En: *Aflatoxin*. Goldblatt, L.A. Ed., 1969. Academic Press:New York. p. 77-102.
- Pons, W.A.Jr., A.F. Cucullu, and L.S. Lee. (1973). Method for the determination of aflatoxin in M_1 in fluid milk and milk products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**:1431-1436.
- Prasad, R. and K.K. Sirkar. (1989). Hollow fiber solvent extraction of pharmaceutical products: a case study. *J. Membrane Sci.*, **47**:235-259.
- Prieta, J., M.A. Moreno, J.L. Blanco, G. Suárez, and L. Domínguez. (1992). Determination of patulin by diphasic dialysis extraction and thin layer chromatography. *J. Food Prot.*, **55**:1001-1002.
- Prieta, J. Nuevos métodos de análisis de patulina en alimentos elaborados con manzana. 1993, Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
- Prieta, J., M.A. Moreno, J. Bayo, S. Díaz, G. Suárez, L. Domínguez, R. Canela, and V. Sanchís. (1993). Determination of patulin by reversed-phase high performance liquid chromatography with extraction by diphasic dialysis. *The Analyst*, **118**:171-173.
- Purchase, I.F.M. and M. Steyn. (1967). Estimation of aflatoxin M_1 in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **50**:363-364.
- Purchase, I.F.H. (1967). Acute toxicity of aflatoxins M_1 and M_2 in day old ducklings. *Food Cosmet.Toxicol.*, **5**:339-342.
- Purchase, I.F.H. and L.J. Vorster. (1968). Aflatoxin in commercial milk samples. *S. Afr. Med. J.*, **42**:219.
- Râsic, J., M. Skrinjar, and S. Markov. (1991). Decrease of aflatoxin B_1 in yoghurt an acidified milk. *Mycopathologia*, **113**:117-119.
- Robb, J., M. Norval, and W.A. Neill. (1990). The use of tissue culture for the detection of mycotoxins. *Lett. Appl. Microbiol.*, **10**:161-165.
- Roberts, B.A. and R. Allcroft. (1968). A note on the semi-quantitative estimation of aflatoxin M_1 in liquid milk by thin layer chromatography. *Food Cosmet. Toxicol.*, **6**:339-340.

- Roberts, B.A. and D.S.P. Patterson. (1975). Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs using a novel membrane cleanup procedure. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**:1178-1181.
- Rodricks, J.V. (1969). Note on adsorption of aflatoxin standards to glass. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **52**:979-980.
- Sabbioni, G., S. Ambs, G.N. Wogan, and J.O. Groopman. (1990). The aflatoxin-lysine adduct quantified by HPLC from human serum albumin samples. *Carcinogenesis*, **11**:2063-2066.
- Sabbioni, G. and C.P. Wild. (1991). Identification of an aflatoxin G₁-serum albumin adduct and its relevance to the measurement of human exposure to aflatoxins. *Carcinogenesis*, **12**:97-103.
- Sargeant, K., J.O. O'Kelly, R.B.A. Carnaghan, and R.C. Allcroft. (1961). The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Vet. Rec.*, **73**:1219-1223.
- Schuller, P.L., C.A.H. Verhülsdonk, and W.E. Paulsch. (1973). Analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk. *Pure. Appl. Chem.*, **35**:291-296.
- Scott, P.M., Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. En: *Mycotoxins in dairy products*, H.P. Van Egmond, (Ed.). 1989, Elsevier Applied Science: London. p. 143-249.
- Scott, P.M., Natural poisons. En: *Official Methods of Analysis*, K. Helrich, (Ed.). 1990a, AOAC: Washington. p. 1184-1205.
- Scott, P.M. (1990)b. General reference reports. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**:98-105.
- Scott, P.M. (1992). General reference reports. *J. AOAC Internat.*, **75**:95-102.
- Serch-Hanssen, A. (1970). Aflatoxin induced fatal hepatitis. *Arch. Environ. Health*, **20**:729.
- Serralheiro, M.L. and M.L. Quinta. (1985). Rapid thin layer chromatographic determination of aflatoxin M₁ in powdered milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**:952-953.
- Serralheiro, M.L. and M.L. Quinta. (1986). Thin layer chromatographic confirmation of aflatoxin M₁ extracted from milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**:836-838.
- Sharman, M. and J. Gilbert. (1991). Automated aflatoxin analysis of foods and animal feeds using immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatographic determination. *J. Chromatogr.*, **543**:220-225.

