

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE PATULINA EN PRODUCTOS COMERCIALES DE MANZANA Y PERA.

TESIS

MANCOMUNADA

QUE PRESENTAN

MARIO RICARDO GUZMAN ROBLES

JAIME GONZALEZ PEREZ

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

México, D.F.,

1 9 8 2 .



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE MEDICINA

**JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:**

|                      |                                       |
|----------------------|---------------------------------------|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Prof. Pedro Valle Vega                |
| <b>VOCAL</b>         | Prof. Eduardo Barzana G.              |
| <b>SECRETARIO</b>    | Prof. Federico Galdeano B.            |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Prof. Agustín López Munguía Canales   |
| <b>2o. SUPLENTE</b>  | Prof. Ma. del los Angeles Valdivia L. |

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**COMISION NACIONAL DE FRUTICULTURA**

**SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y DOCENCIA**

**DEPARTAMENTO DE ANALISIS ESPECIALES Y CONTROL DE CALIDAD**

**LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTROSCOPIA.**

**SUSTENTANTES:**

**MARIO R. GUZMAN ROBLES**

**JAI ME GONZALEZ PEREZ**

**ASESOR DEL TEMA:**

**ING. FEDERICO GALDEANO B.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Subdirección de Investigación y Docencia de la Comisión Nacional de Fruticultura, por habernos permitido -- desarrollar esta tesis en sus Instalaciones. En forma -- particular al Departamento de Análisis Especiales.

A Ma. del Refugio Fonseca J., Sara Escarramán Mata y Yolanda de la Rosa García por el apoyo y entusiasmo mostrados durante la realización de este trabajo.

A Eduardo Amieba Obregón del Departamento de -- Microbiología y Fitopatología por su valiosa -- ayuda en la parte microbiológica del tema.

A Rosario Monroy por su paciencia mostrada al transcribir a máquina esta tesis.

En especial a Alfredo González Pérez y Federico Galdeano B. por su invaluable orientación durante el desarrollo del trabajo.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron para la integración final de este estudio.

A mis padres, sin cuyo apoyo y comprensión hubiera sido muy difícil alcanzar cualquier meta - propuesta.

A mis hermanos y familiares

A Rosario por todo lo que me ha ayudado a descubrir.

A mis Maestros y amigos

A la anónima grandeza de las personas que han tenido el valor de resistir las penalidades de la existencia y aceptado la decisión de tomar a esta por su aspecto más agradable, recordando que los cometas se levantan contra el viento, no a favor de él.

A mi familia  
Quien me ha guiado y acompañado  
durante toda mi educación.

A Tere por su ejemplo

A todos aquellos que con su verdadera  
amistad en cualquier lugar y situación  
ofrecieron su ayuda.

## INDICE

|  | Pag. |
|--|------|
| Introducción y Objetivos                                 | 1    |
| <b>CAPITULO I</b>  |      |
| 1. Generalidades sobre patulina                          | 6    |
| 1.1 Antecedentes   | 6    |
| 1.2 Aspectos microbiológicos                             | 17   |
| 1.2.1 Microorganismos                                    | 17   |
| 1.2.2 Producción de patulina                             | 18   |
| 1.2.3 Biosíntesis de patulina                            | 19   |
| 1.3 Propiedades Físicas, Químicas y Estabilidad          | 23   |
| 1.3.1 Propiedades Físicas y Químicas                     | 23   |
| 1.3.2 Estabilidad  | 25   |
| 1.4 Propiedades tóxicas de la patulina                   | 33   |
| 1.4.1 Carcinogenicidad                                   | 35   |
| 1.4.2 Mutagenicidad                                      | 35   |
| 1.4.3. Teratogenicidad                                   | 37   |
| 1.4.4 Propiedades antibióticas                           | 38   |
| 1.4.5 Fitotoxicidad                                      | 38   |
| 1.4.6 Otros efectos metabólicos                          | 38   |
| 1.4.6 Mecanismo de acción de la patulina                 | 42   |
| <b>CAPITULO II:</b>                                      |      |
| 2. Procedimiento general para el análisis de micotoxinas | 43   |
| 2.1 Extracción   | 44   |
| 2.2 Limpieza   | 46   |
| 2.3 Separación y detección                               | 47   |
| 2.4 Cuantificación                                       | 48   |
| 2.5 Métodos confirmativos                                | 50   |
| <b>CAPITULO III</b>                                      |      |
| 3 Parte Experimental                                     |      |
| 3.1 Materiales   | 52   |

|  | Pag. |
|--|------|
| 3.1.1 Reactivos  | 52   |
| 3.1.1.1 Estándar de patulina   | 52   |
| 3.1.1.2 Extracción   | 52   |
| 3.1.1.3 Limpieza   | 52   |
| 3.1.1.4 Separación y detección                                       | 52   |
| 3.1.1.4.1 Disolvente para residuo de extracto                        | 52   |
| 3.1.1.4.2 Disolvente para Cromatografía de líquidos de alta presión. | 53   |
| 3.1.1.5 Confirmación   |      |
| 3.1.1.5.1 Cromatografía en capa fina                                 | 53   |
| 3.1.1.5.2 Análisis microbiológico                                    | 53   |
| 3.1.1.6 Aislamiento e identificación de <u>Penicillium expansum</u>  | 54   |
| 3.1.1.7 Producción de patulina en medio de cultivo.                  | 54   |
| 3.1.1.8 Muestras   | 55   |
| 3.1.2 Aparatos   | 55   |
| 3.1.2.1 Extracción   | 55   |
| 3.1.2.2 Limpieza   | 55   |
| 3.1.2.3 Separación y detección                                       | 56   |
| 3.1.2.4 Confirmación   | 56   |
| 3.2 Métodos  | 56   |
| 3.2.1 Preparación de solución patrón de patulina                     | 56   |
| 3.2.2 Optimización de la separación y detección                      | 57   |
| 3.2.3 Curva patrón de patulina                                       | 58   |
| 3.2.4 Integración de las señales                                     | 58   |
| 3.2.5 Interpretación estadística                                     | 58   |
| 3.2.6 Monitoreo de las muestras analizadas                           | 59   |
| 3.2.7 Análisis cualitativo   | 59   |
| 3.2.8 Análisis cuantitativo  | 59   |
| 3.2.8.1 Extracción, Limpieza, Separación y detección                 | 59   |
| 3.2.8.2 Porcentaje de recuperación                                   | 60   |
| 3.2.8.3 Límite de detección o intervalo de confianza.                | 61   |

|   | Pag.    |
|---|---------|
| 3.2.9 Métodos confirmativos   | 61      |
| 3.2.9.2 Método microbiológico   | 62      |
| 3.2.10 Aislamiento de <u>Penicillium expansum</u>                         | 63      |
| 3.2.11 Producción de patulina por <u>Penicillium ex-</u><br><u>pansum</u> | 63      |
| 3.2.11.1 Producción en manzanas infectadas.                               | 63      |
| 3.2.11.2 Producción en medio de cultivo                                   | 64      |
| <br><b>CAPITULO IV</b>  |         |
| 4. Resultados y Discusión   | 65      |
| 4.1 Resultados  | 65      |
| 4.1.1 Aislamiento de <u>Penicillium spp</u>                               | 65      |
| 4.1.2 Producción de patulina  | 65      |
| 4.2 Análisis cualitativo  | 67      |
| 4.2.1 Método presuntivo   | 67      |
| 4.2.2 Métodos confirmativos   | 67      |
| 4.3 Análisis cuantitativo   | 71      |
| 4.3.1 Muestras analizadas   | 71      |
| 4.3.2 Curva de calibración  | 71      |
| 4.3.3 Porcentaje de recuperación de la técnica<br>de extracción.          | 72      |
| 4.3.4 Análisis de las muestras  | 72      |
| 4.4 Discusión de resultados   | 74      |
| 4.4.1 Pruebas con microorganismos patógenos                               | 74      |
| 4.4.2 Análisis cualitativo  | 74      |
| 4.4.3 Análisis cuantitativo   | 77      |
| <br>Conclusiones  | <br>109 |
| Recomendaciones   | 111     |
| Bibliografía  |         |
| Anexo I: Interpretación Estadística de los<br>Resultados.                 |         |

## INDICE DE FIGURAS

| Figura No.   | Pag. |
|--|------|
| 1. Estructura de toxinas fungales importantes                                      | 4    |
| 2. Probables rutas de contaminación por micotoxinas                                | 12   |
| 3. Producción de patulina por <u>P. expansum</u> en caldo papa dextrosa.           | 20   |
| 4. Biosíntesis de patulina   | 22   |
| 5. Desaparición de patulina en agua  | 30   |
| 6. Estabilidad de patulina en varios alimentos                                     | 31   |
| 7. Efecto del SO <sub>2</sub> sobre la patulina en agua                            | 32   |
| 8. Espectro de masas de patulina   | 24   |
| 9. Espectro de resonancia magnético nuclear de patulina.                           | 24   |
| 10. Potencial relativo de lactonas carcinogénicas según Dickens                    | 36   |
| 11. Representación básica de un cromatógrafo de líquidos de alta presión           | 49   |
| 12. Integración de las señales   | 64   |
| 13. Método confirmativo: Procedimiento microbiológico                              | 64   |
| 14. Determinación de patulina por interpolación en la curva patrón                 | 73   |
| 15. Soluciones estándar de patulina (cromatograma)                                 | 81   |
| 16. Néctar de manzana adicionado con patulina (cromatograma)                       | 82   |
| 17. Néctar de manzana adicionado con patulina (cromatograma)                       | 83   |
| 18. Jugo de manzana (cromatograma)   | 84   |
| 19. Néctar de pera (cromatograma)  | 85   |
| 20. Co-inyección de jugo de manzana y solución estándar de patulina (cromatograma) | 86   |
| 21. Jugo de manzana (cromatograma)   | 87   |
| 22. Néctar de manzana (cromatograma)   | 88   |
| 23. Producción de patulina por <i>Penicillium</i> sp in vivo (cromatograma).       | 89   |

| Figura No.   | Pag. |
|--|------|
| 24. Correlación entre concentración de patulina y diámetro de inhibición usando <u>Bacillus Megaterium</u> . | 103  |
| 25. Comportamiento de la patulina según la ley de Lambert y Beer   | 104  |
| 26. Línea de regresión de la curva de calibración  | 105  |
| 27. Región de Working-Hotelling para la curva de calibración   | 106  |
| 28. Bandas de confianza para la sección elegida de la curva de calibración                                   | 107  |
| 29. Histogramas de distribución de los niveles de patulina   | 108  |

#### INDICE DE TABLAS

| TABLA  | Pag. |
|--|------|
| 1. Especies fungales capaces de producir patulina  | 5    |
| 2. Principales toxinas producidas por <u>Penicillium spp</u>   | 8    |
| 3. Micotoxicosis toxinas y hongos responsables de intoxicaciones   | 9    |
| 4. Parámetros térmicos de inactivación de la patulina  | 28   |
| 5. Valores de LD <sub>50</sub> de patulina para diferentes especies  | 34   |
| 6. Valores de ID <sub>50</sub> de patulina para algunas enzimas y procesos celulares   | 41   |
| 7. Intervalos de confianza de los valores de tiempo de retención para estándares de patulina                                 | 69   |
| 8. Correlación entre la concentración de micotoxina y el diámetro de la zona de inhibición usando <u>Bacillus megaterium</u> | 70   |

|  | Pag. |
|--|------|
| 9. Datos para curva patrón de patulina   | 90   |
| 10. Región de Working-Hotelling para la ecuación de regresión de la curva de calibración               | 91   |
| 11. Porcentaje de recuperación de la técnica de extracción   | 92   |
| 12. Análisis de varianza de los resultados del % de recuperación de la técnica de extracción           | 93   |
| 13. Tiempo de retención y área promedio correspondiente a patulina en el análisis de néctar de manzana | 94   |
| 14. Tiempo de retención y área promedio correspondiente a patulina en el análisis de jugo de manzana   | 97   |
| 15. Tiempo de retención y área promedio correspondiente a patulina en el análisis de néctar de pera    | 98   |
| 16. Interpolación de la curva de calibración de los valores de área de las muestras analizadas         | 99   |
| 17. Concentración de patulina en las muestras analizadas   | 101  |

## INTRODUCCION

La investigación pura y aplicada a la que se debe en gran parte el enorme desarrollo actual, nos ha proporcionado métodos para encauzar científicamente su aplicación - en beneficio del ser humano para mejores condiciones de vida.

Una de las mayores preocupaciones del hombre moderno es el problema de la contaminación, situación que se manifiesta en la cada vez mas ardua investigación de este - - campo a todos los niveles del ecosistema en el que vivimos.

Los alimentos no escapan a esta preocupación y se desea proporcionar al consumidor productos libres de sustancias nocivas ya sean de origen natural o provenientes de las técnicas empleadas en su elaboración, procesamiento, recolección y cultivo; sin embargo no siempre es posible satisfacer esta condición. El hecho de que algunas de las sustancias potencial o realmente peligrosas ejerzan sus efectos nocivos a muy bajos niveles de concentración dificulta su detección, por lo que es necesario emplear técnicas analíticas sensibles. Tal es el caso de algunos contaminantes de origen natural como son las micotoxinas y los originados por la actividad humana como pueden ser los plaguicidas.

Las micotoxinas son metabolitos fungales biológicamente activos que poseen estructuras moleculares complejas. Básicamente su estudio se inició con Sergeant, Seridan - - O'Kelly y Carnaghan en 1961 con el descubrimiento de la aflatoxina y sus efectos tóxicos (11a); aunque ya se conocían algunas enfermedades debidas a los efectos de las micotoxinas, [como es el caso del ergotismo ], no se les había dado importancia, pero con la comprobación de los riesgos reales y potenciales de estos compuestos sobre la salud animal y humana, se hizo necesaria la intensificación de los estudios para abarcar todas las facetas de este problema, sobre todo teniendo en cuenta la gran posibilidad de-

contaminación de los alimentos por estos agentes. A esta tarea se han avocado organismos de salud pública relacionados con la contaminación de alimentos que han seleccionado varias micotoxinas en base al daño que ocasionan y a la prevalencia de los hongos productores. Estas micotoxinas son: esterigmatocistina, patulina, ácido penicílico, miembros del grupo tricoteceno, luteoskirina y citrina (figura 1) (63).

Entre estas toxinas es de especial interés la patulina, por sus diversas propiedades tóxicas i.e: Carcinogenicidad, Mutagenicidad, Teratogenicidad, Antibiosis y otros efectos fisiológicos y el gran número de especies capaces de producirla (tabla 1). Es de consideración también su estabilidad al tratamiento térmico en alimentos con bajo pH como es el caso de los jugos y néctares de frutas (30).

Debido a que las especies fungales productoras de patulina son contaminantes comunes de los alimentos la probabilidad de contaminación con este compuesto es alta. En la naturaleza esta micotoxina es producida principalmente por el hongo Penicillium expansum que es un patógeno de amplio espectro y tiene alta incidencia en la pudrición de manzana y pera en poscosecha (44). En nuestro país se ha detectado una alta contaminación con Penicillium spp en el almacenamiento de manzana (1). Se considera que los productos de manzana y pera con los más susceptibles a sufrir contaminación por la patulina y aunado esto a la gran estabilidad que presenta la micotoxina en dichos productos (54, 46), se hace necesaria su cuantificación.

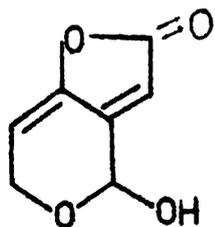
Por lo anterior el objetivo general de éste estudio es la evaluación del nivel de patulina en jugos de manzana y néctares de manzana y de pera expendidos en la Ciu-

dad de México utilizando la cromatografía de líquidos de alta presión como técnica de análisis y así poder emitir un juicio de calidad de estos productos.

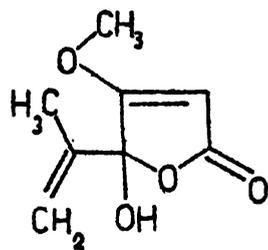
Para cumplir dicho objetivo general se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Seleccionar y optimizar el procedimiento analítico para la identificación, cuantificación y confirmación de patulina en jugos de manzana y néctares de manzana y pera.
- 2.- Comprobar la capacidad de producción de patulina de hongos patógenos que comunmente contaminan a las manzanas:
  - a) Por fermentación en medio de cultivo.
  - b) En manzanas infectadas.
- 3.- Muestrear al azar las principales marcas de jugos y néctares de manzana y pera expandidos en la ciudad de México.
- 4.- Llegar a resultados confiables haciendo uso de métodos estadísticos para emitir un juicio de calidad de los productos analizados.

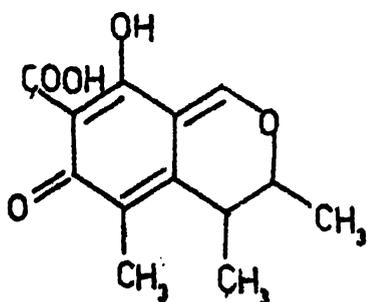
Estructuras de toxinas fungales importantes.



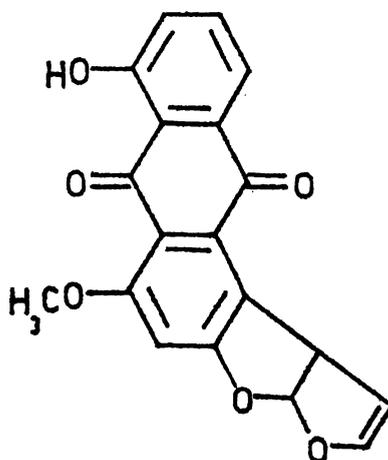
Patulina.



Acido penicílico.

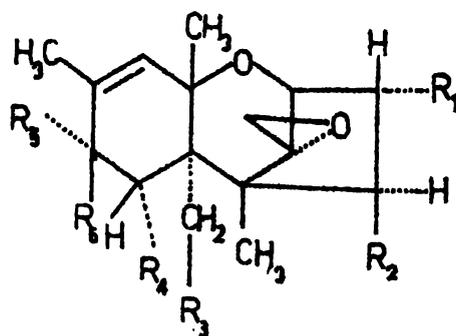
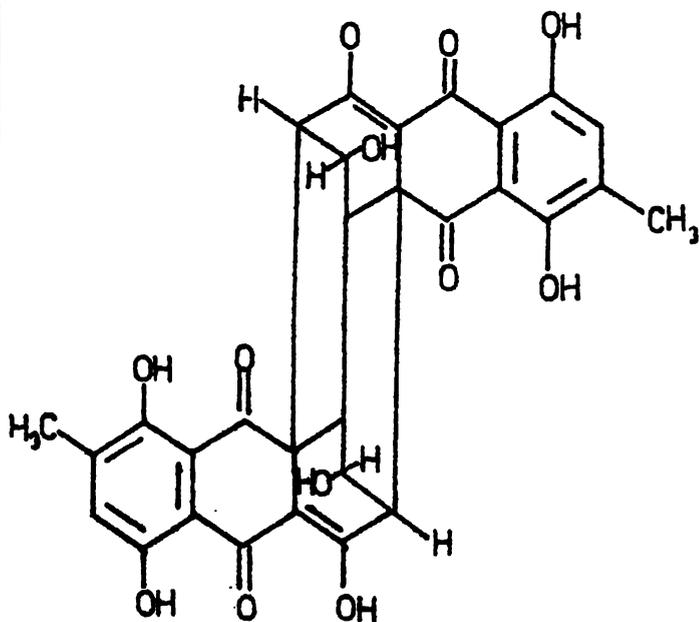


Citrinina



Esterigmatocistina.

Luteoskirina.



Nucleo del tricoteceno.

## Tabla 1

## ESPECIES FUNGALES CAPACES DE PRODUCIR PATULINA

- 1.- Penicillium patulum
- 2.- Penicillium expansum \*
- 3.- Penicillium lapidosum
- 4.- Penicillium melinii
- 5.- Penicillium equinum
- 6.- Penicillium novae-zeelandiae
- 7.- Penicillium divergensis
- 8.- Penicillium griseo-fulvum
- 9.- Penicillium leucopus
- 10.- Penicillium cyclopium
- 11.- Penicillium urticae
- 12.- Penicillium claviforme
- 13.- Aspergillus clavatus
- 14.- Aspergillus giganteus
- 15.- Aspergillus terreus
- 16.- Bissochlamys nivea

\* Principal productor de patulina en la naturaleza.

## CAPITULO I

## 1.- Generalidades sobre Patulina

## 1.1 Antecedentes

El descubrimiento de la penicilina en 1928 y su introducción como agente quimioterapéutico en los años 40'S de este siglo marca un punto importante en la historia del --- hombre y su lucha contra las adversidades causadas por enfermedades de tipo microbiológico. El gran éxito alcanzado en poco tiempo por la penicilina influyó en la búsqueda de nuevos antibióticos, ( un antibiótico es un compuesto tóxico a los microorganismos; para que sea un antibiótico efectivo terapéuticamente hablando, debe ser más tóxico para los microorganismos que para el hombre) así, pronto se descubrieron la patulina, la citrinina, la griseofulvina y el ácido penicílico y se establecieron sus potenciales antibacteriales, sin embargo luego se vió que los compuestos mencionados eran demasiado tóxicos para usarse como medicamentos clasificándose entonces como micotoxinas (44).

La palabra micotoxina proviene del griego mykes (hongo) y del latín toxicum (veneno) y es usada para designar a los metabolitos fungales secundarios que causan cambios patogénicos o anormalidades fisiológicas en el hombre y los animales de sangre caliente. La micotoxicosis es la intoxicación del huésped producida por la ingestión de alimentos contaminados con hongos (71).

Hasta el momento se tienen 3 géneros de hongos que son notables en la producción de diversas toxinas:

Aspergillus.

Penicillium.

Fusarium.

Penicillium y Aspergillus son los dos géneros principales de hongos que afectan a los alimentos durante el almacenamiento en el mundo entero (10). Fusarium es un género que afecta a los vegetales en el campo.

Las especies de Aspergillus producen relativamente pocas toxinas; siendo las principales: aflatoxinas, esterigmatocistina y ocratoxina, mientras que las toxinas de Fusarium son todas derivadas de los núcleos de zearalenona o tricoteceno.

Las toxinas con mayor heterogeneidad son producidas por la especie de Penicillium y de acuerdo a la literatura son también las que más se producen universalmente (el 58-74% de las cepas de Penicillium aisladas de alimentos -- enmohecidos son toxicogénicas). Algunas toxinas de Penicillium aún no han sido caracterizadas y se desconoce mucho sobre los factores que influyen en su producción. En ocasiones la literatura está basada en identificaciones equivocadas que hacen difícil el hecho de establecer las relaciones correctas entre especies; toxinas y enfermedades (44).

Las principales toxinas producidas por Penicillium spp se muestran en la tabla 2. (44).

Se han registrado varios casos de intoxicación con micotoxinas a lo largo de la historia, pero debido a la falta de investigación y a la carencia de técnicas para localizar al agente causal de la enfermedad no se les dió -- importancia. En las épocas anteriores a 1960 solo muy pocas intoxicaciones se relacionaban directamente con los hongos, entre ellas se encuentran las debidas a los basidiomicetos venenosos como la Amanita muscaria y A. phalloides que actualmente caen dentro de la categoría de micotoxicosis. En la tabla 3 se encuentran las principales micotoxicosis, las toxinas y los hongos responsables de la intoxicación. Fue hasta 1960, cuando se presentó un caso de aflatoxicosis en guajolotes, que se denominó enfermedad X de

Tabla 2

## PRINCIPALES TOXINAS PRODUCIDAS POR PENICILLUM

Spp

| Micotoxina:          | especie:  |
|----------------------|---|
| Citroviridina        | <u>P. citreonigrum</u> , <u>P. mezynskii</u>      |
| Citrinina            | <u>P. citrinum</u>                                |
| Cicloclorotina       | <u>P. islandicum</u>                              |
| Acido ciclopiazónico | <u>P. aurantiogriseum</u>                         |
| Islanditoxina        | <u>P. islandicum</u>                              |
| Luteoskirina         | <u>P. islandicum</u>                              |
| Ochratoxina A        | <u>P. viridicatum</u> , <u>P. verrucosum</u>      |
| Patulina             | <u>P. expansum</u> , <u>P. griseofulvum</u>       |
| Acido penicílico     | <u>P. aurantiogriseum</u> , <u>P. puberulum</u> . |
| Penitrem A           | <u>P. crustosum</u>                               |
| P.R. Toxina          | <u>P. roquefortii</u>                             |
| Roquefortina         | <u>P. roquefortii</u>                             |
| Rubratoxina          | <u>P. purpurogenum</u>                            |
| Rugulosina           | <u>P. rugulosum</u> <u>P. aurantiogriseum</u>     |
| Verruculogeno        | <u>P. janthiellum</u> <u>P. simplicissimum</u>    |

Tabla 3

## MICOTOXICOSIS, TOXINAS Y HONGOS RESPONSABLES DE INTOXICACIONES.

| ENFERMEDAD                                 | TOXINA   | HONGO   |
|--|--|---|
| Ergotismo                                  | Alcaloides del ergot   | <u>Claviseps purpurea</u>   |
| Aleukia tóxica alimentaria                 | Tricotecenos   | <u>Fusarium sporotrichioides</u> , <u>F. poae</u>                                   |
| Stachybotryotoxicosis                      | No conocida  | <u>Stachybotrys atra</u>  |
| Enfermedad fotosensibilizante              | Sporidesmina   | <u>Pithomyces chartarum</u>   |
| Aflatoxicosis (enfermedad x de guajolotes) | Aflatoxinas  | <u>Aspergillus flavus</u> A. <u>parasiticus</u>                                     |
| Toxicosis de fusarium                      | Nivalenol<br>Fusarenon-X<br>Toxina T-2<br>Toxina HT-2        | <u>Fusarium nivale</u><br><br>F. <u>spp</u>   |
| Vulvovaginitis                             | Zearalenone  | <u>Fusarium graminearum</u> , <u>F. roseum</u>                                      |
| Toxicosis de patulina                      | Patulina   | <u>Penicillium urticae</u>  |
| Toxicosis de malta germinada enmohecida    | Maltorizina  | <u>Aspergillus oryzae</u> var. <u>microsporus</u>                                   |
| Hiperqueratosis (enfermedad x de vacas)    | Patulina   | <u>Aspergillus chevalieri</u> , A. <u>clavatus</u> .                                |
| Ptialismo                                  | Esiaframina  | <u>Rhizoctania leguminicola</u>   |
| Toxicosis de arroz amarillo                | Cictreoviridina<br>luteoskirina<br>cicloclorotina<br>Citrina | <u>Penicillium citreoviride</u> .<br><br><u>P. islandicum</u><br><u>P. citrinum</u> |

los guajolotes, cuando se descubrió que ciertos metabolitos fungales producían cambios patológicos en el hombre y los animales. En estas dos décadas pasadas se ha demostrado -- que muchas enfermedades de etiología incierta se deben a la ingestión de alimentos contaminados con hongos.

A raíz de este descubrimiento se han identificado numerosas toxinas haciéndose necesaria su agrupación ordenada para facilitar su estudio (71).

Es difícil hacer una clasificación de las micotoxinas debido a que sus estructuras son muy variadas, sin embargo, pueden agruparse de acuerdo a la ruta metabólica de la que derivan, así tenemos:

- 1) Micotoxinas derivadas de aminoácidos
- 2) Micotoxinas derivadas de la ruta del mevalonato
- 3) Micotoxinas derivadas de la ruta del acetato-malonato.
- 4) Micotoxinas derivadas de la ruta de biosíntesis -- aromática (ruta del ácido siquímico) (71).

Natori (10) propuso una clasificación similar pero ligeramente modificada.

Así mismo pueden agruparse de acuerdo a los sitios en los que actúan (órganos blancos):

|  |                     |
|--|---------------------|
| Micotoxinas hepatotóxicas                        | (hígado)            |
| Micotoxinas nefrotóxicas                         | (riñón )            |
| Micotoxinas dermatóxicas                         | ( piel )            |
| Micotoxinas endocrinotóxicas                     | (sistema endócrino) |
| Micotoxinas tóxicas a los órganos reproductores. |                     |
| Micotoxinas neurotóxicas                         | (sistema nervioso)  |

Las micotoxinas son especialmente importantes entre las toxinas naturales por los siguientes factores:

- 1) Los hongos productores de toxinas, están ampliamente distribuidos y pueden contaminar a los ali--

mentos.

- 2) Las micotoxinas pueden persistir en los alimentos afectados aún después de la erradicación fungal.

Estos hechos favorecen la proliferación de micotoxicosis ya sean esporádicas, accidentales, aisladas o bien endémicas y epidémicas (71).

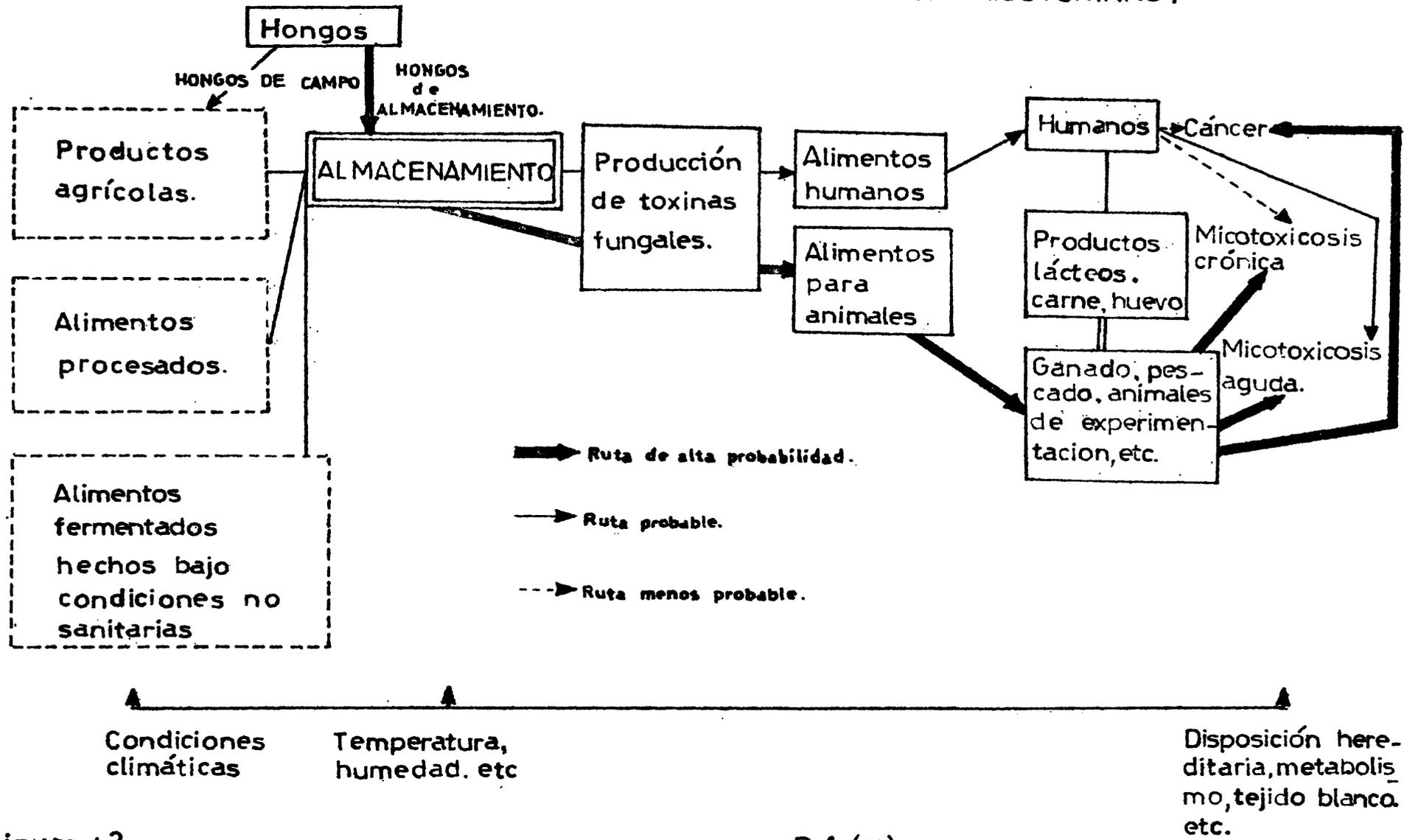
En la figura 2 se presentan las probables rutas de contaminación por micotoxinas.

La patulina se descubrió como un potente antibiótico producido por Penicillium expansum en 1938, después se logró aislar también de medios de cultivo de Aspergillus clavatus en 1942 y Penicillium claviforme en el mismo año, su nombre actual se deriva del subsecuente aislamiento del medio del cultivo de P. patulum sinónimo de P. urticae - Bainier por Birkinshaw y Col. en 1943 (47a), en general ha sido aislada de varias especies de Aspergillus (Kent y Heatley 1945, Waksman 1944, Weisner 1942), de Penicillium (Birkinshaw 1943, Chain 1942, Kent y Heatley 1945, Wilkens y Harris 1942, 1943) y de Gimnoascus (Karow y Foster 1944), como puede verse en la tabla 1. En vista de la diversidad de hongos productores de patulina, se le han asignado varios nombres, entre ellos: clavicina, claviformina, expansina, penicidina, micoína C<sub>3</sub>, leucopina y tercinina (47).

