



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PROTOCOLO Y VALIDACIÓN PARCIAL DEL MÉTODO  
PARA DETERMINAR AFM<sub>1</sub> EN LECHE POR COLUMNA DE  
INMUNOAFINIDAD-HPLC”**

**TÉSIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**HUGO EMILIO GONZÁLEZ AUSTRIA**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Prof. Lucía Cornejo Barrera.  
**VOCAL:** Prof. María de Lourdes Gómez Ríos.  
**SECRETARIO:** Prof. Miguel Ángel Hidalgo Torres.  
**1er. SUPLENTE:** Prof. Juan Diego Ortiz Palma Pérez.  
**2° SUPLENTE:** Prof. Adelina Escamilla Loeza.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 4C, edificio A de la facultad de Química.

**ASESOR:** M. En C. Lucía Cornejo Barrera.

**SUSTENTANTE:** Hugo Emilio Gonzalez Austria.

---

---

## INDICE

	<b>Página</b>
1. IINTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVO.....	2
3. ANTECEDENTES.....	2
3.1. Hongos y micotoxinas. Antecedentes.....	2
3.2. Micotoxinas y micotoxicosis.....	4
3.3. Micotoxicosis en rumiantes.....	6
3.4. Especies productoras de Micotoxinas.....	6
3.5. <i>Aspergillus</i> . Características del microorganismo.....	7
3.6. Factores que influyen en la producción de Micotoxinas.....	8
3.7. Micotoxinas en alimentos.....	11
3.8. Aflatoxinas. Generalidades y características.....	13
3.9. Mecanismos de acción.....	15
3.10. Toxicidad.....	16
3.10.1. Aguda.....	16
3.10.2. Crónica.....	17
3.11. Aflatoxinas en alimentos.....	18
3.12. Aflatoxinas en la alimentación animal y humana.....	19
3.13. Tipos de Aflatoxinas.....	21
3.14. Aflatoxinas M <sub>1</sub> . Generalidades y características.....	22
3.15. Mecanismos de acción.....	23
3.16. Toxicidad.....	24
3.17. Aflatoxinas M <sub>1</sub> en leche.....	25
3.18. Ingesta diaria de aflatoxinas.....	26
3.19. Ingesta diaria de aflatoxinas M <sub>1</sub> .....	27
3.20. Control y prevención.....	28
3.21. Métodos de descontaminación.....	29
3.21.1. Físicos.....	29
3.21.2. Químicos.....	31
3.21.3. Biológicos.....	32
3.22. Análisis de micotoxinas en alimentos.....	32
3.23. Legislación.....	35
4. DESARROLLO DE LA GUÍA DEL CCAYAC-CR-03/0.....	41
4.1. Campo de aplicación.....	41
4.2. Fundamento del método.....	41
4.3. Equipos e instrumentos.....	41
4.4. Materiales.....	42
4.5. Reactivos.....	42
4.6. Muestras.....	48
4.7. Método de ensayo.....	52
4.8. Desarrollo experimental.....	53
5. PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS.....	62
5.1. Intervalo lineal.....	62
5.2. Intervalo de trabajo.....	65
5.3. Limite de cuantificación.....	68
5.4. Recuperación y sesgo.....	70
5.5. Repetibilidad.....	73
5.6. Precisión intermedia.....	74
5.7. Incertidumbre.....	75
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	85
7. CONCLUSIONES.....	88
8. GLOSARIO.....	89
9. BIBLIOGRAFÍA.....	90

## 1. INTRODUCCIÓN.

La Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), publicó desde el pasado 10 de Octubre del 2002, la convocatoria dirigida a las personas físicas y morales, interesadas en fungir como terceros autorizados, auxiliares en el control sanitario.

*“Los Terceros Autorizados son personas autorizadas por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), para apoyar a la autoridad en el control y vigilancia sanitarios a través de la realización de diversas pruebas analíticas, actos de muestreo y/o de verificación o para realizar estudios de bioequivalencia y/o biodisponibilidad” [1]*

Para alcanzar dicha autorización, se deben cumplir ciertos requisitos tales como capacidades financieras, de materiales, técnicas y humanas, solo por mencionar algunas. Un requisito, de los más importantes, consiste en demostrar la competencia técnica del personal encargado de llevar a cabo las metodologías experimentales; para este fin, los interesados en dicha autorización, deben llevar a cabo la Confirmación del método (Validación parcial), del método en cuestión, para que a través de la evaluación de los siguientes parámetros, se demuestre que el personal es apto para llevar a cabo el método.

- Intervalo lineal (Linealidad del Sistema)
- Intervalo lineal de trabajo
- Limite de Detección
- Limite de Cuantificación
- Por ciento de Recuperación. (Veracidad)
- Sesgo
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Incertidumbre

Si bien, existe una guía de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC-CR-03), en la cual se describen los requisitos y puntos a desarrollar para cumplir con una validación de un método, ya sea interno o normalizado por algún organismo nacional o extranjero; no existen documentos de acceso público, que ejemplifiquen una confirmación, que permita dar una idea, de lo que la comisión pedirá como trabajo final.

El propósito de este trabajo, es desarrollar la Confirmación de un método normalizado, extraído de la:

*“NOM-243-SSA1-2010 Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Numeral 8. Determinación de AFM<sub>1</sub> en leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado por columna de inmunoafinidad – HPLC”*

Y dejarla como guía de consulta y fácil acceso; además de demostrar experimentalmente, la metodología y todos los puntos críticos y deficiencias del método.

## **2. OBJETIVO.**

- Llevar a cabo la validación parcial del método para la determinación de Aflatoxinas M<sub>1</sub> en leche, que se encuentra publicado en la NOM-243-SSA1-2010, en el numeral 8; para que este trabajo sirva como una guía de referencia y de acceso público, al alcance de todos aquellos que estén interesados en consultar la información.

## **3. ANTECEDENTES.**

### **3.1. Hongos y micotoxinas. Antecedentes.**

Los hongos, han tenido un gran impacto en la vida humana, tanto por sus efectos destructivos como por los benéficos. Entre los nocivos, están una

amplia gama de agentes causales de enfermedades en cultivos, animales y humanos, además del deterioro en construcciones, cueros, fibras, alimentos y otros productos. Entre los efectos benéficos se pueden mencionar la obtención de antibióticos, fabricación de licores, pan, alimentación humana, reciclaje de nutrientes en el suelo a partir de materia en descomposición, producción industrial de compuestos orgánicos, control biológico de insectos y nematodos, así como otros usos en estudios científicos. **[2]**

Son organismos heterótrofos que se alimentan por medio de la absorción de nutrientes solubles. **[3]**

Pueden ser unicelulares o multicelulares y microscópicos o macroscópicos. Presentan dos tipos de células; la somáticas y las reproductoras, las primeras incluyen núcleos muy pequeños y su proceso de división es por mitosis, en tanto que las reproductoras poseen núcleos mas grandes y su división celular es por meiosis. Se encuentran ampliamente distribuidos y viven en cualquier sitio que presente material orgánico, agua y una temperatura adecuada, comprendida entre 4 y 60 °C; tienen importancia ecológica, medica, agrícola, industrial y económica. **[4]**

Algunos hongos producen cambios deseables en alimentos, aunque la mayoría dan lugar a cambios indeseables estéticamente hablando. Esto no es realmente importante. Lo que sin duda es importante son los aspectos sanitarios de la contaminación de los alimentos por mohos. **[5]**

Los hongos son extremadamente frecuentes en el medio natural, donde existen como saprofitos vivos. Son patógenos importantes para las plantas y es habitual que destruyan alimentos u otros productos de consumo. Son organismos metabolitamente versátiles y fuente de innumerables metabolitos secundarios, como alcaloides y otros compuestos tóxicos. **[6]**

Muchas especies de hongos producen compuestos venenosos denominados micotoxinas. La mayoría de ellas son compuestos resistentes al calor y de masa molecular relativamente baja. Por ejemplo, algunas setas del género

*Amanita* producen  $\alpha$ -amanitina, un péptidos cíclico termoestable, que es mortal por que inhibe a la RNA polimerasa de los mamíferos. [7]

Las micotoxinas, que derivan de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente, son compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación. Son moléculas relativamente pequeñas (PM < 700 kDa). La mayor parte de estos metabolitos secundarios se originan en la ruta policetónica. La cadena general policetónica, del tipo R-(CO-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-SCoA, es de la cual se derivan la mayoría de las micotoxinas. Pueden contaminar los alimentos, o los piensos, o las materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y trastornos, denominados micotoxicosis, y que resultan tóxicos para el hombre o los animales. [8]

Las micotoxinas son producidas como metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios de los hongos así como los de otros organismos son aquellos compuestos que son esenciales para el crecimiento. Los metabolitos secundarios se forman durante el final de la fase de crecimiento exponencial y carecen de importancia aparente para el organismo que los produce con respecto a su crecimiento o a su metabolismo. [9] [10]

### **3.2. Micotoxinas y micotoxicosis.**

La historia de las intoxicaciones por micotoxinas (micotoxicosis) data de la Edad Media, cuando Fueron frecuentes las epidemias de alucinaciones, delirio, convulsiones y gangrena; en el año 1850 se identificaron a los alcaloides del cornezuelo de centeno (productos secundarios del hongo *Claviceps Purpurea*) como agentes causales de la enfermedad. Se volvió a tener interés por las micotoxinas cuando a principios del año 1960 en el Reino Unido se produjo la muerte de miles de pavos y patos (enfermedad X del pavo) por contaminación de harina de cacahuate contaminada por micotoxinas, en concreto, por aflatoxinas. Hoy en día se conocen mas de 300 micotoxinas, químicamente

diferentes, formadas por mas de 350 especies de hongos, causantes de diversas enfermedades (micotoxicosis). **[11]**

Las micotoxicosis, son enfermedades ocasionadas por la ingestión de micotoxinas producidas por hongos filamentosos (mohos), que crecen sobre algunos alimentos. La incidencia de micotoxinas en la alimentación animal durante los últimos años es preocupante, al suponer que es la consecuencia de la evolución de nuevas técnicas de recolección y almacenamiento de los productos agrícolas, así como su forma de producción. **[12]**

La micotoxicosis suele ser el resultado de la ingestión accidental o con fines recreativos de hongos productores de toxinas. **[6]**

Ciertas revisiones sobre micotoxicosis, citan numerosos casos de intoxicaciones; un incidente en Paris en 1843 producido por raciones mohosas dadas al ejercito; una intoxicación en 1878 debida a un pudín enmohecido; y en los años 1906 y 1909, casos mortales debidos al consumo de harinas de cereales mohosos. A lo largo de la historia, los granos contaminados con mohos han causado enfermedades en zonas como Europa del Este, China y Japón. **[5]**

Un numero elevado de mohos producen micotoxinas. Unas son mutágenas y cancerigenas, otras manifiestan una toxicidad orgánica especifica, y otras son toxicas por otros mecanismo. Si bien, algunas micotoxinas no ha sido comprobada la toxicidad en humanos, el efecto de estos compuestos en animales experimentales y su efecto en los sistemas de pruebas *in vitro* deja pocas dudas a cerca de su toxicidad real y posible para los seres humanos. **[9]**

El modo de acción toxica de las micotoxinas esta determinado por su estructura química; dado el amplio rango de estructuras existentes entre las micotoxinas, sus efectos bioquímicos a nivel celular, entre otros, incluyen: interacciones con membranas celulares, interferencia con el metabolismo energético, interacciones con el ADN o moléculas proteinicas, inhibición de la

replicación del ADN, inhibición de la transcripción, interferencia con el metabolismo de purinas e interacciones con receptores hormonales. [11]

Al menos 14 micotoxinas son cancerígenas, siendo las aflatoxinas las más potentes. [9]

### **3.3. Micotoxicosis en rumiantes.**

Datos experimentales y experiencias clínicas sugieren que los rumiantes son los animales menos susceptibles a los efectos de la exposición a las micotoxinas. Esta afirmación se fundamenta en la función de los microorganismos presentes en el rumen, los cuales convierten algunas micotoxinas en metabolitos menos potentes o inactivos biológicamente. La composición de la ración de bovinos es diversa y depende del sistema productivo, lo cual determina la proporción de los componentes (concentrados, pastos, ensilados, heno, pajas) en la dieta, por lo que la concentración de micotoxinas presentes en la ración varía considerablemente, dificultando la estimación de la exposición en rumiantes. [32]

### **3.4. Especies productoras de micotoxinas.**

Como se ha visto, la toxicidad fúngica de los alimentos se debe en especial a la producción de micotoxinas como productos derivados del metabolismo intermediario de determinados hongos. [13]

Los hongos productores de aflatoxinas son de carácter ubicuo y se hallan presentes como contaminantes comunes de una gran variedad de alimentos, en especial granos y cereales. Esto representa un riesgo para la salud animal y humana. [14]

Las especies fúngicas toxigenicas que se encuentran más frecuentemente en alimentos pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. [15]

A continuación, se presentan dos tablas. En la tabla 1, se describen los principales géneros de hongos productores de micotoxinas. En la tabla 2, se destacan aquellos que producen mas especies micotoxígenas, así como su acción toxica principal.

Genero	Especies micotoxígenas
Penicillium	32
Aspergillus	15
Fusarium	12
Byssochlamys	2
Stachybotrys	2
Trichoderma	2
Alternaria	1
Chaetomium	1
Paecilomyces	1
Rhizopus	1

Tabla 1. Principales géneros de hongos productores de micotoxinas, ordenados según el numero aproximado de especies micotoxígenas que incluyen. [8]

#### Hongos productores de micotoxinas y acciones.

- *Aspergillus*  
Aflatoxinas: hepatotóxica, carcinogénicas, teratogénicas.  
Ocratoxinas A, B y C: nefrotóxicas, teratogénicas, hepatotóxicas.  
Esterigmatocistinas: carcinogénicas.
- *Penicillium*  
Ocratoxinas  
Patulína: carcinogénica, mutagénica.  
Rubratoxinas: teratogénicas, hepatotóxicas.  
Citrina: nefrotóxica.  
Tremorgenes: neurotóxicas.
- *Fusarium*  
Tricotecenos: hematotóxicas, teratogénicas.

Tabla 2. Géneros de hongos contaminantes, sus micotoxinas y su acción toxica principal. [16]

### 3.5. *Aspergillus*. Características del microorganismo.

Las especies de *Aspergillus* son hongos filamentosos que forman un micelio de hifas tabicadas y se reproducen con formación de conidios en conidióforos aéreos. Las principales especies patógenas son *A. fumigatus* y *A. flavus*, pero existen cientos de especies en el medio ambiente. Las especies se diferencian

por la configuración de los conidios en el conidióforo. Las especies de *Aspergillus* no son parte de la flora normal de los seres humanos. [17]

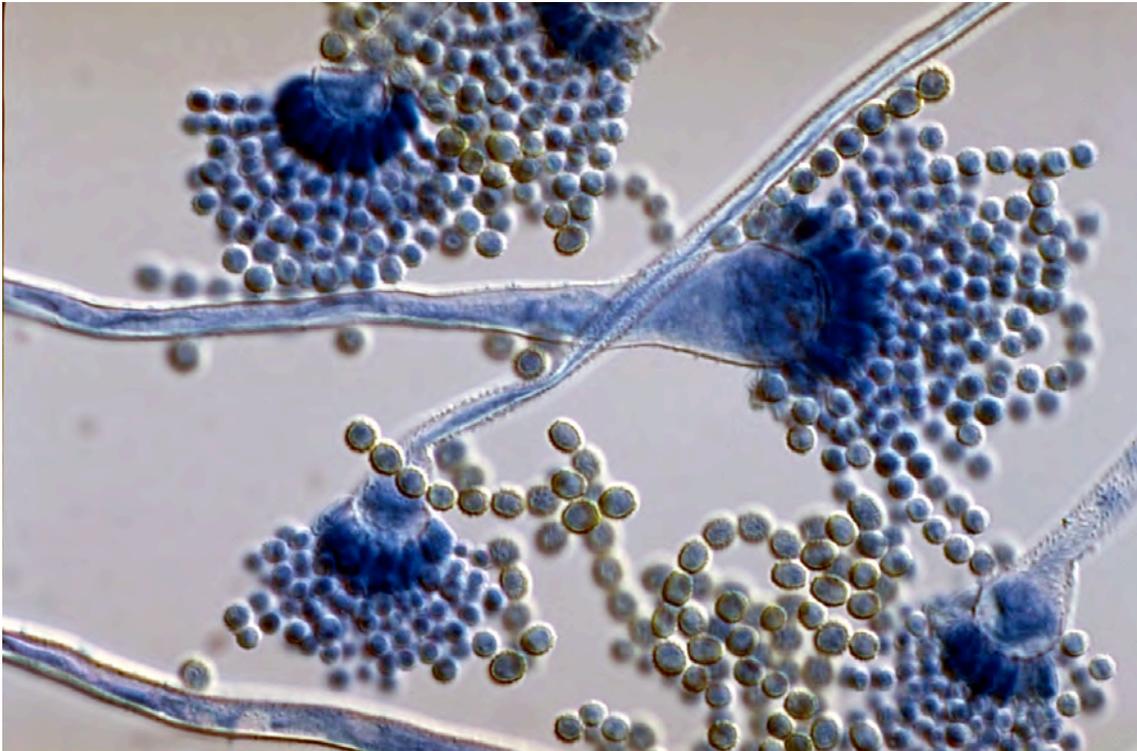


Figura 1. *Aspergillus flavus*.