- Shotwell, O.L. Chemical survey methods for mycotoxins. En: *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins*, R.J. Cole, (Ed.). 1986, Academic Press: London. p. 51-94.
- Sirkar, K.K., *Asymmetrically-wettable porous membrane process*. 1990, United States Patent 4921612. The Trustees of Steven Institute of Technology, Hoboken, New Jersey.
- Skipper, P.L. and S.R. Tannenbaum. (1990). Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, **11**:507-518.
- Sorenson, W.G. (1990). Mycotoxins as potential occupational hazards. *Developments in Industrial Microbiology*, **31**:205-211.
- Stack, M.E., A.E. Pohland, J.G. Dantzman, and S. Nesheim. (1972). Derivative method for chemical confirmation of identity of aflatoxin M₁. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **55**:313-314.
- Steiner, W.E., R.H. Reiker, and R. Battaglia. (1988). Aflatoxin contamination in dried figs: distribution and association with fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, **36**:88-91.
- Stoloff, L. and W. Trager. (1965). Recommended decontamination procedure for aflatoxin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **48**:681-682.
- Stoloff, L., M. Trucksess, N. Hardin, O.J. Francis, J.R. Hayes, C.E. Polan, and T.C. Campbell. (1975). Stability of aflatoxin M₁ in milk. *J. Dairy Sci.*, **58**:1789-1793.
- Stoloff, L. (1980). Aflatoxin M₁ in perspective. *J. Food Prot.*, **43**:226-230.
- Stoloff, L. (1989). Aflatoxin is not a probable human carcinogen: the published evidence is sufficient. *Rev. Toxicol. Pharmacol.*, **10**:272-283.
- Stoloff, L., H.P. Van Egmond, and D.L. Park. (1991). Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. *Food Addit. Contam.*, **8**:213-222.
- Stubblefield, R.D., G.M. Shannon, and O.L. Shotwell. (1973). Aflatoxin M₁ in milk evaluation of methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**:1106-1110.
- Stubblefield, R.D. and G.M. Shannon. (1974). Aflatoxin M₁: analysis in dairy production and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **57**:847-851.

- Stubblefield, R.D. (1979). The rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**:800-802.
- Stubblefield, R.D., H.P. Van Egmond, W.E. Paulsch, and P.L. Schuller. (1980). Determination and confirmation of identity of aflatoxin M₁ in dairy products: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**:907-921.
- Stubblefield, R.D. (1987). Optimum conditions for formation of aflatoxin M₁-trifluoroacetic acid derivative. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**:1047-1049.
- Stubblefield, O.L. and H.P. Van Egmond, Chromatographic methods of analysis for aflatoxin M₁. En: *Mycotoxins in dairy products*, H.P. Van Egmond, (Ed.). 1989, Elsevier Applied Science: London. p. 57-98.
- Takeda, N. (1984). Determination of aflatoxin M₁ in milk by reverse phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **288**:484-488.
- Thaxton, J.P. and P.B. Hamilton. (1971). Immunosuppression in broilers by aflatoxin. *Poultry Sci.*, **50**:1636.
- Thurston, J.R., W. Cook, K. Driftmier, J.L. Richard, and J.M. Sacks. (1986). Decreased complement and bacteriostatic activities in the sera of cattle given single or multiple doses of aflatoxin. *Am. J. Vet. Res.*, **47**:846-849.
- Thurston, J.R., J.M. Sacks, J.L. Richard, W.M. Peden, and K. Driftmier. (1989). Complement, bacteriostatic and enzymatic activities in sera from guinea pigs given aflatoxin and/or rubratoxin. *Am. J. Vet. Res.*, **50**:356-368.
- Tiwari, R.P., C.K. Dham, T.C. Bhalla, S.S. Saini, and D.V. Vadehra. (1985). Mechanism of action of aflatoxin B₁ in *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**:904-907.
- Townsley, P.M. and E.G.H. Lee. (1967). Response of fertilized eggs of the mollusk *Bankia setacea* to aflatoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **50**:361-363.
- Tripet, F.Y., Rivac et J. Vogel. (1981a). Recherche des aflatoxines et dosage de l'aflatoxine M₁ dans les produits laitiers. *Trav. Chim. Aliment. Hyg.*, **72**:367-379.
- Tripet, F.V., C. Riva et J. Vogel. (1981b). Contamination du lait et des produits laitiers par l'aflatoxine M₁. *Lait*, **61**:634-637.