Se utilizó a la patulina como remedio para los resfriados en 1943 (47a) y como un antibiótico para el tratamiento de las infecciones micóticas de la piel en 1945 -- (47b). Se realizó el primer estudio sobre la toxicidad en 1947, se determinó su estructura química en 1949 (Woodward y Singh) y se confirmó por la síntesis artificial en 1950 (36).

La ruta biosintética de la patulina fue estudiada -- originalmente por Birkinshaw en 1953 y continuada por --

# PROBABLES RUTAS DE CONTAMINACION POR MICOTOXINAS.



12

Figura :2

Ref: (71)

Enrensiard (1955), Bu'lock (1958), Tanenbaum y Basett - - (1959), Bu' lock (1965), Scott y Yalpani (1967), Forrester y Gaucher (1972), Scott y Col. (1973), Scott y Breadling (1974), Murphy (1974) Murphy y Linen (1975) y Sekiguchi - y Gaucher (1978) (12,59).

En 1966 se realizó la producción experimental de cáncer por inducción de sarcoma subcutáneo en ratas (10a), el interés inicial (como antibiótico) en la patulina disminuyó pronto debido a su alta toxicidad confirmada en -- 1967 (12a).

La patulina se ha relacionado con hiperkeratosis y - otras toxicosis de *Aspergillus* (1953-1961) en becerros en U.S.A. (10). Se han reportado varias intoxicaciones de ganado por ingestión de alimentos contaminados con hongos - productores de patulina, una de estas fué registrada en - Japón (35), la contaminación de malta con *P. urticae* produjo la muerte de vacas lecheras por hemorragia en Kobe - Japón en 1968 (71), en Alemania la intoxicación de ganado con malta germinada contaminada con *Aspergillus clavatus* se relacionó con los efectos tóxicos de la patulina (71).

La patulina puede presentar un riesgo potencial si - se ingieren productos alimenticios contaminados por esta sustancia. A raíz de las evidencias obtenidas de sus efectos carcinogénicos (10a) y mutagénicos (35) y de su presencia en alimentos comerciales (55) se ha dado gran énfasis a los métodos analíticos para la detección y cuantificación de esta micotoxina.

Se utilizaron métodos microbiológicos para el análisis de la patulina basándose en sus propiedades antibióticas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas así - como contra algunos hongos que son sensibles a la patulina, entre los microorganismos utilizados están: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus* en 1944 y -

1945, con el método de estría en placa, S. aureus y Bacterium coli en 1947 con el método de la placa cilíndrica, con estos métodos la potencia se medía como la más alta dilución de la substancia que evita el crecimiento del microorganismo.

Se han ideado técnicas para cuantificación en términos de  $\mu\text{g}$  utilizando Agrobacterium tumefaciens con un límite de detección de 2-3  $\mu\text{g/ml}$  en 1955 y Bacillus subtilis (4  $\mu\text{g/ml}$ ) en 1947 usando métodos turbidimétricos y de dilución respectivamente (65a, 65b).

En 1975 se desarrolló un método cuantitativo para su determinación utilizando Bacillus megaterium, microorganismo que había sido usado previamente para el análisis de aflatoxinas en 1966 y 1968 y para ocratoxinas en 1969, en este método se encontró una buena correlación entre halo de inhibición del crecimiento y la concentración de patulina, con una exactitud comparable a otros métodos no microbiológicos, pero menos sensible (65).

Otros métodos incluyen técnicas basadas en la cromatografía de capa fina para la determinación de patulina, aplicándose a diversos alimentos susceptibles de contaminación con la toxina: en carne y productos cárnicos en -- 1971 y en pan en 1972 (52), en granos en 1970 (45), en jugos de frutas y harinas en 1968 y 1973 ( 54, 56) y en 1974 en jugo de manzana en un estudio de colaboración con varios laboratorios (57).

El método de Scott y Kennedy de 1973 (56) se adoptó como el método oficial de la Asociación de Químicos Analistas Oficiales (AOAC) en 1974, pero en 1975 Cogley encontró que algunos jugos de manzana contenían sustancias que interferían en la determinación de patulina por este método, entre estas sustancias se encuentran la escopoletina (62) y el 5 hidroximetil furfural (72), por lo tanto se encaminó la investigación a técnicas analíticas que eli-

minaran estas interferencias presentes en los jugos de manzana mencionados, empleando la 2,4 dinitrofenil hidrazina para formar el derivado con la patulina en una microcolumna y la posterior cuantificación por la absorbancia a 375 nm en capa fina (62).

En 1979 (60) se propuso un método utilizando una mezcla de alcohol isopropílico-acetato de etilo para la extracción y cromatografía de capa fina, utilizando acetato de anilina como relevador y cuantificando por densitometría obtuvieron un límite de detección de 0.004 µg, menor al del método oficial de la AOAC que es de 0.01 µg/ (56).

Posteriormente se probó la cromatografía en capa fina bidimensional para eliminar interferencias en jugo de frutas en 1979 (64) y en 1980 (42).

Los métodos que emplean la cromatografía en capa fina se han usado ampliamente en estudios de producción, presencia, estabilidad y toxicidad de la patulina (7,27,28,31, 32, 30, 39, 41,55,61 y 74), paralelamente se han realizado determinaciones de patulina en productos alimenticios utilizando la técnica de cromatografía de gases en 1970 (47) y en 1980 (53) entre otros. Se han desarrollado otros métodos; uno de cromatografía en papel usado fenil hidrazina como revelador en 1956, tres métodos colorimétricos (47) - y otros espectrofotométricos (3,46).

Los avances adquiridos en la tecnología de cromatografía de líquidos de alta presión, han hecho de esta técnica una atractiva alternativa para el análisis de micotoxinas presentando ventajas sobre los métodos comúnmente utilizados: (TLC),(GLC) Cromatografía en capa fina y Cromatografía gas-líquido.

Se han llevado a cabo estudios de determinación de patulina en jugos de manzana mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión en 1974 (72), en puré de manzana en 1975 (73), usando fase inversa para su --

determinación en jugo de manzana en 1978 (67) y en 1980 (38).

Se ha usado la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas de ion simple de alta resolución para determinar patulina en jugo de manzana en 1979 (64).

## 1.2 Aspectos microbiológicos

### 1.2.1 Microorganismos productores de patulina.

Se han reportado varios microorganismos que son capaces de producir patulina como puede verse en la tabla 1.

En general, el 80-90% de las pudriciones totales de manzana en post-cosecha se deben a *Penicillium* spp o mohó azul (1), las especies de *Penicillium* que son productoras de patulina causan el 66% de las pudriciones de manzana durante el almacenamiento (42). La especie más importante es *Penicillium expansum* Link, hongo patógeno que causa pudriciones durante el almacenamiento en peras y manzanas (44), todas las cepas aisladas de *P. expansum*, de diferentes frutas huésped y en diversos países producen patulina aunque en un amplio rango de concentraciones (61,74).

En nuestro país se han efectuado estudios para observar la incidencia de estos hongos en el almacenamiento de manzana, uno de estos estudios (1) indica que el 75% de las pérdidas son de origen biótico de las cuales el 52% del total de pérdidas y el 69% del total de pudriciones se deben a *Penicillium* spp, no se ha enfatizado en la caracterización completa de estos hongos.

En ocasiones *P. expansum* produce hasta 17.7 mg de patulina/manzana dependiendo también de la susceptibilidad de la variedad, del estado de maduración del fruto y de la cepa fungal además de otros factores ambientales importantes (66).

*Penicillium expansum* es capaz de penetrar en el tejido del fruto por vía lenticelar, pero es más común que lo invada por fisuras en la cáscara causadas por daños mecánicos o de insectos (44), la pudrición es blanda de color café claro, de olor y sabor característicos, en estado avanzado se desarrolla un polvillo azul verdoso en la superficie (1).

Este hongo es capaz de crecer sobre manzanas y peras aún bajo condiciones de refrigeración a 0°C (61) y de atmósfera controlada ( 1% de bióxido de carbono, 3% de oxígeno, 96% de nitrógeno, 90% de humedad relativa y a 0°C), - produciendo patulina en el tejido afectado a niveles significativos después de 3 a 6 meses de almacenamiento, la atmósfera controlada no limita la capacidad de P. expansum para invadir el tejido del fruto, pero si reduce la acumulación de patulina a aproximadamente la quinta parte de la encontrada en frutos incubados en condiciones atmosféricas no controladas (32).

### 1.2.2 Producción de Patulina

La producción de patulina está ampliamente distribuida; encontrándose en gran variedad de alimentos, principalmente frutas, sin embargo Stott y Bullerman en 1975, indicaron que solo se localiza naturalmente en manzanas, peras y sus derivados ( 42,60).

La producción de patulina en alimentos por un microorganismo capaz de producirla depende de la temperatura, - tamaño de la lesión y materia huésped, también varia entre cepas aisladas de diferentes huéspedes (61) y otros factores ambientales. Entre los elementos más importantes se encuentran la temperatura y la potencialidad del alimento para soportar la producción de la toxina (26).

Para determinar las condiciones óptimas de producción de patulina se han usado medios sintéticos, encontrándose que el caldo de papa dextrosa es el que da mejores rendimientos de patulina cuando se usa Penicillium urticae ---- Bainier: 2.7 mg/ml a 25°C por dos semanas (40). Tanto la cantidad como la calidad de las fuentes de carbohidratos - y de nitrógeno influyen sobre la producción de patulina, - la glucosa estimula su producción (66), además es más -- efectiva que la lactosa para incrementar el rendi-

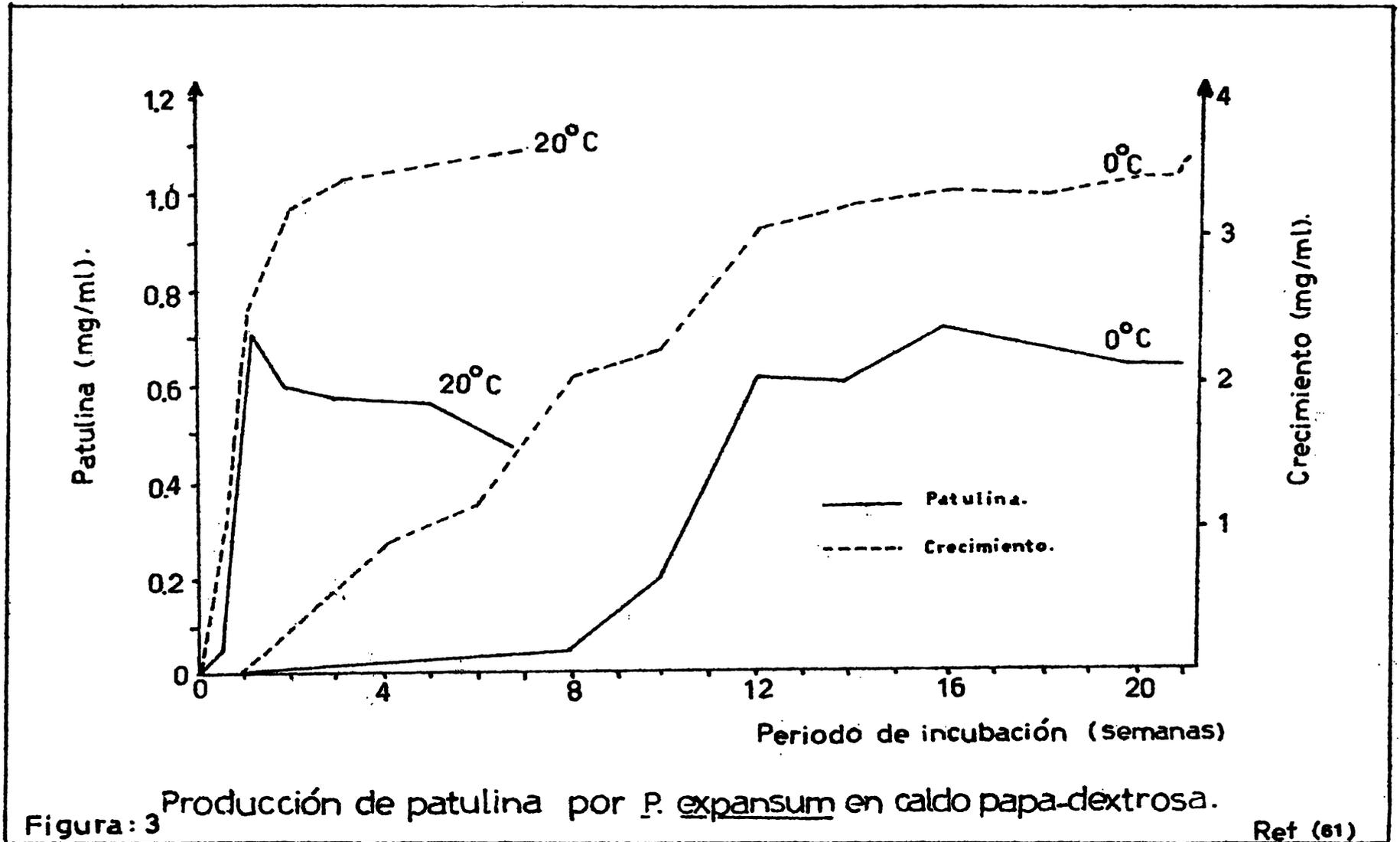
miento de patulina, obteniéndose poca producción cuando se utiliza una fuente limitada de carbohidratos (66). Los sustratos altamente protéicos, como el queso, no favorecen la producción de patulina (41), el extracto de levadura y el líquido de maceración del maíz disminuye su producción (66). La terminación de los nutrientes nitrogenados estimula la biosíntesis de patulina (58) y su producción se halla también limitada por la incubación a bajas temperatura (figura 3), sin embargo P. expansum y P. patulum producen cantidades considerables de patulina a 0-5°C (61).

Una alta concentración de calcio también inhibe la biosíntesis de patulina (58).

### 1.2.3 Biosíntesis de Patulina

Los hongos son organismos heterotróficos, utilizan una fuente de carbono orgánica para poder efectuar su metabolismo, principalmente carbohidratos que son metabolizados a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  como productos finales a través de varias rutas metabólicas. Algunas de las más importantes son la ruta de Embden-Meyerhof Parnas para la glucólisis, el ciclo de las pentosas fosfato para el metabolismo de las pentosas y el ciclo de Krebs para el metabolismo de los derivados metabólicos de carbohidratos y de los ácidos tricarbóxicos.

Se forman muchas clases de metabolitos durante la síntesis de los componentes químicos esenciales y durante los procesos involucrados en la liberación de la energía química para llevar a cabo las reacciones de síntesis. Tales reacciones son esenciales en los organismos vivos y se llaman colectivamente "Metabolismo primario" por conveniencia, el metabolismo primario en los hongos es muy similar en principio al de las plantas, animales y otros organismos. Parte de los compuestos de carbono que ingieren estos seres no se convierten completamente a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  sino que se -

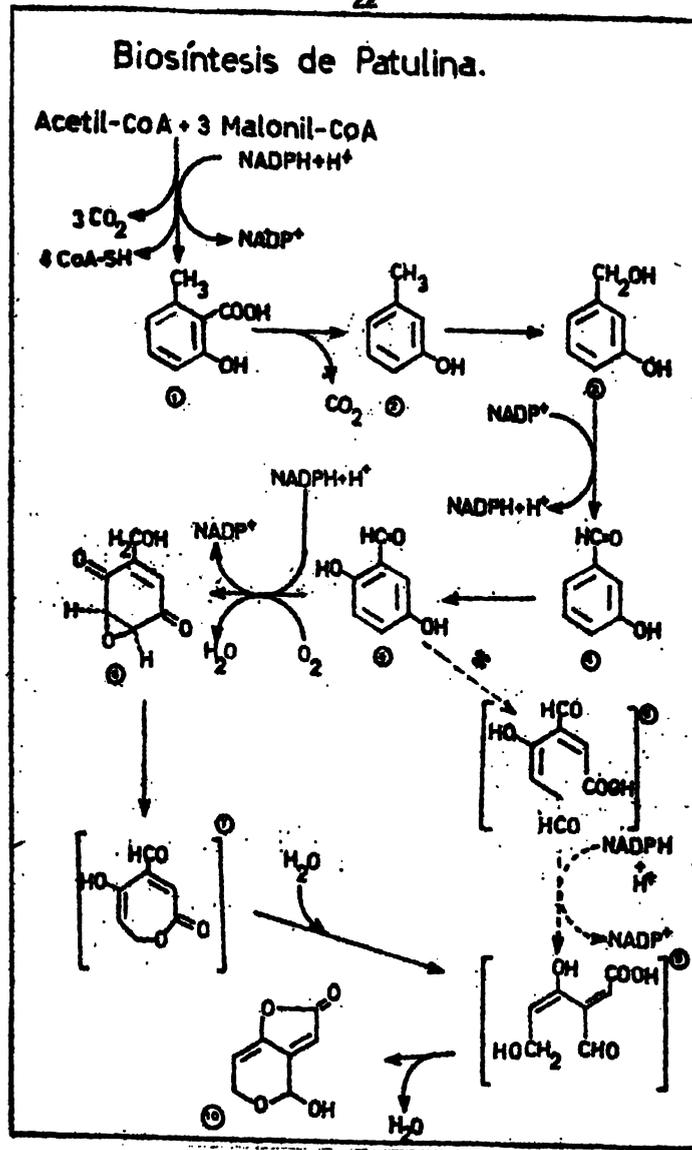


transforman en varios metabolitos intermediarios durante el proceso metabólico. Ciertos azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, compuestos aromáticos etc., son considerados como "metabolitos intermediarios" comunes y a partir de estos se forman los llamados "metabolitos secundarios", a tales compuestos se les conoce también como productos naturales. Al contrario de los metabolitos primarios que son comunes a muchos organismos, los metabolitos secundarios son característicos de organismos particulares. Por ejemplo, el color característico de algunos organismos se debe a metabolitos secundarios. Aunque aún poco conocido el significado de los metabolitos secundarios, estos productos pueden ser tóxicos o exhibir una actividad fisiológica característica hacia otros organismos, entre estos se encuentran las micotoxinas. Como se ha descrito (Pág.10) se ha clasificado a las micotoxinas de acuerdo a la ruta metabólica por la que se biosintetizan, la patulina se encuentra dentro de las que se producen por la ruta del acetato-malonato -- (71), se ha comprobado que el acetyl CoA se une con la malonil-CoA para producir ácido 6-metil salicílico y este puede transformarse en patulina, por lo que también se le conoce como un policétido (derivado de poliacetato) (12).

La ruta metabólica propuesta para la patulina ha sido estudiada profusamente, incluso se ha considerado como un sistema modelo de la biosíntesis policétida y de la biosíntesis de metabolitos secundarios en general, los últimos reportes publicados han elucidado los pasos de esta vía encontrando incluso algunos cofactores que se involucran en las reacciones enzimáticas (12, 59). Los experimentos se han efectuado con compuestos marcados con elementos radiactivos y la ruta propuesta se muestra en la figura 4.

La ruta propuesta por Sekiguchi y Gaucher (59) corresponde sólo a la porción post-gentisaldehydica, la porción inicial fué propuesta por Forrester y Gaucher (12).

## Biosíntesis de Patulina.



- 1.- Acido 6-metil salicílico
- 2.- m-cresol
- 3.- Alcohol m-hidroxibencilico
- 4.- m-hidroxibenzaldehído.
- 5.- gentisaldehído
- 6.- Pilostina (fitotoxina)
- 7.- Intermediario propuesto
- 8.- Intermediario propuesto
- 9.- Intermediario propuesto (pre-patulina).
- 10.- Patulina

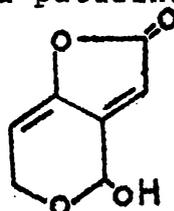
Las líneas punteadas indican la ruta propuesta anteriormente. Las líneas continuas, la ruta propuesta por Sekiguchi y Gaucher (89).

### 1.3 Propiedades físicas, químicas y estabilidad

#### 1.3.1 Propiedades físicas y químicas

La patulina químicamente es la (4-hidroxi-4H-furo [3,2-C] Piran 2(6H)-ona),  $C_7H_6O_4$ , es una lactona heterocíclica  $\alpha,\beta$  insaturada, estable en ácidos diluidos y lábil en álcalis (3, 42).

La estructura de la patulina es:

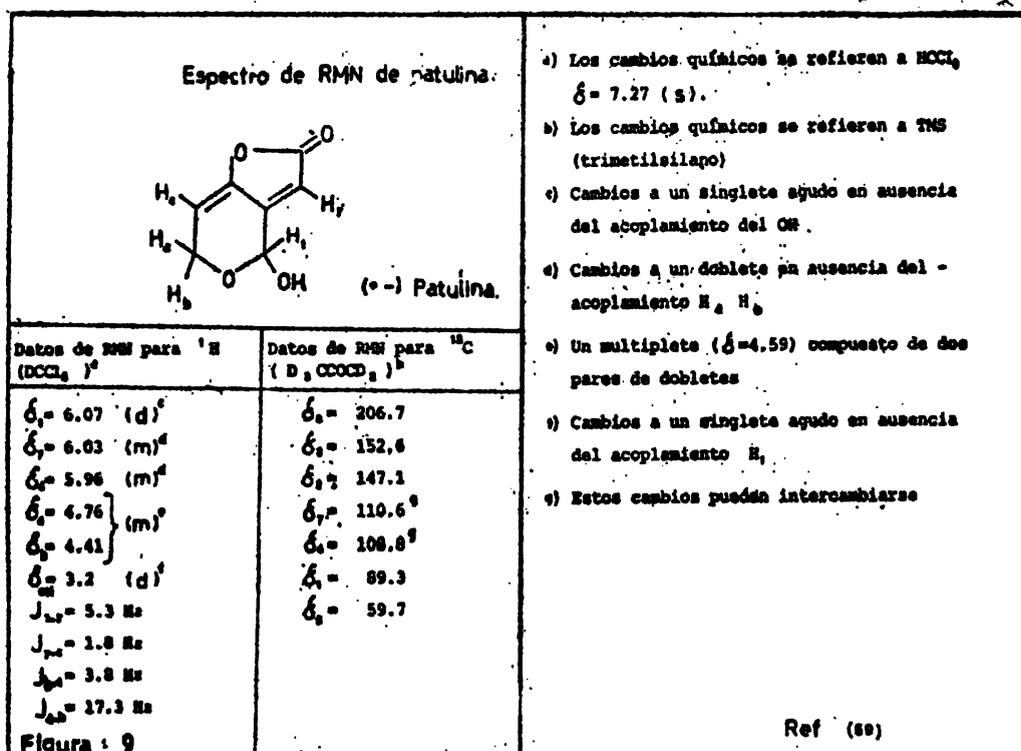
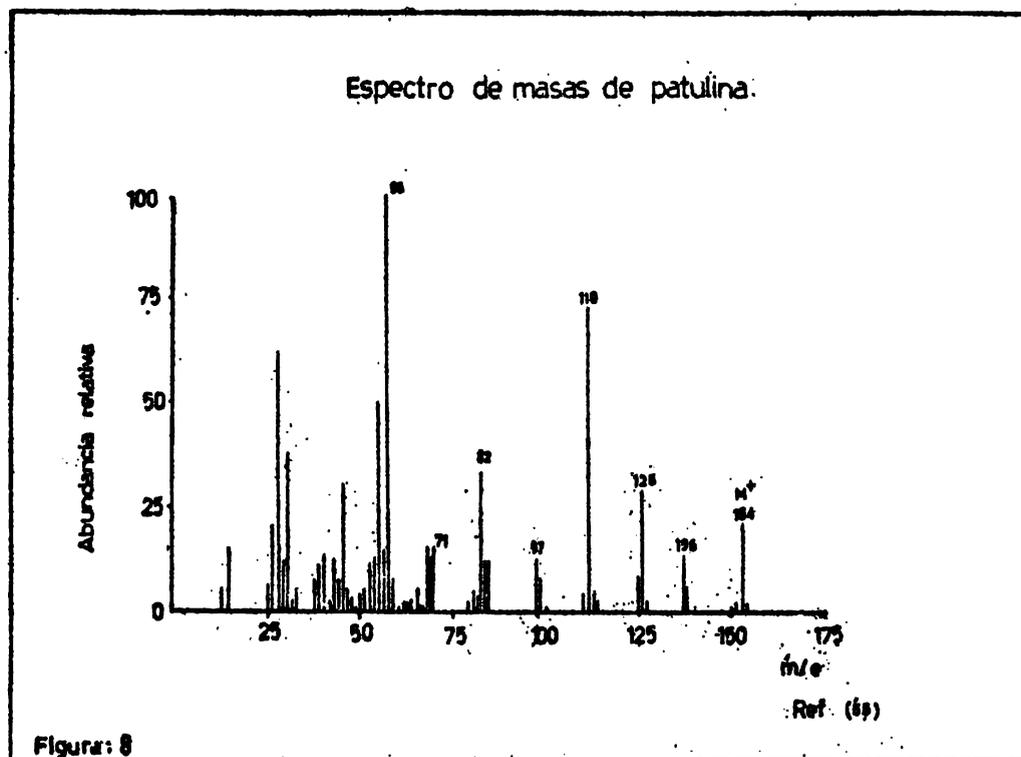


El peso molecular de la patulina es; 154.12 dalton y su análisis proximal; C:54.55% H: 3.93% y O:41.52%. Son prismas compactos o placas delgadas a partir de éter o cloroformo con punto de fusión de 111°C.

Es soluble en agua y algunos solventes orgánicos excepto éter de petróleo. Muy soluble en acetato de amilo o de etilo siendo este último un solvente eficiente para la extracción de la patulina en solución acuosa (38). Cristalizaciones repetidas en éter, benceno, cloroformo, alcohol o acetona transforman a la patulina en un material amorfo insoluble en todos estos solventes así como en agua y ácido acético glacial (46).

La patulina tiene actividad óptica nula y su UV - - -  $\lambda_{\max}^{HCCl_3}$  a 276.5 nm, observándose un cambio en el espectro de absorción cuando agregamos a la solución de patulina  $SO_2$ , presentándose 2 bandas nuevas de baja intensidad a 238 nm y 309 nm; figura 7 (46), Los valores de infrarrojo - - - ( $\nu_{\max}^{HCCl_3} \text{ cm}^{-1}$  : 3580, 3025, 1780, 1755, 1680, 1630, - 1410, 1260, 1160, 1096, 1057, 1035, 998, 970, 922, 875, 852, 826, 808) y en espectroscopía de masas (154 ( $m^+$ , 32.9), - 136 (22.3), 126 (45.3), 110 (85.3), 97 (22.4), 82 (39.9), - 55 (100) ). (59)

El espectro de masas de la patulina se muestra en la figura 8, y sus valores de resonancia magnetica nuclear - asignados se muestran en la figura 9.



### 1.3.2 Estabilidad

Es importante conocer si la patulina es estable en alimentos como las frutas, jugo de frutas, granos, harinas blanqueadas etc., bajo condiciones en las cuales ellos se almacenan y procesa.

Una vez producida la toxina en el alimentos, la estabilidad de la misma será el factor determinante para saber que tanto permanecerá en el alimento y a que nivel, siendo éste un índice para establecer el peligro real o potencial de la contaminación.

De acuerdo a la naturaleza del alimento son tres los factores que influyen en la estabilidad de la patulina: el pH, los grupos sulfhidrilo (SH) en el alimento y la cantidad de agua (Aw), y de acuerdo al proceso que sufre el alimento: el tratamiento térmico, la adición de preservativos como el SO<sub>2</sub> y la fermentación.

La patulina es estable como antibiótico en: suero, pus orina y solución acuosa a pH de 3.3 a 6.3 (30), perdiendo sus propiedades después de un largo período de permanencia en solución acuosa: figura 5 (46).

A medida que aumenta el pH a partir de 6.8 hay una -- destrucción proporcional de la patulina.

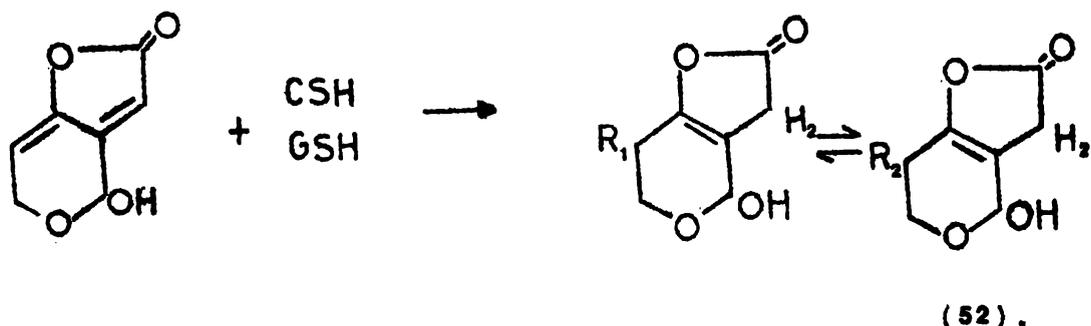
Al adicionar patulina en alimentos ésta desaparece en varios de ellos atribuyéndose esta desaparición a la reacción que presenta con los grupos SH de los aminoácidos -- contenidos en las proteínas (4); se ha encontrado por ejemplo que en el jugo de naranja existe una rápida destrucción de la patulina, debido esto no al efecto del pH, sino a los niveles presentes de compuestos SH en el jugo (0.02-0.03 m moles de grupos SH/100ml de jugo) (54), mientras que la estabilidad de la patulina en jugos de manzana y uva puede ser atribuida a los bajos niveles de grupos SH presentes -- en el jugo (0.003m moles de grupos SH/ 100ml de jugo) (54).

Cuando se agrega cisteína a una solución de patulina - rápidamente se torna ácida, de color amarillo, el pH desciende de 6.5 a 2.5-2.6 y hay precipitación de material insoluble.

Los resultados indican que un mol de patulina reacciona con más de un mol de cisteína, existiendo un incremento en la velocidad de reacción si se agrega una base a la solución (4).

El mecanismo de reacción entre la patulina y los grupos SH es complejo y puede ser postulado mediante la adición tipo Michael del grupo SH al doble enlace de la lactona  $\alpha$ , insaturada de la patulina (4).

Se propone para la reacción de adición de cisteína y glutatión la siguiente forma:



Sin embargo la reacción de la patulina con la cisteína no resulta ser tan simple como el esquema anterior lo demuestra, ya que se han obtenido varios productos de reacción, cuyo número depende de las condiciones en las cuales se lleve a cabo ésta. Hasta el momento no se han aislado ni caracterizado ninguno de los aductos resultantes de la reacción cisteína-patulina (4, 27). El intento por separar e identificar estos compuestos ácidos por cromatografía en columna y cromatografía de líquidos de alta presión, así como por -

espectrofotometría de infrarrojo y resonancia magnético nuclear dieron resultados negativos (4).

Sin embargo estudios recientes reportan que estos productos ácidos (desconocidos) tienen poca toxicidad (18) (27).

La estabilidad de la patulina se ha estudiado en granos, observándose que su concentración disminuye con el tiempo después de la adición, encontrándose que la cantidad de agua libre ( $A_w$ ) influye en la velocidad de reacción entre la toxina y los grupos SH, posiblemente por su acción como solvente (18).

Se considera a la patulina inestable en maíz húmedo, trigo, sorgo, cebada, harinas, pan blanco, queso y jugo de naranja y estable en jugo de manzana, jugo de uva y maíz seco: figura 6. (46, 30, 18, 41).

Wiesner en 1942 fue el primero en reportar la estabilidad térmica de la patulina en solución acuosa (30a), posteriormente se encontró que en la velocidad de destrucción térmica de patulina en solución acuosa influye el pH como parámetro fundamental.

En la tabla 4 se muestran los parámetros de destrucción térmica (valores D y z) en función del pH, para establecer la cinética de destrucción de la patulina, los datos muestran que la patulina es resistente a la destrucción térmica a todos los valores de pH desde 3.5 a 5.5 indicando que la patulina es más estable en soluciones ácidas (30).

En los jugos de uva y manzana en condiciones normales flash de pasteurización (90°C por 30 seg. o a 70°C por 20 min.) la patulina es bastante estable, lo mismo que a 80°C durante 10-20 min o a 100°C por 15 min a un pH de 2 (54) y mediante el proceso de despectinización en manzanas calentando a 87-89°C se reduce el contenido de patulina solo en un 20% del contenido original (67).

El  $SO_2$  se ha utilizado como un agente químico en la

Tabla 4  
Parámetros térmicos de inactivación  
de la patulina

CONCENTRACION INICIAL DE PATULINA:  
( 100 - 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ).

| temperatura<br>(°C) | valores "D" (min) |        |        |
|---------------------|-------------------|--------|--------|
|                     | pH 3.5            | pH 4.5 | pH 5.5 |
| 105                 | 1058              | 695    | 167    |
| 110                 | 744               | 444    | 109    |
| 115                 | 527               | 334    | 71     |
| 120                 | 378               | 236    | 48     |
| 125                 | 268               | 167    | 33     |
| valores "Z"         | 33.4              | 31.6   | 27.7   |

"D" TIEMPO NECESARIO PARA REDUCIR LA CONCENTRACION DE PATULINA A UN 90 %

"Z" RANGO DE TEMPERATURA EN EL CUAL SE PRODUCE UNA REDUCCION DE 90 % DE "D"

preservación de alimentos, se afirma que la afinidad de la patulina por el  $\text{SO}_2$  tiene poco alcance a concentraciones por abajo de 200 ppm mientras que a 2000 ppm se combina con la patulina en un 90% (3).