### 3.6. Factores que influyen en la producción de micotoxinas.

Las micotoxinas son productos del metabolismo secundario de los mohos. Son el final de una serie de reacciones a partir de algunos productos del metabolismo primario, catalizadas por enzimas; en tales reacciones se crea una gran variedad de compuestos secundarios mas o menos tóxicos.

No todos los mohos elaboran micotoxinas. De las casi doscientas especies consideradas toxigenicas, existen cepas que producen micotoxinas y cepas que no las producen o las producen en muy poca cantidad. Por otro lado, el tipo de sustrato y las condiciones ambientales juegan un papel importante en el nivel de producción. [31]

Varias son las condiciones necesarias para que se produzca la contaminación de los alimentos con micotoxinas. En primer lugar, se necesita la presencia de

un hongo que las produzca. Este tipo de hongo es muy abundante y se ha detectado en numerosos alimentos y piensos. Después, el alimento debe constituir un sustrato aceptable, como también deberán ser aceptables los factores ambientales para el crecimiento del hongo y la producción de la micotoxina.

Los hongos pueden desarrollarse dentro de un amplio intervalo de temperaturas, en contraste con los otros microorganismos. Ni siquiera el almacenamiento a baja temperatura impide la formación de micotoxinas. Por tratarse de metabolitos secundarios, las micotoxinas no aparecen durante las primeras fases del desarrollo.

La humedad satisfactoria para el crecimiento y producción de toxina puede hallarse presente en el alimento antes de la recolección o durante la misma. El almacenamiento inadecuado puede elevar la humedad a un nivel apropiado para el crecimiento del hongo. El deterioro de la cáscara protectora de ciertos productos durante su recolección, aumenta la susceptibilidad de invasión por hongos.

Además de la temperatura y la humedad, también otros factores influyen en la producción de micotoxinas; así, la luz, la ventilación, condiciones nutricias, presencia de inhibidores fúngicos y desarrollo competitivo de otros microorganismos. [27]

Los alimentos que consumimos, en muy pocas ocasiones pueden considerarse estériles, ya que por lo general, contienen asociaciones microbianas cuya composición depende de que organismos llegan a ellos y de cómo se multiplican, sobreviven e interaccionan en el alimento en el transcurso del tiempo. Por su naturaleza, los alimentos son nutritivos y metabolizables, y por ello es de esperar que sean sustratos óptimos para el crecimiento y metabolismo de los microorganismos.

De toda la flora contaminante de los alimentos, sin tener en cuenta las condiciones de conservación o almacenamiento, solamente una parte de la

flora inicial llega a proliferar lo suficiente como para determinar la alteración de esos productos. En la práctica, se puede considerar una serie de factores que influyen en la selección de la microflora presente inicialmente en los alimentos y que son la causa de la multiplicación de una parte de ella. Estos factores se pueden agrupar de la siguiente manera:

1. Factores intrínsecos, relacionados con la composición química y las propiedades físicas o biológicas del alimento. Este apartado incluye, entre otros, la composición del alimento, así como la actividad de agua y el pH.
2. Factores extrínsecos o propios del ambiente donde se conserva el alimento. Están integrados principalmente por la temperatura de almacenamiento, la humedad ambiental, la tensión de oxígeno la composición gaseosa ambiental o del envase, y la presencia o ausencia de luz.
3. Factores relacionados con los tratamientos tecnológicos a los que ha estado sometido el producto. Estos tratamientos pueden ser físicos (principalmente térmicos), químicos y biológicos. Los primeros, sobre todo los relacionados con los tratamientos a altas temperaturas, pueden tener efectos letales sobre diferentes microorganismos, y los segundos repercuten en la composición química del producto.
4. Factores implícitos, es decir, las relaciones de dependencia o competencia entre los diferentes microorganismos que se encuentran en el alimento.

Estos cuatro grupos de factores o mecanismos de selección determinan la denominada resistencia a la colonización del alimento.

Concretamente, los alimentos que típicamente pueden ser alterados por mohos son muy diversos, entre los que destacan los cereales, semillas oleaginosas, frutas y legumbres, productos cárnicos y lácteos fermentados, frutos secos,

pasas, especias y productos de panadería, entre otros. Estos productos se caracterizan por tener un valor de actividad de agua y o un pH bajo. Estos dos factores, junto con el tipo de contaminación, parecen ser los determinantes de que los mohos sean capaces de desplazar a las bacterias y levaduras en la carrera por colonizar el alimento.

Los mohos, durante su crecimiento sobre el alimento toman de éste todo aquello que necesitan, tanto para su desarrollo como para producir la energía necesaria para llevar a cabo sus procesos vitales. Esto provoca en el alimento una serie de cambios o alteraciones, como la disminución de su valor nutritivo, cambios en su calidad organoléptica que afectan a la apariencia del alimento (ya sea en su olor, color, sabor y textura), la disminución de la capacidad de germinación en semillas, la pérdida de materia seca como consecuencia de la absorción de nutrientes y agua del grano por parte del micelio fúngico, y la producción de sustancias que pueden tener diversas actividades biológicas. Cuando son tóxicas para los humanos y los animales se les denomina micotoxinas.

La colonización fúngica y producción de micotoxinas en un alimento se desarrolla en una serie de fases o etapas como son la contaminación del alimento, la germinación de las esporas fúngicas, el crecimiento del micelio fúngico, y finalmente la producción y acumulación de las micotoxinas en el alimento. [8]

### **3.7. Micotoxinas en alimentos.**

En los últimos años se han identificado cientos de micotoxinas diferentes producidas por aproximadamente 200 hongos diferentes. Sin embargo, se sabe que solo un limitado número (aproximadamente 20) se presentan frecuentemente en alimentos en concentraciones significativas. [39]

Como ya hemos visto, el término de micotoxinas se refiere a una variedad de compuestos altamente tóxicos que son el resultado de un metabolismo secundario de origen fúngico y que son producidos en diferentes sustratos bajo

ciertas condiciones climatológicas. En general, los hongos pueden crecer y producir toxinas en un amplio rango de sustratos. **[11]**

Los hongos productores de toxinas han sido muy estudiados (mas que las toxinas bacterianas), a causa de:

1. Ubicuidad de las esporas de estos hongos, que pueden contaminar plantas, alimentos para consumo humano, piensos para animales y materia en descomposición.
2. Por que pueden estar presentes en alimentos aceptables desde el punto de vista organoléptico.
3. Por que estos producen toxinas que al ser ingeridas por los animales dan lugar a metabolitos tóxicos secundarios, que pasan a la leche, carne o huevos.
4. El riesgo carcinógeno que el consumo de sus toxinas representa. **[16]**

En la actualidad se conocen mas de 200 diferentes micotoxinas presentes en gran variedad de productos, tanto naturales como procesados; son compuestos tales como las aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, y zearalenona, entre muchas otras. **[18]**

Las micotoxinas exhiben una resistencia variable al procesamiento de los alimentos, tales como limpieza y molienda de cereales, procesos de horneado y panificación, tueste de semillas, producción de aceites vegetales, fermentación alcohólica, cocción, almacenamiento de carne y procesamiento de productos lácteos. En general, las micotoxinas son químicamente estables y resistentes, por lo que son capaces de persistir en los productos terminados.

**[11]**

### 3.8. Aflatoxinas generalidades y características.

El nombre de aflatoxinas, hace referencia al hecho de ser biosintetizadas por el hongo *Aspergillus flavus* y fue propuesto en 1962 por sus descubridores. La primera letra, la A, hace referencia al genero *Aspergillus*, las tres siguientes, FLA, proceden de la especie *flavus* y el termino TOXINA, se refiere a su efecto toxico. En cuanto a las aflatoxinas B y G, se les denomina asi por el color de la fluorescencia que emiten bajo la luz UV : azul (blue) y verde (green), respectivamente. La estructura de las aflatoxinas fue deducida alrededor de 1962 por el grupo de Asoa. [8]

Las aflatoxinas son producidas por *Aspergillus flavus*, pero también por *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus nomius*

Dichas aflatoxinas son liberadas por el micelio del hongo al sustrato y llegarán a los animales a través de los alimentos, por ejemplo, los piensos. [19]

Representan el grupo de toxinas mas conocido y estudiado hasta el presente. Son sustancias biogenéticas y están estructuralmente relacionadas. Químicamente son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona, comunes en todas ellas, tienen pesos moleculares de entre 312 y 346 kDa, la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, tales como el cloroformo o el metanol, en forma cristalina son bastante termoestables, soportan pH de entre 3 y 10, y sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C. Se conocen 18 tipos de toxinas dentro de este grupo, de los cuales, como ya se menciono, las mas conocidas son la B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (la numeración 1 y 2 dentro de cada grupo hace referencia a su movilidad cromatográfica relativa). [20]

Resulta fácil distinguirlas si se observa su estructura, contienen en su molécula una mitad de dihidrofurano o tetrahydrofurano unida a un anillo cumarina; las aflatoxinas del grupo B contienen un anillo de ciclopentanona, las del grupo G

contienen una lactona, las del grupo M son derivados hidroxilados del grupo B. **Ver figura 2.**

Pueden formarse en productos alimenticios tales como cacahuates, nueces, semillas de algodón, granos de cereales y también en higos. La aparición de alimentos contaminados con aflatoxinas ocurre tanto en países industrializados como en países en vía de desarrollo. [11]

Originalmente se identificaron cuatro aflatoxinas, hoy en día, se conocen muchas más, incluyendo una denominada M<sub>1</sub> (del inglés *milk*), la cual se presenta en la leche si el animal consume alimento contaminado con la aflatoxina B<sub>1</sub>. Todas tienen una estructura similar, con algunos pequeños cambios en los grupos funcionales. La estructura que poseen las aflatoxinas les confiere gran estabilidad al calor y como consecuencia de esta característica, la pasteurización y otros tratamientos térmicos usados en el procesamiento de alimentos no las eliminan. [21]

Son los carcinógenos hepáticos más potentes que se conocen en la actualidad, de hecho, son una de las principales causas implicadas en el desarrollo de carcinomas hepatocelulares. Prácticamente afectan a todos los animales y al hombre. [22]

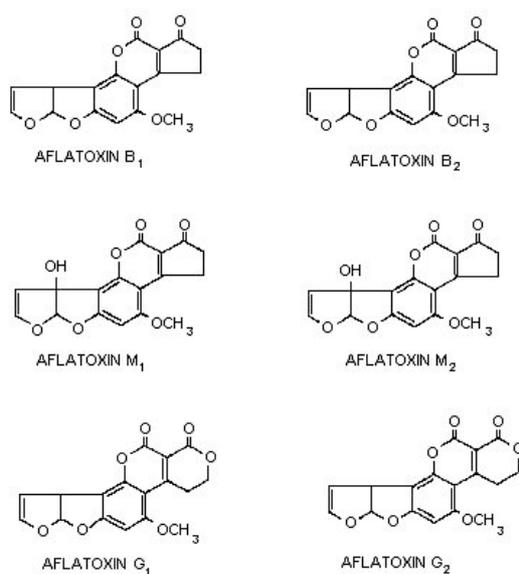


Figura 2. Estructuras de las aflatoxinas B, G y M.

### 3.9. Mecanismos de acción.

Las aflatoxinas revisten mucho interés en salud pública por que se ha comprobado que son altamente carcinogénicas y producen principalmente cáncer de hígado. [21]

Entre las aflatoxinas estudiadas, la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es la más importante, seguida por la aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), la AFB<sub>2</sub> y la AFG<sub>2</sub>. La AFB<sub>1</sub> es citotóxica y carcinógena, inhibe la síntesis de ADN y ARN (experimentos realizados en ratas tratadas con 5 mg de AFB<sub>1</sub>/kg de pienso durante seis semanas demuestran estos efectos. La AFB<sub>1</sub> se biotransforma al metabolito activo AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido, el cual se une covalentemente con el N en posición 7 de la guanina, formando el aducto AFB<sub>1</sub>-N7-guanina en las células diana, originando mutaciones, transversiones G----T, lesiones en el ADN y subsiguiente formación de tumores. En el hombre, los carcinomas hepatocelulares observados han sido ligados a la transversion G----T en el codón 249 del gen supresor del tumor p-53. Este metabolito reactivo epóxido (AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido) también puede hidrolizarse a AFB<sub>1</sub>-8,9-dihidrodiol, el cual se ioniza para formar una base de Schiff con los grupos amino primarios en las proteínas. El metabolito AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido también se ha asociado en animales con coagulopatía debida a una reducción de la síntesis de vitamina K y otros factores de coagulación. Con respecto a los efectos citotóxicos, la AFB<sub>1</sub> induce peroxidación lipídica, lo que conduce a un daño oxidativo en los hepatocitos. La AFB<sub>1</sub> inhibe la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclico, en tejidos tales como cerebro, hígado, corazón y riñón. [11]

La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), se considera la más importante de toda la serie, normalmente aparece con mayor frecuencia y a mayor concentración que las otras aflatoxinas. Es absorbida en el intestino delgado y transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, mayoritariamente por vía portal. La toxina entra a la célula y es metabolizada en el retículo endoplásmico para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos tales como las aflatoxinas M<sub>1</sub>. [25] [26]

### **3.10. Toxicidad.**

Las aflatoxinas causan necrosis aguda, cirrosis y carcinomas hepáticos en un gran número de especies animales; ninguna especie animal es resistente a los efectos tóxicos agudos de las aflatoxinas, por ello, es lógico asumir que en la especie humana produzca efectos semejantes. Se ha observado una gran variación en los valores de las  $DL_{50}$  determinadas experimentalmente en diversas especies animales a las que se administró una dosis única de Aflatoxina. En la mayoría de las especies, los valores de la  $DL_{50}$  varían de 0.5 a 10 mg/kg de peso corporal. Las especies animales responden de forma distinta en su susceptibilidad a la intoxicación crónica y aguda de las aflatoxinas. La toxicidad está influenciada por los factores ambientales, nivel de exposición y duración de la misma, edad y estado sanitario y nutritivo de la dieta. [25]

Las Aflatoxinas son aguda y crónicamente tóxicas en animales y humanos, no solo por la cirrosis y lesiones hepáticas, también por que son promotoras de tumores, además de sus efectos como inmunodepresores, ya que pueden actuar solas o en conjunto con otras micotoxinas. [26]

Estos compuestos de anillo plano se intercalan con los ácidos nucleicos de las células y actúan como mutágenos, por desplazamiento del marco de lectura, y puede derivar en un proceso carcinogénico. Esto sucede principalmente en el hígado, donde se convierten en derivados inestables. [12]

El comité científico de la Alimentación Humana de la UE ha señalado que la  $AFB_1$  es un agente cancerígeno genotóxico que contribuye al riesgo de padecer cáncer hepático, incluso a dosis sumamente bajas.

#### **3.10.1. Aguda.**

Los síntomas de la intoxicación aguda, tienen lugar cuando se ingieren grandes cantidades de aflatoxinas, las cuales, como se ha mencionado anteriormente, son absorbidas en el intestino delgado llegando hasta el hígado. La presencia de aflatoxinas en el hígado da lugar a una infiltración de lípidos que originara

necrosis y/o muerte celular hepática. En el hígado las enzimas oxidasas las biotransforman en una serie de metabolitos, algunos altamente reactivos, que tienen la capacidad de unirse covalentemente con el ADN, ARN y proteína. Los metabolitos originados reaccionan con diferentes proteínas celulares, lo cual origina la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la inhibición del metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos. Paralelamente, se observa la falta de apetito (anorexia), depresión, ictericia, diarrea y fotosensibilización, llegando a la muerte, en el caso de los animales, en un periodo que puede variar entre 12 y 27 días tras el consumo del alimento contaminado. También exhibe efectos citotóxicos debido a que induce la peroxidación lipídica en el hígado produciendo un daño oxidativo en los hepatocitos. Además, la AFB<sub>1</sub> puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclica en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales.