- Trucksess, M.W., M.E. Stack, S. Nesheim, D.L. Park, and A.E. Pohland. Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B₁, B₂ and G₁ in corn, cotton seed, peanuts, peanut butter and poultry feed: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**:957-961.
- Trucksess, M.W. (1976). Derivatization procedure for identification of aflatoxin M₁ on a thin layer chromatogram. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **59**:722-723.
- Tuinstra, L.G.M. and J.M. Bronsgeest. (1975). Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level. *J. Chromatogr.*, **111**:448-451.
- Tuinstra, L.G.M., P.G.M. Kienhuis, W.A. Traag, M.M.L. Aerts, and W.M.J. Beek. (1989). Fully automated column-switching HPLC determination aflatoxin M₁ in milk using dialysis as sample preparation. *J. High Resol. Chromatogr.*, **12**:709-713.
- Tuinstra, L.G.M., P.G.M. Kienhuis, and P. Dols. (1990). Automated liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk using on-line dialysis for sample preparation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**:969-973.
- Tyczkowska, K., J.E. Hutching, and W.M.J. Hagles. (1984). Liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**:739-741.
- Van der Linde, J.A., A.M. Frens, M.D. Jongh, and R.O. Vles. (1964). [Inspection of milk from cows fed aflatoxin-containing groundnut meal]. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **89**:1082-1088.
- Van Egmond, H.P., W.E. Paulsch, and P.L. Schuller. (1978). Confirmatory test for aflatoxin M₁ on a thin layer plate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**:809-812.
- Van Egmond, H.P. and P.J. Wagstaffe. The certification of aflatoxin M₁ in 3 milk powder samples CRM NOS 282, 284, 285 BCR information. 1986, Commission of the European Communities, Luxemburg.
- Van Egmond, H.P. and P.J. Wagstaffe. (1988). Development of milk powder reference material certified for aflatoxin M₁ content (part II): certification of milk powder RM 283. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**:1180-1183.
- Van Egmond, H.P. (1989a). Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Addit. Contam.*, **6**:139-188.
- Van Egmond, H.P., Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation. En: *Mycotoxins in dairy products*,

- Van Egmond, H.P., (Ed.). 1989b, Elsevier Applied Science: London. p. 11-56.
- Van Egmond, H.P., Introduction. En: *Mycotoxins in dairy products*, H.P.V. Egmond, (Ed.). 1989c, Elsevier Applied Science: London. p. 1-10.
- Van Egmond, H.P., Mycotoxins. En: *Residues and contaminants in milk and milk products. International Dairy Federation, special issue 9101*. 1991, p. 131-145.
- Velasco, J. (1972). Detection of aflatoxin using small columns of florisil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**:141-142.
- Wei, C.I., M.R. Marshall, and D.P.H. Hsieh. (1985a). Characterization of water-soluble glucuronide and sulphate conjugates of aflatoxin B₁. 1. Urinary excretion in monkey, rat and mouse. *Food Chem. Toxicol.*, **23**:809-819.
- Wei, C.I., M.R. Marshall, and D.P.H. Hsieh. (1985b). Characterization of water-soluble glucuronide and sulphate conjugates of aflatoxin B₁. 2. Studies in primary cultures of rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **23**:821-825.
- Wicklowsky, D.T. and O.L. Shotwell. (1983). Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Can. J. Microbiol.*, **29**:1-5.
- Wild, C.P., Y.Z. Jiang, G. Sabbioni, B. Chapot, and R. Montesano. (1990). Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. *Cancer Res.*, **50**:245-251.
- Windholz, M. (Ed.). Aflatoxins. En: *The Index Merck*. Ninth ed. 1976, Merck, Co., Rahway, New Jersey.
- Winterlin, W., G. Hall, and D.P.H. Hsieh. (1979). On-column chromatographic extraction of aflatoxin M₁ from milk and determination by reversed phase high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **51**:1873-1874.
- Wiseman, D.W. and E.H. Marth. (1983a). Heat and acid stability of aflatoxin M₁ in naturally and artificially contaminated milk. *Milchwissenschaft*, **38**:464-466.
- Wiseman, D.W. and E.H. Marth. (1983b). Behavior of aflatoxin M₁ in yogurt, butter milk and kefir. *J. Food Prot.*, **46**:115-118.
- Wiseman, D.W. und E.H. Marth. (1983c). [Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of ice-cream and sherbet]. *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **177**:22-24.

- Wogan, G.N. and S. Pagialunga. (1974). Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, **13**:441-443.
- Wogan, G.N. (1992). Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res. Suppl.* **52**:2114S-2118S.
- Wong, J.J. and D.P.H. Hsieh. (1976). Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**:2241-2244.
- Woychik, N., R.D. Hindsill, and F.S. Chu. (1984). Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin M₁. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**:1096-1099.
- Yang, C.Y. (1972). Comparative studies on the detoxification of aflatoxins by sodium hypochlorite and commercial bleaches. *Appl. Microbiol.*, **24**:885-890.
- Yates, I.E. and J.K. Porter. (1982). Bacterial bioluminescence as a bioassay for mycotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**:1072-1075.
- Yousef, A.E. and E.H. Marth. Stability and degradation of aflatoxin M₁. En: *Mycotoxins in dairy products*, H.P. Van Egmond, (Ed.). 1989, Elsevier Applied Science: London. p. 127-162.