La reacción de la patulina con el  $\text{SO}_2$  en solución acuosa involucra la adición del ion ( $\text{HSO}_3^-$ ) al sistema de lactona conjugado en forma similar al postulado para los compuestos con grupos tiol, aunque es posible también que el grupo  $\text{HSO}_3^-$  se adicione a la función aldehído del enlace hemiacetal de la patulina (46).

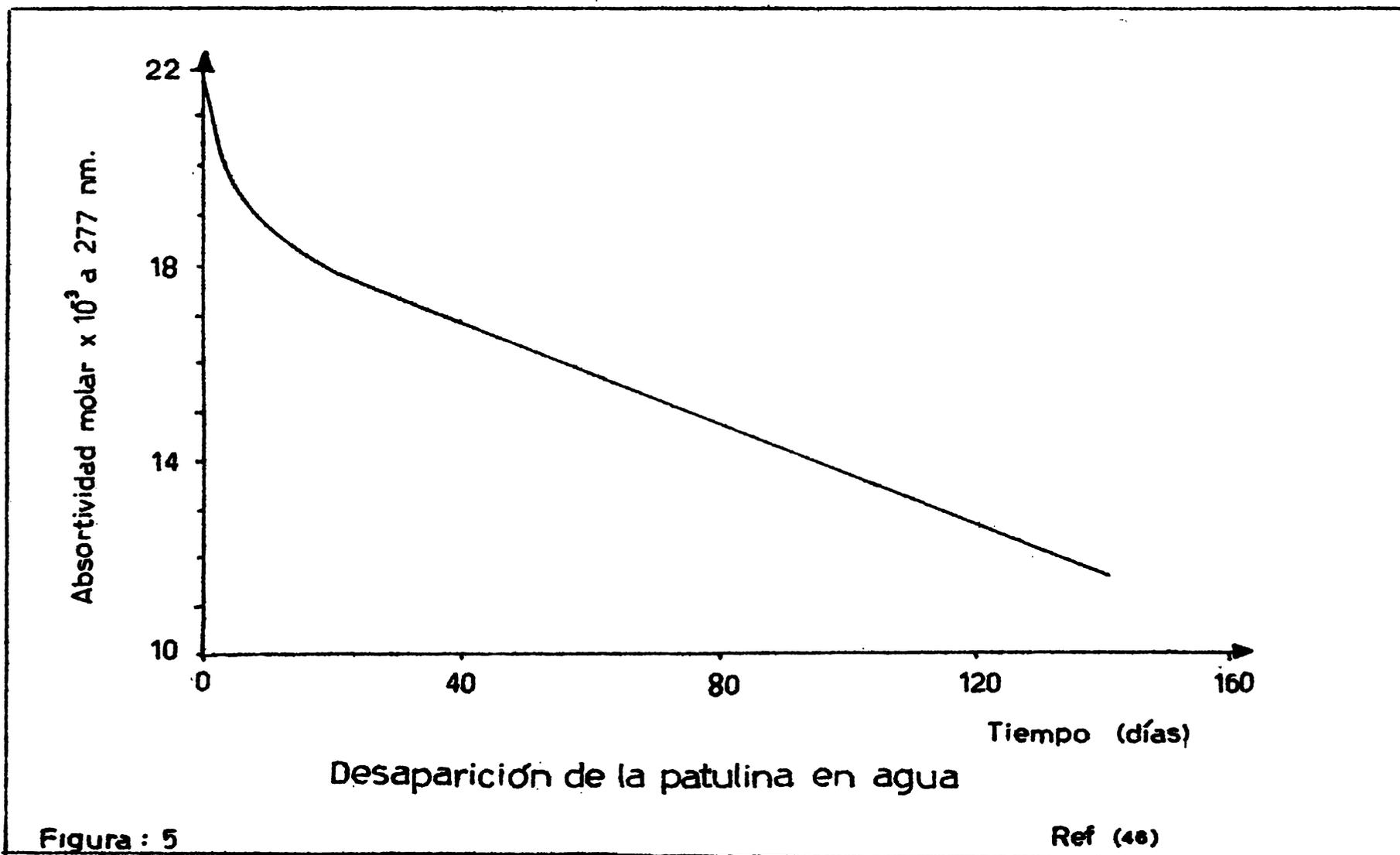
Así entonces se proponen dos tipos de reacción del  $\text{SO}_2$  con la patulina:

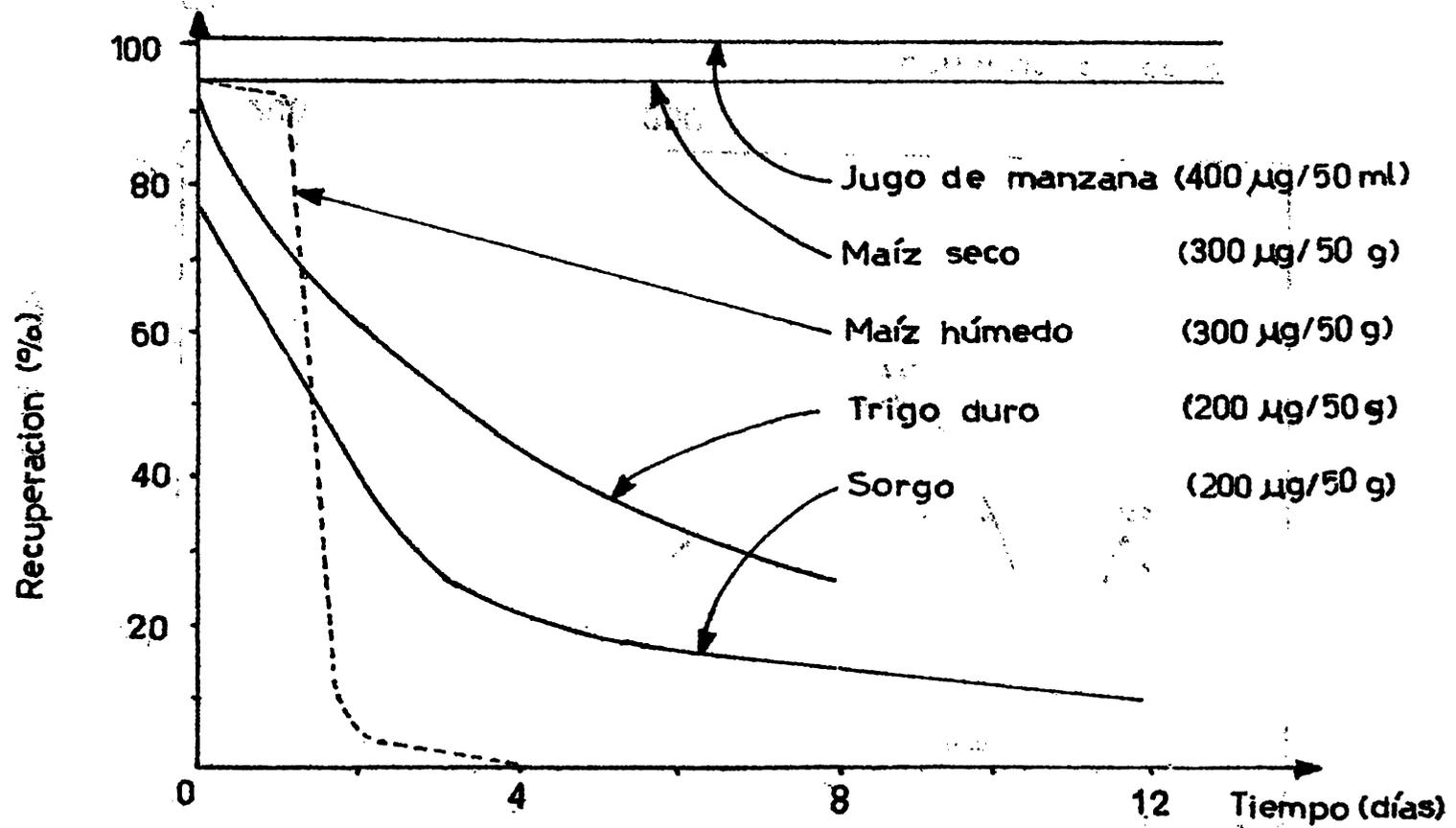
a) Reversible; reacción de la función aldehído del anillo hemiacetálico para formar el típico carbonilo hidroxisulfonado.

b) Irreversible; cuando ocurre una reacción con la doble ligadura conjugada de la lactona y la consecuente apertura del anillo (3).

La patulina disminuye su contenido cuando las levaduras actúan fermentando el jugo de manzana; cerca del 90% del contenido de patulina desaparece durante la fermentación (3).

Lovett y Col (31) encontraron que la extirpación cuidadosa del tejido enfermo de manzanas infectadas con hongos productores de patulina, disminuye el contenido de ésta en un 93-99% independientemente de la temperatura de incubación, la cepa fungal y la variedad de manzana.





Estabilidad de patulina en varios alimentos.

Ref (46)

Figura : 6

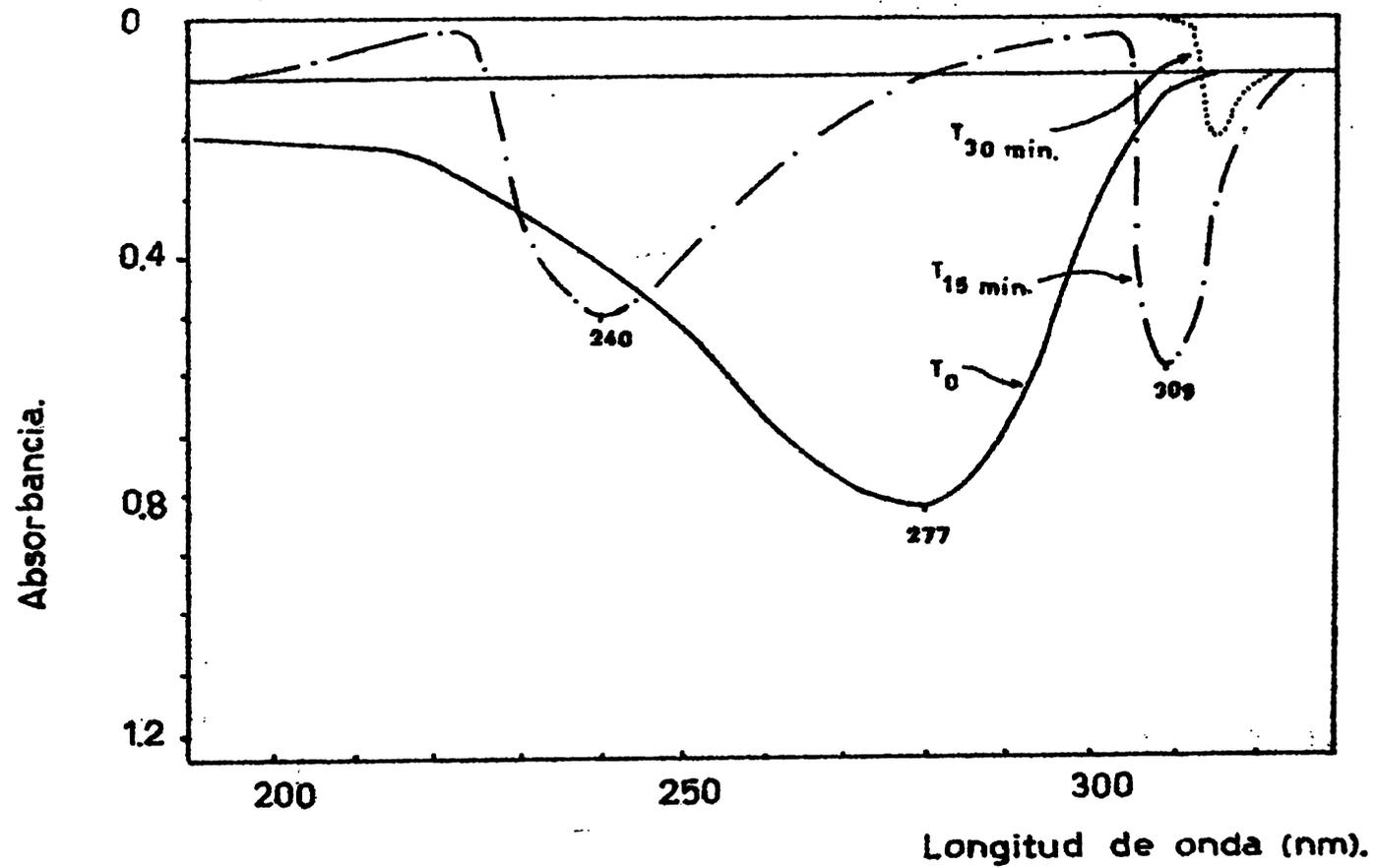


Figura: 7

Efecto del  $\text{SO}_2$  sobre la patulina en agua.

Ref (46)

#### 1.4 Propiedades tóxicas de la patulina.

Para investigar los factores tóxicos se hacen experimentos de actividad biológica denominados bioensayos, que son determinaciones de la potencia de un determinado agente por medio de un indicador biológico. El indicador biológico es la respuesta medible provocada por el agente en cuestión en un organismo o tejido. Se han empleado numerosos indicadores biológicos para probar la toxicidad de las micotoxinas, entre ellas se tienen organismos (animales de experimentación), órganos o tejidos aislados y microorganismos -- (70).

En las investigaciones usando animales de experimentación se analizan los efectos externos y diferentes órganos histológicamente al administrar la toxina por diversas -- vías. El desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos -- ha provisto al toxicólogo de una arma sumamente importante, ya que proporciona un material biológico simple para la detección y estimación de los efectos tóxicos, el agente tóxico puede ser analizado directamente con detalle en el medio ambiente simple y cuidadosamente controlado del cultivo de tejido. Los microorganismos son especialmente adecuados para mostrar los posibles efectos mutagénicos de la toxina ya que pueden observarse cientos de generaciones en un corto plazo (11).

Para el estudio de la toxicidad de la patulina se ha hecho uso de los indicadores biológicos mencionados en los párrafos anteriores y a dado lugar al descubrimiento de las siguientes características tóxicas: carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, antibiosis, fitotoxicidad y otros efectos metabólicos y fisiológicos. Con estos estudios se han establecido los valores de  $LD_{50}$  para varios animales de experimentación por diferentes vías (tabla 5).

## Tabla 5

Valores de LD<sub>50</sub>\* de patulina para diferentes especies.

| LD <sub>50</sub> | Especie                                  | Vía de administración | Ref. |
|------------------|--|-----------------------|------|
| 32.5 mg/kg       | Ratas Sprague Dawley                     | oral                  | (6)  |
| 29 mg/kg         | Ratones macho NMRI                       | oral                  | (31) |
| 25 mg/kg         | Ratones                                  | oral                  | (71) |
| 170 mg/kg        | Gallos White Leghorn                     | oral                  | (29) |
| 68.7 mg/kg       | Embrión de pollo sin incubar             | saco de aire          | (4)  |
| 2.35 mg/kg       | Embrión de pollo de 4 días de incubación | saco de aire          | (4)  |
| 5 mg/kg          | Ratas                                    | Intraperitoneal       | (14) |
| 10 mg/kg         | Ratón                                    | Subcutáneo            | (71) |
| 0.3-0.7 mg/kg    | Rata y ratón                             | Intravenosa           | (48) |
| 10.4 mg/kg       | Perros                                   | oral                  | (49) |

\* Dosis de patulina que mata al 50% de los animales de experimentación.

#### 1.4.1 Carcinogenicidad

En los estudios de toxicidad crónica de las micotoxinas se ha dado énfasis a los efectos carcinogénicos, en 1966 Dickens y colaboradores realizaron una evaluación de los compuestos que contienen una estructura lactónica y sus posibles propiedades carcinogénicas, varias micotoxinas entre ellas la patulina indujeron sarcomas locales en ratas por administración subcutánea en un período prolongado de experimentación; la patulina tiene una potencia carcinogénica alta-media como puede observarse en la figura 10 (71).

Por vía oral, en ratones y ratas no se producen cambios carcinogénicos aparentemente porque estos animales son resistentes a la ingestión de la micotoxina (71), en pollos se han inducido lesiones hepáticas por ingestión prolongada de patulina (71).

#### 1.4.2 Mutagenicidad

Las propiedades mutagénicas de la Patulina se han demostrado mediante el uso de microorganismos y cultivos de células de tejidos animales, vegetales y humanos.

La acción mutágena de la patulina se debe a la inactivación o mutación del material genético. Estos efectos se han investigado detalladamente, entre los más notables encontramos que: la patulina inhíbe la división celular, la división nuclear o ambas en bacterias, plantas y cultivo de tejidos (35), principalmente en la mitosis (25); en la mitosis de huevos de salamandra ha causado ruptura cromosomal (6) (71); y alteración de los husos mitóticos (6); inhíbe la síntesis de DNA y RNA, esto se ha demostrado por experimentos con precursores marcados (10) (19), a un nivel de 100 µg/ml inhíbe la síntesis de RNA en un 30% en el núcleo de hepatocitos de rata, este efecto puede explicarse por la inhibición de las enzimas RNA polimerasa I (31% de inhibición), de la RNA polimerasa II (87% de inhibición) y de la RNA hibridasa (62% de inhibición con 50 µg/ml) - -

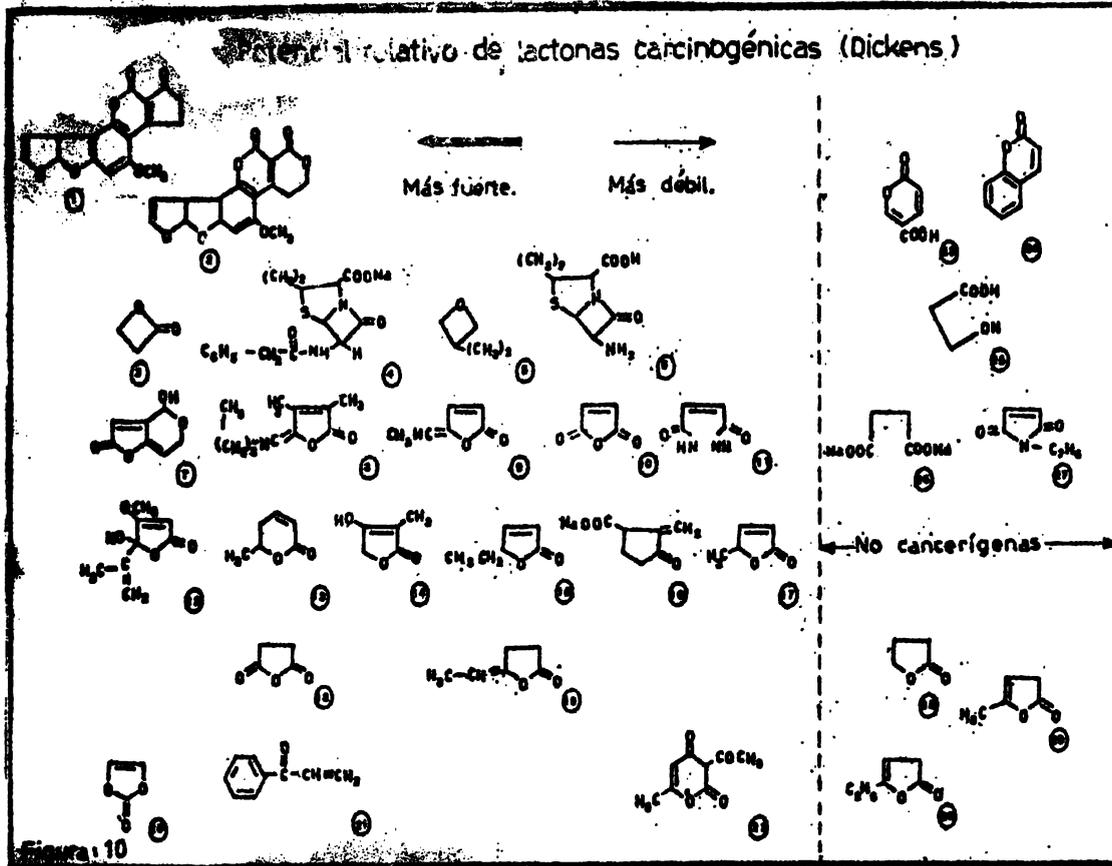


Figura 10

- 1.- Aflatoxina b.
- 2.- Aflatoxina G.
- 3.-  $\beta$  propiolactona
- 4.- Penicilina G.
- 5.- Oxido de  $\beta$ - $\beta$ - dimetil trimetileno
- 6.- Acido 6-amino penicilánico
- 7.- Patulina
- 8.- Bovólido
- 9.- Protoanemonina metílico
- 10.- Anhídrido maleico y derivados  $\alpha$ ,  $\beta$  sustituidos
- 11.- Hidrazina maleica
- 12.- Acido penicílico
- 13.- Acido parasorbico
- 14.- Acido  $\alpha$ -metil- tetrónico
- 15.- Lactona de ácido 2 hexenoico
- 16.- Sarcomicina
- 17.-  $\beta$  Angélica lactona
- 18.- Anhídrido succínico
- 19.- Lactona del ácido 4-hexenoico
- 20.- Carbonato de vinileno
- 21.- Fenil-vinil cetona
- 22.- Acido dehidroacético
- 23.- Ácido cumálico
- 24.- Cumarina
- 25.- Acido  $\beta$  hidroxipropiónico
- 26.- Maleato de sodio
- 27.- N-etil maleimida
- 28.- butirolactona
- 29.-  $\alpha$  Angélica lactona
- 30.- Lactona del ácido 3- hexenoico

NOTA: El potencial carcinogénico está dado por la posición en la tabla, no por la numeración asignada.

Figura : 10

(71), Con esto se afecta el proceso de transcripción en la síntesis de proteínas. También inhibe el paso de elongación, y probablemente el paso de iniciación en el proceso de transcripción de la síntesis de proteínas en células de Hela y de Chang de hígado humano y en lisado de reticulitos de conejo (19). Se ha observado la inhibición de la síntesis de -- proteínas en vivo, aunque este efecto puede deberse al impedimento del transporte de aminoácidos a través de la membrana, que produce la patulina (19). Otro efecto de la micotoxina es la inducción de un alto porcentaje de células poliploides de leucocitos humanos cuando se exponen a niveles de - - 0.54  $\mu\text{g/ml}$  (71).

En forma general, los efectos tóxicos y mutagénicos de la patulina varían con la fase del ciclo de crecimiento de las células tratadas (35).

#### 1.4.3 Teratogenicidad

Otro de los efectos tóxicos que puede ejercer la patulina es la teratogenicidad; son pocas las micotoxinas que han demostrado ser teratogénicas: las aflatoxinas, ocratoxina, rubratoxinas, patulina (4) y citrinina (5).

El principal indicador biológico empleado para demostrar esta propiedad ha sido el embrión de pollo en distintas etapas de incubación. Los efectos teratogénicos se presentan primero en los huevos incubados por 4 días, que en los no incubados, la dosis para producir anomalías es menor, para los embriones de 4 días (1-2  $\mu\text{g/huevo}$ ) que para los no incubados (10  $\mu\text{g/huevo}$ ). El porcentaje de embriones que muestran efectos teratogénicos es alto (47% de los sobrevivientes; índice de supervivencia 64%) a un nivel de 1  $\mu\text{g/huevo}$ . Los efectos observados son variados pero predominan el pie deforme, el tobillo volteado, los embriones son más pequeños que el testigo (1:1.9) en casos aislados se presentan exencefalia, exoftalmia y picos cruzados deformes (4).

No se han observado efectos teratogénicos marcados - por ingestión de patulina, salvo algunos casos de disminución de tamaño en la generación subsiguiente en ratas alimentadas con alimentos adicionados de patulina ( 6 ) ( 13 ).

#### 1.4.4 Propiedades Antibióticas

Las propiedades antibióticas de la patulina fueron las que condujeron a su descubrimiento (44). Es un antibiótico potente que afecta a todo tipo de bacterias independientemente de su reacción a la tinción de Gram, así como algunos hongos. Su principal efecto radica en la inhibición de la respiración aerobia. Su toxicidad es mas notable a los microorganismos en la fase exponencial de crecimiento (35).

A sus propiedades antibióticas se deben probablemente algunos de los efectos tóxicos encontrados en la administración oral de la patulina a ratas, como se discutirá posteriormente ( 6 ). (Pag. 42 ).

#### 1.4.5 Fitotoxicidad

Se ha sugerido que la patulina juega un papel importante durante la acción patógena de Penicillium expansum en las frutas que infecta (61). Así como la filostina, precursor de la patulina (pág.22), tiene propiedades fitotóxicas que provocan marchitamiento de las hojas de trébol cuando lo infecta Phyllosticta spp (59), la patulina ha mostrado su fitotoxicidad en replante de manzanas y en el crecimiento de trigo. (61).

#### 1.4.6 Otros efectos metabólicos y fisiológicos.

La patulina causa la inhibición de numerosas enzimas, - in vitro e in vivo, entre ellas la adenosin trifosfatasa de eritrocitos humanos (14). Otras enzimas afectadas son : - -

La adenosin trifosfatasa  $Mg^{++}$  dependiente  $Na^+ K^+$  estimulada de cerebro de ratón, riñón e hígado in vitro, (43), la aldolasa y la deshidrogenasa láctica de músculo de conejo (43), la deshidrogenasa alcohólica de levadura, la deshidrogenasa succínica, la carboxilasa, la oxidasa de NADP - (14), la transaminasa sérica del ac. glutámico-oxálalacetato de ratas (vía oral) (14), y enzimas de la respiración aerobia (35).

Los valores de  $LD_{50}$  (concentración de patulina requerida para disminuir en 50% la actividad enzimática) se presentan en la tabla 6.

Asimismo afecta algunos procesos celulares a nivel de membrana como la absorción de glicina en reticulocitos, presumiblemente por unión de la micotoxina con el centro de enlace de la glicina en las membranas del reticulocito (71); al transporte de aminoácidos a través de la membrana (19) y la absorción del potasio en eritrocitos humanos (43).

En pruebas de contacto con patulina se producen edemas internos y una capa keroidea en el sitio de reacción en tejido dérmico de hombre y de conejo (71).

Las ratas inyectadas con patulina subcutánea o intraperitonealmente sufren de edema pulmonar, hemorragia interna y congestión de capilares de hígado, bazo y riñones, elevación de la glucosa sanguínea, edema y degeneración de la corteza cerebral y reducción de la cuenta de linfocitos (43) (14), en ratones produce síntomas nerviosos, hemorragia cerebral y muerte (43), así como la producción de tumores en el sitio de aplicación (14, 71).

Al administrar oralmente patulina a pollos se observó el siguiente patrón tóxico: apatía después de una hora de la administración, a las doce horas, se presente acumulación de fluido en la cavidad peritoneal y el buche acuoso, en el período entre 16 y 48 hras., se encontró intensa hemorragia



en el tracto digestivo, particularmente en proventrículo, -  
molleja e intestino (29).

Cuando se administra oralmente la patulina (1.5 mg/Kg) a ratas se produce distensión gaseosa a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (6, 27) se observa un marcado efecto antidiurético (71), pérdida de peso proporcional a la dosis ingerida y disminución del índice de preñez (6).

Se ha estudiado el destino de la patulina en ratas alimentadas con la micotoxina marcada con carbono 14 y a las 24 horas siguientes a la ingestión se excreta el 35% de la radioactividad en orina y heces, un 1-2% se elimina como  $\text{CO}_2$ , de 2-3% permanece en los tejidos y en la sangre por más de 7 días.

El principal sitio de retención y persistencia de la radioactividad son los eritrocitos, como consecuencia el hígado, el bazo, el riñón y los pulmones son posibles sitios de acumulación. No se detectó patulina intacta en la orina o heces, por lo que es posible que la radioactividad detectada en los eritrocitos se deba a fragmentos metabólicos o a metabolitos conjugados a componentes celulares (7).

Los síntomas en perros después de una dosis oral de 100 mg/Kg de peso son, letargia, anorexia, hematemesis, diarrea, hemorragia pulmonar, edema y hemorragias luminales del tracto gastro-intestinal. Las dosis subletales no afectan drásticamente a los pulmones (48, 49).

En primates la administración oral de patulina produce una disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina sérica, proporcional a la dosis, se observa un rechazo de la comida adicionada de patulina a niveles de 5mg/Kg que puede deberse a que los monos (Macaça nemestrina) reconocen el sabor de la patulina y lo asocian con una tensión física o un sabor desagradable (14).

## Tabla 6

Valores de  $ID_{50}^*$  de patulina para algunas enzimas y procesos celulares:

| $ID_{50}$              | Enzima o proceso celular afectados.   | Ref. |
|------------------------|---|------|
| $3.6 \times 10^{-4}$ M | Translación (síntesis de proteínas) en reticulocitos de conejo.                 | (19) |
| $1.3 \times 10^{-3}$ M | Transcripción (síntesis de proteínas) en reticulocitos de conejo.               | (19) |
| $2. \times 10^{-4}$ M  | Transporte de aminoácidos a través de membrana                                  | (19) |
| $1 \times 10^{-5}$ M   | Translación y transcripción en células Hela                                     | (19) |
| $1.7 \times 10^{-5}$ M | Síntesis de proteínas (40% de inhibición) en células de Chang de hígado humano. | (19) |
| $6. \times 10^{-6}$ M  | Replicación en células Hela   | (19) |
| $1.7 \times 10^{-5}$ M | Síntesis de RNA (60% de inhibición) en células de Chang de hígado humano.       | (19) |
| $2 \times 10^{-4}$ M   | Absorción de glicina $Na^+$ dependiente en reticulocitos de pollo.              | (71) |
| $3 \times 10^{-4}$ M   | Adenosintrifosfatasa $Na^+$ , $K^+$ dependiente de cerebro de ratón.            | (43) |
| $1.3 \times 10^{-5}$ M | Aldolasa de músculo de conejo.  | (71) |

\* Concentración de patulina necesaria para inhibir la actividad enzimática o proceso celular en un 50%.

#### 1.4.7 Mecanismo de acción de la patulina

Existen varias hipótesis sobre el modo de acción de la patulina. Varios grupos de investigadores han propuesto que la patulina reacciona químicamente en los grupos sulfhidrilo de los sistemas enzimáticos o metabólicos vitales. El proceso involucra una adición tipo Michael ya especificada en la sección 1.4.2, observaciones posteriores han demostrado que la patulina reacciona muy lentamente con la cisteína y que -- la reacción requiere altas concentraciones, esto parece contradecir esta proposición.

Además se ha encontrado que no ocurre reacción entre la patulina y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa que tiene grupos SH en su centro activo (46, 4, 19) . Sin embargo parece ser la explicación mas congruente del efecto de la patulina sobre las enzimas y otros procesos celulares.

Con los estudios de la ruta metabólica que sigue la patulina en ratas (7), se encontró que no había excreción de patulina intacta, por tanto se postuló que cualquier efecto tóxico encontrado en animales después de la administración oral de la micotoxina puede deberse a algún(os) producto(s) biotransformado( s) aún sin identificar.

Algunos investigadores han propuesto que la patulina se transforma en solución en el agente tóxico verdadero (46), pero no se ha probado tal hecho.

Por otro lado, el efecto antibiótico de la micotoxina sobre la flora gastrointestinal normal puede provocar un sobrecrecimiento de las bacterias productoras de gas en el intestino, lo cual explicaría el problema de distensión gaseosa del tracto gastrointestinal en la administración oral de la patulina en ratas (6).

El efecto biológico de la patulina puede modificarse en función de la especie (tabla 5) y de la acción sinérgica de otras micotoxinas especialmente la citrinina y el ácido penicílico (48) que pueden producirse a la vez en manzanas infectadas con Penicillium expansum (5).

## CAPITULO II

## 2.- Procedimiento general para el análisis de micotoxinas.

Las micotoxinas tienen una serie de propiedades que causan graves implicaciones en los aspectos nutricional y económico, esto ha promovido el desarrollo de métodos sensibles y precisos para su determinación en alimentos humanos y animales.

En general se han desarrollado dos tipos básicos de pruebas para detección de micotoxinas:

Pruebas biológicas

Pruebas químicas

Todos los procedimientos químicos empleados para el análisis de micotoxinas se componen de los mismos pasos básicos. El primer paso es la remoción de la toxina del alimento por extracción con solventes, desafortunadamente los disolventes solubilizan otras sustancias que pueden interferir con la detección del tóxico, por lo que es necesario separar la sustancia deseada lo mas posible de las interferentes y finalmente separar y medir por una técnica adecuada, generalmente cromatografía, los niveles de toxina. - En resumen los pasos a seguir son:

Extracción

Limpieza

Separación y detección

Cuantificación

En las pruebas químicas se encuentran una serie de factores que los complican:

a) Las micotoxinas se encuentran en diferentes productos necesitando un procedimiento de extracción especial. Un procedimiento de extracción adecuado para un producto puede ser inadecuado para otro.

- b) La cantidad de toxina es pequeña.
- c) La distribución en productos naturales es irregular
- d) Las pruebas son inespecíficas y requieren pruebas - confirmativas posteriores.