### **3.10.2 Crónica.**

La intoxicación crónica, que es la forma mas frecuente, se debe al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de aflatoxinas durante semanas y/o meses. Los síntomas en animales no son muy específicos: reducción en la ganancia de peso, menor índice de conversión, disminución en la producción de huevos y leche y mayor susceptibilidad frente a diversas enfermedades infecciosas. Este ultimo síntoma se debe a los efectos inmunosupresores ocasionados por la reactividad de las aflatoxinas con las células T y por la disminución en la actividad fagocitaria de los macrófagos. En general, las aves son mas sensibles a las aflatoxinas que los mamíferos. El orden de susceptibilidad en aves es: patos < pavos < pollos; y en mamíferos, el orden es el siguiente: perros < cerdos < terneros < ovejas < ganado bovino. Una explicación de por que es menos susceptible el ultimo grupo reside en que las enzimas bacterianas presentes en el rumen tienen la capacidad de degradar a las aflatoxinas haciéndolas perder su toxicidad. **[8]**

Aunque la actividad carcinogénica se desarrolle principalmente en el hígado, las aflatoxinas pueden inducir la formación de tumores en otros órganos, especialmente, el riñón. **[27]**

### 3.11. Aflatoxinas en alimentos.

En diversos alimentos se ha detectado crecimiento de cepas de mohos toxigénicos y de micotoxinas específicas. Entre ellos están el maíz, trigo, cebada, centeno, arroz, ejotes, chicharos, cacahuete, queso, embutidos secos, especias, sidra de manzana, harinas de cereales, semillas de algodón, entre otras. El consumo de alimentos contaminados con micotoxinas puede causar micotoxicosis en seres humanos. La alimentación de animales y aves con productos que contienen mohos, también puede ocasionar que los alimentos obtenidos de aquellos estén contaminados con micotoxinas. [28]

De todas las micotoxinas conocidas las de mayor interés son las Aflatoxinas, metabolitos de *Aspergillus Flavus* y *A. Parasiticus*, ya que son potentes carcinógenos hepáticos, especialmente la Aflatoxina B<sub>1</sub> (la cual, se encuentra con mayor frecuencia en los alimentos). [29]

Las aflatoxinas se han detectado como contaminantes naturales en un gran número de productos agrícolas, habiéndose confirmado su presencia en prácticamente todas las zonas del mundo y, en mayor o menor grado, en casi todos los alimentos de primera necesidad.

La infección fúngica y la contaminación por aflatoxinas pueden ocurrir en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde el cultivo, hasta la recolección, el transporte, el almacenaje y el procesado de los diferentes productos agrícolas. Los factores que favorecen la proliferación de los hongos aflatoxigénicos son principalmente las altas temperaturas y una elevada humedad relativa, así como la humedad del suelo, las sequías extremas y los daños producidos en las semillas y frutos por golpes mecánicos y el ataque de insectos, roedores, pájaros, etc., los cuales constituyen excelentes vías de entrada para el desarrollo de los hongos y la eventual formación de las aflatoxinas. [8]

Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación fúngica y la consiguiente producción de aflatoxinas incluyen típicamente al maíz, los

cacahuates, pistachos, nueces de Brasil, semillas de algodón, semillas de la copra, semillas oleaginosas como girasol y soja, en aceites vegetales sin refinar, frutos secos como almendras avellanas y nueces, en especias como el pimentón, chili y pimienta, en frutas secas como higos y pasas, en el café y el cacao, en productos derivados de los cereales y en los piensos. [8] [30] [24]

### **3.12. Aflatoxinas en la alimentación animal y humana.**

El problema de las micotoxinas es desde hace 20 años cada vez mas preocupante en alimentación animal, en razón de la evolución de las técnicas de recolección y almacenamiento.

La alimentación animal, esta principalmente constituida por brotes de oleaginosas, cereales o derivados, forraje, ensilados, etc. Todos ellos, sustratos particularmente propicios para el desarrollo de diversos grupos de mohos. [31]

Estos alimentos se elaboran en forma de harina o granulado (*pellets*). En las que están en forma de harinas, muchos de los ingredientes, como los cereales, se deben procesar por completo antes de agregarse al pienso.

La mayoría de estos compuestos básicos se asocian a menudo a mohos micotoxigénicos o bien a sus micotoxinas. En algunos casos la infección o la contaminación se producen durante el crecimiento de la planta, y en otros después de la cosecha y durante el almacenamiento. [32]

Los animales mas jóvenes son mas susceptibles a la Aflatoxicosis que los adultos y la resistencia varia según las especies. Entre las aves de corral, las mas susceptibles son los patos, seguidos de los pavos, faisanes, gansos y pollos. En el ganado, los mas susceptibles son los cerdos jóvenes, las cerdas en gestación, terneras, cerdos adultos, vacuno adulto y corderos. La mayoría de los animales de laboratorio, son asi mismo susceptibles. El efecto de las aflatoxinas sobre los animales depende del tipo de las mismas, de la especie animal, edad, peso, salud y alimentación. [27]

Algunos investigadores han reportado desde 1984 que los rumiantes padecen menos micotoxicosis, debido a la flora rumial que actúa como primera línea de defensa contra las micotoxinas. La fracción protozoaria del ecosistema microbiano del rumen parece ser mas efectiva en el metabolismo de las micotoxinas que la formación bacteriana, pero los protozoarios son mas sensibles a estas toxinas. Bacterias como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium*, y *Anaerovibrio lipolytica* son capaces de usar toxina T-2 como fuente de energía a través de dos sistemas enzimáticos.

Las aflatoxinas son parcialmente degradadas por la flora ruminal, formando un metabolito secundario denominado aflatoxicol. Ciertos metabolitos de las aflatoxinas, como el aflatoxicol y la AFM<sub>1</sub>, han sido detectados en rumen. La fracción de aflatoxinas restante que no fue degradada es absorbida en el tracto digestivo por difusión pasiva y es biotransformada en el hígado a diversos metabolitos. La presencia de AFM<sub>1</sub> en el contenido ruminal sugiere que podría deberse a la recirculación de la vía hepática ruminal. Puesto que la degradación ruminal de la AFB<sub>1</sub> es minima y la toxicidad del metabolito aflatoxicol es similar a la aflatoxina original, se puede concluir que el paso de las aflatoxinas por el rumen no disminuye su toxicidad. **[32]**

En el hombre es diferente. Los hábitos alimenticios varían de un lugar a otro y, exceptuando algunos países castigados por el hambre, la diversificación de nuestros alimentos impide la absorción regular de cantidades suficientes de toxina para llegar a ser peligrosas. **[31]**

Hay abundantes pruebas de que las aflatoxinas producen enfermedades agudas y crónicas en animales ¿qué efecto tienen en las personas? No se ha experimentado con voluntarios dispuestos a ingerirlas. Lo que se sabe concierne únicamente a casos de ingestión de alimentos naturalmente contaminados con ellas. Por ejemplo, se detecto aflatoxina B<sub>1</sub> en muestras de deposiciones, orina, hígado, cerebro y riñón provenientes de niños Tahí muertos de encefalopatía e hígado graso. **[27] p 199**

### 3.13. Tipos de aflatoxinas.

Las micotoxinas más conocidas son las aflatoxinas, producidas principalmente por *Aspergillus Flavus*, un moho presente en numerosos sustratos, principalmente en granos y en tortas de oleaginosas.

Esta especie produce varias aflatoxinas de estructuras químicas parecidas derivadas de la metoxicumarina. La más importante es la Aflatoxina B<sub>1</sub>. [31]

Luego del incidente de los Pavos Ingleses en la década de los 60's, se procedió a analizar parte del pienso contaminado con *Aspergillus flavus*: un cromatograma del extracto del pienso mohoso observado a la luz ultravioleta puso de manifiesto cuatro fracciones, dos azules y dos verdes. Las sustancias tóxicas recibieron el nombre de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, correspondiendo las letras al color (Blue-Green) y al número de movilidad relativa. En la actualidad, son trece los compuestos de esta clase observados en la naturaleza. Todos ellos poseen un núcleo de cumarina unido a un bifurano. Ocho aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>2a</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, R<sub>0</sub> o Aflatoxicol o AFL y Q<sub>1</sub>) poseen un anillo de penteno, mientras que cuatro G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>2a</sub> y GM<sub>1</sub> lo poseen séxtuple de lactona. La otra toxina fue considerada un parasiticol (B<sub>3</sub>) similar a la serie B, salvo que el anillo penteno está abierto. [27]

Hay alrededor de 20 diferentes tipos de AF, las más importantes por su alto potencial cancerígeno, mutágeno y teratógeno son: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub> y AFD, este último derivado del tratamiento de la AFB<sub>1</sub> con amonio. Otro metabolito muy tóxico de la AFB<sub>1</sub> es el aflatoxicol (AFL). Sólo las AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> se sintetizan naturalmente de la AFB<sub>1</sub>; las otras AF (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>, G<sub>2a</sub>, B<sub>2a</sub> y AFL) son hidroxilados productos del metabolismo animal o microbiano. La AFB<sub>1</sub> es la más peligrosa y tóxica de todas. [33]

### 3.14. Aflatoxinas M<sub>1</sub>. Generalidades y características.

En 1963, Allcroft y Carnaghan observaron que la leche de las vacas alimentadas con piensos contaminados con aflatoxina B<sub>1</sub> contenía una sustancia que producía los mismos efectos tóxicos en los patos que la AFB<sub>1</sub>. Nombraron a esta micotoxina M (Milk aflatoxin). Posteriormente, el grupo de Holzapfel aislaba aflatoxina M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> (Ver figura 3) y determinaron sus estructuras concluyendo que estas micotoxinas eran la forma hidroxilada de la AFB<sub>1</sub> y de la AFB<sub>2</sub> respectivamente. [8]

La aflatoxina M<sub>1</sub>, el metabolito principal de la B<sub>1</sub> ingerida por los animales, se excreta corrientemente por la leche y la orina del ganado vacuno y de otras especies de mamíferos. [25]



Figura 3. Estructuras de las Aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>

Se trata en realidad, de dos derivados hidroxilados de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, que se han denominado, respectivamente, aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, y de las que destaca la M<sub>1</sub> por ser un hepatocarcinógeno potencial tan peligroso como la aflatoxina B<sub>1</sub>.

Existen hasta el momento dieciocho tipos de aflatoxina de las cuales la más tóxica es la AFB<sub>1</sub>, seguida de la AFM<sub>1</sub> (derivado metabólico de la AFB<sub>1</sub>) y la AFM<sub>2</sub> (derivado metabólico de la AFB<sub>2</sub>). La menor toxicidad de la AFM<sub>2</sub> frente a la AFM<sub>1</sub> es debido a que la primera de ellas ha perdido el doble enlace del anillo difurano. [30]

### **3.15. Mecanismos de acción.**

La aflatoxina B<sub>1</sub> es posiblemente el cancerígeno hepático mas potente que se conoce para muchas especies animales, incluida la humana. **[34]**

Los primeros estudios que se realizaron de la toxicidad de la AFM<sub>1</sub> revelaron que esta poseía similar toxicidad a la AFB<sub>1</sub>, pero actualmente se conoce que es menos tóxica y menos hepatocarcinogénica que su antecesora metabólica (2 al 10 % de la AFB<sub>1</sub>). La mayor importancia toxicológica de la AFM<sub>1</sub> radica en que al poder encontrarse en la leche o productos lácteos y no ser un producto detoxificado, constituye un peligro para la salud pública. **(35)**

La aflatoxina B<sub>1</sub> se absorbe fácilmente en el tubo digestivo y en el comienzo se distribuye en el hígado, órgano en donde se somete a metabolismo de primer paso extenso. La sustancia en cuestión es metabolizada por CYP que incluyen IA2 y 3A4 para generar un 8,9-epóxido o productos hidroxilados en la posición 9 (aflatoxina M<sub>1</sub>). Los productos de hidroxilación son menos susceptibles a la epoxidación y en consecuencia, son productos de desintoxicación. La Aflatoxina M<sub>1</sub> se incorpora a la circulación y es excretada por la orina y la leche. **[36]**

Si el ganado consume piensos contaminados con aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, excretará leche contaminada con aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>. **[12]**.

La cantidad de aflatoxinas M<sub>1</sub> que pasa a la leche es proporcional a la ingesta de aflatoxinas B<sub>1</sub>. **[27]**.

Cuando la AFB<sub>1</sub> es absorbida por el tracto gastrointestinal pasa al hígado donde es metabolizado por las monooxigenasas microsomales de las células hepáticas. Los productos de degradación de la AFB<sub>1</sub> y metabolitos no conjugados de esta pasan al sistema circulatorio y se distribuyen en la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. Aproximadamente el 50% de la AFB<sub>1</sub> es eliminada por la bilis en su forma conjugada con glutatión, ácido glucorónico, o con sulfato y entre el 15 y 25% es eliminada por la orina de forma inalterada o

previamente metabolizada. Su eliminación es lenta ya que solo el 70 a 80% se elimina cuatro días después de haber sido ingerida según se ha observado en el ratón, mono y rata. En sangre, una elevada proporción de AFB<sub>1</sub> se fija a la albúmina y una pequeña cantidad (1 a 10%) se une covalentemente a las proteínas hepáticas.

La AFM<sub>1</sub> es el derivado metabólico más importante de la AFB<sub>1</sub>. La concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche variará según la cantidad de AFB<sub>1</sub> ingerida, la duración del consumo del alimento contaminado y el estado de salud del animal. [8]

### **3.16. Toxicidad.**

La aflatoxina M<sub>1</sub> actúa en el hígado, aunque también es tóxica para el tubo digestivo y el sistema hematológico. La exposición a dosis grandes origina necrosis aguda en el hígado, que causa ictericia y en muchos casos, la muerte. La toxicidad aguda para dicha sustancia es relativamente rara en seres humanos y equivale a consumir miligramos de aflatoxina al día durante muchas semanas. [36]

La AFM<sub>1</sub> produce en patos y ratas efectos tóxicos agudos similares a la AFB<sub>1</sub>. En un estudio realizado en patos de un año de edad, la DL<sub>50</sub> obtenida para ambas micotoxinas fue de 12 a 16 µg. Además se observó que la AFM<sub>1</sub> causa lesiones hepáticas parecidas a las producidas por la AFB<sub>1</sub> y necrosis en los túbulos renales.

La AFM<sub>1</sub> y la AFB<sub>1</sub> TD<sub>50</sub> (dosis de micotoxina con la cual el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) de 10.38 y 1.15 µg/kg pc/día, respectivamente, por lo que se considera que la potencia carcinógena de la AFM<sub>1</sub> es aproximadamente 10 veces inferior a la de la AFB<sub>1</sub>. En 1993 la AFM<sub>1</sub> fue clasificada como posible carcinógeno en humanos. Según estudios *in vitro* en rata la AFM<sub>1</sub> es genotóxica y mutagénica (test de Ames) pero en menor proporción que la AFB<sub>1</sub>.

Aun no está del todo claro el metabolismo de la AFM<sub>1</sub>, su activación y mecanismos de detoxificación en humanos. La AFM<sub>1</sub> induce cáncer de hígado en roedores por un mecanismo similar a la AFB<sub>1</sub>, la AFM<sub>1</sub> es oxidada por las oxigenasas de la función mixta de la citocromo P450 del hígado, oxidación que da lugar a un reactivo 8,9-epóxido que ataca los residuos de guanina de la doble hélice de DNA. Sin embargo, la formación de epóxidos en hepatocitos humanos es menor que en células de rata y el mecanismo de detoxificación mediante la conjugación con la glutatión-S-transferasa es más rápida en ratones que en humanos. En dichos estudios, a diferencia de la AFB<sub>1</sub>, la AFM<sub>1</sub> parece tener un efecto citotóxico directo en células humanas que no precisa de activación metabólica previa.