Los métodos usados en el análisis de micotoxinas en alimentos pueden clasificarse en tres categorías.

Métodos de visualización: procedimientos rápidos de localización y visualización de las micotoxinas en alimentos.

Métodos presuntivos: procedimientos para identificar y cuantificar los niveles de toxina en el alimento.

Métodos confirmativos: pruebas para identificar la toxina.

Esta clasificación es ampliamente recomendada por la Comisión del Codex Alimentarius (11) (63).

Para reproducir con exactitud los resultados se llevan a cabo comparaciones de métodos y estudios colaborativos para desarrollar otros nuevos y mejores ( 57, 56 ).

## 2.1 Extracción

Antes de realizar cualquier paso es sumamente importante llevar a cabo la preparación de la muestra, que consiste en tomar una muestra representativa, pesarla o medir el volumen y homogenizarla. Esta es una etapa crítica sobre todo en este tipo de muestras de origen biológico.

(Todas las manipulaciones deben efectuarse cuidadosamente).

Una vez preparada la muestra, se debe emplear el procedimiento de extracción que proporcione el mayor rendimiento de micotoxina extraída (50).

Existen muchos procedimientos de extracción que han sido diseñados para una micotoxina o muestra específica.

En el caso de la Patulina se utiliza como disolvente de extracción el acetato de etilo en casi todos los métodos reportados y es el que se usa en el método oficial de la AOAC (20) para jugos de manzana.

Este procedimiento de extracción se basó en la Ley de distribución de Nernst, que establece que una substancia se distribuye entre dos solventes inmiscibles hasta que en el equilibrio se alcanza una relación constante de las actividades de la substancia en los dos solventes, a una temperatura dada. Cuando se trabaja con soluciones diluidas, como en éste caso, la actividad es prácticamente igual a la concentración. La relación constante se puede expresar entonces como:

$$K = \frac{C_B}{C_A}$$

La constante  $K$  se llama coeficiente de distribución o de reparto  $C_B$  y  $C_A$  son las concentraciones del soluto en el solvente A y en el B respectivamente. Esta relación es válida para soluciones diluidas,  $K$  depende de la naturaleza del soluto y de los líquidos utilizados, la temperatura y otros factores como la disociación, asociación o reacción de las moléculas en la solución.

Cuando una substancia se distribuye entre dos solventes sin complicaciones de asociación y disociación o reacción, es posible calcular el peso que se remueve en una serie de extracciones. Así después de  $n$  extracciones, el peso  $W_n$ , del soluto que permanece sin extraer es:

$$W_n = W \left( \frac{K V_1}{K V_1 + V_2} \right)^n$$

$W$ : peso del soluto en solución en el líquido

$V_1$ : volúmen de solución

$V_2$ : volúmen de solvente de extracción

$K$ : coeficiente de reparto =  $\frac{C_B}{C_A}$

Por tanto el peso extraído  $W_e$  es:

$$W_e = W \left( 1 - \left[ \frac{K V_1}{K V_1 + V_2} \right]^n \right)$$

De aquí podemos visualizar que para obtener una alta eficiencia de extracción es conveniente realizar cierto número  $N$  de extracciones separadas en vez de usar todo el solvente en una sola operación.

O sea, la eficiencia máxima de extracción se logra manteniendo valores pequeños de  $V_2$  y grandes de  $N$  (dentro de valores prácticos) (37).

## 2.2 Limpieza

El disolvente orgánico extrae a la micotoxina y usualmente deja atrás sustancias como las proteínas, aminoácidos y carbohidratos, que son pocos solubles en la fase orgánica.

Sin embargo, existen aún muchos compuestos que se disuelven y extraen junto con el compuesto de interés, en general entre estos compuestos se encuentran los lípidos, pigmentos y una amplia gama de sustancias polares y no polares.

Por consiguiente, para evitar interferencias en los pasos subsiguientes, se efectúa un paso de limpieza del extracto, que elimina las interferencias y concentra el compuesto deseado.

El proceso de Limpieza puede ser de tres tipos:

- a) Partición del extracto entre un disolvente no polar y uno polar, tratando que la sustancia de interés quede en la fase polar y en la no polar se eliminan lípidos principalmente.
- b) Cromatografía líquida o de capa fina con ácido sílico (sílica gel), Florisil o carbón activado.
- c) Saponificación del extracto, los triglicéridos y ácidos grasos se transforman en jabones solubles en agua y se eliminan por lavado, este método solo funciona -

si la micotoxina es estable a pH alcalino (50). Los dos primeros tipos son los más empleados.

La limpieza depende mucho de la técnica de separación que se va a seguir posteriormente, la cromatografía de gases requiere de procesos muy detallados de limpieza, en -- cambio la cromatografía de líquidos de alta presión puede incluso prescindir de este paso; algunos fluidos biológicos complejos, por ejemplo la orina, pueden ser separados con gran resolución en una columna de un cromatógrafo de líquidos de alta presión (51).

### 2.3 Separación y detección

Generalmente se efectúan estos dos pasos en conjunto. Las técnicas cromatográficas: cromatografía de capa fina -- (CCF), cromatografía líquida (CL), y cromatografía de gases (CG), son las más utilizadas para efectuar la separación de las micotoxinas de los extractos sometidos al proceso de -- limpieza; para la detección se usan algunas de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia en cuestión: absorción en la región del ultravioleta o del visible, fluorescencia, índice de refracción, etc.

La cromatografía en capa fina es una técnica barata pero de poca resolución y difícil de realizar cuantitativamente aunque pueden llevarse a cabo muchos análisis en la misma placa.

La cromatografía de gases requiere de una considerable limpieza del extracto para prevenir interferencias de otras sustancias. Aunque algunas interferencias pueden eliminarse usando sistemas de detección específicos, invariablemente se requiere una purificación pre-analítica. El principal requisito de los compuestos a analizar es su volatilidad ya sea del compuesto mismo y/o de alguno de los derivados químicos. Los métodos de cromatografía de gases no se pueden aplicar al análisis de sustancias altamente polares o de --

peso molecular alto (51).

La cromatografía de líquidos es un proceso muy lento que puede durar días y aún semanas, sin embargo la reciente implementación de altas presiones para acelerar esta técnica a dado lugar a la cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP), (51).

En este método se usan columnas de diámetro muy reducido por ejemplo 2 mm, rellenas de materiales especiales pulverulentos, cuyas partículas tienen tamaños de 30-40  $\mu\text{m}$ , y en ocasiones hasta de 15  $\mu\text{m}$ , que son muy eficaces pero que requieren de una alta presión (hasta 400 atm) para permitir un flujo razonable a través de la columna (9): figura 11.

En general puede decirse que la CLAP y la CG con técnicas complementarias mas que competitivas (51, 9).

#### 2.4 Cuantificación

El proceso de cuantificación consta de tres etapas básicas:

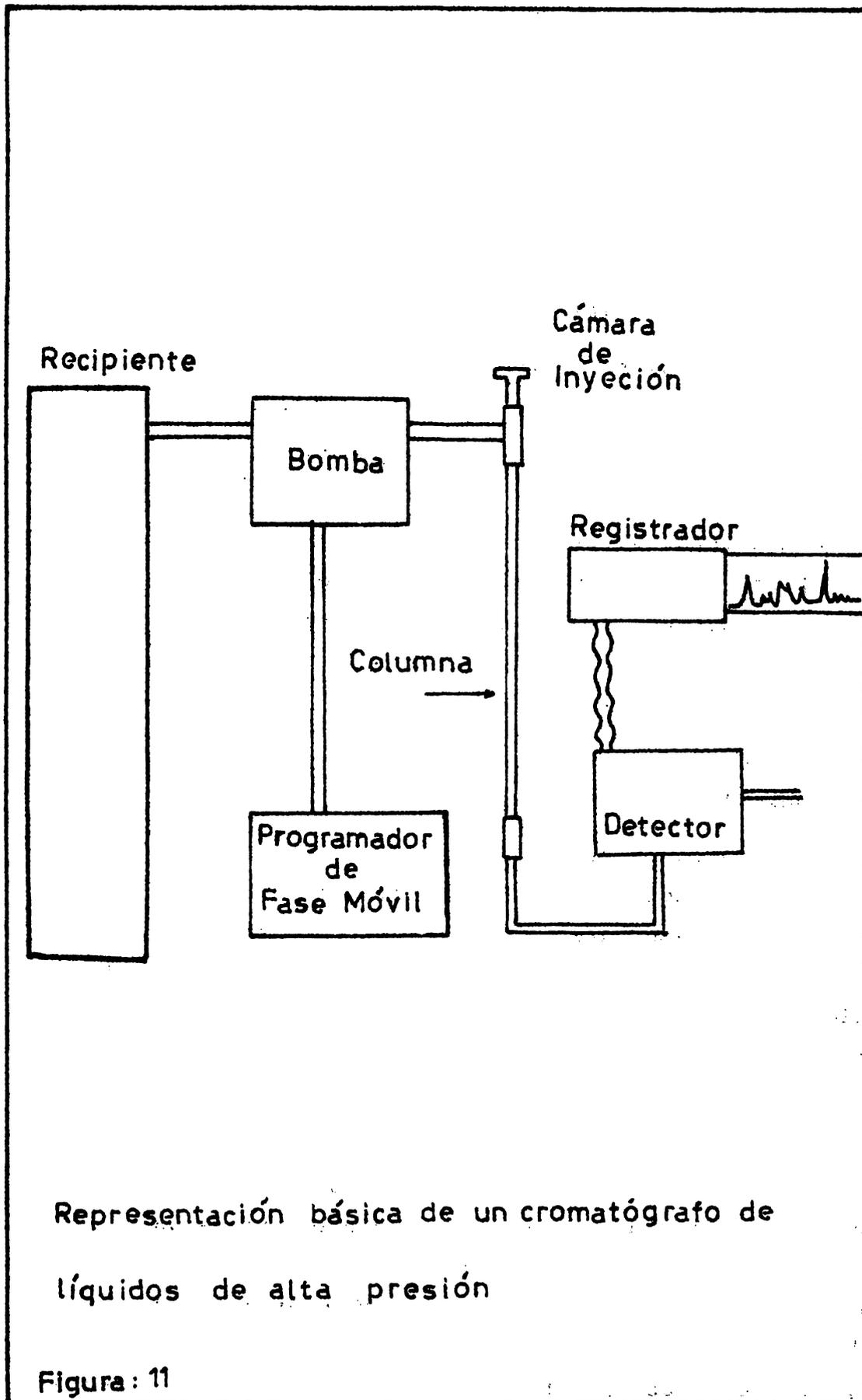
Integración de las señales (medición física)

Cálculos de composición (conversión de la señal a -- composición).

Interpretación estadística

La integración de las señales se lleva a cabo por diversas técnicas que varían en complejidad y exactitud. El propósito de esta etapa es transformar la intensidad de -- las señales emitidas por el detector en medidas que pueden relacionarse con la cantidad de muestra, las señales obtenidas en la mayoría de los detectores aparecen en el registrador como picos de forma aproximadamente gaussiana cuya altura y área se utilizan como una medida de tipo cuantitativo.

Existen diferentes técnicas manuales e instrumentales para integrar las áreas de los picos:



Altura del pico  
 Altura por el ancho de la mitad de la altura.  
 Triangulación  
 Cortar y pesar  
 Planímetro  
 Integrador de disco  
 Integradores electrónicos  
 Sistemas de computación

La conversión de la señal a composición se lleva a cabo por alguno de los siguientes métodos:

- a) Normalización de áreas: relación de las áreas obtenidas con el % de composición de la mezcla.
- b) Calibración externa: uso de curvas de calibración.
- c) Uso de un patrón interno: uso de sustancias (de concentración conocida) adicionadas a la muestra cromatográfica.

Por último, se puede hacer un análisis estadístico de los datos obtenidos para determinar su confiabilidad (68) - (9) Anexo 1.

## 2.5 Métodos confirmativos

Una vez identificada y cuantificada la toxina por cromatografía es necesario confirmar su presencia, esto se debe a que la cromatografía es en esencia una técnica de separación y no de identificación, es útil la información obtenida de esta técnica, pero en general siempre se requiere de alguna técnica no cromatográfica para efectuar la identificación de un compuesto determinado.

Hay algunas técnicas y parámetros puramente cromatográficos que en muchas ocasiones, pueden servir de guía o de aproximación a la identificación de un compuesto, pero no son confiables en grado absoluto, entre estas están las medidas de retención: tiempo de retención, volumen de retención; la comparación entre diferentes columnas y la compara-

ción de las respuestas en diversos detectores.

La única manera de identificar una substancia con alto grado de seguridad es utilizando alguna técnica auxiliar, - como por ejemplo: la espectrometría de Masas, la resonancia magnético nuclear etc, o utilizando las reacciones químicas de algunos grupos funcionales. Cuando la substancia posee actividad biológica es posible combinar las pruebas biológicas con las químicas (33).

## CAPITULO III

## 3 Parte experimental

## 3.1 Materiales

## 3.1.1 Reactivos

## 3.1.1.1 Estándar de patulina

Patulina grado analítico producida por Calbiochem Lote No. 602023, punto de fusión 109-110°C, cromatográficamente uniforme.

Cloroformo grado plaguicida

Etanol absoluto grado reactivo

$K_2Cr_2O_7$  grado reactivo

$H_2SO_4$  0.018N

## 3.1.1.2 Extracción

Acetato de etilo grado reactivo

## 3.1.1.3 Limpieza

Solución de  $Na_2CO_3$  al 20% (w/v)

Sílica gel (40-140 mallas) para cromatografía en columna.

Tolueno grado reactivo

Acetato de etilo grado reactivo } (75:25)

Sulfato de sodio anhidro grado reactivo

Nitrógeno (gas a presión)

## 3.1.1.4 Separación y detección

## 3.1.1.4.1 Disolventes para residuo de extracto

Metanol absoluto grado Photrex

Acetato de etilo grado reactivo } (90:10)

### 3.1.1.4.2 Disolventes para cromatografía de líquidos de alta presión:

Agua tridestilada (en vidrio)  
 Metanol absoluto grado Photrex  
 Acetonitrilo grado HPLC

### 3.1.1.5 Confirmación

#### 3.1.1.5.1 Cromatografía en capa fina

Placas de 20 x 20 cm de aluminio precubiertas con sílica gel 60/tierra silicea F<sub>254</sub>, espesor 0.20 mm.

Benceno grado reactivo  
 Metanol absoluto grado reactivo  
 Acido acético glacial  
 Clorhidrato de fenilhidrazina grado reactivo  
 NH<sub>4</sub> OH grado reactivo

#### 3.1.1.5.2 Análisis microbiológico

Caldo triptona extracto de levadura glucosa (TYG)

Triptona 5 g

Extracto de levadura 2.5 g

glucosa 1 g

H<sub>2</sub>O destilada c.b.p 1 lt

pH 7.1

Esterilizado a 121°C

15 min.

Agar TYG

Idéntica composición al caldo TYG adicionando 1% de agar.

Bacillus megaterium: cultivo de 24 hrs en agar nutritivo a 37°C

Solución salina estéril: NaCl al 0.9% (w/v)

Discos de papel filtro Whatman 2 de 0.6 mm de diámetro.

### 3.1.1.6 Aislamiento e identificación de Penicillium expansum.

#### - Agar Czapek-extracto de levadura (CYA)

|                       |         |  |
|-----------------------|---------|--|
| $K_2HPO_4$            | 1.0 g   |  |
| concentrado de Czapek | 10 ml   |  |
| extracto de levadura  | 5 g     |  |
| sacarosa              | 30 g    |  |
| agar                  | 15 g    |  |
| agua                  | 1000 ml |  |

#### - Concentrado Czapek

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| $NaNO_3$              | 30 g   |
| KCl                   | 5 g    |
| $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ | 5 g    |
| $Fe SO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.1 g  |
| agua                  | 100 ml |

#### - Agar extracto de malta (MEA)

|                            |      |      |         |
|----------------------------|------|------|---------|
| Extracto de malta en polvo | 20 g | agar | 15 g    |
| Peptona                    | 1 g  | agua | 1000 ml |
| D (+) glucosa              | 20 g |      |         |

### 3.1.1.7 Producción de patulina en medio de cultivo.

#### Caldo papa dextrosa

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Extracto de papa       | 500 ml  |
| glucosa                | 20 g    |
| $H_2O$ destilada c b p | 1000 ml |

Esterilizar a 121°C por 30-40 min.

#### Extracto de papa

Calentar a 121°C por 30 min 200 g de papas en 500 ml de agua.

- Agar nitrato 25% de glicerol (G25N)

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| $K_2HPO_4$               | 0.75 g |
| concentrado Czapek       | 75 ml  |
| extracto de levadura     | 3.7 g  |
| glicerol grado analítico | 250 g  |
| agar                     | 12 g   |
| agua                     | 750 ml |

### 3.1.1.8 Muestras

Jugos y néctares de manzana y Néctares de pera de las principales marcas comerciales expandidas en la Ciudad de México.

### 3.1.2 Aparatos

#### 3.1.2.1 Extracción

Agitador mecánico "Burrell" modelo 75 (Burrell corporation Pittsburgh P.A. U.S.A.)

Centrifuga "DYNAC" (Clay Adams Co. N.J U.S.A. para 8 tubos).

Centrífuga a prueba de explosión "Damon / IEC" modelo Exa. (International Equipment Co. Boston M. U.S.A.)

Agitador vibratorio "MAXI MIX" (Thermolyne Sybron Corp. Iowa U.S.A.)

#### 3.1.2.2 Limpieza

Columnas cromatográficas de 23 mm x 300 mm con llave de teflón

Rotavapor Buchii modelo R. (Brinkmann instruments N.Y. U.S.A.) con baño de agua integrado.

### 3.1.2.3 Separación y detección

Cromatógrafo de líquidos Varian modelo 5000 (Varian - - Associates Inc. California U.S.A.) equipado con inyector de circuito de 10  $\mu$ l de alta presión, con una columna de fase reversa Micropak MCH-10 (sílica gel de 10  $\mu$  de diámetro unida a una capa monomérica de octadecil silano) de 30 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno.

Detector "Vari-chrom" Varian (Varian associates Inc. - California USA) de longitud de onda variable de 200-720 nm.

Registrador Varian modelo 9176

Microjeringa de punta plana de 100  $\mu$ l "Glenco" (Glenco scientific inc. Texas U.S.A.)

Espectrofotómetro de UV Pye Unicam SP 1800 con celdas de 1 cm de espesor, con registrador Unicam AR 25 (Pye Unicam Ltd. Cambridge Inglaterra.)

### 3.1.2.4 Confirmación

Cámara de cromatografía 9 x 20 x 20 cm (Desaga Heidelberg Alemania) para cromatografía en capa fina.

Lámpara de ultravioleta UVSL-25 254 nm/366 nm - (Ultra-violet products Inc. San Gabriel California U.S.A)

Material de vidrio de uso común en el laboratorio.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparación de solución patrón de patulina.

Se disolvieron 10 mg de patulina en 10 ml de cloroformo grado plaguicida, y se verificó la concentración de la solución en un espectrofotómetro pye Unicam a 276 nm .

(20). De esta solución se tomaron partes alícuotas, que se evaporaron a sequedad en baño de agua a 45°C bajo corriente

de nitrógeno, se disolvieron inmediatamente en el volúmen correspondiente para obtener soluciones de diferente concentración, misma que se comprobó por el método oficial ya citado.

### 3.2.2. Optimización de la separación y detección

El método de separación escogido fue la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión; y el de detección, la absorción en la región del ultravioleta a la  $\lambda$  máx de la patulina (277 nm).

La optimización se efectuó inyectando soluciones de patulina estándar en metanol-acetato de etilo 90:10, y variando algunos parámetros, principalmente del detector y registrador hasta obtener la mejor señal. Las condiciones optimizadas fueron:

- a) Cromatógrafo de líquidos Varian modelo 5000  
Líquido acarreador: H<sub>2</sub>O tridestilada 1ml/min.  
Columna: Micropak MCH-10  
Temperatura: 25°C  
Volúmen de inyección: 10  $\mu$ l
- b) Detector Vari-chrom  
Fuente de luz: lámpara de arco de deuterio  
Longitud de onda: 277 nm  
Celdas: 8  $\mu$ l  
Sensibilidad: normalmente 0.01 aufs, ocasionalmente 0.005 ó 0.02 aufs. (aufs: escala total de las unidades de absorbancia).  
Anchura de la banda espectral: 8 nm  
Tiempo de respuesta: lenta ( 2.0 seg).
- c) Registrador Varian modelo 9176: velocidad de carta 0.25 cm/min.  
Período de estabilización del equipo al encendido: 1 hora. Lavado de columna con metanol por 15 min a

a 1ml/min al finalizar las labores diarias.

Estas condiciones se siguieron a lo largo de la investigación.

### 3.2.3 Curva patrón de patulina

La conversión de la señal obtenida en el registrador a composición se efectuó por calibración externa.

Con las condiciones de separación y detección optimizadas se construyó una curva patrón de patulina, utilizando - soluciones de patulina en metanol: acetato de etilo 90:10 - (67), de 10, 8, 6, 4, 2, 1 y 0.5 µg/ml inyectando por triplicado 10 µl de cada solución. La preparación de las soluciones se hizo como se explica en la sección 3.2.1. Esta curva patrón se repitió durante el transcurso de la determinación para checar la eficiencia de la columna.

### 3.2.4 Integración de las señales

La integración de las señales obtenidas en el registrador (picos cromatográficos) se efectuó calculando el área - bajo el pico por la técnica manual de multiplicar la altura por el ancho a la mitad de la altura, como se muestra en la figura 12.

### 3.2.5 Interpretación estadística

La interpretación estadística de los datos para la curva de calibración y de los resultados, se efectuó de acuerdo a Haubaux y Vos (21), Bailey, Cox y Springer (2) y Hunter (23) (ver anexo 1). Con estos métodos se determinó la línea de calibración ajustada, el límite de detección de la técnica cromatográfica así como los intervalos de confianza de los resultados.

### 3.2.6 Monitoreo de las muestras analizadas

Se recolectaron al azar néctares de manzana, de pera y jugos de manzana de 5,2 y 4 de las principales marcas - comerciales respectivamente del país, en centros de auto-servicio de diferentes puntos de la ciudad de México, durante los meses de abril y mayo de 1981. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

### 3.2.7 Análisis cualitativo.

El análisis cualitativo de la patulina se efectuó por comparación con el tiempo de retención de la solución estándar de patulina sola o adicionada a un néctar o jugo y extraída por el procedimiento indicado en la sección 3.2.8. El tiempo de retención se determinó como tiempo de retención absoluto (tra): Se midió la distancia entre el punto de inyección y el máximo del pico y se correlacionó con la velocidad de la carta para determinar el tiempo de retención.

### 3.2.8 Análisis cuantitativo

#### 3.2.8.1 Extracción, limpieza, separación y detección.

Se utilizó la técnica de Möller y Josefsson (38) con algunas modificaciones.

Se tomaron 5 ml de muestra (jugo o néctar) inmediatamente después de abrir el recipiente, se colocaron en un embudo de separación de 125 ml con llave de teflón, se extrajeron con 5 ml de acetato de etilo con ayuda de un agitador mecánico por 2 minutos, se transfirieron el jugo extraído y el acetato de etilo a un tubo de centrifuga de fondo cónico, se centrifugó por dos minutos a 2000 r.p.m., se separó la fase superior con ayuda de una pipeta pasteur, - este proceso se llevó a cabo 2 veces más, los tres extrac-

tos se unieron. Los extractos orgánicos se extrajeron -- con 3ml de agua adicionada de 250 ul de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% w/v durante 2 minutos con ayuda de un agitador mecánico, se dejó reposar y se separó la fase superior -- evitando el mezclado con la fase inferior; la fase inferior se extrajo con 5ml de acetato de etilo durante 2 minutos. Las fases superiores se reunieron y secaron con 2 gramos de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro por 10 min, rompiendo los grumos que se formaron inicialmente con una varilla de vidrio. - Se transfirió por decantación el extracto seco a un matraz redondo de boca esmerilada, se enjuagó el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  con 2 porciones de 2ml de acetato de etilo que se unen al extracto seco. Se evaporó la fase orgánica en un rotavapor a 45°C casi a sequedad (2-3ml). Se transfirió el residuo a un tubo de fondo cónico Kontes graduado, con ayuda de 3 porciones de 1ml de acetato de etilo, se evaporó a sequedad a 45°C bajo corriente de nitrógeno, el residuo se disolvió inmediatamente en 100 ul de acetato de etilo-metanol (10:90) (según recomendación de Stray (67)), se agitó perfectamente en agitador vibratorio por  $\frac{1}{2}$  minuto, se -- centrifugó a 2500 r.p.m. por 2 minutos, se verificó el volúmen inicial y se inyectaron 10 ul de esta solución en el cromatógrafo de líquidos. Se utilizaron las condiciones optimizadas (sección 3.2.2).

Los resultados obtenidos se interpolaron en la curva de calibración construída según la sección 3.2.8.3 y se sometieron al tratamiento estadístico ahí mencionado.

Todo el material se lavó con agua y jabón, se enjuagó con abundante agua destilada y después con acetato de etilo, se secó al aire antes de usarlo.

### 3.2.8.2 Porcentaje de recuperación

Para determinar el porcentaje (%) de recuperación de la técnica descrita en la sección 3.2.8.1, se tomaron jugos o néctares sin contaminación detectable de patulina y

se adicionaron con solución estándar de patulina (50  $\mu$ l - de solución de 4  $\mu$ g/ml), y se sometieron a todo el procedimiento de cuantificación por duplicado; se repitió este procedimiento alternadamente a lo largo de todo el experimento.

### 3.2.8.3 Límite de detección e intervalo de confianza.

Para conocer el límite de detección de la técnica, - se utilizó el procedimiento descrito por Hubaux y Vox -- (21), incrementando el número de estándares, el rango de las concentraciones de estos estándares y la distribución de las concentraciones dentro del rango escogido.

Se prepararon soluciones estándar de patulina (según la sección 3.2.1) en acetato de etilo-metanol (10:90) - de diferentes concentraciones: 9 soluciones de concentración baja (aproximadamente 0.5  $\mu$ g/ml), 2 soluciones de -- concentración media (1-2  $\mu$ g/ml), y otra solución de con-- centración alta (6  $\mu$ g/ml), se midieron las áreas bajo la curva como se describe en la sección 3.2.4 y se graficaron contra la concentración para construir una línea recta que se sometió al tratamiento estadístico descrito por Hunter (23) y Hubaux y Vox (21). Los intervalos de confianza se calcularon también de acuerdo a estos métodos.

### 3.2.9. Métodos confirmativos

Para la técnica cromatográfica en capa fina se siguió el método de Sommer y col. (61): Se utilizaron placas precubiertas de sílica gel 60F 254 activadas por 1 hora a - - 110°C, el eluyente fué: benceno-metanol-ácido acético glacial (90: 5:5 v/v/v), la patulina se localizó por comparación visual del valor de R<sub>f</sub> con una solución estándar; para la detección de las manchas se empleó luz ultravioleta de onda corta (254 nm). Subsecuentemente se roció la placa de NH<sub>4</sub> OH al 3% (v/v) y después con una solución acuosa de clorhidrato de - Fenilhidrazina al 4% (w/v) y se calentó a 110°C por 2-3 min.

Los extractos de muestras se obtuvieron por el método oficial de la AOAC (20) usando 50 ml de jugo o néctar y la limpieza en columna. Este procedimiento se repitió a lo largo del experimento.

### 3.2.9.2 Método microbiológico

Se utilizó la técnica descrita por Stoot y Bullerman - (05), empleando una cepa de Bacillus megaterium proporcionada por el cepario de la Facultad de Química de la UNAM.

Se prepararon soluciones estandar de patulina en acetato de etilo-metanol (10:90) de 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15, y 20 µg/ - 10 µl.

Se checó su concentración según la sección 3.2.1. Se colocaron 20 µl de cada solución en discos de papel Whatman # 3 de 6 mm de diámetro esterilizados bajo luz ultravioleta y se colocaron en la superficie de cajas petri conteniendo Agar TYG inoculadas con Bacillus megaterium (0.2 ml de un cultivo en caldo TYG con 70% de transmitancia a 520 nm) - como se muestra en la figura 13.

Se incubaron por 15 horas a 37°C y se midió el diámetro del halo de inhibición, se restó el diámetro del disco (6mm) y se graficó concentración contra halo de inhibición para tener una curva de calibración. La curva se ajustó, se obtuvo su límite de detección y los intervalos de confianza por el método de Hunter (23). Paralelamente se extrajeron jugos y néctares contaminados mediante el método de Möller y Josefsson (38) utilizando 50 ml de muestra, se colocaron 20 µl del extracto en los discos, se distribuyeron e incubaron como los estandares en cajas petri; y se observó la presencia de halo de inhibición midiéndose su diámetro para interpolarlo en la curva de calibración. Todas las determinaciones tanto de estandares como de muestras se hicieron por cuadruplicado. Este procedimiento se repitió a lo largo del experimento.

### 3.2.10 Aislamiento de Penicillium expansum

Se efectuó por el método descrito por Amieba y Col (1), tomando una pequeña fracción de la zona sana-enferma de manzanas con sintomatología de P. expansum ( pag. 17 ), se le trato con hipoclorito de sodio al 1% durante tres minutos - después se lavó con agua destilada, los trozos desinfectados se secaron y transfirieron a cajas petri con PDA y agar nutritivo. Se incubaron a temperatura ambiente (20°C) durante - 3 días una vez desarrollado el microorganismo se resiembra en nuevas cajas con cultivos específicos para su identificación.

La identificación se llevó a cabo por observación macroscópica de la morfología colonial de acuerdo a Pitt (44) - - y por medio de observación microscópica (1).

Se comprobó la patogenicidad de la cepa aislada inoculando 12 frutas (3 repeticiones de 4 unidades cada una) por - los métodos de inoculación por contacto por isopo y por lesión.

Se incubaron en una cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 8 días, se midieron los diámetros de desarrollo de pudriciones y se observó la sintomatología.

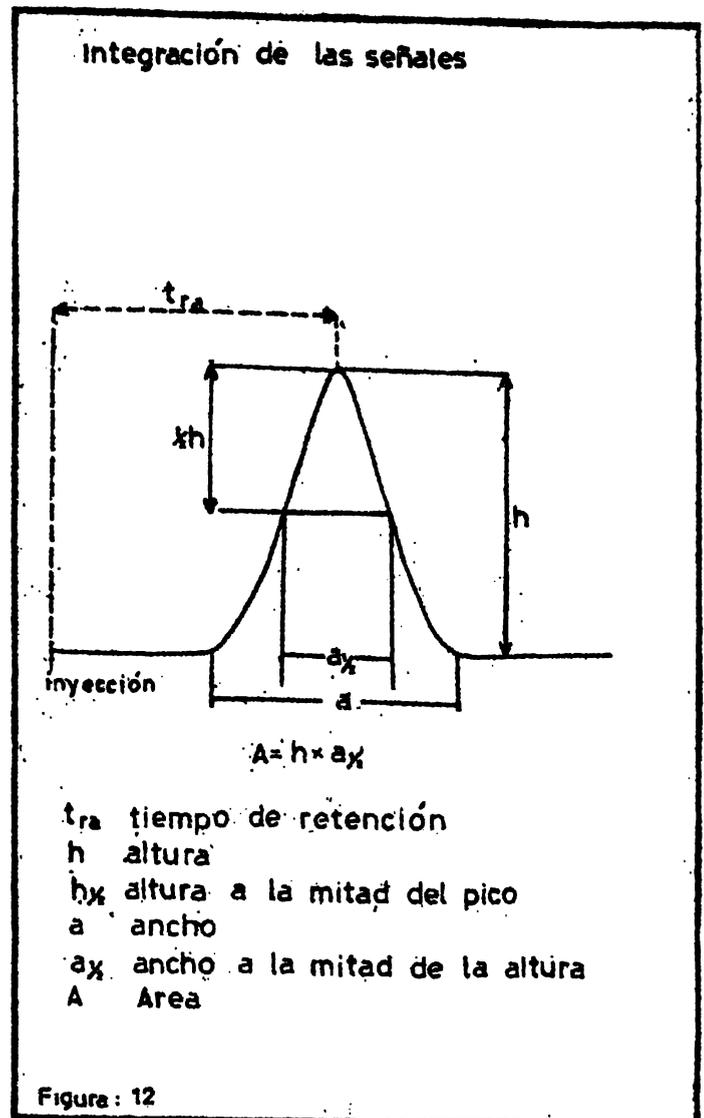
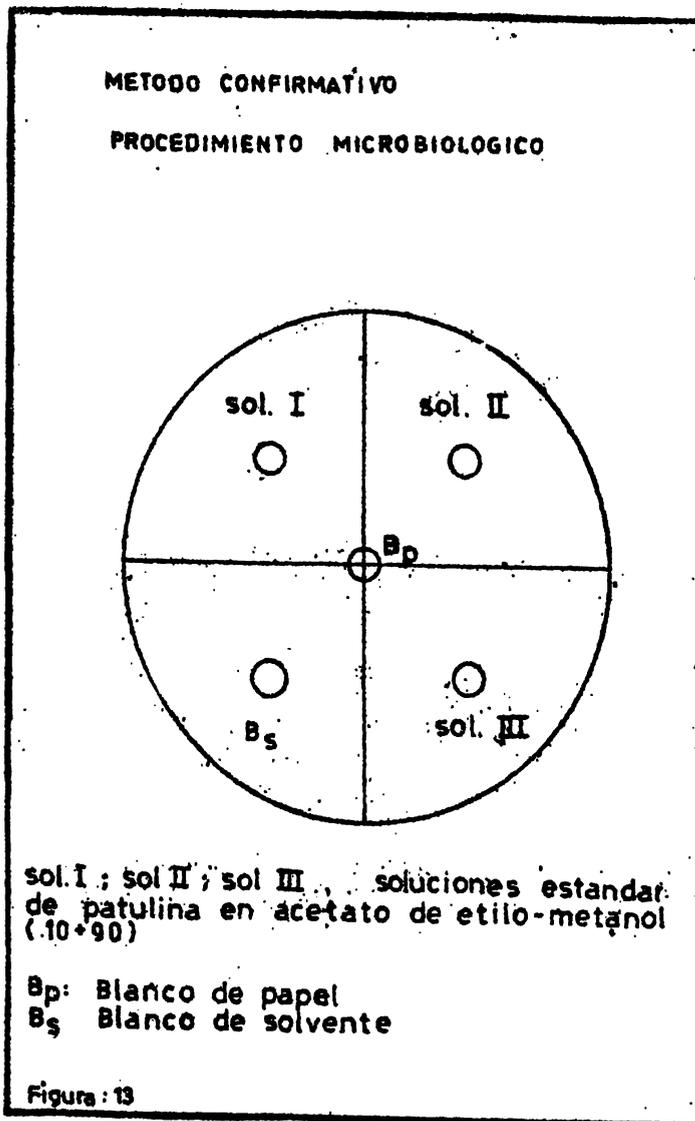
### 3.2.11 Producción de patulina por Penicillium expansum

#### 3.2.11.1 Producción en manzanas infectadas.

Las manzanas utilizadas para demostrar la patogenicidad se emplearon para observar la producción de patulina in vivo. Cuando la lesión cubría un 50% de la superficie de la manzana, se trituró en una Waring laboratory Blendor ajustando los sólidos totales con agua destilada a 40% (similar al néctar de manzana comercial) y se cuantificó la patulina según la sección 3.2.8.

### 3.2.11.2 Producción en medio de cultivo.

Se siguió el procedimiento descrito por Norstadt y Macalla (40) para obtener patulina en medio artificial.



## CAPITULO IV

## 4. Resultados y Discusión

## 4.1. Resultados

4.1.4. Aislamiento de *Penicillium* spp.

Siguiendo los lineamientos propuestos por Amieba y col. (1), se aisló una cepa de *Penicillium* de manzanas - que presentaban pudrición blanda, café claro con olor y sabor peculiares. Se realizó la observación macroscópica de la morfología colonial en los medios de CYA, MEA y G25N a 25°C durante 7 días y en CYA por 7 días a 5°C y 37°C. - Las características coloniales y microscópicas encontradas coinciden bastante con la descripción de *Penicillium expansum* hecha por Pitt (44), una de las características distintivas de este hongo en su habilidad para producir - pudriciones destructivas de las frutas pomáceas, lo cual se comprobó al realizar las pruebas de infectividad.

En las pruebas de infectividad, se obtuvieron sólo - pudriciones características con inoculación por lesión, - no así por contacto con isopo: los diámetros de pudrición a los 8 días de incubación variaron entre 3 y 5 cm. cuando se lesionó la fruta, no hubo desarrollo de pudrición con - la suspensión de esporas colocada en el isopo sobre el tejido sano.

## 4.1.2. Producción de patulina.

Las manzanas utilizadas para demostrar la patogenicidad se emplearon para observar la producción de patulina en vivo como se ha descrito en 3.2.11.1. Los 4 análisis efectuados dieron resultados de alta contaminación, el rango - fué de 337.49 - 572.97 ug/l de néctar preparado con estas frutas, la figura 23 muestra uno de estos análisis.

La producción in vitro se efectuó por el procedimiento de Norstadt y Mc Calla (40), el hongo aislado se incubó a temperatura ambiente en 2 l de caldo papa-dextrosa, durante 2 semanas, al finalizar este período, el medio se centrifugó y filtró para eliminar al microorganismo, se concentró el volumen a 500 ml y se extrajeron 5 ml por el procedimiento de la sección 3.2.8.4, se confirmó la presencia de la micotoxina en el medio por cromatografía en capa fina y el método microbiológico usando Bacillus megaterium. No se efectuó cuantificación.

## 4.2 Análisis cualitativo.

### 4.2.1. Método presuntivo.

El parámetro principal empleado en el análisis cualitativo fué el tiempo de retención absoluto ( $t_{ra}$ ), que se determinó en dos diferentes condiciones:

a) Mediante soluciones estándar de diferente concentración cromatografiadas según lo expuesto en la sección 3.2.2. (figura 15 ).

b) Mediante extractos de muestras contaminadas con concentraciones conocidas del analito problema, obtenidos por el método de la sección 3.2.8 y cromatografiadas en las mismas condiciones de los estándares (figuras 3, 16 y 17 ).

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 7.

Se encontró que en las condiciones optimizadas no se presentaba interferencia en la determinación de la toxina. ( figuras 18,19 )

La presencia de contaminación en las muestras analizadas se determinó por comparación del  $t_{ra}$  con el intervalo de confianza correspondiente, (generalmente el nivel de 20 o 40  $\mu\text{g}/\text{l}$  de muestra. tabla I): Para tener una información adicional se hicieron coinyecciones de extractos de jugo o néctar que presentaban contaminación y solución estándar, -- obteniéndose un sólo pico. ( figura 20 ).

### 4.2.2. Métodos confirmativos.

Como el tiempo de retención no es un parámetro absolutamente confiable para la identificación de un compuesto dado, se recurrió a otros parámetros para confirmar la presencia de la micotoxina en los productos analizados:

a) El valor de  $R_f$ , comparándolo con el  $R_f$  de patulina auténtica en cromatografía en capa fina.

b) Sus propiedades antibióticas.

La cromatografía en capa fina se realizó de acuerdo - al método descrito en la sección 3.2.9.1: a 254 nm, en la - placa cromatográfica se distinguieron puntos oscuros contra un fondo fluorescente a un Rf de 0.40. Al revelar la placa con la fenilhidrazina, se observaron manchas amarillo-rojizas al mismo Rf.

El límite de detección de ésta técnica fué de 0.2 µg/mancha que correspondió a 20 µg/l cuando se extrajeron 50 ml de muestra, el volúmen final del extracto fué de 100 µl y se eluyeron 20 µl de éste en la placa cromatográfica. En muestras que presentaron contaminación inferior a éste límite se llevó el extracto final a 50 µl.

La confirmación usando sus propiedades antibióticas se efectuó usando Bacillus megaterium como indicador biológico. El método seguido se ha descrito en la sección 3.2.9.2.

En éste método el diámetro de la zona de inhibición - fué directamente proporcional a la concentración de la toxina como puede observarse en la tabla 8 y la figura 24.

El límite de detección fué de 2.02 µg/disco que equivale a 40 µg/l cuando se usaron 50 ml de muestra, el volúmen final del extracto fué de 20 µl y se colocaron 10 µl por cada disco.

En muestras que presentaron contaminación inferior a este límite se utilizó un volúmen de muestra de 100 ml.

Todas las muestras que presentaron pico cromatográfico con tr correspondiente a patulina dieron resultados positivos en ambas pruebas confirmativas. Con estos dos parámetros se confirmó la presencia de la micotoxina en los productos analizados.

Tabla 7

Intervalos de confianza de los valores de  $tr_a$  para estándares de patulina.

| Nivel ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Intervalo de $tr_a$ (min)<br>( $\alpha 0.05$ ) |
|----------------------------|--|
| 10                         | (23.9479, 24.5621)                             |
| 8                          | (23.9474, 24.3626)                             |
| 6                          | (23.8601, 24.0599)                             |
| 4                          | (23.7778, 24.2622)                             |
| 2                          | (23.7366, 24.0844)                             |
| 1                          | (23.7642, 24.0358)                             |

Intervalos de confianza de los valores de  $tr_a$  para patulina adicionada a jugos y néctares.

| Nivel | $\frac{\mu\text{g patulina}}{1 \text{ muestra}}$ | Intervalo de $tr_a$ (min)<br>( $\alpha 0.05$ ) |
|-------|--|--|
| 160   |  | (23.5724, 23.9276)                             |
| 120   |  | (23.3219, 23.4761)                             |
| 40    |  | (24.0626, 24.2354)                             |
| 20    |  | (23.9079, 24.1581)                             |

Tabla 8

Correlación entre la concentración de micotoxina y el --  
diámetro de la zona de inhibición usando Bacillus megate-  
rium.

| x           | <u>µg de patulina</u><br>disco | y:          | Diámetro corregido prome-<br>dio de la zona de inhibi-<br>ción.* (cm) |
|-------------|--------------------------------|-------------|---|
|             | 0.4815                         |             | 0.2975  |
|             | 0.9634                         |             | 0.455   |
|             | 1.9984                         |             | 0.620   |
|             | 2.7048                         |             | 0.682   |
|             | 4.9985                         |             | 1.005   |
|             | 9.9972                         |             | 1.1775  |
|             | 14.4468                        |             | 1.305   |
| $\bar{x}$ : | 5.0419                         | $\bar{y}$ = | 0.7917  |

Coefficiente de correlación.

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x}) (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \cdot \sum (y - \bar{y})^2}} = 0.9346$$

$$s^2 = 0.0216$$

$$s = 0.1472$$

\* Cada determinación se hizo por cuadruplicado; n=4

### 4.3 Análisis cuantitativo

#### 4.3.1 Muestras analizadas

Se analizaron 71 muestras de néctar de manzana, 34 de jugo de manzana y 14 de néctar de pera de 5, 4 y 2 marcas comerciales respectivamente.

Se utilizó la técnica de extracción de la sección -- 3.2.8, se integraron las señales como se indica en 3.2.4 y se calculó la concentración interpolando en la curva patrón construida como se indica en la sección 3.2.3.

#### 4.3.2 Curva de calibración

Se encontró que la patulina obedece la ley de Lambert y Beer en un rango de concentración de  $0.05 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  a  $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ , como se indica en la figura 25.

Se construyó una curva de calibración siguiendo los lineamientos propuestos por Hubaux y Vos (21). (ver anexo I), utilizando 12 soluciones estándar, 9 de ellas de baja concentración, 2 de concentración media y una de concentración alta. Se determinó el límite de detección de la técnica con  $\alpha = 0.01$ , que correspondió a  $9.2 \mu\text{g}$  de patulina/l de muestra analizada ( ver figura 27).

Los valores obtenidos para la construcción de la curva se encuentran en la tabla 9 y la figura 26. Durante el experimento se repitió 2 veces más esta curva para probar la eficiencia de la columna, no se encontró diferencia significativa entre estas repeticiones.

Se determinaron las bandas de confianza de Working-Hotelling sobre la línea ajustada; o sea la región de confianza para toda la línea, los resultados se muestran en la tabla 10 y en la figura 27.

#### 4.3.3 Porcentaje (%) de recuperación de la técnica de extracción.

Los análisis de este trabajo fueron realizados por dos personas; existiendo la posibilidad de una diferencia significativa entre analistas, se utilizó el análisis de varianza aplicado a los resultados de la tabla II, que son los datos obtenidos en la extracción de muestras adicionadas de 40 µg de toxina/1 de muestra. Como puede verse en la tabla 12, no hay diferencia significativa entre ambos.

La recuperación promedio de la toxina adicionada fué de 76.35% con una variabilidad de  $\pm$  3.08%.

#### 4.3.4 Análisis de las muestras.

Las muestras se agruparon por marcas; a cada una se le asignó una letra y un número para su identificación según la marca comercial.

En las tablas 13, 14 y 15 se muestran los tiempos de retención promedio y las áreas promedio obtenidas en el análisis de néctares de manzana, jugos de manzana y néctares de pera respectivamente, así como los intervalos de confianza al 95% para estos valores.

Las figuras 19, 21 y 22 son representaciones típicas del análisis efectuado.

Para obtener una estimación de los valores de concentración de la micotoxina en las muestras analizadas se empleó el método de Lieberman y col. expuesto por Hunter (23), que emplea un intervalo de confianza de 100 P% para la respuesta de área, establecido con un 100  $(1-\alpha/2)$  % de confianza.

Al interpolar los valores de área en la ecuación de regresión de la curva de calibración se observó que la mayor densidad de éstos se agrupaba en la región de 0.04 -- 0.015 µg, se utilizó sólo ese intervalo de la gráfica, con la ventaja de que usando el método de Wynn y Bloomfield ex-

puesto por Hunter (23) se reduce la anchura de intervalo de Working-Hotelling y por consiguiente el rango de concentración estima. En este caso el usar la región de 0.004 - 0.015  $\mu\text{g}$  redujo el intervalo a un 89% del valor mostrado en la tabla 10 (ver figura 28).

La interpolación en la curva de calibración y su correspondiente región de confianza se realizó como se indica en la figura 14. Y los valores obtenidos del intervalo de confianza para el área. ( $\eta$ ), la concentración de patulina estimada ( $\hat{x}$ ) y el intervalo de concentración estimado se muestra en la tabla 16.

En la tabla 16 se muestran los niveles de concentración en  $\mu\text{g}$  de patulina/l de muestra, tomando en cuenta que se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  del extracto cuyo volúmen fué de 100  $\mu\text{l}$ , el volúmen de muestra extraída fué de 5 ml y el % de recuperación de la técnica de extracción de 76.35%.

La figura 29 muestra, a manera de resumen, la representación en histograma de los niveles de patulina en jugos y néctares de manzana y néctares de pera.

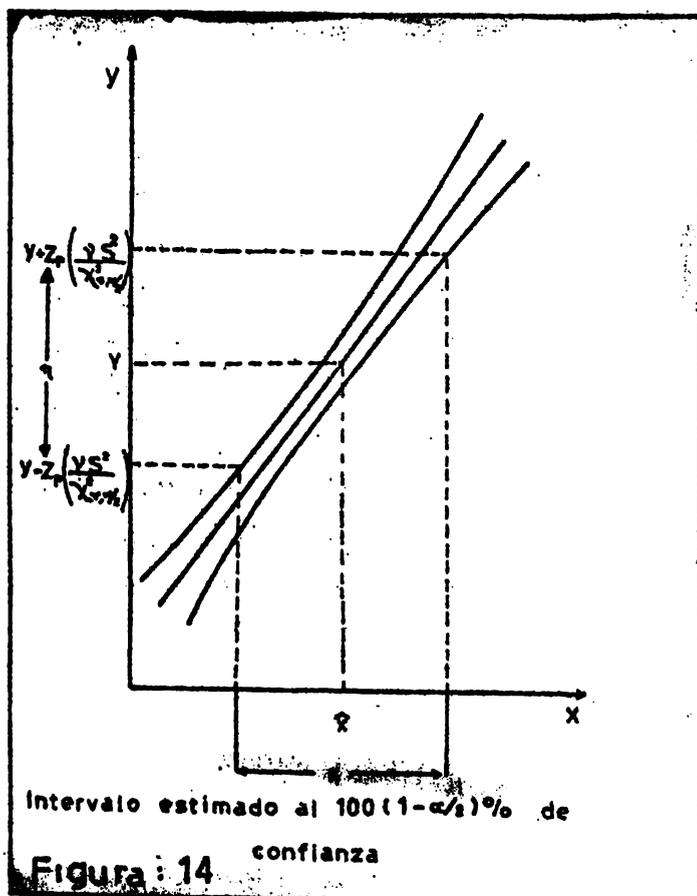


Figura: 14

Determinación de patulina por interpolación en la curva calibración

#### 4.4. Discusión de resultados.

##### 4.4.1. Pruebas con microorganismos patógenos.

Debido a que se hizo solo una prueba de aislamiento, no se tiene la certeza total de la identidad del microorganismo aislado, pero se presume que el hongo proveniente de manzanas con pudrición blanda, café claro, de olor y sabor característico es Penicillium expansum, pues se ha reportado que normalmente se encuentra contaminando a las manzanas y peras (44). Lo importante es la corroboración de la capacidad productiva de patulina por el hongo patógeno, tanto en los frutos como en el medio artificial, lo cual indicó una posibilidad de contaminación en los productos comerciales.

El microorganismo aislado no tiene capacidad de infectar a los frutos por contacto, sino tan solo a través de daños en la piel. De lo anterior se desprende que los procedimientos inadecuados de recolección, transporte y manejo pueden favorecer la infección de los frutos con hongos de este tipo y contaminarlos con patulina.

La cuantificación de la patulina producida en medio artificial no se realizó por la alta probabilidad de prevaencia de esporas del hongo que contaminarían la columna analítica del cromatógrafo, por lo que el análisis quedó a nivel cualitativo.

##### 4.4.2. Análisis cualitativo.

La cromatografía líquida es en esencia una técnica de separación y cuantificación y no de identificación, aunque es posible obtener alguna información de tipo cualitativo, basándose en parámetros de retención.

En este caso se utilizó el tiempo de retención absoluto (tra), que es el tiempo transcurrido desde la introduc-

ción de la muestra hasta el máximo del pico en la gráfica. Este parámetro está sujeto a errores en mayor grado que otros como el tr relativo y el tr ajustado, pero no fué posible utilizar estos dos últimos en vista de la carencia de una sustancia de referencia. En todos los casos se probaron algunos con resultado negativos y se optó por emplear sólo el tra. La identificación se hizo por comparación con estándares, en caso de duda se inyectaba o --- coinyectaba una solución estándar para cerciorarse de que el tr registrado correspondió a la toxina, pues esta es función de las condiciones de operación del equipo y aunque es posible mantener un nivel constante, existen algunas variaciones.

Se determinó el tr en las dos condiciones mencionadas en la sección 4.1.2 por la posibilidad de una interferencia con algún componente del extracto; según se ve en las figuras 18, 19, no hubo problema de ese tipo empleando el procedimiento de extracción, limpieza y las condiciones cromatográficas descritas.

Como puede observarse en la tabla 7, en general todos los intervalos de confianza para tr son semejantes tanto en soluciones estándar como en los extractos de productos contaminados con niveles conocidos de toxina. Las variaciones en los valores de este parámetro se deben probablemente a error humano en la determinación del dato por medición manual y en el procedimiento de inyección de la muestra, a fluctuaciones en la velocidad del líquido acarreador, al estado de la columna y a la velocidad de carta del registrador.

En general, siempre se requiere de un método confirmativo para la identificación. Los métodos confirmativos -- empleados se seleccionaron aprovechando las propiedades específicas de la micotoxina y la sensibilidad y aplicabilidad del método. La cromatografía en capa fina fué útil --

pero no suficiente como confirmación de la identidad de patulina, en vista de que se han reportado interferencias con este procedimiento que podían conducir a error (62), por tanto se utilizó la propiedad antibiótica del compuesto para la identificación total. El microorganismo empleado, Bacillus megaterium se ha reportado como el más sensible a esta y otras toxinas (70).

Ambas pruebas dieron muy buenos resultados con solución estándar y extractos de productos contaminados intencionalmente, principalmente el método microbiológico donde se obtuvo una correlación respuesta-concentración del orden de 0.93 (figura 24). En el método cromatográfico la estimación de fluorescencia y la coloración fué visual, - por lo que no se presenta ningún valor de correlación con la concentración e intensidad de mancha con ambos reveladores. La correlación observada entre las variables de cada prueba indica que puede utilizarse para el análisis confirmativo de la identidad de la toxina, en estándares y muestras contaminadas naturalmente. El límite de detección que se reporta en ambos casos es el promedio de la mínima cantidad que produjo respuesta apreciable, por lo que no tiene fines netamente cuantitativos, sino tan solo para que obtenido el resultado de la cromatografía de líquidos, se planeara el volúmen adicional de muestra que se extraería en los casos necesarios, como se indicó en su oportunidad. Estos datos son comparables con los reportados en la bibliografía que son de  $0.2 \mu\text{g}/20\mu\text{l}$  (54) y de  $1.7 \mu\text{g}/\text{disco}$  (65). Por otra parte, el límite de cromatografía en capa fina es mucho mayor que el reportado para otros reveladores como el MBTH ( $0.01 \mu\text{g}/5\mu\text{l}$ ) (56), sin embargo fué satisfactorio para los fines que perseguimos.

Una observación interesante relacionada con el método microbiológico es la aparición de un crecimiento anormal a nivel macroscópico del bacilo en los bordes de la -

zona de inhibición, las colonias bacterianas en esta zona presentan cambios de textura y de forma con respecto al resto de las colonias, hubo un crecimiento exagerado en dirección al centro de la zona de inhibición, no se observó a nivel microscópico; esto puede tener relación con las propiedades mutagénicas de la patulina, tal como se ha propuesto para una situación semejante en la interacción de aflatoxina y E. coli. (70).

#### 4.4.3. Análisis cuantitativo.

La selección de las muestras se hizo aleatoriamente de acuerdo a su disponibilidad aparente en el mercado. La curva de calibración se construyó tomando en cuenta que la absorbancia de la toxina obedece la ley de Lambert y Beer, según se ve en la figura 25, con esto se aseguró que la respuesta sería lineal, lo cual se comprobó con inyecciones de solución estándar de diferente concentración (figura 15).

Es importante hacer notar que para la construcción de la curva patrón se hicieron algunas suposiciones:

- 1.- Los estándares fueron independientes.
- 2.- La variación de la distribución de los errores de las señales se mantuvo constante (ver coeficiente de variabilidad del área, tabla 9).
- 3.- Se conoció exactamente la concentración de los estándares.
- 4.- Las señales observadas tuvieron una distribución gaussiana alrededor del valor esperado.

Con estas hipótesis fué posible aplicar los tratamientos estadísticos mencionados (anexo I).

Durante el experimento se inyectaron soluciones de concentración conocida y se compararon con los intervalos de tolerancia para la curva contruida. Todos estuvieron

dentro de ese intervalo, por lo que se asegura que no hubo diferencia significativa, ésto sirvió para verificar la eficiencia de la columna y del detector. En vista de los resultados, se decidió emplear la curva de calibración construida originalmente para obtener la estimación de las concentraciones en las muestras.

Una vez optimizado el procedimiento de extracción se hicieron análisis de recuperación en diferentes días, los resultados pueden verse en la tabla 11. El dato promedio obtenido fué similar al reportado por Möller Josefsson -- (38), aunque menor al de otros procedimientos de cromatografía de líquidos (67) (72) que son del orden de 80-85% y más, sin embargo, la variabilidad de los resultados -- fué baja y no existió diferencia significativa entre analistas ni entre los distintos análisis (tabla 12), por -- tanto se consideró este dato adecuado para utilizarlo como referencia para dar un valor corregido de la concentración estimada como se estipula en la tabla 17.

Varios autores han relacionado el concepto de límite de detección con los conceptos estadísticos de error (2, 21,23). Siguiendo estos lineamientos (anexo I) y utilizando los datos de la curva de calibración, calculamos  $9.2 \mu\text{g}$  de patulina/litro de muestra, como nuestro límite de detección, establecido con 99% de confianza, que es comparable al reportado por Ware:  $11 \mu\text{g}/\text{l}$  (72), pero inferior al de Möller:  $5 \mu\text{g}/\text{l}$  (38) y al de Stray:  $1 \mu\text{g}/\text{l}$  (57). Sin embargo, estos autores no especifican la manera como determinaron ese valor.

La utilización del método de Wynn y Bloomfield para -- reducir el intervalo de Working-Hotelling fué de gran ayuda pues permitió obtener un valor estimado del intervalo de confianza para la concentración estimada de toxina en las muestras más estrecho y con la misma concentración --

(ver figura 28).

El área asociada al límite de detección ( $0.2917 \text{ cm}^2$ ), fué el límite de decisión, que permitió en términos cuantitativos expresar si la muestra estaba contaminada. En el caso de las muestras  $A_4-A_7$ ,  $B_8-B_9$ ,  $C_{14}$ ,  $D_{10} - D_{16}$ ,  $E_2-E_4$  de néctar de manzana,  $D_5-D_6$  de jugo de manzana y  $D_8$  de néctar de pera, a pesar de que existió un pico cromatográfico con tr característico de patulina (ver tabla 13,14,15) no se consideraron para la estimación cuantitativa por estar debajo del área mínima detectable, además las pruebas confirmativas fueron dudosas. Estas muestras se reportaron con nivel de contaminación menor de  $9.2 \mu\text{g/l}$ . (En los histogramas de la figura 29 corresponden a la primera barra, - junto con las que no presentaron tr característico).

La región de Working-Hotelling expuesta en la tabla 10 y la figura 27, se tomó como medida de la capacidad para predecir las señales asociadas con una concentración dada, dicho con un 95% de confianza.

La interpolación en la curva de calibración de los valores de área de las muestras cuyos cromatogramas contuvieron picos con superficie mayor o igual a  $0.2917 \text{ cm}^2$ , se efectuó según el método de Lieberman y col., con lo que el intervalo estimado para la cantidad de patulina -- contendrá el valor verdadero el 90% de las veces dicho -- con un 95% de confianza ( $P: 0.90, \alpha: 0.05$ ), como lo expone Hunter (23).

Del histograma de distribución de los niveles de patulina se observa que tanto el néctar como el jugo de manzana presentan contaminación, no así el néctar de pera. La mayor proporción no se encontró contaminada con niveles detectables de patulina (76.8% de los néctares de manzana, 76.4% de jugos de manzana y 100% de néctares de pera). El



rango de concentración en néctares de manzana es de 9,2-39.49  $\mu\text{g}/\text{l}$  y en jugo de manzana de 9.2-25.42  $\mu\text{g}/\text{l}$ , este rango está distribuido en mayor proporción entre los niveles de baja concentración (figura 29).

La contaminación con patulina encontrada en las muestras analizadas (9.2 - 39.49  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) es comparable a los resultados obtenidos en Suiza (2.5 - 25  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) (28) y Finlandia (25  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) (28), y considerablemente inferior a los encontrados en E.U.A. (44 - 309  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) (72), (40-440  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) (7) y en Canadá (hasta 45 mg/l con productos obtenidos de manzanas descompuestas). (74).

En Mexico, la Dirección General de Normas (8) establece que " . . . el jugo de manzana será elaborado en condiciones sanitarias apropiadas con manzanas sanas, maduras frescas, convenientemente lavadas y libres de residuos de plaguicidas y otras sustancias eventualmente nocivas . . .", como se observa esta norma no establece ninguna especificación en cuanto al tipo y cantidad de las sustancias restringidas, en vista de los resultados obtenidos se comprueba que estas condiciones no se cumplen, ya que el uso de manzanas contaminadas con hongos pueden provocar la presencia de esta toxina en el producto final.

En Noruega y Suiza se ha establecido que la máxima cantidad permisible de patulina es de 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  en jugo de manzana (67). De la tabla 17, se observa que los alimentos analizados están por debajo de esta especificación por lo que es posible considerar que la ingestión de productos con los niveles de contaminación encontrados es inocua.

Figura 15 : soluciones estándar de patulina.

Soluciones estándar de patulina en acetato de etilo-metanol (10:90); cromatógrafo de líquidos Varian 5000; detector UV Vari-chrom a 277 nm, sensibilidad 0.01; columna Micropak MCH-10; fase móvil: agua tridestilada a 1 ml/min; temperatura 25°C, presión 90 atm; velocidad de carta 0.25 cm/min.

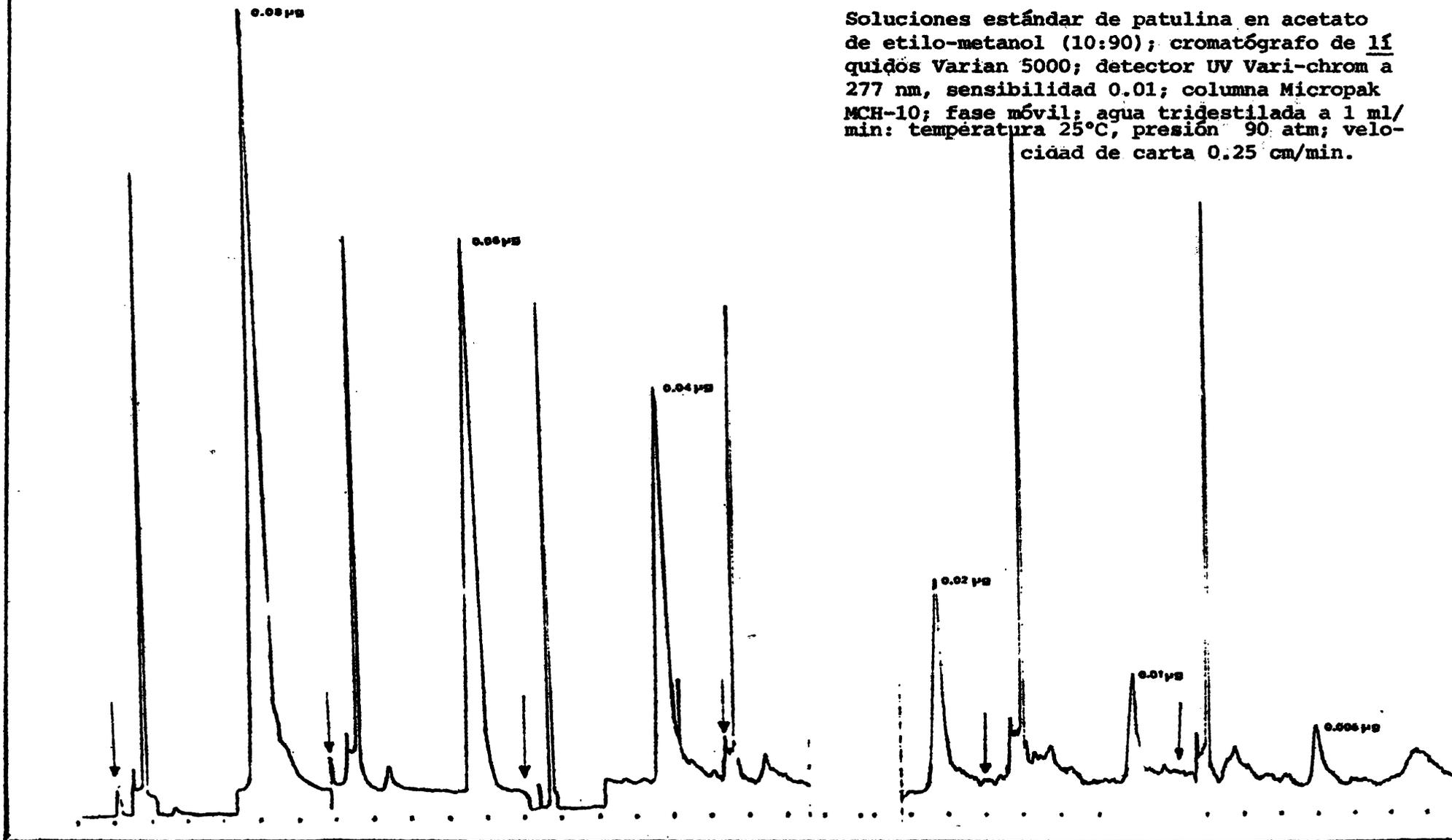
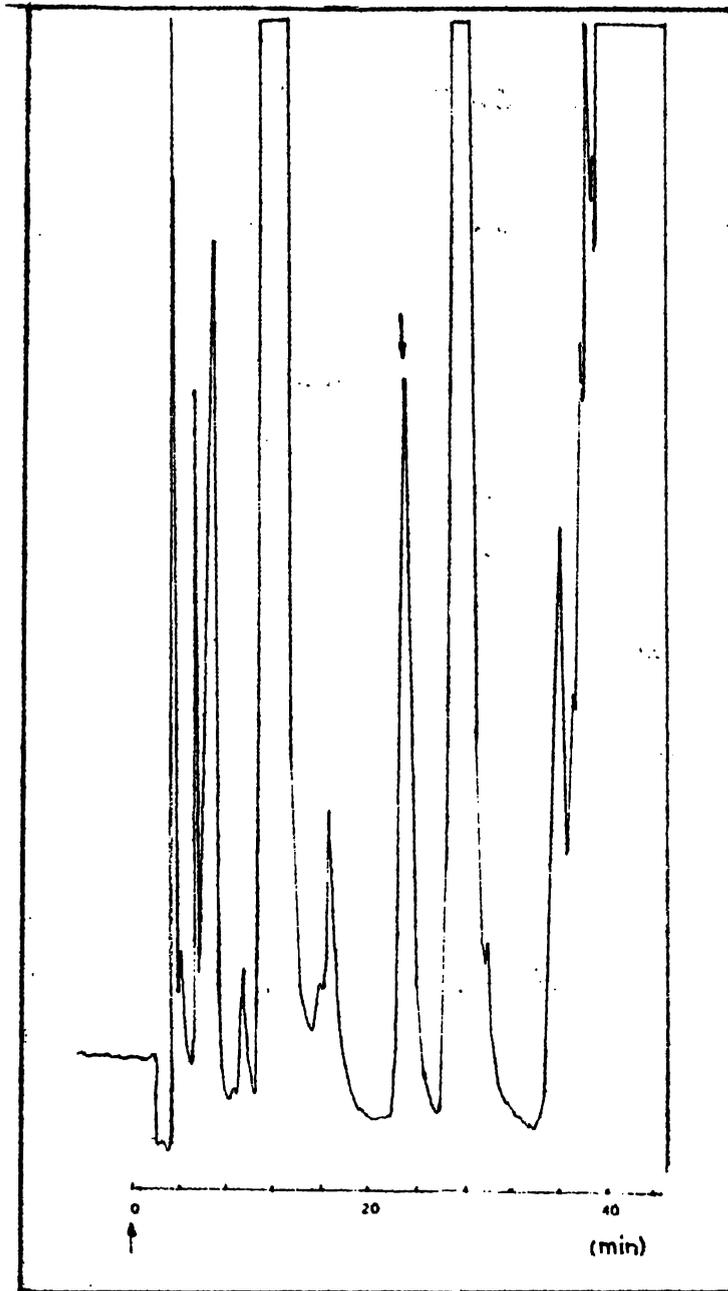
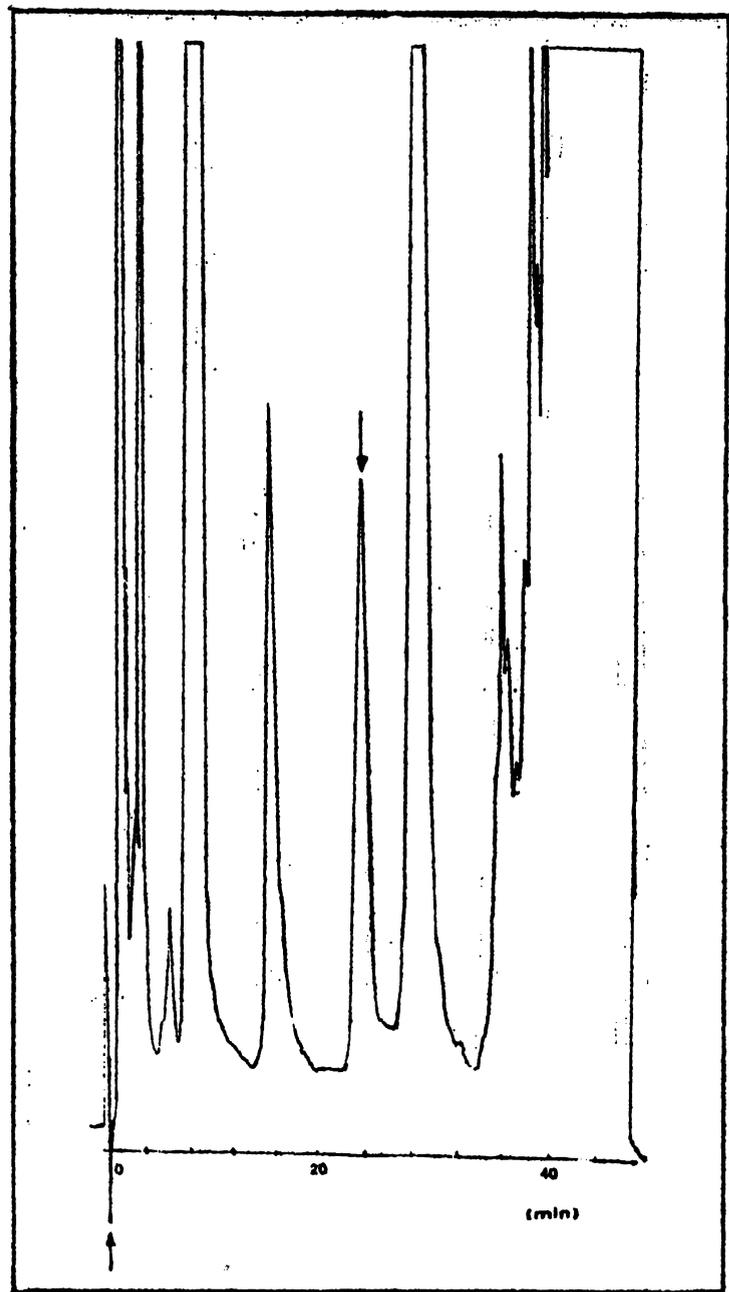


Figura 16 : Néctar de manzana adicionado con patulina.