El metabolismo oxidativo de la AFB<sub>1</sub> a su forma epóxido y a AFM<sub>1</sub> puede bloquearse *in vitro* (hepatocitos humanos) e *in vivo* (ratas) mediante un tratamiento con oltipraz, un medicamento antiúlcero que bloquea la formación del epóxido e induce la formación de la enzima más importante de detoxificación de la AFB<sub>1</sub>, la glutatión-S-transferasa. Esta sustancia se está utilizando en ensayos clínicos en China para la prevención del cáncer de hígado. [8]

### **3.17. Aflatoxinas M<sub>1</sub> en leche.**

Las aflatoxinas pueden llegar a la leche indirectamente a través del consumo de alimentos infectados por hongos. Las vacas, son más resistentes a las aflatoxinas que la mayoría de los animales y pueden ingerir alimentos contaminados con niveles relativamente altos de aflatoxinas sin que desarrollen síntomas de toxicidad aguda. Sin embargo, aunque no lleguen a presentar síntomas de intoxicación, la leche excretada si se vera contaminada por aflatoxinas M<sub>1</sub>. [30]

Numerosos estudios y programas de monitoreo se han realizado para intentar conocer el nivel de contaminación por AFM<sub>1</sub> en leche y productos lácteos. En muchos de ellos, sobre todo en los países en vías en desarrollo, se observa que la presencia de AFM<sub>1</sub> está relacionada con determinadas condiciones

ambientales de humedad y temperatura que facilitan el crecimiento de los hongos en piensos. Además, durante el buen tiempo, en muchas zonas el ganado se alimenta de los pastos, pero con el frío existe el riesgo de que los piensos que se utilicen para alimentarlos estén almacenados durante un largo periodo y por lo tanto contaminados.

Se ha observado en los últimos años una disminución progresiva de AFM<sub>1</sub> en leches comerciales y derivados. Actualmente un porcentaje muy elevado de las muestras analizadas están por debajo de 0.05 ng/mL, el valor máximo permitido por la comunidad Europea y la FAO. Sin embargo, no hay que olvidar que el riesgo de la AFM<sub>1</sub> sobre la salud es a nivel crónico debido a una exposición continua por lo que análisis en leche y productos lácteos se han de seguir realizando a pesar de que en muchos lugares no se superen los límites establecidos.

El hombre al igual que los animales metaboliza la AFB<sub>1</sub> a AFM<sub>1</sub> y las elimina por orina y leche materna. Este es uno de los puntos importantes a controlar por los efectos de la AFM<sub>1</sub> en el recién nacido, sobre todo en países en vías de desarrollo en los que la dieta de la población se basa fundamentalmente en cereales y otros alimentos susceptibles de ser contaminados. [8] [37]

### **3.18. Ingesta diaria de aflatoxinas.**

La Unión Europea mantiene que para este tipo de sustancias no existe ningún umbral por debajo del cual no se hayan observado efectos nocivos, por lo tanto no considera pertinente fijar una dosis diaria tolerable y ha seguido el principio de fijar los límites legales en los niveles más bajos posibles. De este modo, y admitiendo que en el momento actual no es posible la eliminación total de la presencia de aflatoxinas en los productos alimenticios, la concentración más baja permitida de AFB<sub>1</sub> en alimentos tales como los cereales y ciertos frutos secos, esta establecida en 2 µg/kg. [8]

### 3.19. Ingesta diaria de aflatoxinas M<sub>1</sub>.

La dificultad que conlleva el cálculo de las ingestas diarias reales de AFM<sub>1</sub> en cada país para evaluar los niveles de exposición humana hace que los programas de monitorización sean la principal estrategia para reducir los riesgos de exposición en animales y en el hombre. Para evaluar el riesgo sobre la salud que supone la presencia de AFM<sub>1</sub> en los alimentos, concretamente en leche y derivados lácteos, es necesario estimar la composición de estos productos en la dieta y conocer los residuos que cada uno de estos pueda contener. [8]

La potencia carcinogénica de la AFM<sub>1</sub> es significativamente inferior a la de la AFB<sub>1</sub>; así pues, la AFM<sub>1</sub> y la AFB<sub>1</sub> tienen una TD<sub>50</sub> (dosis de micotoxina con la cual el 50 % de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) de 10.38 y 1.15 µg/kg pc/día, respectivamente, lo que hace suponer que la AFM<sub>1</sub> es aproximadamente nueve veces menos carcinogénica que la AFB<sub>1</sub>.

La TDI (ingesta de micotoxina diaria que puede ser tolerada) para la AFB<sub>1</sub> esta comprendida entre 0.11 y 0.19 ng/kg pc/día (0.00011 y 0.00019 µg/kg pc/día), con un factor de seguridad de 5000 y un nivel de riesgo de 1/100000.

Los valores de NOAEL (estimación del nivel de micotoxina con el que no se observan efectos adversos) para la AFM<sub>1</sub> y la AFB<sub>1</sub> son < 2.5 y 0.75 µg/kg pc/día, respectivamente.

Si dividimos el valor de TD<sub>50</sub> correspondiente a la AFM<sub>1</sub> por el factor de seguridad 5000, podríamos atribuir hipotéticamente, un valor de TDI para la AFM<sub>1</sub> de 2 ng/Kg p.c./día (0.002 µg/kg pc/día), lo que representa, aproximadamente, diez veces más de tolerancia que la AFB<sub>1</sub> comparado con el mayor valor de TDI para la AFB<sub>1</sub>. [39]

En la siguiente tabla se muestra la ingesta de leche según distintas dietas, los niveles de AFM<sub>1</sub> que se encontraron tras el análisis de un gran número de

muestras y la ingesta de aflatoxinas. En ningún caso las ingestas diarias estimadas superan las ingestas diarias tolerables. [8]

Dietas	Ingesta de leche (kg/día)	AFM <sub>1</sub> en leche (µg/kg)	Ingesta diarias estimadas de aflatoxinas	
			ng/persona/día	ng/kg/día
Europea	0.29	0.023	6.8	0.11
Latinoamericana	0.16	0.022	3.5	0.058
Asia	0.032	0.36	12	0.20
Oriente medio	0.12	0.005	0.6	0.10
África	0.042	0.002	0.1	0.002

Tabla 3. ingesta de leche según distintas dietas.

### 3.20. Control y prevención.

El control de las aflatoxinas en los alimentos se basa generalmente en técnicas de selección que separan los productos afectados (frutos secos, granos y semillas). En el maíz, semillas de algodón e higos la búsqueda de aflatoxinas se realiza examinándolos bajo luz UV; las porciones que emiten fluorescencia suelen estar contaminadas. Dado que todos los granos de cacahuete fluorescen al exponerlos a la luz UV, este método no sirve para dicho grano. En este caso, se puede utilizar maquinas que separan electrónicamente por color a los granos, aquellos que estén contaminados, presentan un color distinto. [34]

Los sistemas de control de las aflatoxinas en alimentos y piensos son esencialmente las mismas que se aplican al control de la toxina microbiana. Debe impedirse la contaminación del alimento por *A. Flavus* y/o *A. Parasiticus* e inhibir su crecimiento y la producción de toxina. Se puede analizar el alimento en búsqueda de aflatoxinas y de hallarse esta presente, eliminarla o detoxificarla.

A partir del momento en que se sospecha que los cultivos están contaminados por hongos, se puede recurrir a remedios que impidan la penetración de aflatoxinas. Por ejemplo; controlar la recolección y la acción de los insectos para evitar cultivos dañados, controlar la humedad puede prevenir el

crecimiento del hongo, el almacenamiento a bajas temperaturas impide el crecimiento de *Aspergillus Flavus*. [27]

### **3.21. Métodos de descontaminación.**

#### **3.21.1 Físicos.**

Los procedimientos de descontaminación basados en principios físicos básicamente se clasifican en cuatro tipos:

Extracción con disolventes: Por ejemplo, etanol al 95%, acetona al 90%, isopropanol al 80% o bien en combinaciones de hexano-metanol, metanol-agua, agua-acetonitrilo, hexano-etanol-agua y acetona-hexano-agua. Sin embargo, su uso hoy en día está restringido debido al alto coste de aplicación de estos disolventes y problemas de toxicidad en los extractos.

Uso de adsorbentes: Los aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados (HSCAS) tienen gran afinidad por la AFB<sub>1</sub> permitiendo su eliminación en más de un 80%. Además, el uso de este adsorbente ha mostrado su efectividad en estudios *in vivo*, para prevenir la mutagenicidad y la toxicidad de AFB<sub>1</sub>. [8]

Inactivación por calor: El principal tratamiento físico utilizado para reducir la toxicidad de la aflatoxina es el calor. [27]

El rango efectivo de temperaturas capaz de descomponer estas micotoxinas se sitúa entre los 237 y los 306 °C. La presencia de agua ayuda a abrir el anillo de lactona de la AFB<sub>1</sub> para formar ácido carboxílico terminal el cual por efecto del calor se descarboxilará. La presencia de sal incrementa la extensión de la degradación de esta micotoxina por el calor. El pH tiene efecto sinérgico con el calor, siendo este efecto el responsable de la reducción de la actividad mutagénica de la micotoxina.

Irradiación: La radiación puede ser de tipo iónica (rayos X,  $\gamma$ , y UV) o no iónica (ondas de radio, microondas, infrarrojas, y luz visible). La luz UV, rayos  $\gamma$  y luz

solar son las mas empleados. La luz UV es efectiva ya que estas micotoxinas tienen un máximo de absorción a 362 nm, lo que permite obtener hasta 12 productos de fotodegradación que son menos tóxicos. Los rayos  $\gamma$  con 1 y 10 kGy, pueden reducir en un 75 y 100% respectivamente, la presencia de AFB<sub>1</sub> en cacahuates, sin embargo, dosis mas altas de 10 kGy incrementan el valor del peroxido del aceite contenido en los cacahuates. En el caso de la irradiación, cobra importancia la presencia de agua, ya que la radiolisis del agua conduce a la formación de radicales libres que interaccionan con el anillo furano terminal de la AFB<sub>1</sub>, disminuyendo su actividad mutagénica. [32]

Las esporas de *A. Flavus* no resisten un tratamiento de 45 segundos con luz UV. La radiación gamma a niveles de 0.25 a 1.0 Mrad inactiva los hongos presentes en alimentos almacenados. [27]

En la leche:

Existe controversia sobre los efectos de la pasteurización y esterilización en la AFM<sub>1</sub> de la leche. Se ha observado que tratamientos de 62 °C durante 30 minutos reducen la AFM<sub>1</sub> de la leche en un 32%, o con calentamientos de 71 a 120 °C durante 30 minutos se han conseguido reducciones del 12 al 35%, mientras que en otros estudios con tratamientos similares (63 °C durante 30 minutos, pasteurización a 77 °C en 16 segundos) o el calentamiento directo sobre el fuego durante 3 o 4 horas no afectaron el contenido de la AFM<sub>1</sub>. En general tanto la AFB<sub>1</sub> como la AFM<sub>1</sub> se considera bastante termoestable.

También se han publicado distintos resultados en cuanto a la estabilidad de la AFM<sub>1</sub> durante la refrigeración y la congelación, pero en general apenas existen variaciones de AFM<sub>1</sub>.

Entre los procesos físicos que se han estudiado para eliminar el AFM<sub>1</sub> de la leche están la absorción y la radiación. Algunos absorbentes pueden unirse a la aflatoxina y eliminarla de las soluciones acuosas, la bentonita en la leche absorbe del 67 al 79% de AFM<sub>1</sub>.

Las aflatoxinas son sensibles a la radiación UV, la destrucción de la AFM<sub>1</sub> se produce por la apertura del enlace doble del anillo furano de la AFM<sub>1</sub>. La concentración de AFM<sub>1</sub> se reduce entre 3.6 y 100% dependiendo del tiempo en que la leche es expuesta a la radiación ultra violeta, el volumen de la leche tratada, presencia de peroxido de hidrogeno, etc. **[8]**

### **3.21.2. Químicos.**

Entre los tratamientos químicos ensayados se señala el uso de Monometilamina/ cal o urea/ ureasa, cloruro de sodio durante el tratamiento térmico, bisulfito de sodio a diversas temperaturas, ácido propiónico y sus sales. peroxido de hidrógeno, gas cloro, hipoclorito de sodio, peroxido de benzoílo, perborato de sodio, hidróxido sódico, amoníaco, metil amina, dióxido de cloro, formaldehído, dióxido de nitrógeno y ozono. **[27]**

A continuación se describen los mas usados.

La amoniación: Procedimiento utilizado principalmente para la descontaminación en el maíz, el cacahuate, las semillas de algodón y las harinas incluye acompañar la acción de amoníaco con el tratamiento a alta presión/ alta temperatura y a presión atmosférica/ temperatura ambiente. El tratamiento a presión atmosférica/ temperatura ambiente se limita a las semillas/ nueces enteras y a las aflatoxinas.

La nixtamalización: Permite reducir las aflatoxinas alrededor de un 90% por la transformación de estas en metabolitos no tóxicos (aflatoxinas B<sub>2a</sub> Y G<sub>2a</sub>). **[8]**

En la leche:

Entre los aditivos permitidos que se utilizan para degradar la AFM<sub>1</sub> están los sulfitos, bisulfitos y peroxido de hidrogeno. **[8]**

### **3.21.3. Biológicos.**

Se han llevado a cabo diversos estudios para demostrar la eficacia de determinados microorganismos para degradar las aflatoxinas. *Flavobacterium aurantiacum* B-184 permite la degradación irreversible de estas micotoxinas en diversos alimentos como aceite, cacahuete, leche, maíz y verduras. [8]

*Corynebacterium rubrum*, *aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Mucor ambiguus* descomponen la aflatoxina B<sub>1</sub> en aflatoxina R<sub>0</sub>, la cual es menos toxica para algunas especies. [27]

### **3.22. Análisis de micotoxinas en alimentos.**

Se han estudiado diversos métodos para detectar micotoxinas, en particular aflatoxinas en los alimentos. [28]

El desarrollo de métodos químicos para la determinación de micotoxinas es una tarea de carácter internacional. En Norteamérica los Químicos han desarrollado y evaluado métodos para un amplio numero de micotoxinas. Los métodos adoptados aparecen en el capítulo 26 del la AOAC. Existen 18 jurados asociados que se encargan cada uno de un tema concreto relacionado con las aflatoxinas y un jurado general que coordina todas las actividades. Una serie de métodos adoptados por la AOAC, de validez internacional, han sido publicados como métodos recomendados por la IUPAC. [39]

Aunque la presencia de hongos toxigénicos en los alimentos puede servir de señal de alarma, en realidad la toxina puede hallarse en los alimentos sin que el hongo sea aparente.

El primer problema reside en la obtención de una muestra representativa. La aflatoxina no esta homogéneamente repartida en todo el producto. Con un solo grano o semilla altamente contaminado, el contenido aparente de aflatoxina puede ser mucho mas alto que el del lote muestreado. [27]

El tamaño representativo de las muestras depende del tamaño de las partículas; así pues, una muestra de 500 g es aceptable para aceites o leche en polvo, pero son necesarios 3 kg de harina o de mantequilla de cacahuete.

**[26]**

La prueba mas sencilla con algunas materias primas alimentarias consiste en inspeccionar el grano o la semilla con radiación UV a una longitud de onda de 365 nm. La presencia de aflatoxinas se traduce por una fluorescencia verde amarillenta brillante o dorado verdosa. **[27]**

Las micotoxinas pueden ser detectadas por métodos químicos o biológicos. La determinación química de las Aflatoxinas se ha estandarizado bastante. Las muestras se extraen con solventes orgánicos, en combinación con pequeñas cantidades de agua. Los extractos pueden lavarse aun mas con el paso a través de una columna de silica gel. Ser concentrados y posteriormente separados por cromatografía en capa fina o por cromatografía liquida de alta resolución. Después de la cromatografía, las aflatoxinas son visualizadas y cuantificadas por comparación visual. **[26]**

Se han propuesto también algunos test biológicos; uno de ellos se basa en la sensibilidad de embriones de pollo a las micotoxinas, en otro se utilizan larvas de crustáceo de agua dulce; también se pueden utilizar las propiedades antibióticas de numerosas micotoxinas frente al *Bacillus thuringiensis*. Existen pruebas específicas para detectar la potencialidad mutagénica, teratogénica o carcinogénica de las micotoxinas, así como otras para determinar residuos o derivados en los tejidos animales. **[31]**

Se han desarrollado técnicas de inmuno ensayo, incluidos los ensayos de inmunoabsorción asociada a enzimas y test con tira reactiva, para la detección de aflatoxinas. Estos kits están en el mercado. Se ha combinado la inmunoafinidad con la detección fluorométrica para desarrollar biosensores capaces de detectar aflatoxinas hasta 50 µg/kg en el corto tiempo de dos minutos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido aplicada para

detectar la presencia de hongos aflatoxigénicos en alimentos, teniendo por diana los genes de biosíntesis de aflatoxinas. **[26]**

Comercialmente se dispone de ensayos ELISA y de aglutinación en látex para la detección de aflatoxinas. Se distinguen observándolas bajo luz ultravioleta. Para la detección cuantitativa de mohos en los alimentos pueden utilizarse ensayos ELISA, pero, mientras estos ensayos requieren 5 a 10 horas, el método de aglutinación en látex es mucho mas rápido, 10 a 20 minutos. . **[25]**.