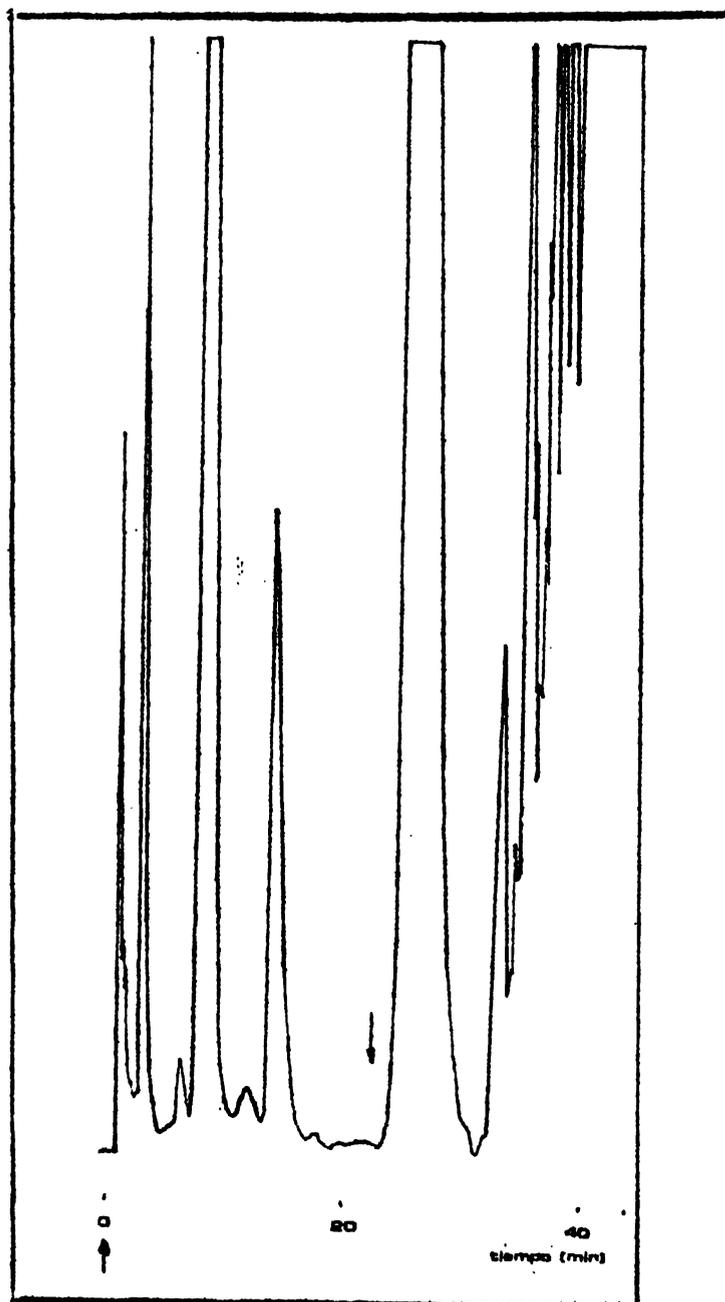
Análisis de néctar de manzana "D"; cromatógrafo Varian 5000; Detector UV Vari chrom a 277 nm, sensibilidad 0.01; columna Micropak MCH-10; fase móvil agua a 1 ml/min; temperatura 25°C, presión 90 atm, área del pico 3.99 cm<sup>2</sup> concentración: 150.89 µg de patulina; velocidad de carta 0.25 cm/min.

Figura 17 : Néctar de manzana adicionado de patulina.



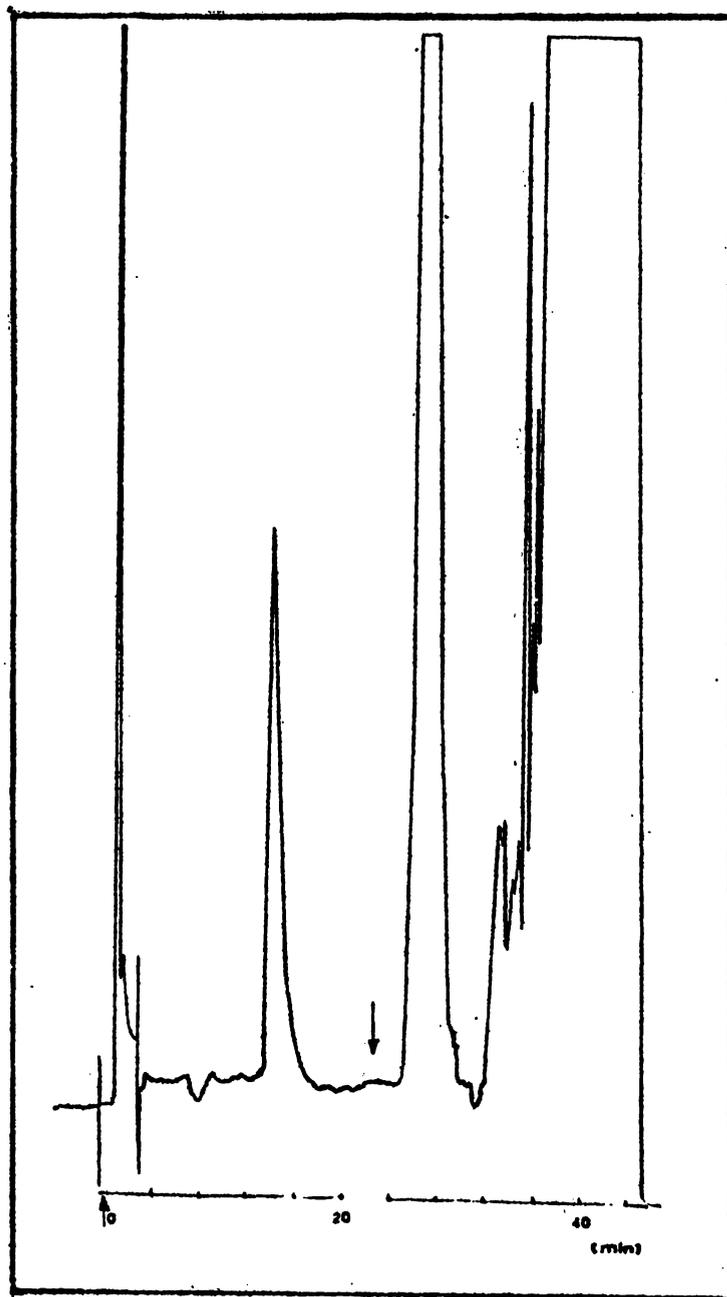
Análisis de néctar de manzana "D", cromatógrafo Varian 5000; detector UV Vari-Chrom a 277 nm, sensibilidad 0.01; columna Micropak -- MCH-10; fase móvil agua a 1 ml/min; temperatura 25°C, presión ~ 90 atm; área del pico 2.81 cm<sup>2</sup>, concentración 107.5 µg patulina Velocidad de carta 0.25 cm/min.

Figura 18 : Jugo de manzana



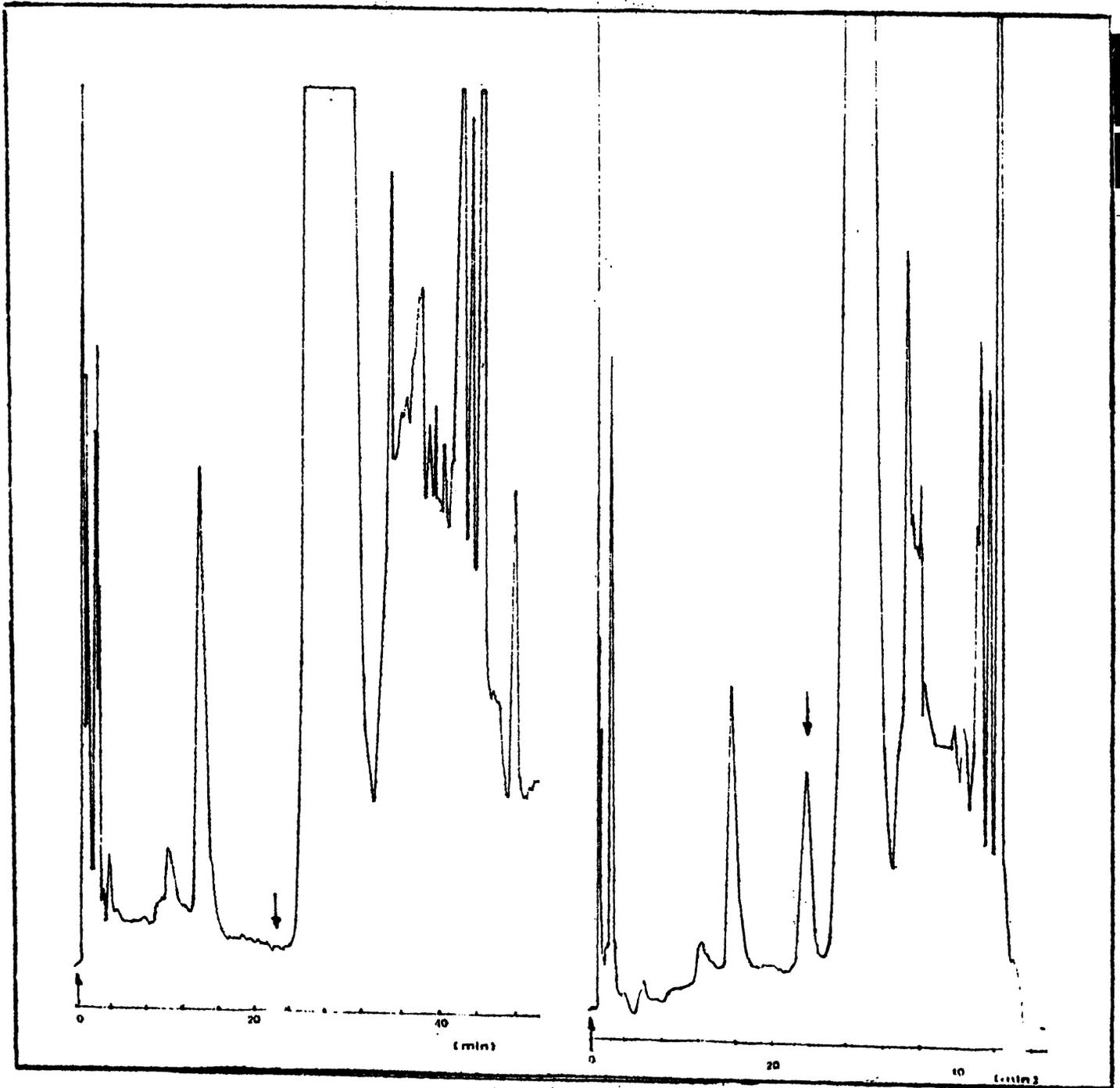
Análisis de jugo de manzana "F" no contaminado; cromatógrafo Varian 5000, detector UV Vari-chrom a 277 nm, sensibilidad 0.01; columna Micropak MCH-10; fase móvil: agua a 1 ml/min; temperatura 25°C, presión ~ 90 atm; área: debajo de la mínima cantidad detectable, velocidad de carta 0.25 cm/min.

Figura 19 : Néctar de Pera



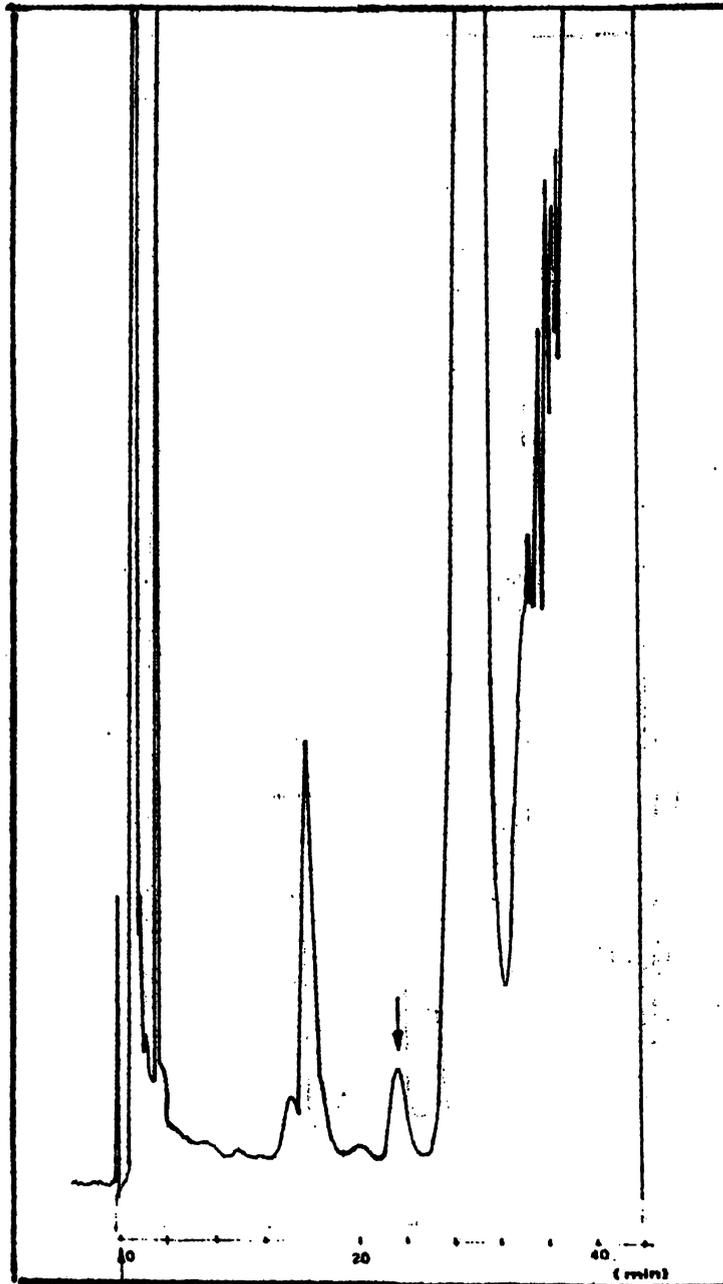
Análisis de Néctar de pera "E"; cromatógrafo Varian 5000; detector UV Vari-chrom a 277 nm. sensibilidad 0.01; columna Micropak MCH 10; fase móvil agua a 1 ml/min; temperatura 25°C, presión ~ 90 atm; area: debajo de la mínima cantidad detectable; velocidad de carta - 0.25 cm/min.

Figura 20 : CO-inyección de jugo de manzana y solución estándar de patulina.



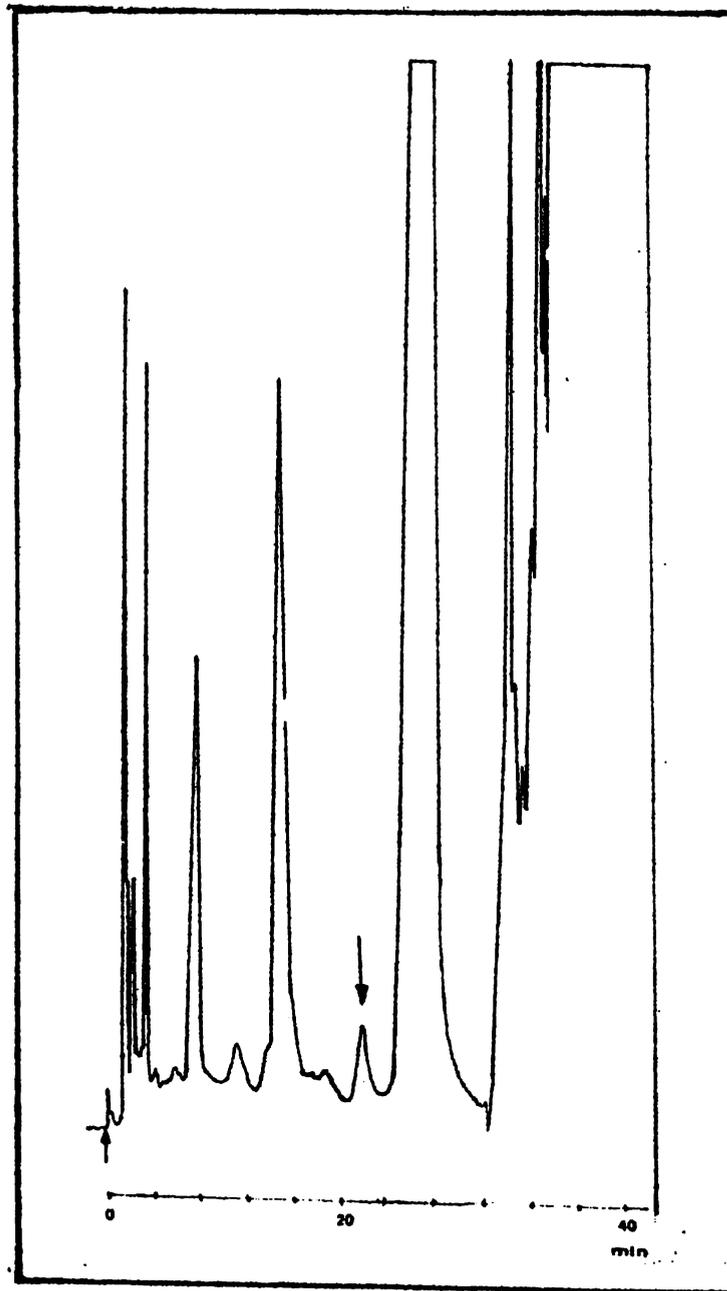
Análisis de jugo de manzana "D" y solución estándar de patulina inyectados al mismo tiempo, a la izquierda se muestra el cromatograma del extracto de jugo sin adicionar; cromatógrafo Varian 5000; detector - UV Vari-chrom a 277 nm, sensibilidad 0.01; columna Micropak MCH-10 - fase móvil: agua a 1 ml/min; temperatura 25°C, presión ~ 90 atm, --- área 1.53 cm<sup>2</sup>, concentración: 58.86  $\mu$ g, velocidad de carta 0.25 cm/min.

Figura 21 : Jugo de manzana



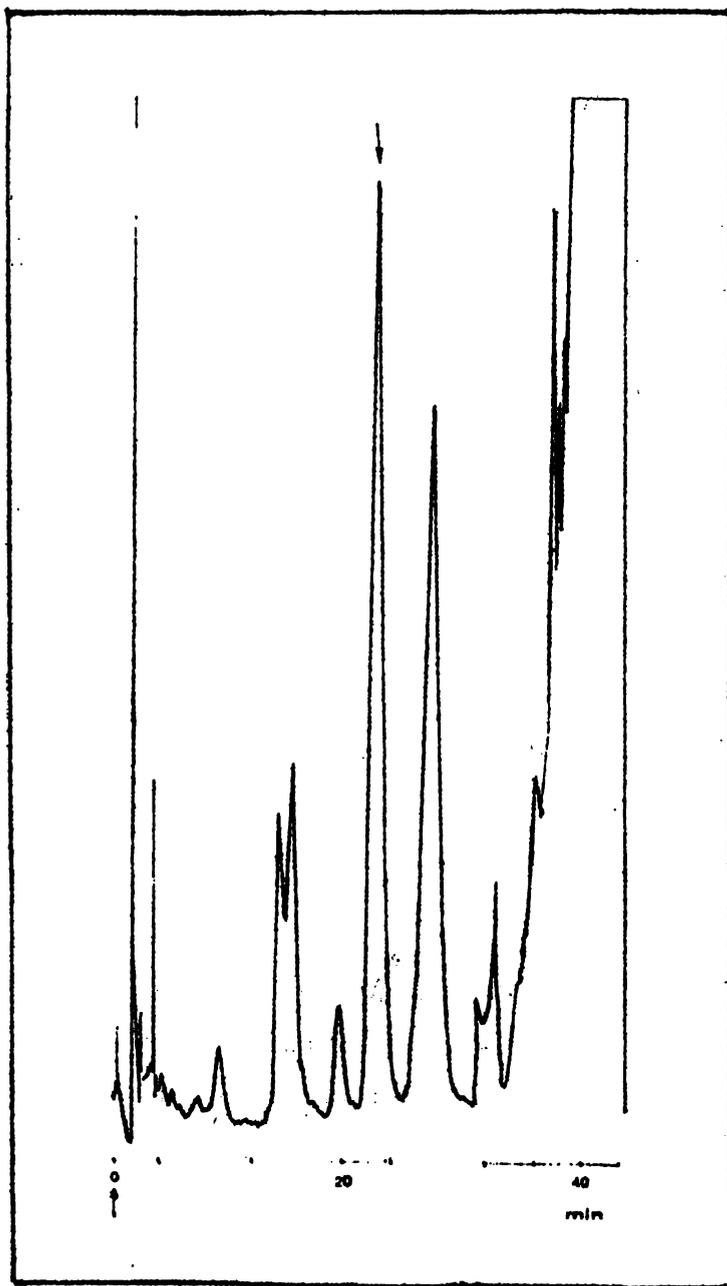
Análisis de jugo de manzana "G"; cromatógrafo Varian 5000; detector UV Vari-chrom a 277 nm, sensibilidad 0.01; columna Micropak MCH 10; fase móvil agua a 1 ml/min; temperatura 25°C; presión 90 atm; área 0.65 cm<sup>2</sup>, concentración: 25.426  $\mu$ g  
1

Figura 22: Néctar de manzana



Análisis de néctar de manzana "E"; cromatógrafo Varian 5000; detector UV Varichrom a 277 nm; sensibilidad 0.01; columna Micropak MCH-10 -- fase móvil agua a 1 ml/min; temperatura 25° C, presión ~ 90 atm; -- área 0.375 cm<sup>2</sup>, concentración 14.786 µg/l; velocidad de carta 0.25 cm/min.

Figura 23. Producción de patulina por *Penicillium* sp. in vivo.



Análisis de manzanas afectadas por *P.* sp. cromatógrafo Varian 5000; detector UV Vari-chrom a 277 nm, sensibilidad 0.02; columna Micropak MCH-10; fase móvil agua a 1 ml/min; temperatura 25°C; presión ~ 90 atm; área 4.6 cm<sup>2</sup>, concentración 351.05  $\mu$ g; velocidad de carta 0.25 cm/min.

Tabla 9

Datos para curva patrón de patulina.

| x<br>(cantidad de patulina en $\mu\text{g}$ ) | $\bar{y}$ (área en $\text{cm}^2$ ) <sup>*</sup> | Coef. variabilidad<br>del área (%) |
|---|---|------------------------------------|
| 0.0031  | 0.160   | 1.30                               |
| 0.0034  | 0.180   | 1.21                               |
| 0.00598                                       | 0.375   | 0.96                               |
| 0.00604                                       | 0.392   | 0.99                               |
| 0.00617                                       | 0.390   | 0.97                               |
| 0.00617                                       | 0.390   | 0.95                               |
| 0.00617                                       | 0.390   | 1.02                               |
| 0.00637                                       | 0.405   | 1.00                               |
| 0.00736                                       | 0.48  | 1.12                               |
| 0.01  | 0.750   | 1.18                               |
| 0.02  | 1.487   | 1.01                               |
| 0.06  | 4.075   | 1.30                               |

\* n = 3

Coefficiente de correlación:  $r = 0.99892217$

$$S^2 = 0.00282368$$

$$S = 0.005313835$$

Límite de detección con 99% de seguridad = 0.00451  $\mu\text{g}$  de patulina considerando que se emplearon 5 ml de muestra, el volumen final del extracto fué de 100  $\mu\text{l}$  y se inyectaron siempre 10  $\mu\text{l}$  de este extracto, el límite de detección de la técnica fué de 9.02  $\frac{\mu\text{g}}{1}$  o sea, un área mínima detectable de 0.2917  $\text{cm}^2$ .

## Tabla 10

Región de Working-Hotelling para la ecuación de regresión de la curva de calibración.

| x ( $\mu\text{g}$ patulina) | Intervalo de confianza * ( $\alpha:0.05$ )<br>para el área |
|-----------------------------|--|
| 0.0031                      | (0.1440, 0.2451)   |
| 0.0034                      | (0.1651, 0.2654)   |
| 0.00598                     | (0.3461, 0.4401)   |
| 0.00604                     | (0.3503, 0.4442)   |
| 0.00617                     | (0.3594, 0.4530)   |
| 0.00617                     | (0.3594, 0.4530)   |
| 0.00617                     | (0.3594, 0.4530)   |
| 0.00637                     | (0.3733, 0.4666)   |
| 0.00736                     | (0.4836, 0.5339)   |
| 0.01                        | (0.6260, 0.7144)   |
| 0.02                        | (1.3095, 1.4096)   |
| 0.06                        | (3.9686, 4.2654)   |

\* Al 95% de confianza. El valor de F de Snedecor utilizado fué:

$$F_{2,10,0.05} = 4.10 \quad \text{Ref. (68)}$$

Tabla 11

% de recuperación de la técnica de extracción.

| Experimento | Analista* |         |
|-------------|-----------|---------|
|             | A (% r)   | B (% r) |
| 1           | 77.97     | 75.35   |
| 2           | 78.45     | 79.28   |
| 3           | 78.57     | 74.64   |
| 4           | 71.42     | 75.00   |
| 5           | 79.00     | 74.75   |
| 6           | 74.47     | 75.13   |
| 7           | 73.97     | 78.79   |
| 8           | 75.80     | 79.12   |

$$\bar{x} = 76.35\%$$

$$\text{Varianza entre duplicados } \sigma_d = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} = \pm 2.352$$

$$d = \% r_A - \% r_B$$

$$\% \text{ variabilidad: } \frac{\sigma_d}{\bar{x}} \times 100 = \pm 3.08 \%$$

\* Se enlistan los valores medios de 2 determinaciones por cada analista.

Tabla 12

Análisis de varianza de los resultados del % de recuperación de la técnica de extracción.

| Experimento | Analista     |              |               |
|-------------|--------------|--------------|---------------|
|             | A (%)        | B (%)        |               |
| 1           | 77.97        | 75.35        | 153.22        |
| 2           | 78.45        | 79.28        | 157.73        |
| 3           | 78.57        | 74.64        | 153.21        |
| 4           | 71.42        | 75.00        | 146.42        |
| 5           | 79.00        | 74.75        | 153.75        |
| 6           | 74.47        | 75.13        | 149.6         |
| 7           | 73.97        | 78.79        | 152.76        |
| 8           | <u>75.80</u> | <u>79.12</u> | <u>154.92</u> |
|             | 609.65       | 612.06       | 1221.71       |

$$F_c = \frac{(\sum x)^2}{16} = 93285.95$$

$$S_t = \sum x_i^2 - F_c = 84.79$$

$$S_e = \frac{(\sum x_1)^2 + (\sum x_2)^2 + \dots}{\text{analistas}} - F_c = 40.51$$

$$S_a = \frac{(\sum x_A)^2 + (\sum x_B)^2}{\text{experimentos}} - F_c = 0.36$$

| Fuentes de varianza | G.L | Sx    | CM   | F <sub>calc</sub> | P. 5% | P. 1% |
|---------------------|-----|-------|------|-------------------|-------|-------|
| Experimentos        | 7   | 40.51 | 5.78 | 0.92              | N.S   | N.S   |
| Analistas           | 1   | 0.36  | 0.36 | 0.057             | N.S   | N.S   |
| Residual            | 7   | 43.92 | 6.27 |                   |       |       |
| Total               | 15  | 84.79 | 5.65 |                   |       |       |

N.S. No hay diferencia significativa

Tabla 13

Tiempo de retención y área promedio correspondiente a patulina en el análisis de néctar de manzana.

| Muestra         | *<br>$\bar{t}_r$ (min) | Intervalo de<br>confianza --<br>( $\alpha$ :0.05)<br>(min) | área (cm <sup>2</sup> )* | Intervalo<br>de confian-<br>za ( $\alpha$ :0.05)<br>(cm <sup>2</sup> ) |
|-----------------|------------------------|--|--------------------------|--|
| A <sub>1</sub>  | N.C**                  | —  | —                        | —  |
| A <sub>2</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| A <sub>3</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| A <sub>4</sub>  | 24.0                   | (23.966, 24.034)   | 0.035                    | (0.0327, 0.0372)   |
| A <sub>5</sub>  | 24.0                   | (23.932, 24.068)   | 0.100                    | (0.0920, 0.1029)   |
| A <sub>6</sub>  | 23.6                   | (23.306, 23.894)   | 0.110                    | (0.1077, 0.1122)   |
| A <sub>7</sub>  | 23.8                   | (23.630, 23.964)   | 0.110                    | (0.1054, 0.1145)   |
| A <sub>8</sub>  | 23.8                   | (23.607, 23.992)   | 0.320                    | (0.3177, 0.3222)   |
| A <sub>9</sub>  | 23.8                   | (23.652, 23.947)   | 0.400                    | (0.3966, 0.4033)   |
| A <sub>10</sub> | 23.8                   | (23.630, 23.969)   | 0.403                    | (0.4007, 0.4052)   |
| A <sub>11</sub> | 23.6                   | (23.441, 23.758)   | 0.525                    | (0.5227, 0.5272)   |
| A <sub>12</sub> | 23.7                   | (23.347, 24.053)   | 0.550                    | (0.5454, 0.5545)   |
| B <sub>1</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| B <sub>2</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| B <sub>3</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| B <sub>4</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| B <sub>5</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| B <sub>6</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| B <sub>7</sub>  | N.C.                   | —  | —                        | —  |
| B <sub>8</sub>  | 23.8                   | (23.710, 23.890)   | 0.175                    | (0.1682, 0.1818)   |
| B <sub>9</sub>  | 23.8                   | (23.652, 23.947)   | 0.210                    | (0.2009, 0.219)  |
| B <sub>10</sub> | 23.8                   | (23.709, 23.890)   | 0.320                    | (0.3166, 0.3233)   |
| B <sub>11</sub> | 24.0                   | (23.932, 24.067)   | 0.338                    | (0.3323, 0.3436)   |
| B <sub>12</sub> | 23.6                   | (23.396, 23.803)   | 0.720                    | (0.7154, 0.7245)   |
| B <sub>13</sub> | 23.8                   | (23.618, 23.981)   | 1.02                     | (1.0120, 1.0279)   |

\* n = 3 en todos los casos \*\* N.C.No característico

Tabla 13 (cont.)

| Muestra         | $\bar{t}_r$ (min) | intervalo de confianza -<br>( $\alpha:0.05$ ) -<br>(min). | área (cm <sup>2</sup> ) | intervalo de confianza ( $\alpha:0.005$ )<br>(cm <sup>2</sup> ) |
|-----------------|-------------------|---|-------------------------|---|
| C <sub>1</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>2</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>3</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>4</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>5</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>6</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>7</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>8</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>9</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>10</sub> | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>11</sub> | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>12</sub> | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>13</sub> | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| C <sub>14</sub> | 24.0              | (23.909,24.090)   | 0.16                    | (0.1481,0.1713)   |
| C <sub>15</sub> | 24.0              | (23.909,24.090)   | 0.250                   | (0.2454,0.2545)   |
| C <sub>16</sub> | 24.0              | (23.920,24.079)   | 0.389                   | (0.3788,0.3992)   |
| D <sub>1</sub>  | N.C.              | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>2</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>3</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>4</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>5</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>6</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>7</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>8</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>9</sub>  | N.C               | ---   | ---                     | ---   |
| D <sub>10</sub> | 23.8              | (23.585,24.015)   | 0.105                   | (0.0948,0.1152)   |
| D <sub>11</sub> | 24.0              | (23.943,24.056)   | 0.105                   | (0.0971,0.1129)   |
| D <sub>12</sub> | 24.0              | (23.932,24.068)   | 0.180                   | (0.1709,0.1890)   |
| D <sub>13</sub> | 23.8              | (23.709,23.809)   | 0.200                   | (0.1909,0.2090)   |
| D <sub>14</sub> | 24.0              | (23.886,24.113)   | 0.213                   | (0.2062,0.2197)   |
| D <sub>15</sub> | 24.0              | (23.920,24.079)   | 0.255                   | (0.2470,0.2629)   |
| D <sub>16</sub> | 24.0              | (23.920,24.079)   | 0.280                   | (0.2743,0.2856)   |
| D <sub>17</sub> | 23.9              | (23.809,23.990)   | 0.300                   | (0.2943,0.3056)   |
| D <sub>18</sub> | 23.8              | (23.596,24.003)   | 0.350                   | (0.3420,0.3579)   |
| D <sub>19</sub> | 24.0              | (23.920,24.079)   | 0.842                   | (0.8261,0.8578)   |
| D <sub>20</sub> | 24.0              | (23.898,24.102)   | 0.879                   | (0.8677,0.8903)   |

Tabla 13 (cont.)

| Muestra         | $\bar{t}_r$ (min) | Intervalo de<br>confianza --<br>( $\alpha:0.05$ )<br>(min) | $\bar{área}$ (cm <sup>2</sup> ) | Intervalo de<br>confianza<br>( $\alpha; 0.05$ )<br>(cm <sup>2</sup> ) |
|-----------------|-------------------|--|---------------------------------|---|
| E <sub>1</sub>  | N.C               | —  | —                               | —   |
| E <sub>2</sub>  | 23.9              | (23.809, 23.990)   | 0.219                           | (0.2088, 0.2292)  |
| E <sub>3</sub>  | 24.0              | (23.932, 24.067)   | 0.239                           | (0.2272, 0.250)   |
| E <sub>4</sub>  | 23.8              | (23.790, 23.809)   | 0.250                           | (0.2365, 0.2635)  |
| E <sub>5</sub>  | 24.0              | (23.920, 24.079)   | 0.300                           | (0.2909, 0.3090)  |
| E <sub>6</sub>  | 24.0              | (23.920, 24.079)   | 0.370                           | (0.3592, 0.3802)  |
| E <sub>7</sub>  | 24.0              | (23.898, 24.102)   | 0.475                           | (0.4648, 0.4852)  |
| E <sub>8</sub>  | 24.1              | (24.032, 24.167)   | 0.495                           | (0.4825, 0.5074)  |
| E <sub>9</sub>  | 24.0              | (23.943, 24.056)   | 0.495                           | (0.4825, 0.5074)  |
| E <sub>10</sub> | 23.8              | (23.596, 24.003)   | 0.950                           | (0.9273, 0.9726)  |

Tabla 14

Tiempo de retención y área promedio correspondiente a patulina en el análisis de jugo de manzana.

| Muestra                          | $\bar{t}_r$ (min)* | Intervalo de confianza --<br>( $\alpha$ :0.05)<br>(min) | area (cm <sup>2</sup> )* | Intervalo de confianza<br>( $\alpha$ :0.05)<br>(cm <sup>2</sup> ) |
|----------------------------------|--------------------|---|--------------------------|---|
| D <sub>1</sub>                   | N.C                | ---   | ---                      |   |
| D <sub>2</sub>                   | N.C                | ---   | ---                      |   |
| D <sub>3</sub>                   | N.C                | ---   | ---                      |   |
| D <sub>4</sub>                   | N.C                | ---   | ---                      |   |
| D <sub>5</sub>                   | 24.0               | (23.932, 24.067)  | 0.139                    | (0.1288, 0.1492)  |
| D <sub>6</sub>                   | 24.0               | (23.909, 24.090)  | 0.239                    | (0.2265, 0.2514)  |
| F <sub>1</sub>                   | N.C                | ---   | ---                      | ---   |
| F <sub>2</sub>                   | N.C                | ---   | ---                      | ---   |
| F <sub>3</sub>                   | N.C                | ---   | ---                      | ---   |
| F <sub>4</sub>                   | N.C                | ---   | ---                      | ---   |
| G <sub>1</sub>                   | 23.8               | (23.709, 23.890)  | 0.345                    | (0.3348, 0.3552)  |
| G <sub>2</sub>                   | 24.0               | (23.921, 24.079)  | 0.375                    | (0.3648, 0.3852)  |
| G <sub>3</sub>                   | 24.0               | (23.909, 24.090)  | 0.389                    | (0.3810, 0.3969)  |
| G <sub>4</sub>                   | 24.0               | (23.909, 24.090)  | 0.389                    | (0.3799, 0.3980)  |
| G <sub>5</sub>                   | 23.8               | (23.698, 23.902)  | 0.435                    | (0.4248, 0.4451)  |
| G <sub>6</sub>                   | 24.0               | (23.921, 24.079)  | 0.455                    | (0.4448, 0.4652)  |
| G <sub>7</sub>                   | 24.0               | (23.943, 24.056)  | 0.510                    | (0.4896, 0.5303)  |
| G <sub>8</sub>                   | 24.0               | (23.932, 24.068)  | 0.650                    | (0.6375, 0.6624)  |
| H <sub>1</sub> - H <sub>16</sub> | N.C                | ---   | ---                      | ---   |

\* n = 3

\*\* N.C. no característico

Tabla 15.

Tiempo de retención y área promedio correspondiente a patulina en el análisis de Néctar de Pera.

| Muestra                         | $\bar{t}_r$ (min)* | Intervalo de confianza -<br>( $\alpha$ :0.05)<br>(min) | Area (cm <sup>2</sup> )* | Intervalo de confianza ( $\alpha$ :0.05)<br>(cm <sup>2</sup> ) |
|---------------------------------|--------------------|--|--------------------------|--|
| D <sub>1</sub>                  | N.C                | —  | —                        | —  |
| D <sub>2</sub>                  | N.C                | —  | —                        | —  |
| D <sub>3</sub>                  | N.C                | —  | —                        | —  |
| D <sub>4</sub>                  | N.C                | —  | —                        | —  |
| D <sub>5</sub>                  | N.C                | —  | —                        | —  |
| D <sub>6</sub>                  | N.C                | —  | —                        | —  |
| D <sub>7</sub>                  | N.C                | —  | —                        | —  |
| D <sub>8</sub>                  | 23.8               | (23.687,23913)   | 0.150                    | (0.1386,0.1613)  |
| E <sub>1</sub> - E <sub>6</sub> | N.C                | —  | —                        | —  |

\* n= 3

\*\* N.C no característico

Tabla 16

Interpolación en la curva de calibración de los valores de área de las muestras analizadas. \*

| Muestra         | $\eta$ ** (cm <sup>2</sup> ) | Néctar de manzana                                       |  |
|-----------------|------------------------------|---|--|
|                 |                              | $\hat{X}$ (µg x 10 <sup>-3</sup> )<br>( $\alpha$ :0.05) | Intervalo<br>estimado<br>(P:0.90,<br>$\alpha$ :0.05) |
| A <sub>8</sub>  | (0.3155, 0.3244)             | 4.91931   | (4.225, 5.575)                                       |
| A <sub>9</sub>  | (0.3933, 0.4066)             | 6.07981   | (5.350, 6.762)                                       |
| A <sub>10</sub> | (0.3985, 0.4074)             | 6.12333   | (5.425, 6.525)                                       |
| A <sub>11</sub> | (0.5205, 0.5294)             | 7.89309   | (7.200, 8.562)                                       |
| A <sub>12</sub> | (0.5411, 0.5588)             | 8.25575   | (7.400, 8.925)                                       |
| B <sub>10</sub> | (0.3133, 0.3266)             | 4.91931   | (4.187, 5.600)                                       |
| B <sub>11</sub> | (0.3269, 0.3490)             | 5.18043   | (4.380, 5.925)                                       |
| B <sub>12</sub> | (0.7111, 0.7288)             | 10.7218   | (10.000, 11.400)                                     |
| B <sub>13</sub> | (1.0045, 0.5588)             | 15.0736   | (14.350, 15.875)                                     |
| C <sub>16</sub> | (0.3691, 0.4088)             | 5.92024   | (5.000, 6.800)                                       |
| D <sub>17</sub> | (0.2899, 0.3110)             | 4.62919   | (3.825, 5.3875)                                      |
| D <sub>18</sub> | (0.3345, 0.3654)             | 5.3545  | (4.500, 6.150)                                       |
| D <sub>19</sub> | (0.8110, 0.8729)             | 12.4915   | (11.450, 13.500)                                     |
| D <sub>20</sub> | (0.8569, 0.9011)             | 13.0283   | (12.150, 13.950)                                     |
| E <sub>5</sub>  | (0.2823, 0.3176)             | 4.62919   | (3.750, 5.750)                                       |
| E <sub>6</sub>  | (0.3501, 0.3891)             | 5.64463   | (4.725, 6.500)                                       |
| E <sub>7</sub>  | (0.4551, 0.4949)             | 7.16778   | (5.750, 8.025)                                       |
| E <sub>8</sub>  | (0.4707, 0.5193)             | 7.45791   | (6.475, 8.425)                                       |
| E <sub>9</sub>  | (0.4707, 0.5193)             | 7.45791   | (6.475, 8.425)                                       |
| E <sub>10</sub> | (0.9058, 0.9942)             | 14.0582   | (12.850, 15.350)                                     |

\* Sólo se muestran los valores para muestras que presentaron picos con tr característico de patulina y cuya área fué mayor o igual a 0.2917, área correspondiente al límite de detección.

\*\*  $\eta$ : Intervalo estimado para el área con P:0.90 y  $\alpha$ :0.05 (ver figura 14).

\*\*\*  $\hat{X}$ : valor estimado de concentración de patulina por interpolación en la ecuación de regresión.

Tabla 16 (cont.)

| Muestra        | Jugo de manzana          |   | Intervalo estimado ( $\mu\text{g} \times 10^{-3}$ ) (P:0.90 $\alpha$ :0.05) |
|----------------|--------------------------|---|---|
|                | $\eta$ ( $\text{cm}^2$ ) | $\hat{X}$ ( $\mu\text{g} \times 10^{-3}$ )<br>( $\alpha$ :0.05) |   |
| G <sub>1</sub> | (0.3251,0.3649)          | 5.28197   | ( 4.3625,6.1500)  |
| G <sub>2</sub> | (0.3551,0.3949)          | 5.71716   | ( 4.8125,6.5875)  |
| G <sub>3</sub> | (0.3735,0.4044)          | 5.92024   | ( 5.0625,6.7250)  |
| G <sub>4</sub> | (0.3713,0.4066)          | 5.92024   | ( 5.0375,6.7375)  |
| G <sub>5</sub> | (0.4151,0.4549)          | 6.58753   | ( 5.6500,7.4750)  |
| G <sub>6</sub> | (0.4351,0.4749)          | 6.87766   | ( 5.9750,7.7500)  |
| G <sub>7</sub> | (0.4702,0.5498)          | 7.67551   | ( 6.4750,8.8000)  |
| G <sub>8</sub> | (0.6257,0.6743)          | 9.70637   | ( 8.7750,10.6250)   |

## Néctar de Pera

No se encontró contaminación

Tabla 17

Concentración de patulina en las muestras analizadas.

Néctar de manzana

| Muestra         | $\mu\text{g/l}$ de muestra ( $\alpha : 0.05$ ) | Intervalo estimado ( $\mu\text{g/l}$ )<br>(P. 0.90 $\alpha$ 0.05) |
|-----------------|--|---|
| A <sub>8</sub>  | 12.886   | ( 11,067, 14.604 )  |
| A <sub>9</sub>  | 15.926   | ( 14,014, 17.714 )  |
| A <sub>10</sub> | 16.040   | ( 14.210, 17.092 )  |
| A <sub>11</sub> | 20.676   | ( 18.860, 22.429 )  |
| A <sub>12</sub> | 21.626   | ( 19.384, 23.379 )  |
| B <sub>10</sub> | 12.886   | ( 10.969, 14.669 )  |
| B <sub>11</sub> | 13.570   | ( 11,473, 15.520 )  |
| B <sub>12</sub> | 28.086   | ( 26,195, 29.862 )  |
| B <sub>13</sub> | 39.485   | ( 37.590, 41,584 )  |
| C <sub>16</sub> | 15.508   | ( 13.097, 17.812 )  |
| D <sub>17</sub> | 12.126   | ( 10.019, 14.112 )  |
| D <sub>18</sub> | 14.026   | ( 11,788, 16.110 )  |
| D <sub>19</sub> | 32.721   | ( 29.993, 35.363 )  |
| D <sub>20</sub> | 34.127   | ( 31.827, 36.542 )  |
| E <sub>5</sub>  | 12.125   | ( 9.823, 15.062 )   |
| E <sub>6</sub>  | 14.786   | ( 12.377, 17.027 )  |
| E <sub>7</sub>  | 18.776   | ( 15.061, 21.021 )  |
| E <sub>8</sub>  | 19.536   | ( 16.962, 22.070 )  |
| E <sub>9</sub>  | 19.536   | ( 16.961, 22.070 )  |
| E <sub>10</sub> | 36.825   | ( 33.660, 40.209 )  |

\* Valores correlacionados con el volúmen de muestra, volúmen de inyección y % de recuperación de la técnica de extracción (76.35%)

Tabla 17 (cont.)

## Jugo de Manzana

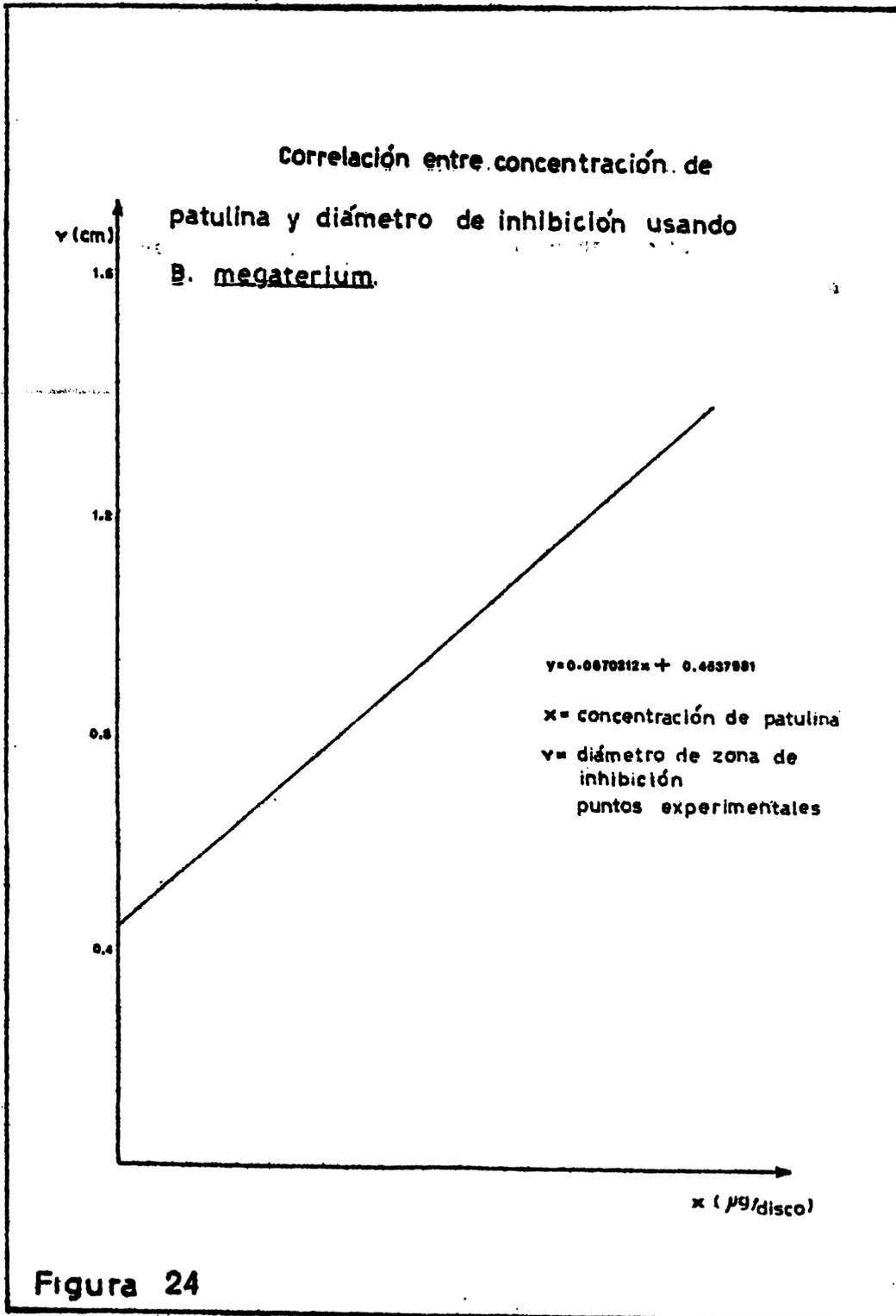
| Muestra        | $\mu\text{g}/\text{l}$ de muestra ( $\alpha 0.05$ ) | Intervalo estimado ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )<br>(P. 0.90 $\alpha$ 0.05) |
|----------------|---|--|
| G <sub>1</sub> | 13.836  | ( 11.427, 16.110 )   |
| G <sub>2</sub> | 14.976  | ( 12,606, 17.256 )   |
| G <sub>3</sub> | 15.500  | ( 13.261, 17.616 )   |
| G <sub>4</sub> | 15.508  | ( 13.195, 17.648 )   |
| G <sub>5</sub> | 17.256  | ( 14.800, 19.580 )   |
| G <sub>6</sub> | 18.016  | ( 15.651, 20,301 )   |
| G <sub>7</sub> | 20.106  | ( 16.961, 23.051 )   |
| G <sub>8</sub> | 25.425  | ( 22.986, 27,832 )   |

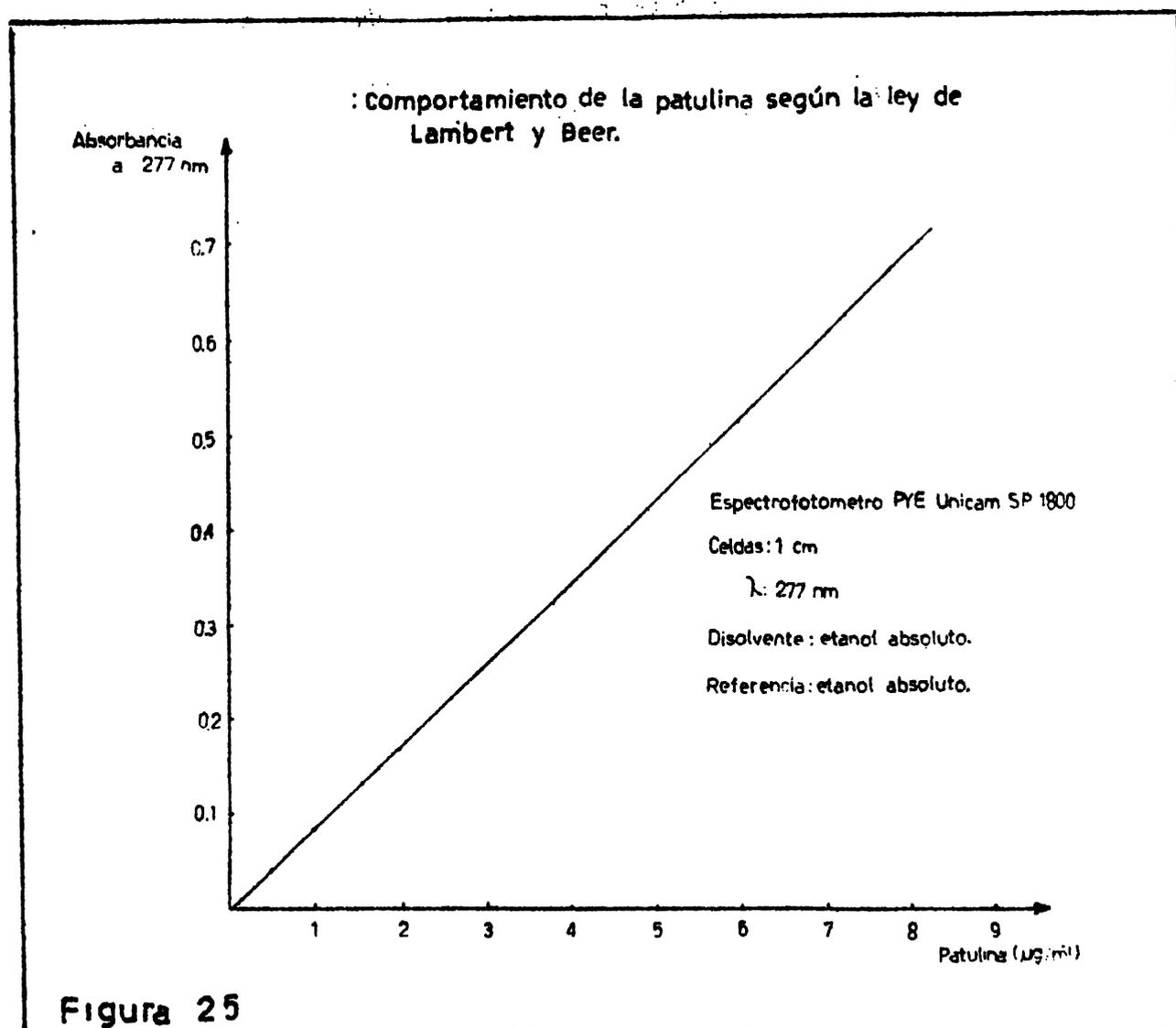
## Néctar de Pera

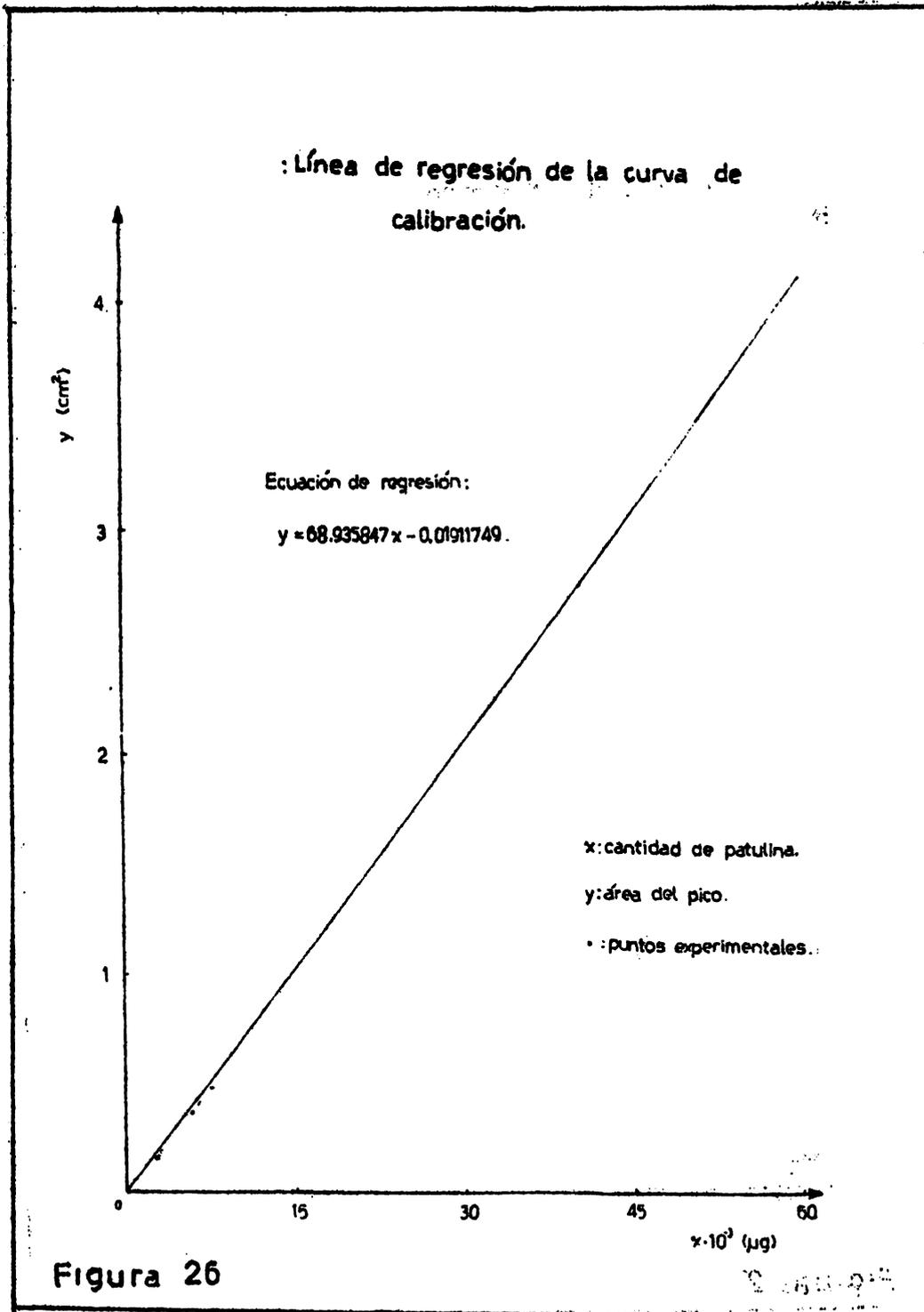
E<sub>1</sub> - E<sub>6</sub>

No se encontró contaminación.

D<sub>1</sub> - D<sub>8</sub>







: Región de Working-Hotelling para  
la curva de calibración.