Los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de micotoxinas deben ser eficientes en términos de recuperación, repetibilidad y reproducibilidad. Se han validado diferentes métodos para la determinación de micotoxinas en cereales. Dichos métodos difieren para cada matriz alimenticia y para los niveles de contaminación. Los métodos oficiales disponibles para el análisis de micotoxinas en cereales se enlistan en la AOAC, en la prEN 14123 de la Unión Europea y en el caso de México en las NOM-186-SSA1/SCFI-2002, NOM-187-SSA1/SCFI-2002, NOM-247-SSA1-2008 y en la NOM-243-SSA1-2010.

En general, las micotoxinas presentes en alimentos se extraen con solventes orgánicos, tales como diclorometano, metanol, acetonitrilo y acetato de etilo, la determinación posterior se realiza por cromatografía; ya sea en capa fina, capa fina de alta resolución, cromatografía de gases y con mayor frecuencia de líquidos, principalmente con detección ultravioleta, fluorescencia y electroquímica. Spanger y col. Diseñaron un método de cromatografía de líquidos-espectrometría de masa, para el análisis simultaneo de micotoxinas de varios productos (cacaahuates, pistaches, trigo, maíz, hojuela de maíz, pasas e higos). **[40]**

En resumen, la determinación físico-química de las micotoxinas y de su concentración lleva consigo las siguientes operaciones:

1. Extracción con solventes orgánicos.
2. Eliminación de impurezas.
3. Separación por cromatografía.
4. Identificación y cuantificación por fluorometría.

### **3.23. Legislación.**

El peligro que constituyen las micotoxinas y la estimación que muestra que el consumo diario tolerable puede excederse ocasionalmente, ha detonado el establecimiento de regulaciones. Con el fin de restringir la ingestión de micotoxinas, se han establecido regulaciones en mas de 70 países. Sin embargo, los limites legales varían significativamente tanto de país a país como del tipo de micotoxina y del tipo de alimento.

Aunque no es posible eliminar por completo las micotoxinas de los alimentos, mediante el análisis de riesgos basado en conocimientos científicos, es posible definir los niveles en los alimentos (tolerancias, niveles de referencia, limites máximos para residuos), los cuales no es probable que constituyan un problema para la salud. Estos niveles serán útiles para armonizar los reglamentos y procedimientos de control sobre micotoxinas y facilitaran el comercio internacional de alimentos. **[40]**

Las aflatoxinas son unas de las pocas micotoxinas que disponen de legislación; algunos países han establecidos las cantidades máximas permitidas legalmente en determinados alimentos. El limite exigido por la mayoría de los países occidentales es de 5 a 20  $\mu\text{g}$  de Aflatoxina B<sub>1</sub> por kg de alimento, incluidos sus productos derivados. Las cantidades autorizadas en los piensos varían, así en los EE UU se permiten para los piensos del ganado vacuno y para las ovejas hasta 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de pienso. En el sudeste de Asia generalmente no hay limites legales de aflatoxinas para alimentos ni para piensos. **[34]**

En los paises industrializados rara vez ocurre la contaminación con aflatoxinas de los alimentos hasta niveles capaces de producir aflatoxicosis agudas en la especie humana. Teniendo esto en cuenta, los estudios de toxicidad humana por ingestión de aflatoxinas se han dirigido a su carcinogenicidad potencial. **[25]**

Los esfuerzos internacionales encaminados a detectar y regular las concentraciones de aflatoxinas en los alimentos dio como resultado la fijación de un patrón de 30 ppb (Junta consultiva para las proteínas FAO/OMS/UNICEF). Se fijo ese patrón teniendo en cuenta la dosis que no producía efectos nocivos en el mono, con un factor de seguridad de 50 ppb. [41]

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas en los años 60, y con mayor o menor prontitud, los gobiernos de la mayoría de los países del mundo han ido fijando límites máximos aceptables para distintas micotoxinas en alimentos, mediante la promulgación de una reglamentación particular, lo que ha ocasionado la aparición de una amplia legislación en el ámbito internacional que, para una misma micotoxina, difiere en los niveles de aceptación según el país considerado. Así, por ejemplo, a finales de 2003 aproximadamente 100 países contaban ya con límites específicos para las micotoxinas, y este número continúa incrementándose poco a poco.

Según el documento de la FAO: Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003, México se encuentra entre los Países que cuentan con una reglamentación para las micotoxinas. Ver figura 4.

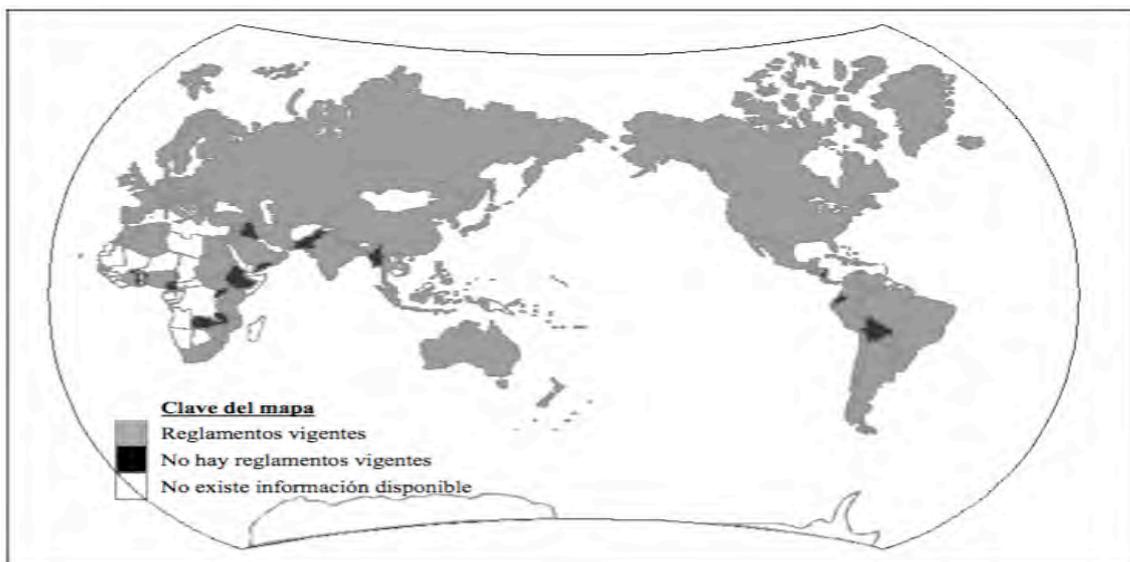


Figura 4. Países que cuentan con una reglamentación para las micotoxinas.

Los principales cultivos agrícolas de América Latina (maíz, trigo, café, algodón, soja, cebada, girasol, maníes y nueces de árbol, cocoa y lácteos) son muy susceptibles a la contaminación con hongos y proclives a producir micotoxinas. La figura 5 muestra los límites reglamentarios respectivos para diversas micotoxinas en América Latina en los alimentos.

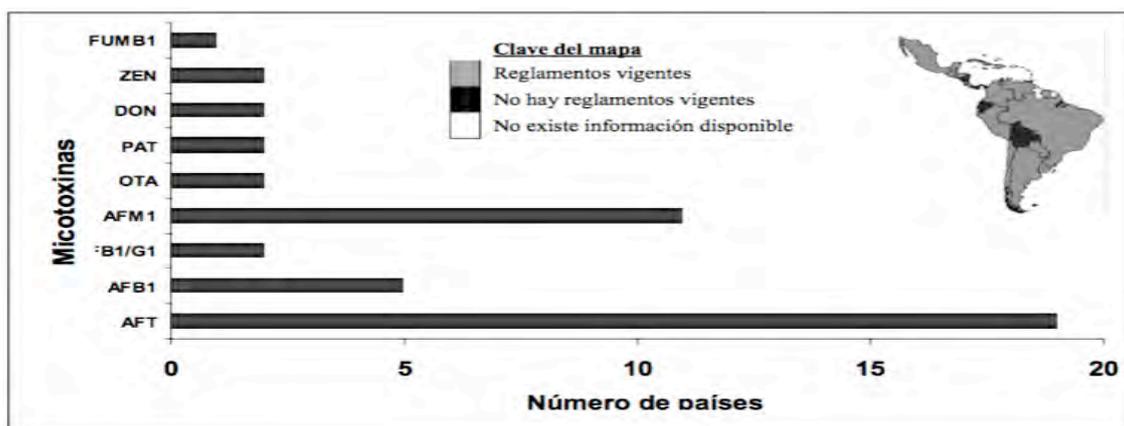


Figura 5. Límites reglamentarios para diversas micotoxinas.

Igual que en 1995, en el año 2003 muchos países reglamentaron las aflatoxinas con límites para la suma de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, y G<sub>2</sub>, a veces de manera combinada con un límite específico para la aflatoxina B<sub>1</sub>. El intervalo de los límites (0-35 µg/kg) se ha reducido ligeramente comparado con el del año 1995, en tanto que el límite mediano (10 µg/kg) es ligeramente superior. El límite que aparece con mayor frecuencia es de 4 µg/kg (aplicado por 29 países). Otro pico importante aparece en los 20 µg/kg, aplicado por 17 países, la mitad de ellos en América Latina. Ver figura 6.

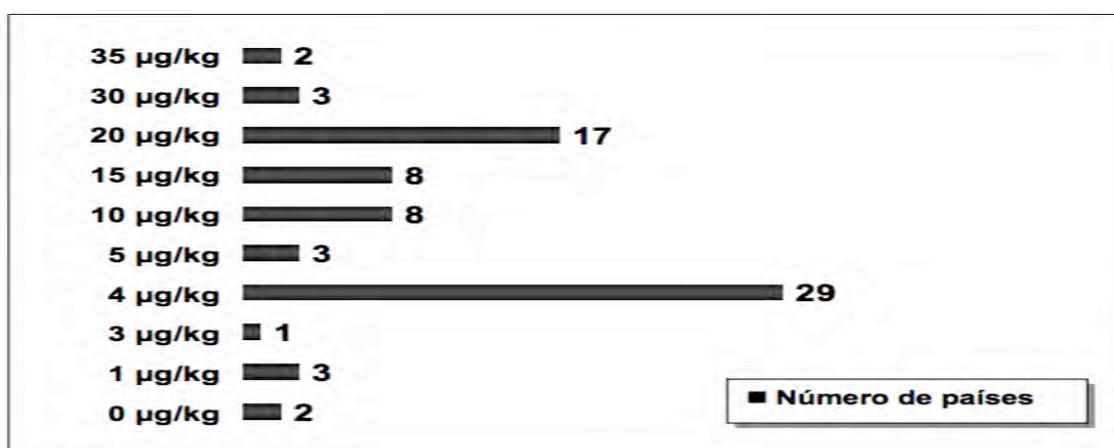
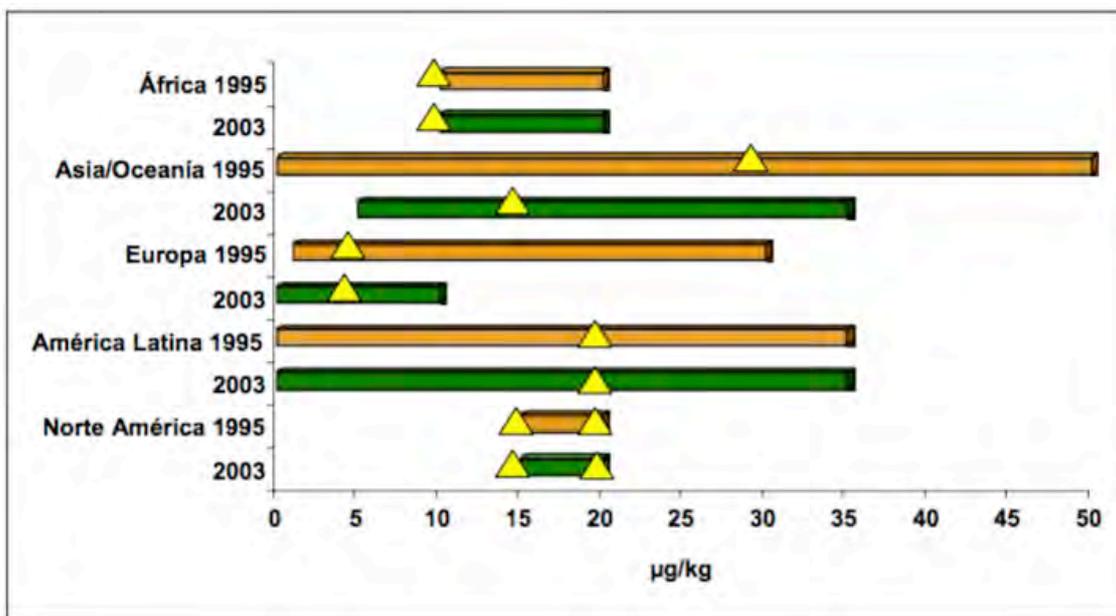


Figura 6. Límites reglamentarios para diversas micotoxinas.

Es discutible si un límite reglamentario para la suma de las aflatoxinas, que requiere mucho más trabajo analítico que sólo para la aflatoxina B<sub>1</sub>, contribuye significativamente a una mejor protección de la salud pública. La aflatoxina B<sub>1</sub> es la aflatoxina más importante, tanto desde el punto de vista toxicológico como por su frecuencia. Es muy poco probable que los productos básicos contengan las aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> y no la aflatoxina B<sub>1</sub>, en tanto que la concentración de la suma de las aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> es generalmente menor que la concentración de la aflatoxina B<sub>1</sub> sólo.

La figura 7 muestra los rangos y medianas de los límites para las aflatoxinas totales para diversas zonas del mundo en los alimentos para los años 1995 y 2003. No parecen haberse registrado cambios observables en el África, América Latina y América del Norte; en cambio en Asia/Oceanía y en Europa se aprecia una tendencia a valores más bajos para los límites de las aflatoxinas totales.



La Figura 7. Rangos y medianas de los límites para aflatoxinas totales en diversas zonas del mundo para los años 1995 y 2003

A fines del año 2003 existían reglamentaciones para la aflatoxina M<sub>1</sub> en 60 países, un incremento superior a las tres veces comparado con el año 1995. Nuevamente son los países de la UE los que contribuyen mayoritariamente al pico más significativo indicado en la figura 8 de 0.05 µg/kg, aunque otros

países en el África, Asia y América Latina aplican también este límite. Otro límite significativo aparece con 0.5 µg/kg. Este límite superior se aplica en los Estados Unidos, varios países asiáticos y europeos, aunque con más frecuencia aparece en América Latina. [38]

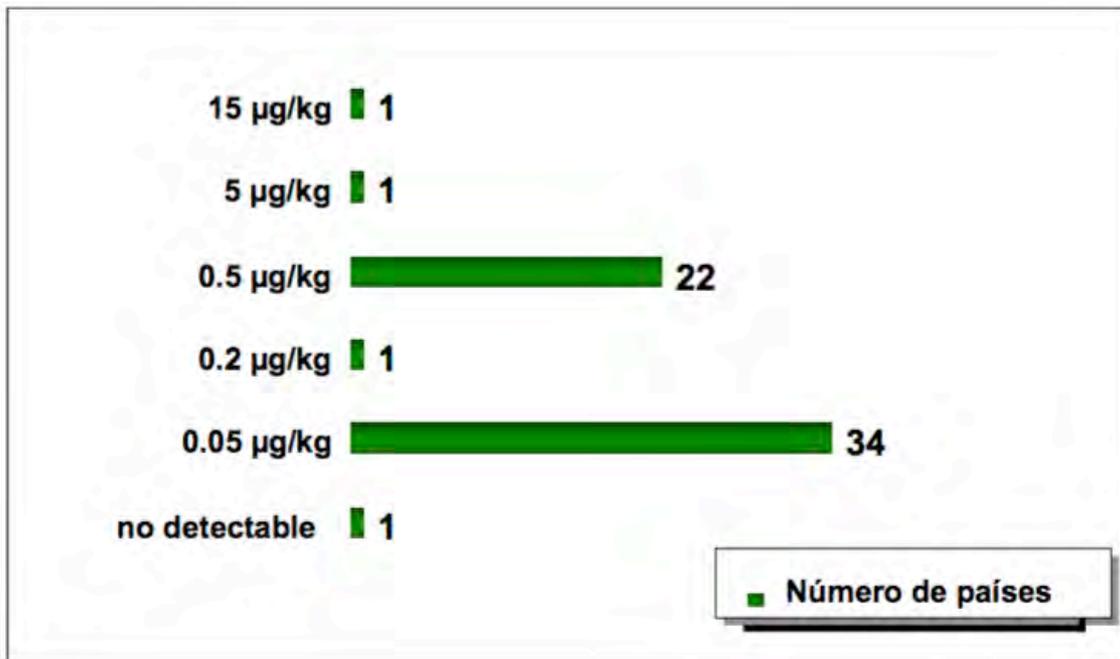


Figura 8. Límites reglamentarios para la AFM<sub>1</sub>.

Varios factores, tanto de naturaleza científica como socioeconómica, influyen en las autoridades cuando se pretenden fijar límites y establecer reglamentaciones sobre las micotoxinas. Entre ellos destacan los siguientes:

- Evaluación de riesgo.
- Distribución de la micotoxina en el producto procedimientos de muestreo.
- Disponibilidad de métodos de análisis.
- Política económica y disponibilidad de alimentos. [8]

Son 19 países de América Latina que cuentan con legislación para micotoxinas. Las aflatoxinas están armonizadas en el MERCOSUR desde 1996.

Por su importancia económica, cinco son los países mas importantes y que cuentan con una legislación mas completa con respecto a las micotoxinas: Brasil, Uruguay, Argentina, Chile y México. Los tres primeros, junto con Paraguay forman el mercado común del sur (MERCOSUR), por lo que comparte la legislación de micotoxinas. **[32]**

Actualmente en México, existen cuatro normas aplicables al control de micotoxinas:

NORMA Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2002. Productos y servicios. Cacao, productos y derivados. I Cacao. II Chocolate. III Derivados. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. **[42]**

NORMA Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002. Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. **[43]**

NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. **[44]**

NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. **[45]**

En las cuales, se ha establecido un limite permisible de:

- ❖ 20 µg/kg de producto para Aflatoxinas totales (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>)
- ❖ 0.5 mg/L de leche para AFM<sub>1</sub>

#### 4. DESARROLLO DE LA GUÍA: CCAYAC-CR-03/0

##### VALIDACION PARCIAL DEL METODO:

##### Determinación de AFM1 en leche, por columna de inmunoafinidad - HPLC

#### 4.1. Campo de aplicación.

Esta validación aplica para la determinación de Aflatoxinas M1 en leche de vaca líquida.

#### 4.2. Fundamento del método.

La AFM1 es extraída de una porción de prueba (leche líquida o leche deshidratada reconstituida), con ayuda de una columna de inmunoafinidad, la cual contiene anticuerpos monoclonales específicos ligados a un material de soporte sólido (gel).

Al pasar la muestra a través de la columna, los anticuerpos selectivamente se ligan a la AFM1 presente para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Los otros componentes de la muestra son removidos de la columna con una serie de lavados y posteriormente la AFM1 es removida de la columna con acetonitrilo y cuantificada por HPLC en fase reversa con detector de fluorescencia.

#### 4.3. Equipos e instrumentos.

Equipo para cromatografía de líquidos, que consta de bomba cuaternaria, detector de fluorescencia, degasificador en línea y columna cromatográfica C-18.
Balanza Analítica
Estufa
Baño maria
Termometro calibrado
Centrifuga
Procesador de vacío y presión positiva
Bomba de vacío
Rotometro
Vortex

Equipo de filtración para fase móvil
Espectrofotómetro UV-VIS

#### 4.4. MATERIALES.

- De uso general.

Micropipeta
Tubos para centrifuga
Espatula
Vasos de Precipitados
Embudos de tallo corto
Papel filtro Whatman No. 4
Columnas de Inmunofinidad
Frascos vial color ámbar
Membranas de filtración
Jeringas
Celdas de cuarzo
Pipeta Pasteur
Frascos de 1L

- Material volumétrico Ámbar, clase A.

Micropipeta 500 $\mu$ L
Pipeta 1 mL
Pipeta 5 mL
Pipeta 25 mL
Pipeta 50 mL
Matraz 5 mL
Matraz 10 mL
Matraz 50 mL
Matraz 100 mL
Matraz 250 mL
Matraz 1000 mL

#### 4.5. REACTIVOS.

##### a) Pureza

Acetonitrilo	HPLC
Agua grado HPLC	HPLC
Acido Sulfúrico Concentrado	Absorción atómica
Cloruro de Sodio	De alta pureza
Fosfato de Sodio dihidratado	De alta pureza

Cloruro de potasio	De alta pureza
Hidróxido de sodio	De alta pureza
Agua	Destilada
Nitrógeno	Absorción atómica

**b) Patrones de referencia (Estándares).**

Patrón	Lote	Marca	Pureza	Conc.
AFM1	LB99575	SUPELCO	98.50%	10.081 µg/mL ± 0.008
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	MKBD1028V	SIGMA-ALDRICH	99.99%	99.99%

**c) Preparación de Soluciones.**

- Ácido sulfúrico 0.018 N.

Colocar 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en un matraz aforado de 2 L y aforar con agua destilada.

$$2 \text{ L} \left( \frac{0.018 \text{ eq H}_2\text{SO}_4}{\text{L}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol H}_2\text{SO}_4}{2 \text{ eq H}_2\text{SO}_4} \right) \left( \frac{98 \text{ g H}_2\text{SO}_4}{1 \text{ mol H}_2\text{SO}_4} \right) \left( \frac{1 \text{ mL H}_2\text{SO}_4}{1.8 \text{ g H}_2\text{SO}_4} \right) = 0.98 \text{ mL} \approx 1 \text{ mL H}_2\text{SO}_4$$

- Dicromato de Potasio 0.25 mM.

Pesar 73.5 mg de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; previamente secado a 100°C, colocarlos en un matraz aforado de 1 L y aforar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.018 N.

$$1 \text{ L} \left( \frac{0.25 \text{ mmol K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}{\text{L}} \right) \left( \frac{294 \text{ mg K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}{1 \text{ mmol K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \right) \left( \frac{99.99 \text{ mg K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}{100 \text{ mg K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \right) = 73.49 \text{ mg} \approx 73.5 \text{ mg } 99.99 \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$$

- Dicromato de Potasio 0.125 mM.

Tomar una alícuota de 25 mL de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.25 mM, colocarla en un matraz aforado de 50 mL y aforar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.018 N.

$$(C_1) \times (V_1) = (C_2) \times (V_2)$$

$$(0.25 \text{ mM}) \times (X) = (0.125 \text{ mM}) \times (50 \text{ mL})$$

$$(X) = \frac{(0.125 \text{ Mm}) \times (50 \text{ mL})}{0.25 \text{ mM}} = 25 \text{ mL}$$

- Dicromato de Potasio 0.0625 mM.

Tomar una alicuta de 25 mL de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0.125 mM, colocarla en un matraz aforado de 50 mL y aforar con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.018 N.

$$(C_1) \times (V_1) = (C_2) \times (V_2)$$

$$(0.125 \text{ mM}) \times (X) = (0.0625 \text{ mM}) \times (50 \text{ mL})$$

$$(X) = \frac{(0.0625 \text{ Mm}) \times (50 \text{ mL})}{0.125 \text{ mM}} = 25 \text{ mL}$$

- Fase movil Agua:Acetonitrilo 75:25.

Para un litro de fase movil, se mezclan; 750 mL de Agua grado HPLC y 250 mL de Acetonitrilo grado HPLC y se hace pasar por el equipo de filtracion.

- Solucion amortiguadora de fosfatos.

Pesar:

8 g NaCl  
1.16 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.2 g KCl

Se disuelven y se afora a un litro con agua destilada.

- Dilución de trabajo 1 de AFM1; 2 ng/ $\mu\text{L}$ .

Romper la ampollita que contiene al patrón de AFM1, con ayuda de una jeringa, extraer el total de su contenido y depositarlo en un matraz de 5 mL, enjuagar la ampollita con varias porciones de Acetonitrilo y adicionar dichos enjuagues al matraz, hasta llegar al aforo; agitar en vortex.

$$\left( \frac{1 \text{ mL} \times 10.081 \text{ ng}/\mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \right) = 2.0162 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- Dilución de trabajo 2 de AFM1; 0.5 µg/mL.

Tomar 1.25 mL de la dilución de trabajo 1 y colocarlos en un matraz volumetrico de 5 mL, llevar al aforo con Acetonitrilo; agitar en vortex.

$$\left( \frac{1.25 \text{ mL} \times 2.0162 \text{ ng}/\mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \right) = 0.50405 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

ó 0.50405 µg/mL

### **Verificación de la concentración.**

Calibración del Espectrofotómetro:

1. Determinar la absorbancia (A) de las tres soluciones de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,25, 0,125 y 0,0625 mM a su máximo de absorción cerca de 350 nm, usando como blanco la solución de ácido sulfúrico 0.018 N.
2. Calcular la absortividad molar ( $\epsilon$ ) de cada concentración con el siguiente modelo matematico:

$$\frac{\text{Absorbancia (A)} \times 1000}{\text{Concentracion mM}}$$

3. Si los tres valores varían mucho, repetir. Promediar los 3 valores para obtener el valor de ( $\epsilon$ ).

4. Determinar el factor de corrección (FC) con el siguiente modelo matemático:

$$FC = \frac{3160}{(\epsilon)}$$

5. Si el valor de FC es < 0.95 o > 1.05 Repetir la determinación.

Determinación de la concentración de la Solución Patrón de 2 ng/mL

1. Transferir una alícuota de 2 a 3 mL de esta solución a una celda de cuarzo y registrar el espectro ultravioleta entre 330 y 370 nm, usando acetonitrilo en la celda de referencia.
2. Medir la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción (la cual es cercana a 325 nm).
3. Determinar la concentración exacta con el siguiente modelo matemático:

$$\frac{\text{ng AFM}_1}{\mu\text{L}} = \frac{\text{Absorbancia} \times 328 \times 1000 \times \text{F.C}}{19850}$$

F.C

$$\frac{0.208462 \times 1000}{0.0625} = 3335.392$$

$$\frac{0.403698 \times 1000}{0.125} = 3229.584$$

$$\frac{0.807493 \times 1000}{0.25} = 3229.972$$

3335.392

3229.584

3229.972

3264.983 (Promedio de lecturas)

$$F.C = \frac{3160}{3264.983} = 0.97$$

Concentración de AFM<sub>1</sub>

0.132107

0.131443

0.130827

0.131459 (Promedio de lecturas)

$$\frac{\text{ng AFM}_1}{\mu\text{L}} = \frac{0.131459 \times 328 \times 1000 \times 0.97}{19850} = 2.11 \frac{\text{ng AFM}_1}{\mu\text{L}}$$

Una vez que se ha verificado la concentración real de la dilución de trabajo 1 (2.11 ng AFM<sub>1</sub>/μL), se debe ajustar el valor de la concentración de la dilución de trabajo 2.

$$\left( \frac{1.25 \text{ mL} \times 2.11 \text{ ng}/\mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \right) = 0.5275 \text{ ng}/\mu\text{L} \text{ ----- dilución de trabajo 2}$$

- Diluciones para la curva de trabajo; primer punto; ≈ 0.5 ng.

Tomar 0.1 mL de la dilución de trabajo 2 y colocarlos en un matraz volumétrico de 5 mL, evaporar a sequedad con corriente de Nitrogeno y después llevar al aforo con fase móvil. *NOTA: Considerar que el loop de inyección es de 50 μL.*

$$\left( \frac{0.1 \text{ mL} \times 0.5275 \text{ ng}/\mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \right) = 0.01055 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 50 \mu\text{L} = 0.5275 \text{ ng}$$

- Diluciones para la curva de trabajo; segundo punto;  $\approx 1.0$  ng.

Tomar 0.2 mL de la dilucion de trabajo 2 y colocarlos en un matraz volumétrico de 5 mL, evaporar a sequedad con corriente de Nitrogeno y despues llevar al aforo con fase movil. *NOTA: Considerar que el loop de inyeccion es de 50  $\mu$ L.*

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.5275 \text{ ng}/\mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \right) = 0.0211 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 50 \mu\text{L} = 1.055 \text{ ng}$$

- Diluciones para la curva de trabajo; tercer punto;  $\approx 5.0$  ng.

Tomar 1 mL de la dilucion de trabajo 2 y colocarlos en un matraz volumétrico de 5 mL, evaporar a sequedad con corriente de Nitrogeno y despues llevar al aforo con fase movil. *NOTA: Considerar que el loop de inyeccion es de 50  $\mu$ L.*

$$\left( \frac{1.0 \text{ mL} \times 0.5275 \text{ ng}/\mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \right) = 0.1055 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 50 \mu\text{L} = 5.275 \text{ ng}$$

- Diluciones para la curva de trabajo; cuarto punto;  $\approx 10.0$  ng.

Tomar 2 mL de la dilucion de trabajo 2 y colocarlos en un matraz volumétrico de 5 mL, evaporar a sequedad con corriente de Nitrogeno y despues llevar al aforo con fase movil. *NOTA: Considerar que el loop de inyeccion es de 50  $\mu$ L.*

$$\left( \frac{2.0 \text{ mL} \times 0.5275 \text{ ng}/\mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \right) = 0.211 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 50 \mu\text{L} = 10.55 \text{ ng}$$

#### 4.6. Muestras.

Para la determinación de parámetros estadísticos involucrados en esta validación, se puede utilizar blancos adicionados o muestras adicionadas con el analito de interés; en este caso, se procedió a trabajar con muestras adicionadas.

- Leche líquida Alpura, semi descremada, ultrapasteurizada.

- 5 envases de 1 L.
- Almacenados a una temperatura menor de 18 °C y 45 % HR

### **Muestras adicionadas.**

Para obtener la cantidad de datos experimentales necesaria, se trabajo con otro analista; a continuación se describe su trabajo.

Analista 1: Analista 1

Día uno: (15 adiciones)

Adicionar las muestras en 5 niveles y cada nivel por triplicado.

Día dos: (9 adiciones)

Adicionar las muestras en los niveles 1, 3 y 5 por triplicado.

Analista 2: Analista 2

Día uno: (15 adiciones)

Adicionar las muestras en 5 niveles y cada nivel por triplicado.

Día dos: (9 adiciones)

Adicionar las muestras en los niveles 1, 3 y 5 por triplicado.

### **Procedimiento de adición.**

NIVEL 1, (Muestra 1): Poner 0.2 mL del primer punto de la curva de trabajo, en un matraz de 50 mL, y adicionar la muestra hasta llegar al aforo.

En volumen.

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.01055 \text{ } \mu\text{g/mL}}{50 \text{ mL}_{\text{Leche}}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) = 0.0422 \text{ } \mu\text{g/L}$$

En masa.

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.01055 \text{ ng/} \mu\text{L}}{0.2 \text{ mL}_{\text{Reconstitución}}} \right) \times 50 \text{ } \mu\text{L}_{\text{Loop}} = 0.5275 \text{ ng}$$

NIVEL 2, (Muestra 2): Poner 0.2 mL del segundo punto de la curva de trabajo, en un matraz de 50 mL, y adicionar la muestra hasta llegar al aforo.

En volumen.

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.0211 \mu\text{g/mL}}{50 \text{ mL}_{\text{Leche}}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) = 0.0844 \mu\text{g/L}$$

En masa.

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.0211 \text{ ng}/\mu\text{L}}{0.2 \text{ mL}_{\text{Reconstitución}}} \right) \times 50 \mu\text{L}_{\text{Loop}} = 1.055 \text{ ng}$$

NIVEL 3, (Muestra 3): Poner 0.12 mL del tercer punto de la curva de trabajo, en un matraz de 50 mL, y adicionar la muestra hasta llegar al aforo.

En volumen.

$$\left( \frac{0.12 \text{ mL} \times 0.1055 \mu\text{g/mL}}{50 \text{ mL}_{\text{Leche}}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) = 0.2532 \mu\text{g/L}$$

En masa.

$$\left( \frac{0.12 \text{ mL} \times 0.1055 \text{ ng}/\mu\text{L}}{0.2 \text{ mL}_{\text{Reconstitución}}} \right) \times 50 \mu\text{L}_{\text{Loop}} = 3.165 \text{ ng}$$

NIVEL 4, (Muestra 4): Poner 0.2 mL del tercer punto de la curva de trabajo, en un matraz de 50 mL, y adicionar la muestra hasta llegar al aforo.

En volumen.