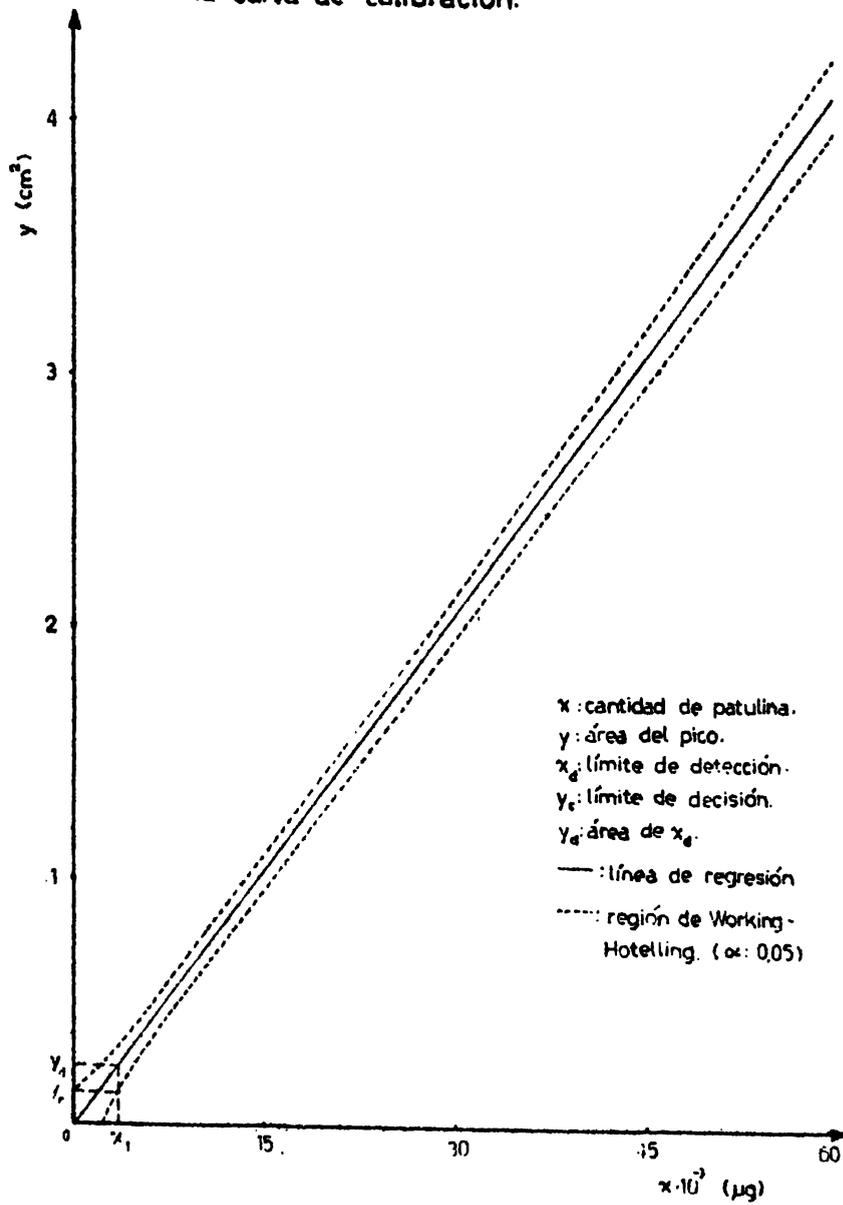
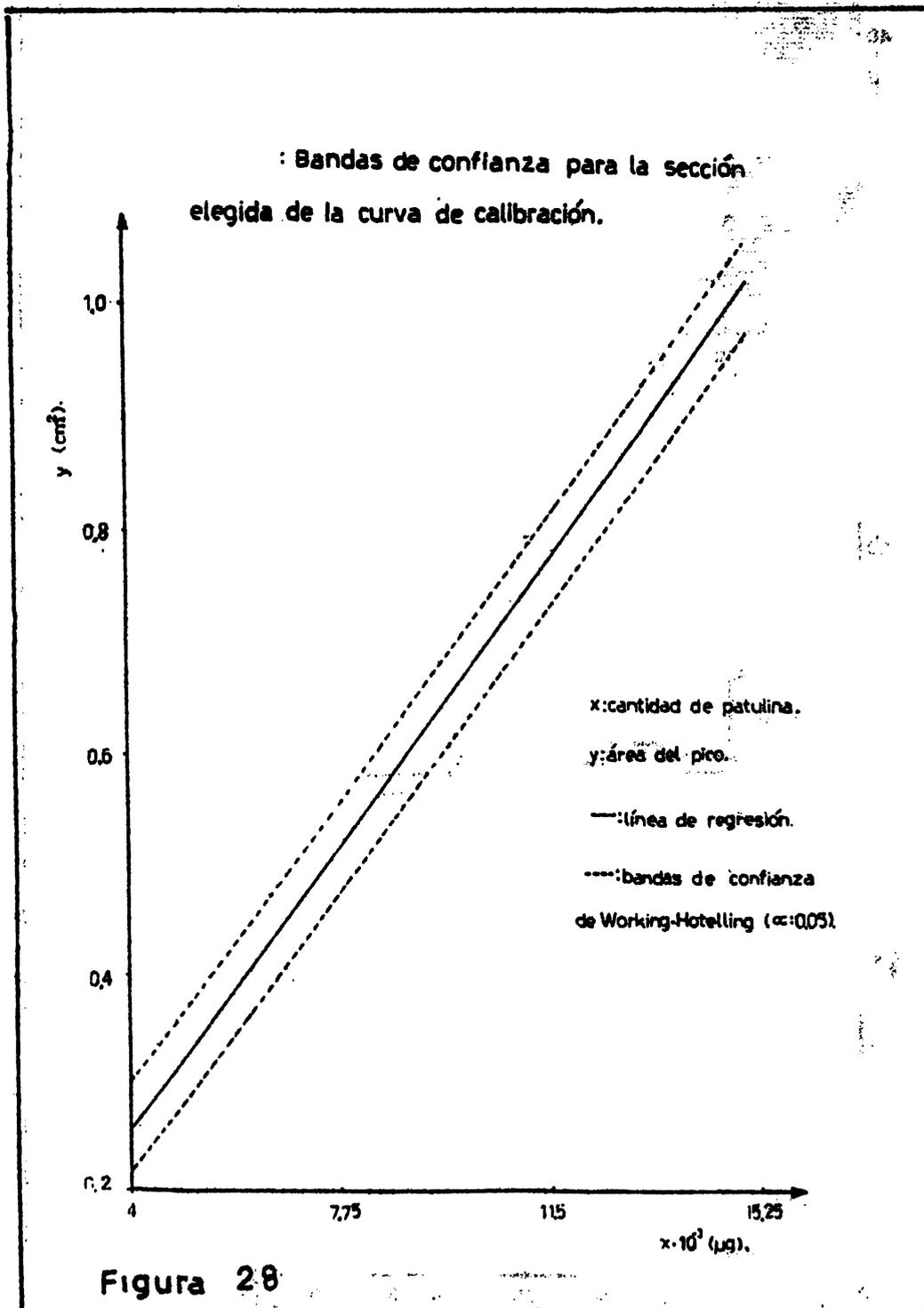
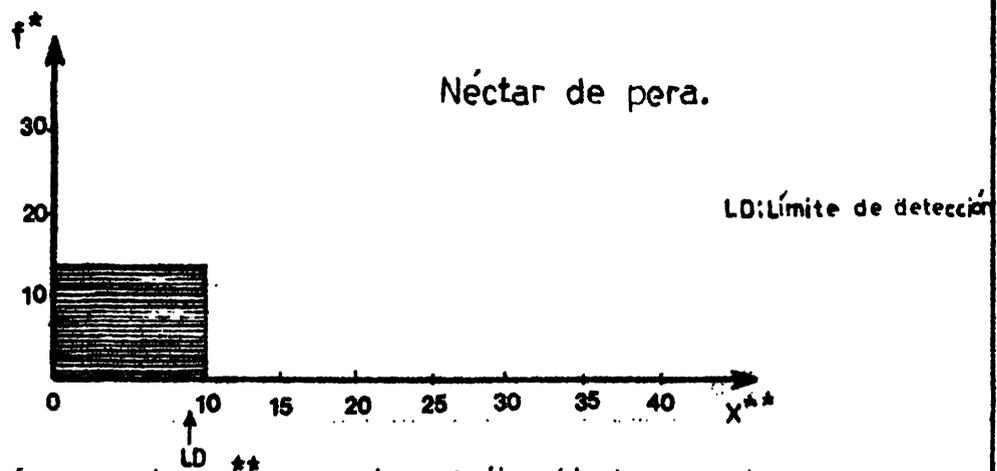
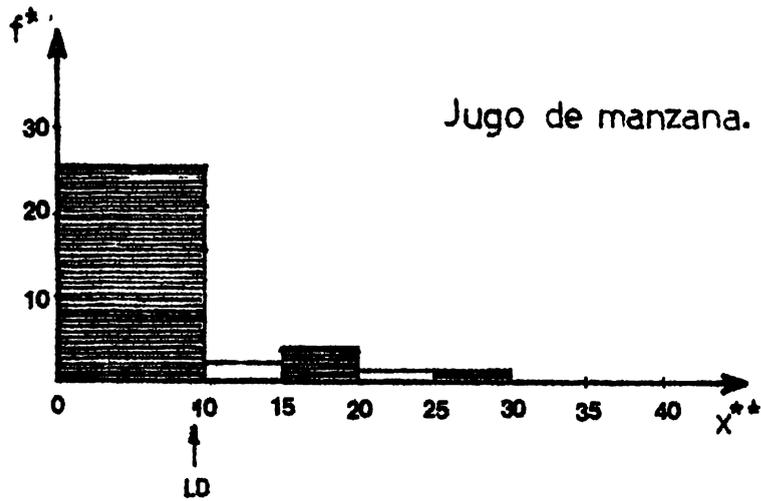
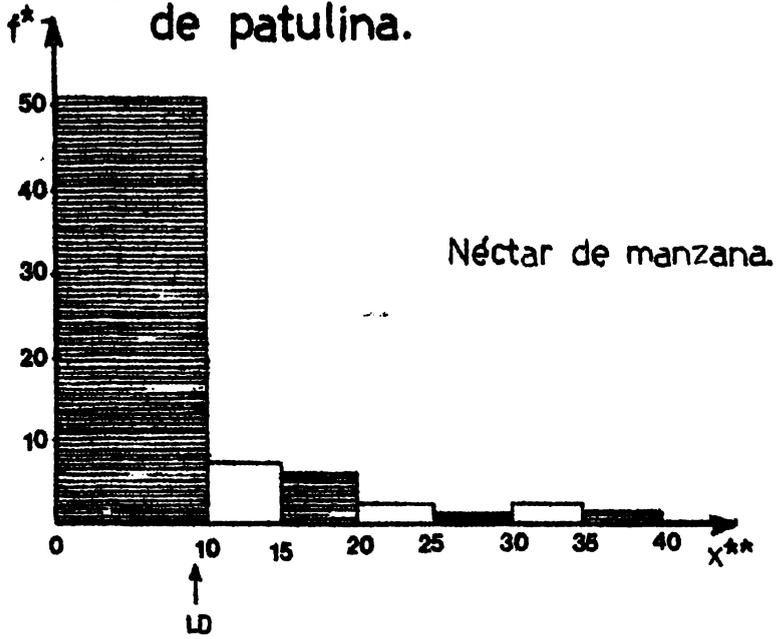


Figura 27



### Histogramas de distribución de los niveles de patulina.



\*f: frecuencia      \*\*x: µg de patulina/l de muestra.  
 LD: Límite de detección

Figura 29

## C O N C L U S I O N E S

En base a los resultados obtenidos se pueden generar las siguientes conclusiones:

1.- El hongo patógeno aislado de manzanas demostró su capacidad para producir patulina, sobre manzanas y en medio artificial.

2.- Las condiciones de análisis utilizadas, fueron idóneas para la determinación de la micotoxina en los productos seleccionados, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

3.- Los tratamientos estadísticos empleados contribuyeron a la elucidación del límite de detección de la técnica (9.2 ug/1 de muestra) y a presentar los resultados con una confiabilidad del 95%.

4.- El nivel de contaminación con patulina en los productos analizados fué bajo: 9.2 a 39.5 ug/1 de muestra. Estos resultados fueron inferiores a los límites estipulados en los países en que se considera a esta toxina dentro de la legislación para alimentos.

5.- La proporción de muestras contaminadas en relación al total de muestras analizadas fué pequeña: 28.20% de néctar de manzana, 23.53% de jugo de manzana y 0% de nectar de pera.

6.- El rango de concentración de la toxina en néctar de manzana fué ligeramente mayor al encontrado en el jugo de manzana aún en la misma marca, lo que se puede explicar por el -

uso de mayor proporción de la fruta (pulpa y jugo) utilizada en la elaboración de néctar.

7.- La calidad de los productos analizados es buena en relación a la contaminación con patulina. Considerando los niveles en los cuales ejerce sus efectos tóxicos, su ingestión es prácticamente sin riesgo.

8.- La determinación de la micotoxina puede emplearse como índice de calidad de la materia prima, sobre todo en el aspecto de sanidad de los frutos empleados.

## RECOMENDACIONES

1.- La calidad de las manzanas y peras utilizadas en los productos analizados, es buena, pero sería recomendable optimizar el procedimiento de selección y limpieza de la materia-prima a fin de eliminar la contaminación con patulina en el producto final. La eliminación de la cáscara por pelado alcalino (75) podría ayudar también en este punto por la poca estabilidad de la toxina en pH básico.

2.- En vista del probable amplio rango de susceptibilidad individual humana a las micotoxinas (10), es muy difícil estimar la dosis de máxima seguridad de ingestión de éstas. - Un análisis más extenso y profundo de los alimentos hará posible elucidar la extensión en la cual la dieta humana está contaminada con micotoxinas y permitirá, mediante correlaciones ingestión-efecto, determinar esa dosis máxima, además la continuación de estudios de este tipo permitirá conocer las implicaciones toxicológicas que pueden originarse de la ingestión de productos aparentemente seguros.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- AMIEBA O.E., R. MADRID, N. ARAGON. 1980 "Enfermedades postcosecha de manzana y su control" Departamento de Microbiología y Fitopatología. No. 1 CONAFRUT. SARH México, pag. 10.11. 24-27, 31.
- 2.- BAILEY. J.C, A. COX J. SPRINGER. 1978. High pressure liquid chromatographic determination of the intermediates/side reaction products in FD C Red. No. 2 and FD C Yellow No. 5. statistical analysis of instrument response. J. Assoc. Off. Anal. Chem 61 (6), 1404-1414.
- 3.- BURROUGHS F.L. 1977. Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60 (1) 100-103.
- 4.- CIEGLER A., A.C BECKWITH, K.L. JACKSON- 1976. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. Appl. Environ, Microbiol. 31 (5) - 664-667.
- 5.- CIEGLER A., R.F. VESONDER, K.L. JACKSON 1977. Production and biological activity of patulin and citrinin from Penicillium expansum. Appl. Environ. Microbiol. 33 (4) 1004-1006.
- 6.- DAILEY E.R., E. BROUWER, A. BLASCHKA, F. REINALDO ,S. GREEN, W. MONLUX, D. RUGGLES. 1977. Intermediate-duration toxicity study of patulin in rats. Toxicol. Environ. Health. 2 , 713-725.
- 7.- DAILEY E.R., A. BLASCHKA, E. BROUWER. 1977. Absorption - distribution and excretion of (<sup>14</sup>C) patulin by --- rats. Toxicol. Environ. Health. 3, 479-489.
- 8.- DIRECCION GENERAL DE NORMAS. 1969. Norma Oficial de Calidad para "Jugo de manzana" DGN-F-45. Departamento de Normalización Nacional. Secretaria de Industria y Comercio. México.

- 9.- DIXON W., F. MASSEY "Introducción al análisis estadístico".. Trad. J.P. Vilaplana. 2a. Ed. México, - McGraw Hill Editorial. 1970. p. 125-127, 136,380, - 381, 384, 385.
- 10.- ENOMOTO M., M. SAITO. 1972. Carcinogens produced by fungi. Ann. Rev. of Microbiol. 26, 279-312.  
a) DICKENS F., H. F. JONES. 1961. Brit. J. Cancer 20 , 134-144.
- 11.- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. " Micotoxins in Food and monitoring" en Food contaminants Analysis course. Phase VIII. Roma. United Nations Environment programme. 24. Feb-17 Mar. 1978.  
a) SERGEANT K., A. SHERIDAN, J. O'KELLY, R.B. CARNAGHAN. 1961. Nature,192, 1096.
- 12.- FORRESTER I.P., M. GAUCHER. 1972. Conversion of 6-methylsalicylic acid into patulin by Penicillium - urticae. Biochemistry 11, (6), 1102-1107.  
a) SHING, J. 1967. en "Antibiotics". Gattlieb D. and Shaw P.D. Ed. Nueva York, Springer Verlag. p. 621.
- 13.- GALLO. M.A., D.E. BAYLEY, S.G. BABISH, S.M. TAYLOR R.E. DAILY. 1977. Toxicity and reproduction studies with patulin in the rat. Toxicol. and Appl. Pharmacol. 41, (1), 139.
- 14.- GARZA. H.C., B.G. SWANSON. A.C. BRANEN 1977. Toxicological study of patulin in monkeys. J. Food Sci. - 42, (1). 1229-1231.
- 15.- GUTTERSSON M. "Fruit processing". London, Noyes data corp. 1971. (Food processing review No. 21) p. 87-89.
- 16.- HADDEN N., F. BAUMANN, F. MacDONALD, M. MUNK, R. --- STEVENSON, D. GERE, F. ZAMORONI, R. MAJORS. "Basic Liquid Chromatography" California, Varian Associates Ed. 1971.

- 17.- HAMMARSTRAND K. "Gas chromatographic analysis of pesticides". California. Varian Associates ed. 1976 p. 3,19.
- 18.- HARWIG J., B.J. BLANCHFIELD, G. JARVIS. 1977: Effects of water activity on disappearance of patulin and citrinin from grains. J. Food Sci. 42 (5) 1225-1228.
- 19.- HAYES P., P. GAYE. 1978. Inhibition of translation in reticulocyte lysate by the micotoxin patulin. - FEBS Letters 95 (2) 252-256.
- 20.- HORWITZ. ed. Natural poissons. Cap. 26. en " Official methods of analysis". Official Analytical Chemists, Washington, 1975.
- 21.- HUBAUX A., G. VOS. 1970. Decision and detection limits for linear calibration curves, Anal. Chem. 42 - (8), 849-855.
- 22.- HUDSON VALLEY APPLE PRODUCTS. 1979. Apple juice line squeezes out profits . Food Eng. International 4, (9) 52-55.
- 23.- HUNTER S.J., 1981. Calibration and the straight line: current statistical practices. J. Assoc. Off. Anal. Chem, 64 (3), 574-583.
- 24.- JOHNSON.L.E., R. STEVENSON. "Basic Liquid Chromatography ". California Varian Associates ed. 1978.
- 25.- KEILOVA RODOVA H. 1949. The effect of patulin on tissue cultures. Experientia 5, (6), 242.
- 26.- LIEU F., L.B. BULLERMAN. 1977. Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates. J. Food Sci. 42 (5), 1222-1224.
- 27.- LINDROTH S., A. VonWRIGHT. 1977. Comparison of the toxicities of patulin and patulin adducts formed with cysteine. Appl. Environ. Microbiol. 35 (6), 1004- 1007.
- 28.- LINDROTH S., R. NISKANEN. 1978. Comparison of potential patulin hazard in home-made and commercial apple products. J. Food. Sci. 43 (2) 446-449.

- 29.- LOVETT J. 1972. Patulin Toxicosis in poultry. Poul. Sci. 51. 2097-2098.
- 30.- LOVETT J., T. PEELER. 1973. Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. J. Food. Sci. 38 (6) 1094-1095.  
a) WEISNER B.P. 1942. Nature 149, 356.
- 31.- LOVETT J., G. THOMPSON, K. BOUTIN. 1975. Trimming as a means of removing patulin from fungus rotted apples J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58 (5), 909-911.
- 32.- LOVETT J., G. THOMPSON, K. BOUTIN. 1975. Patulin production in apples stored in a controlled atmosphere - J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58, (5), 912-914.
- 33.- MCNAIR D.H., B. ESQUIVEL. "Cromatografía líquida de alta presión" Washington D.C. Secretaría General de la Organización de los Estados Unidos Americanos --- (OEA) ed. 1973.
- 34.- MARON S., C. PRUTTON. "Fundamentos de fisicoquímica". 1a. Ed. México, Ed. Limusa. 1973. p. 306 -310.
- 35.- MAYER W.V., S.M. LEGATOR. 1969. Production of petite mutants of Sacharomyces cerevisiae by patulin. J. Agr. Food Chem, 17 (3) 454-456.
- 36.- MERCK Co. Inc. "The Merck Index". 9a. ed. U.S., the Merck Co. Ed. 1976. p. 914.
- 37.- MILEZEWSKI K.E.V., V. KRUSH. 1976. Research on the effect of micotoxins on cell cultures of human origin. Cytomorphological changes in relation to toxin concentration. Keiler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 28 (4), 391-457.
- 38.- MÖLLER E.T., E. JOSEFSSON. 1980. Rapid high pressure liquid chromatography of patulin in apple juice. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63 (5), 1055-1056.
- 39.- NIP K, S. CHU. 1977. Production of [<sup>14</sup>C] patulin by Penicillium patulum. Appl. Environ. Microbiol. 33 (4), 814-816.

- 40.- NORSTADT A.F., M.T. McCALLA. 1969. Patulin production by Penicillium urticae Bainier in batch culture. Appl. Microbiol. 17 (1), 193-196.
- 41.- OLIVIGNI J.F., L.B. BULLERMAN. 1978. Production of penicillic acid and patulin by an atypical Penicillium roqueforti isolate. Appl. Environ. Microbiol. 35 (2), 435-438.
- 42.- OUGH S.C., A.C. CORISON. 1980. Measurement of patulin in grapes and wines. J. Food. Sci. 45 (2), 476-478.
- 43.- PHILLIPS D.T., W.A. HAYES. 1978. Effects of patulin on the kinetics of substrates and cationic ligand activation of adenosine triphosphatase in mouse - brain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 205 (3), 606-615.
- 44.- PITT I.J. "The genus Penicillium and its teleomorphic states: Eupenicillium and Talaromyces" 1a. ed. Londres Academic Press. 1979. p. 45, 154, 155, 162-163, 316, 329, 613, 617.
- 45.- POHLAND E.A., R. ALLEN. 1970. Analysis and chemical confirmation of patulin in grains. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 53 (4), 686-687.
- 46.- POHLAND E.A., R. ALLEN. 1970. Stability studies with patulin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 53 (4), 688-691.
- 47.- POHLAND E.A., K. SANDERS, W. THORPE. 1970. Determination of patulin in apple juice. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 53 (4), 692-695.
- a) BIRKINSHAW J. H., et al. 1943. Lancet No. 245, 625-635.
- b) OOSTERHUIS H.K., 1945, Mededel. Lab. Phisiol. -- Chem. Univ. Amsterdam 10 (3), 116.
- 48.- REDDY S.C., P.K. CHAN, A.W. HAYES, W.L. WILLIAMS, A. CIEGLER. 1979. Toxicity of patulin and its interaction with penicillic acid. Federation Proceedings - 38 (3), 679.

- 49.- REDDY C.S., P.K. CHAN, A.W. HAYES. W.L. WILLIAMS, A. CIEGLER. 1979. Accute toxicity of patulin and its - interaction with penicillic acid in dogs. Food and cosmetics toxicol. 17 (6) 605-609.
- 50.- REISS J. 1972. Comparative investigation on the toxicity of some mycotoxins to the larvae of the brine - shrimp (Artemia salina L.). Zentralblatt fur Bakteriologie Parasitenkunde 155 (5) 531- 534.
- 51.- REISS J. 1972. Toxic effects of the mycotoxins aflatoxin B, Rubratoxin B. patulin and diacetoxyscirpenol on the crustacean Cyclopeus fuscus. J. Assoc. Off. - Anal. Chem. 55(4)- 895-896.
- 52.- REISS J. 1976. Mycotoxins in foodstuffs VII. Inactivation of patulin in whole wheat bread by sulfhydryl compounds, Cereal Chem. 53 (2). 150-152.
- 53.- RICE L.S. 1980. Patulin production by Byssochlamys spp in canned grape juice, J. Food. Sci. 45 (2) 485-496.
- 54.- SCOTT P.M., E. SOMERS 1968. Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. J. Agr. - Food. Chem. 16 (3) 483-485.
- 55.- SCOTT P.M., F.W. MILES, P. TOFT, G.J. DUBE. 1972. --- Ocurrance of patulin in apple juice. J. Agr. Food. - Chem. 20 (2) 450-451.
- 56.- SCOTT P.M., P.C. KENNEDY. 1973. Improved method of - thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56 (4) - 813-816.
- 57.- SCOTT P.M. 1974. Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin in apple -- juice. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57 (3) 621-625.
- 58.- SEKIGUCHI J., M. GAUCHER. 1977. Conidiogenesis and -- secondary metabolism in Penicillium urticae. Appl. Environ. Microbiol. 33 (1) 147-158.

- 59.- SEKIGUCHI J., M. GAUCHER. 1978. Identification of --  
Phyllostine as an intermediate of the patulin path-  
way in Penicillium urticae. Biochemistry. 17 (9) -  
1785-1791.
- 60.- SIRIWARDANA M.G., P. LAFONT. 1979. Méthode densitomé-  
trique de dosage de la patuline dans les jus de - -  
fruits. J. Chromatogr. 173, 425-428.
- 61.- SOMMER. F.N., R.J. BUCHANAN, J.R. FORTLAGE. 1974. --  
Production of patulin by Penicillium expansum. Appl. .  
Microbiol. 28 589-592.
- 62.- STINTSON E.E., N.C. HUHTANEN, E.T. ZELL. P. SCHWARTZ,  
F.S. OSMAN. 1977. Determination of patulin in apple  
juice products as the 2,4 dinitrophenylhydrazone de-  
rivative. J. Agr, Food, Chem 25, (5) 1220-1222.
- 63.- STOLOFF L. 1972. What FDA is doing about the mycoto-  
xin problem? en "Master manual of molds and mycoto-  
xins". Farm Technology/ agrifedman-Celanese Chemical  
Co. ed. U.S.A. p.61-63.
- 64.- STOLOFF L. 1981. Report on mycotoxins. J. Assoc. Off  
Anal. Chem. 64 (2), 376.
- 65.- STOTT T.W., L.B. BULLERMAN. 1975. Microbiological - -  
assay of patulin using Bacillus megaterium. J. Assoc.  
Off. Anal. Chem. 58 (3) 497-499.  
a) KLEMMER, H., A. RICKER, O. ALLEN. 1955. Phytopatho-  
logy 45, 618-625.  
b) KAVANAGH F. 1947. J. Bacteriol. 54, 761-766.
- 66.- STOTT T.W., L.B. BULLERMAN. 1975. Influence of carbo-  
hydrate and nitrogen source on patulin production by  
Penicillium patulum. Appl. Microbiol. 30 (5), 850-  
854.
- 67.- STRAY H. 1978, High pressure liquid chromatographic -  
determination of patulin in apple juice. J. Assoc. \_  
Off. Anal. Chem. 61 (6) 1359-1362.

- 68.- TEH WEI HU. "Econometría : Un análisis introductorio"  
1a. Ed. México. Fondo de cultura económica. 1979. -  
p. 48-59, 191-193.
- 69.- TRESSLER, JOSLYN. Apple juice. cap. 6 en "Fruit and  
vegetable juice technology". Connecticut U.S.A. AVI  
Publishing Co. 1971.
- 70.- UNITED STATES-JAPAN COOPERATIVE PROGRAM IN NATURAL -  
RESOURCES. (UJNR). "Proceedings of the first U.S.-  
Japan conference on toxic microorganisms, mycotoxin  
botulism" Publicado por UJNR. Joint panels and USDI  
Washington D.C. 1970. p. 12-18, 146-148, 195.
- 71.- URAGUCHI K., M. YAMAZAKI. "Toxicology, biochemistry -  
and pathology of mycotoxins". London. John Wiley  
Sons ed. 1978. p. 4, 26, 27, 65, 91, 92, 145, 147, -  
172, 175, 200, 212, 217, 233, 260.
- 72.- WARE M.G., W. THORPE, E. POHLAND. 1974. Liquid chro-  
matographic method for determination of patulin in  
apple juice. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57 (5),  
1111, 1113.
- 73.- WARE M.G., 1975. High pressure liquid chromatographic  
method for the determination of patulin in apple --  
butter. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58 (4), 754-756.
- 74.- WILSON D.M., J.G. NUOVO. 1973. Patulin production in  
apples decayed by Penicillium expansum. Appl. Micro-  
biol. 26 (1), 124-125.
- 75.- WOODROT, LUH. "Comercial Fruit Processing". Connec--  
ticut USA AVI. Publishing Co. 1975. p. 149-162.

## ANEXO I

### Interpretación estadística de los resultados.

Los estándares externos se usan comunmente en la --- práctica analítica. En muchos métodos, el analista usa - una curva de calibración lineal o curva patrón obtenida - de la medición de estándares, para estimar la concentra- ción de una muestra desconocida; en la cromatografía de - líquidos de alta presión se realizan determinaciones cuan- titativas utilizando una curva de calibración donde la -- respuesta en área bajo el pico se grafica como una función de la concentración, la línea que pasa por los puntos re- presentativos se denomina línea de regresión, esta línea es una estimación de la línea de calibración verdadera. Puede predecirse que cualquier nuevo estándar dará una señal que caerá en la vecindad de la línea obtenida, no necesariamen- te coincidirá con esa línea, esto se debe a que la línea de calibración es un estimado de la línea verdadera y que para un contenido dado, la señal de respuesta correspondiente - no asume un valor fijo sino que se distribuye al azar alrede- dor de un valor medio y esta distribución no se conoce con exactitud; en otras palabras la incertidumbre se debe a la falta de información y a la falta de reproducibilidad per- fecta inherente al método.

Los puntos más importantes de la construcción de una curva de calibración son:

- a) La elección del tratamiento matemático para el me- jor ajuste de la línea recta para los datos de calibración.
- b) La determinación del límite de detección.
- c) La determinación de la confiabilidad de los resul- tados en base a los datos obtenidos.

El tratamiento matemático más utilizado en estos casos es el modelo de regresión de una ecuación con el estimador de mínimos cuadrados, cuyo principio consiste en la elección de los valores de los coeficientes de regresión - ( a y b de la ecuación  $y = bx + a$  ) que minimizan la suma de las desviaciones al cuadrado entre los valores observados y los estimados de Y:  $\sum_{i=1}^n e_i^2$  donde  $e = y - \hat{y}$ .

La línea de regresión se calculó en este trabajo por este método, las ecuaciones empleadas fueron: ( 2 ).

La línea de regresión:

$$y = bx + a \quad (I)$$

Donde

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad a = \bar{y} - b\bar{x}$$

La correlación entre el área y la concentración se midió por el coeficiente de correlación lineal r:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (II)$$

Una vez determinada la ecuación de regresión se establecen varias limitantes; en este punto se han propuesto -- tres niveles:

a) Límite de decisión: que es la respuesta del instrumento arriba del cual una señal puede ser reconocida lo -- suficiente para ser detectada. Con este límite uno puede -- decidir si el resultado de un análisis indica la presencia o ausencia de la sustancia buscada.

b) Límite de detección: que es el nivel de señal neto que puede esperarse que conduzca a la detección, en un procedimiento analítico dado, es el Límite en el cual puede -- confiarse la detección del analito problema.

c) Límite de determinación, el nivel al cual la precisión de la medición es satisfactoria para análisis cuantitativo (21).

En ambos lados de la línea de regresión, pueden dibujarse dos límites de confianza, con un nivel de confianza  $\alpha$  escogido a priori. El tratamiento matemático fué descrito por Working y Hotelling en 1929 (23); la línea de regresión y sus dos límites de confianza representan una síntesis gráfica de nuestro conocimiento sobre la relación entre contenido y señal. Con ella podemos predecir con un contenido aún no explorado rendirá una señal que caiga dentro de la banda de confianza y hacer esta predicción con  $1 - \alpha$  de probabilidad. En general, la anchura de la banda de confianza depende de: la dispersión de las señales para un contenido dado, el conocimiento que tengamos de esa dispersión y el grado de incertidumbre sobre la verdadera posición de la línea de calibración. Los límites de confianza, no representan la dispersión de las señales sino nuestra capacidad para predecir valores probables para las señales. (21) (ver gráfica IV de la sección de resultados).

En este caso el procedimiento seguido para la determinación del límite de detección y las bandas de confianza fué el siguiente:

La línea de regresión (I) se resolvió para una concentración de cero para determinar un área de pico que es la esperada para un valor blanco (un valor blanco es aquel que no contiene la sustancia en cuestión), este valor corresponde al parámetro  $a$  de la ecuación (I), se calcularon los límites de confianza, éstos se derivan de la consideración de que cualquier valor  $y$  correspondiente a un valor dado  $x$  tiene una distribución gausiana alrededor de su valor calculado  $Y$ , los límites de confianza a cualquier punto  $x$  se expresan como:

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \pm t\sqrt{V(y)} \quad (\text{III})$$

t: corresponde a la probabilidad  $1 - \alpha$  para los límites superior e inferior. La varianza de y:  $V(y)$  es la suma de la varianza de  $\bar{y}$  más la varianza residual.

$$V(y) = V(\bar{y} + b(x - \bar{x})) + \sigma^2 \quad (\text{IV})$$

con:

$$V(\bar{y}) = \frac{\sigma^2}{n} \quad y \quad V(b) = \frac{\sigma^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{V})$$

La varianza  $\sigma^2$  puede reemplazarse por su estimado  $s^2$  y entonces queda:

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \pm st \sqrt{1 + \frac{1 + (x - \bar{x})^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{VI})$$

En particular para  $x = 0$

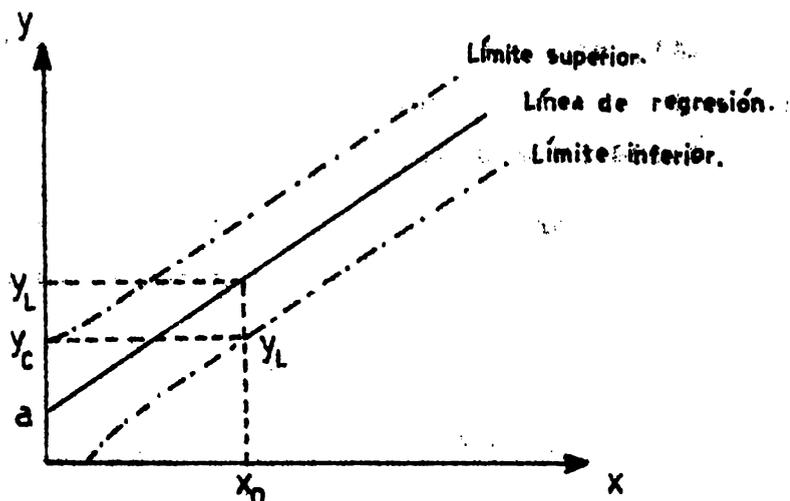
$$y_c = \bar{y} + b\bar{x} + st \sqrt{1 + \frac{1 + \bar{x}^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{VII})$$

$Y_c$  es el límite superior de predicción en el blanco al 99%, o límite de decisión, t se calculó de las tablas de t de student con  $n-2$  grados de libertad y  $\alpha = 0.01$ .  $Y_L$  -- es el límite inferior de predicción y esta dado por:

$$y_L = \bar{y} + b(x_p - \bar{x}) - st \sqrt{1 + \frac{1 + (x_p - \bar{x})^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{VIII})$$

El límite de detección se calculó por comparación de estos dos límites de predicción, los límites inferiores de confianza de compararon con el límite superior en el blanco hasta que se encuentra un límite inferior que fué mayor o igual al límite superior de predicción en el blanco, esto se realizó sustituyendo los valores de  $X_p$  en la ecuación VIII hasta que igualaron o superaron el valor de  $Y_c$ ,

el valor de  $x_p$  que produjo esto fué  $x_D$ , el límite de detección, gráficamente es más fácil visualizarlo:



La región de confianza para la línea entera está dada por:

$$a + bx \pm \left[ \frac{2F_{2, \nu, \alpha} \left( \frac{1 + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i/n)^2}}{n} \right)}{n} \right]^{1/2} s^2 \quad (IX)$$

donde  $F$  se encontró en las tablas de Snedecor (68) con  $\nu = n - 2$  grados de libertad y  $\alpha = 0.05$ , este es el intervalo de Working-Hotelling, que es una generalización de las ecuaciones (VII) y (VIII), ya que estas son sólo válidas para un valor preseleccionado de  $x_i$ , mientras que este es válido para cualquiera que sea el valor de  $x$ .

La región de confianza sobre la línea puede estrecharse limitando el rango de la variable  $x$  ( $C < x < e$ ) para la cual se requieren futuras predicciones, así los nuevos valores fueron:

$$a + bx \pm L W \quad (X)$$

donde L es una constante que se encontró en la tabla 2 de (23), esta constante L es función del rango escogido, en nuestro caso se encontró un valor de 0.89 para un intervalo  $0.004 < x < 0.015$ .

Para el problema inverso, o sea el determinar la concentración dada una área, se estimó el valor de la concentración x por :

$$x = \frac{y - a}{b} \quad (XI)$$

Y se mantuvo la región de Working-Hotelling para la línea entera.

Para dar resultados de estimación de concentración - confiables se usó el método de Lieberman, Miller y Hamilton, que construye un intervalo de confianza 100P% para la respuesta real  $\eta$  basada en las observaciones futuras y dadas por  $Y \pm Z_p \sigma^2$  donde  $Z_p$  es la desviación normal.

Debido a que  $\sigma$  se desconoce, el límite superior de -- confianza 100 (1- $\alpha/2$ ) % está dado por:

$$\sigma \leq \left[ \frac{Us^2}{\chi^2_{v, \alpha/2}} \right]^{1/2} \quad (XII)$$

Donde  $\chi^2_{v, \alpha/2}$  es el valor de la distribución chi - cuadrada ( ) con  $v = n-2$  grados de libertad. Los límites

$$y \pm Z_p \left[ \frac{Us^2}{\chi^2_{v, \alpha/2}} \right]^{1/2} \quad (XIII)$$

contendrán el valor verdadero  $\eta$  100 P% del tiempo y esta proposición está hecha con 100 (1- $\alpha/2$ ) % de confianza (23). (ver diagrama 6)