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.1055 \mu\text{g/mL}}{50 \text{ mL}_{\text{Leche}}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) = 0.422 \mu\text{g/L}$$

En masa.

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.1055 \text{ ng}/\mu\text{L}}{0.2 \text{ mL}_{\text{Reconstitución}}} \right) \times 50 \mu\text{L}_{\text{Loop}} = 5.2750 \text{ ng}$$

NIVEL 5, (Muestra 5): Poner 0.2 mL del cuarto punto de la curva de trabajo, en un matraz de 50 mL, y adicionar la muestra hasta llegar al aforo.

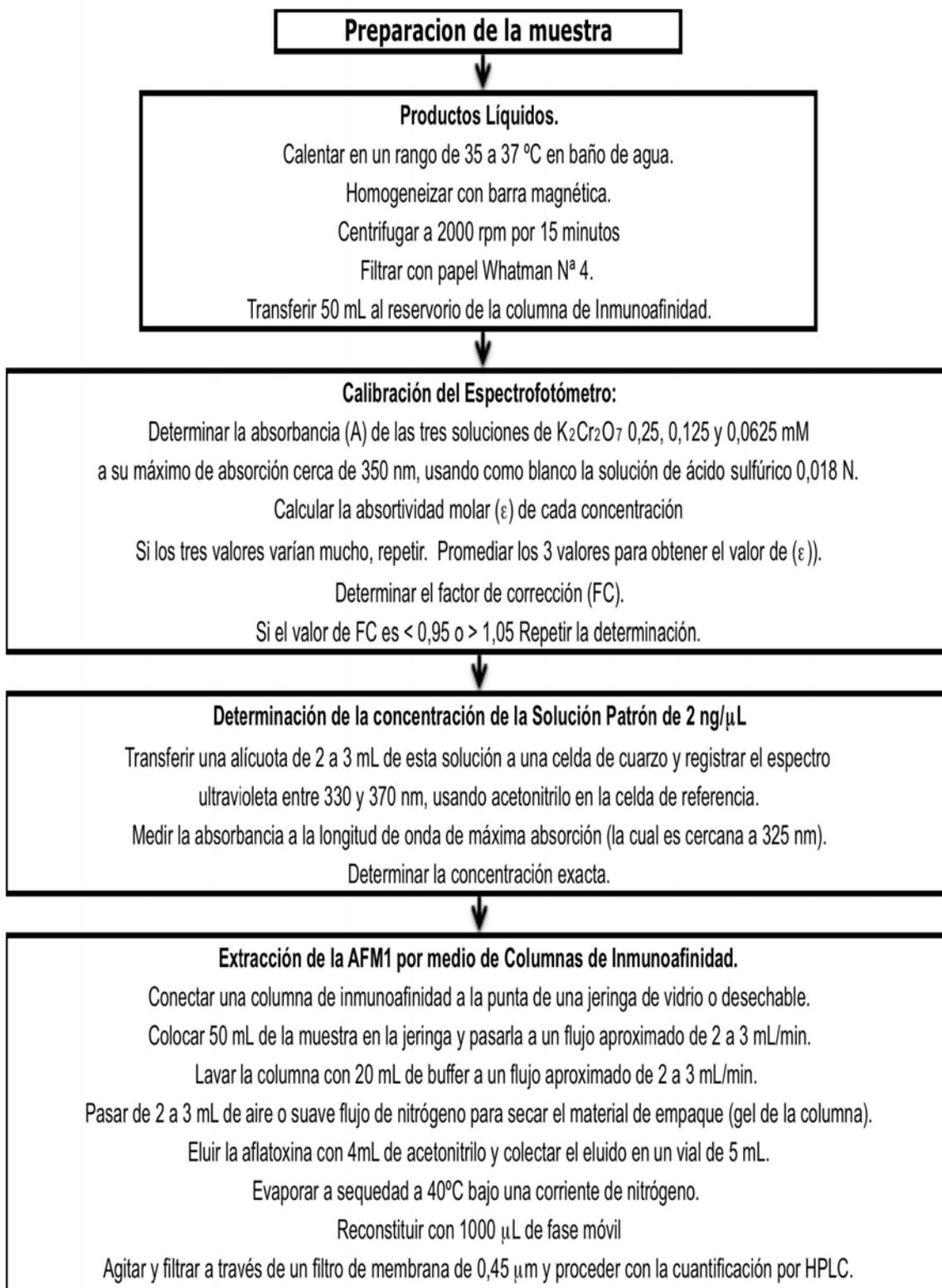
En volumen.

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.211 \mu\text{g/mL}}{50 \text{ mL}_{\text{Leche}}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) = 0.844 \mu\text{g/L}$$

En masa.

$$\left( \frac{0.2 \text{ mL} \times 0.211 \text{ ng}/\mu\text{L}}{0.2 \text{ mL}_{\text{Reconstitución}}} \right) \times 50 \mu\text{L}_{\text{Loop}} = 10.55 \text{ ng}$$

#### 4.7. Método de ensayo. Determinación de aflatoxinas $m_1$ en leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado por columna de inmunoafinidad-HPLC.



#### 4.8. Desarrollo experimental.

##### Algunas consideraciones sobre el método, según la guía del CCAYAC:

- ❖ Clasificación de Método: Norma oficial Mexicana NOM-243.
- ❖ Categoría: II; Cuantificación del analito a nivel trazas; Micotoxinas.
- ❖ Confirmación de Método:
  - Intervalo lineal
  - Intervalo de trabajo
  - Limite de cuantificación
  - Recuperación
  - Repetibilidad
  - Precisión intermedia
  - Incertidumbre

#### Procedimiento y resultados

##### Tratamiento de la muestra.

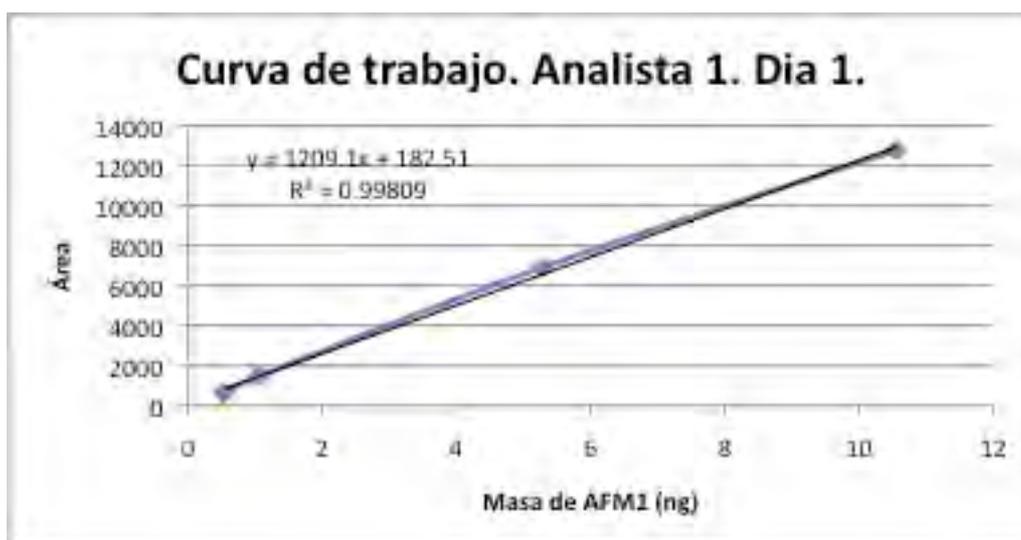
##### Analista 1. Día 1.

Muestra Adicionada	Cantidad de leche (mL)	Calentamiento (°C)	Homogeneización (Agitación)	Centrifugado (rpm)	Filtración (Papel)	Paso por columna de Inmunoafinidad	Lavados con buffer	Extracción con Acetonitrilo	Evaporación Reconstitución
1	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
1a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
1b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
2	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
2a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
2b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
4	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
4a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
4b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL

## Resultados, curva de trabajo.

### Analista 1. Día 1.

Masa de AFM-1 (Teórico)	Área Cuentas/mv/s
0.5275	633.489
1.055	1463.514
5.275	6905.742
10.55	12774.7



Con los datos de la ecuación de la recta y con los de las Áreas obtenidas de las muestras adicionadas, se procede a sustituir y despejar, para obtener las cantidades de Aflatoxina M1 en cada muestra.

$$y = 1209.1x + 182.51$$

Donde;

$y$  = Área de la AFM1 en la muestra

$x$  = ng de AFM1 en la muestra

Despejando;

$$x = \frac{y - 182.51}{1209.1}$$

Una vez que se han obtenido las masas de AFM1 en la muestra, se aplica la siguiente ecuación, la cual toma en cuenta, la cantidad de muestra, volúmenes de reconstitución e inyección.

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} \frac{\text{ng AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos en la curva}}{50 \text{ mL} \times (50 \mu\text{L} / 200 \mu\text{L})}$$

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} \frac{\text{ng AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos en la curva}}{12.5}$$

$$\frac{0.4417 \text{ ng AFM}_1}{12.5 \text{ mL}} = 0.0353 \text{ ng AFM}_1 / \text{mL} \text{ ó } \mu\text{g AFM}_1 / \text{L}$$

Donde;

50 mL; volumen de la alícuota de leche

50  $\mu\text{L}$ ; Loop de inyección

200  $\mu\text{L}$ ; Volumen de reconstitución de las muestras.

Muestra	Area de AFM1 en la muestra	ng de AFM1 en la muestra	ngAFM1/mL
1	716.55	0.4417	0.0353
1a	759.25	0.4770	0.0382
1b	923.93	0.6132	0.0491
2	1260.42	0.8915	0.0713
2a	1352.91	0.9680	0.0774
2b	1314.53	0.9363	0.0749
3	3927.33	3.0972	0.2478
3a	3887.16	3.0640	0.2451
3b	3823.56	3.0114	0.2409
4	6246.03	5.0149	0.4012
4a	6959.66	5.6051	0.4484
4b	6862.34	5.5246	0.4420
5	12074.52	10.4548	0.8364
5a	11794.31	10.2127	0.8170
5b	12453.3	10.1487	0.8119

## Tratamiento de la muestra.

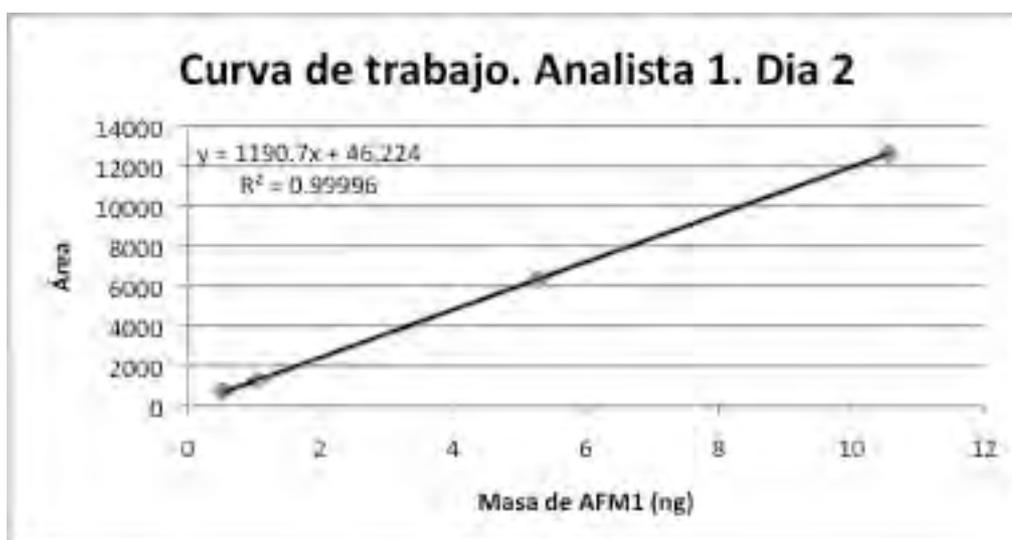
### Analista 1. Día 2.

Muestra Adicionada	Cantidad de leche (mL)	Calentamiento (°C)	Homogeneización (Agitación)	Centrifugado (rpm)	Filtración (Papel)	Paso por columna de Inmunoafinidad	Lavados con buffer	Extracción con Acetonitrilo	Evaporación Reconstitución
1	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
1a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
1b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL

## Resultados, curva de trabajo.

### Analista 1. Día 2.

Masa de AFM-1 (Teórico)	Área Cuentas/mv/s
0.5275	711.484
1.055	1256.984
5.275	6338.252
10.55	12605.137



Con los datos de la ecuación de la recta y con los de las Áreas obtenidas de las muestras adicionadas, se procede a sustituir y despejar, para obtener las cantidades de Aflatoxina M1 en cada muestra.

$$y = 1190.7x + 46.224$$

Donde;

y = Área de la AFM1 en la muestra

x = ng de AFM1 en la muestra

Despejando;

$$x = \frac{y - 46.224}{1190.7}$$

Una vez que se han obtenido las masas de AFM1 en la muestra, se aplica la siguiente ecuación, la cual toma en cuenta, la cantidad de muestra, volúmenes de reconstitución e inyección.

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} \frac{\text{ng AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos en la curva}}{50 \text{ mL} \times (50 \mu\text{L} / 200 \mu\text{L})}$$

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} \frac{\text{ng AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos en la curva}}{12.5}$$

$$\frac{0.5436 \text{ ng AFM}_1}{12.5 \text{ mL}} = 0.0435 \text{ ng AFM}_1 / \text{mL} \text{ ó } \mu\text{g AFM}_1 / \text{L}$$

Donde;

50 mL; volumen de la alícuota de leche

50µL; Loop de inyección

200 µL; Volumen de reconstitución de las muestras.

Muestra	Area de AFM1 en la muestra	ng de AFM1 en la muestra	ngAFM1/mL
1	693.47	0.5436	0.0435
1a	688.87	0.5397	0.0432
1b	685.21	0.5366	0.0429
3	2975.2	2.4599	0.1968
3a	3020.93	2.4983	0.1999
3b	3008.85	2.4881	0.1991
5	13094.87	10.9588	0.8767
5a	12728.75	10.6513	0.8521
5b	13044.67	10.9166	0.8733

### Tratamiento de la muestra.

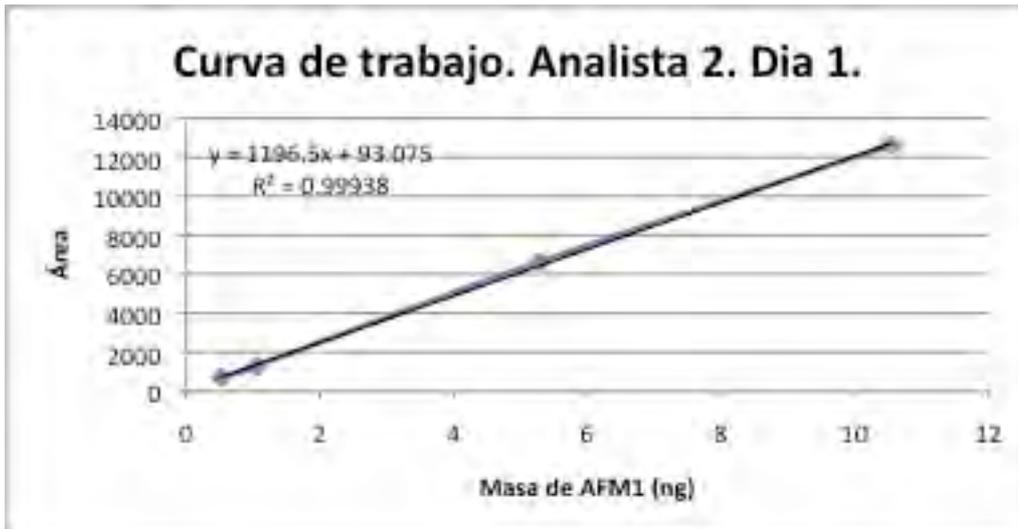
#### Analista 2. Día 1.

Muestra Adicionada	Cantidad de leche (mL)	Calentamiento (°C)	Homogeneización (Agitación)	Centrifugado (rpm)	Filtración (Papel)	Paso por columna de Inmunoafinidad	Lavados con buffer	Extracción con Acetonitrilo	Evaporación Reconstitución
1	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
1a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
1b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
2	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
2a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
2b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
4	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
4a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
4b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL

### Resultados, curva de trabajo.

#### Analista 2. Día 1.

Masa de AFM-1 (Teórico)	Área Cuentas/mv/s
0.5275	680.548
1.055	1287.401
5.275	6610.184
10.55	12622.691



Con los datos de la ecuación de la recta y con los de las Áreas obtenidas de las muestras adicionadas, se procede a sustituir y despejar, para obtener las cantidades de Aflatoxina M1 en cada muestra.

$$y = 1196.5x + 93.075$$

Donde;

y = Área de la AFM1 en la muestra

x = ng de AFM1 en la muestra

Despejando;

$$x = \frac{y - 93.075}{1196.5}$$

Una vez que se han obtenido las masas de AFM1 en la muestra, se aplica la siguiente ecuación, la cual toma en cuenta, la cantidad de muestra, volúmenes de reconstitución e inyección.

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} \frac{\text{ng AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos en la curva}}{50 \text{ mL} \times (50 \mu\text{L} / 200 \mu\text{L})}$$

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} \frac{\text{ng AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos en la curva}}{12.5}$$

$$\frac{0.4811 \text{ ng AFM}_1}{12.5 \text{ mL}} = 0.0385 \text{ ng AFM}_1 / \text{mL} \text{ ó } \mu\text{g AFM}_1 / \text{L}$$

Donde;

50 mL; volumen de la alícuota de leche

50 $\mu$ L; Loop de inyección

200  $\mu$ L; Volumen de reconstitución de las muestras.

Muestra	Area de AFM1 en la muestra	ng de AFM1 en la muestra	ngAFM1/mL
1	668.68	0.4811	0.0385
1a	673.09	0.4848	0.0388
1b	675.08	0.4864	0.0389
2	1227.88	0.9484	0.0759
2a	1222.53	0.9440	0.0755
2b	1194.87	0.9208	0.0737
3	3774.41	3.0768	0.2461
3a	3767.89	3.0713	0.2457
3b	3789.36	3.0892	0.2471
4	6472.48	5.3317	0.4265
4a	6423.8	5.2910	0.4233
4b	6499.54	5.3543	0.4283
5	12774.84	10.5991	0.8479
5a	12578.07	10.4346	0.8348
5b	12697.7	10.5346	0.8428

### Tratamiento de la muestra.

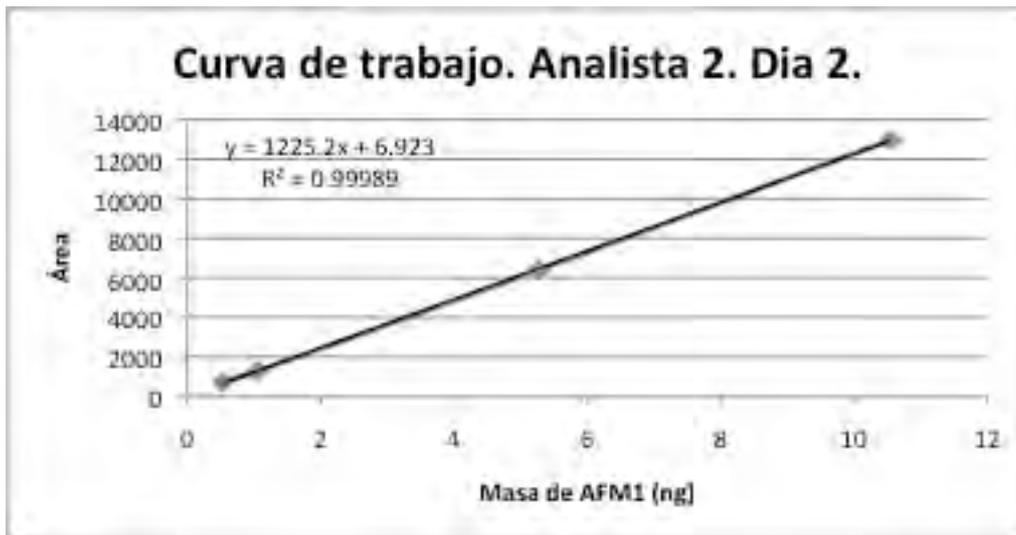
#### Analista 2. Día 2.

Muestra Adicionada	Cantidad de leche (mL)	Calentamiento (°C)	Homogeneización (Agitación)	Centrifugado (rpm)	Filtración (Papel)	Paso por columna de Inmunoafinidad	Lavados con buffer	Extracción con Acetonitrilo	Evaporación Reconstitución
1	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
1a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
1b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
3b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5a	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL
5b	50	37	Si	2000	Si	Si	2 x 10 mL c/u	4 mL	Si, a 0.2 mL

## Resultados, curva de trabajo.

### Analista 2. Día 2.

Masa de AFM-1 (Teórico)	Área Cuentas/mv/s
0.5275	715.243
1.055	1272.856
5.275	6400.166
10.55	12967.498



Con los datos de la ecuación de la recta y con los de las Áreas obtenidas de las muestras adicionadas, se procede a sustituir y despejar, para obtener las cantidades de Aflatoxina M1 en cada muestra.

$$y = 1225.2x + 6.923$$

Donde;

y = Área de la AFM1 en la muestra

x = ng de AFM1 en la muestra

Despejando;

$$x = \frac{y - 6.923}{1225.2}$$

Una vez que se han obtenido las masas de AFM1 en la muestra, se aplica la siguiente ecuación, la cual toma en cuenta, la cantidad de muestra, volúmenes de reconstitución e inyección.

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} \frac{\text{ng AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos en la curva}}{50 \text{ mL} \times (50 \mu\text{L} / 200 \mu\text{L})}$$

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} \frac{\text{ng AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos en la curva}}{12.5}$$

$$\frac{0.5714 \text{ ng AFM}_1}{12.5 \text{ mL}} = 0.0457 \text{ ng AFM}_1 / \text{mL} \text{ ó } \mu\text{g AFM}_1 / \text{L}$$

Donde;

50mL; volumen de la alícuota de leche

50μL; Loop de inyección

200μL; Volumen de reconstitución de las muestras.

Muestra	Area de AFM1 en la muestra	ng de AFM1 en la muestra	ngAFM1/mL
1	707.02	0.5714	0.0457
1a	656.97	0.5306	0.0424
1b	690.6	0.5580	0.0446
3	4626.89	3.7708	0.3017
3a	4531.4	3.6928	0.2954
3b	4496.18	3.6641	0.2931
5	12967.73	10.5785	0.8463
5a	12958.01	10.5706	0.8456
5b	12598.64	10.2773	0.8222

## 5. Procedimiento y resultados.

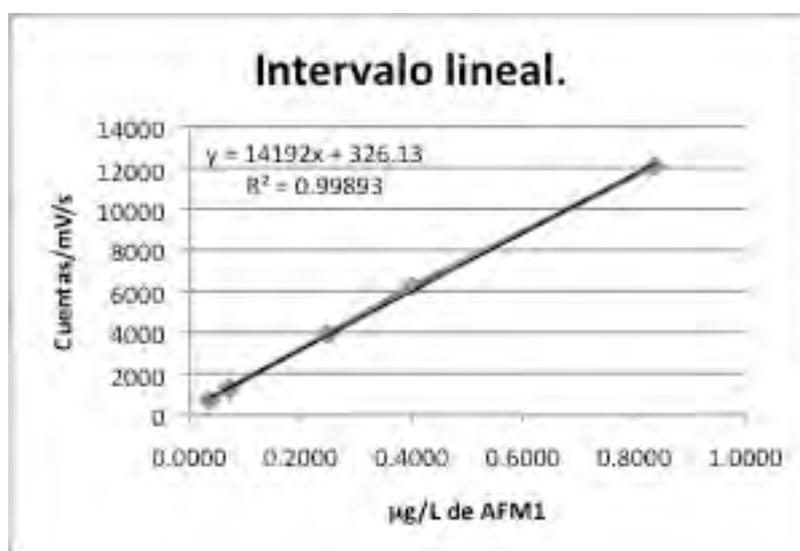
### 5.1. Intervalo lineal.

Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

Muestras adicionadas, cinco niveles de concentración, cada nivel por triplicado.

a) Graficar la respuesta analítica (y), contra nivel de concentración (x).

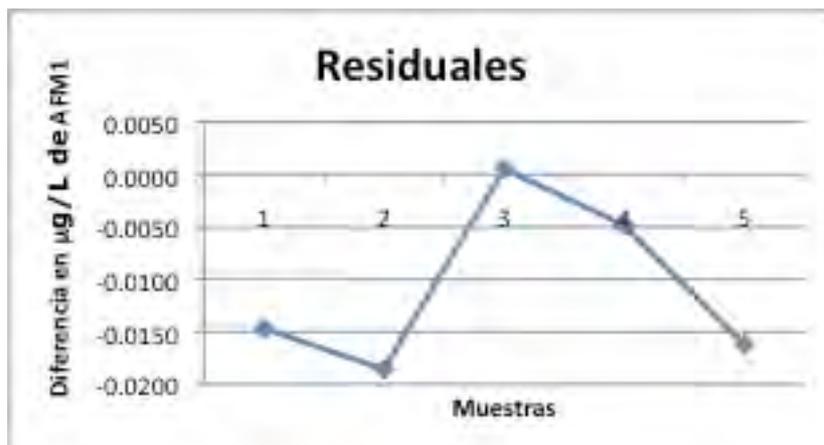
$\mu\text{g/L}$ de AFM1 en la muestra	Areas Cuentas/ mV/ s
0.0353	716.55
0.0713	1260.42
0.2478	3927.33
0.4012	6246.03
0.8364	12074.52



b) Comprobar visualmente la existencia de linealidad. Comprobado.

c) Elaborar un gráfico de residuales. Sustituir los valores de área en la ecuación de la recta y despejar el valor de masa en ng de AFM1.

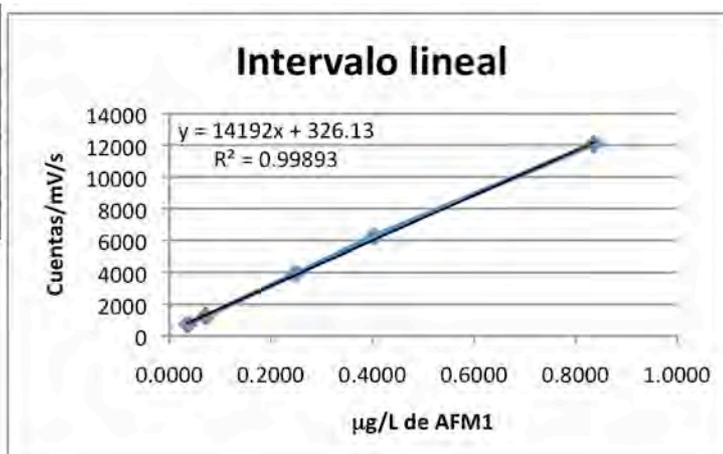
Muestra	Area de AFM1 en la muestra	$x=y-b/m$	Adicion valor teorico	Diferencia en $\mu\text{g/L}$ de AFM1
1	716.55	0.0275	0.0422	-0.0147
2	1260.42	0.0658	0.0844	-0.0186
3	3927.33	0.2537	0.2532	0.0005
4	6246.03	0.4171	0.422	-0.0049
5	12074.52	0.8278	0.844	-0.0162



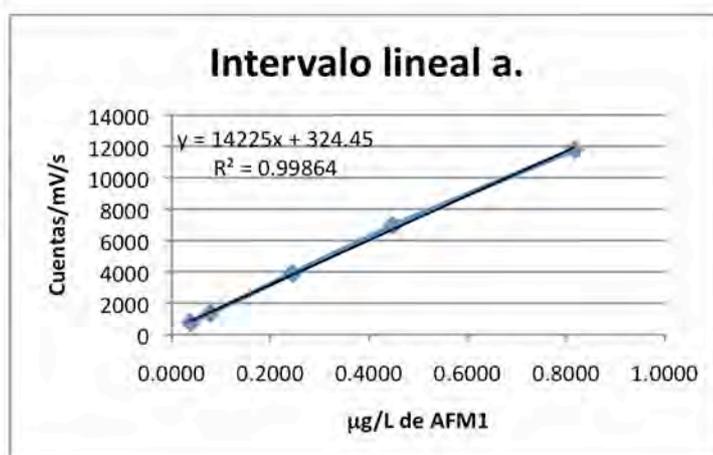
d) Confirmar aleatoriedad en los residuales alrededor de la recta. Confirmado.

e) Calcular el intervalo de confianza del intercepto.

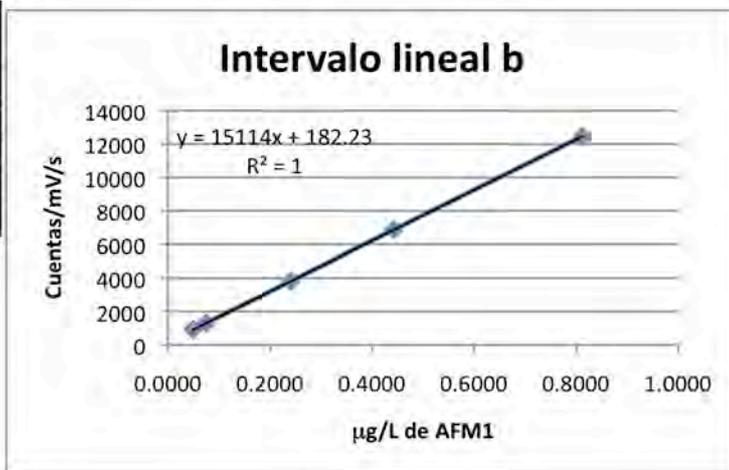
$\mu\text{g/L}$ de AFM1 en la muestra	Areas Cuentas/ mV/ s
0.0353	716.55
0.0713	1260.42
0.2478	3927.33
0.4012	6246.03
0.8364	12074.52



$\mu\text{g/L}$ de AFM1 en la muestra	Areas Cuentas/ mV/ s
0.0382	759.25
0.0774	1352.91
0.2451	3887.16
0.4484	6959.66
0.8170	11794.31



µg/L de AFM1 en la muestra	Areas Cuentas/ mV/ s
0.0491	923.93
0.0749	1314.53
0.2409	3823.56
0.4420	6862.34
0.8119	12453.3



\*Debido a que el valor de 182.23 esta por debajo de los otros dos, se tomo la decisión de eliminarlo.

<b>Ordenada (b)</b>	
	326.13
	324.45
x=	325.29
S=	1.19

### Intervalo de confianza

$$\mu = x \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}; \text{ para un 98\% de probabilidad}$$

$$\mu = 325.29 \pm 6.695 \frac{1.19}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 325.29 \pm 4.6$$

### 5.2. Intervalo de trabajo.

Intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior (Incluyendo dichas concentraciones) y para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad.

Utilizar los datos obtenidos en la estimación del intervalo lineal.

a) Calcular la cantidad recuperada para cada nivel.

Nivel	Concentracion Teorica ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentracion Obtenida( $\mu\text{g/L}$ )	% de recuperacion
1	0.0422	0.0353	83.73
2	0.0844	0.0713	84.50
3	0.2532	0.2478	97.86
4	0.422	0.4012	95.07
5	0.844	0.8364	99.10

b) Considerar los niveles que cumplen con los criterios de recuperaci3n y repetibilidad establecidos.

Criterio de aceptaci3n:

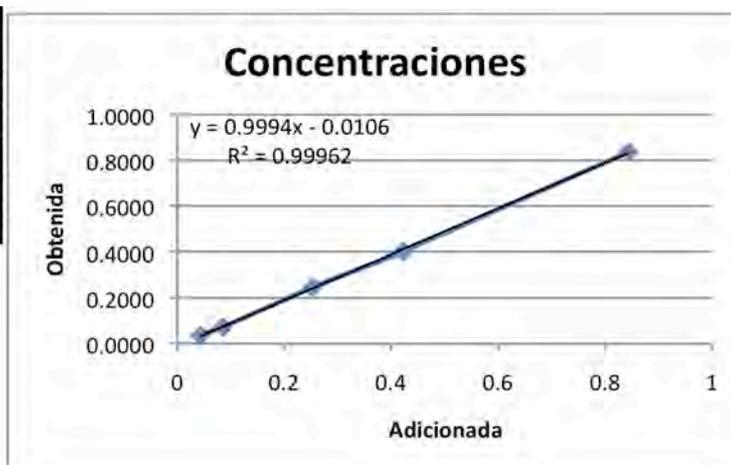
% de recobro	
$\leq 1 \mu\text{g/L}$	Intervalo
	50 a 120 %

Repetibilidad y precisi3n intermedia	
$\leq 1 \mu\text{g/L}$	Coficiente de variaci3n
	$\text{CV} \leq 35\%$

Todos los puntos cumplen con los criterios de aceptaci3n.

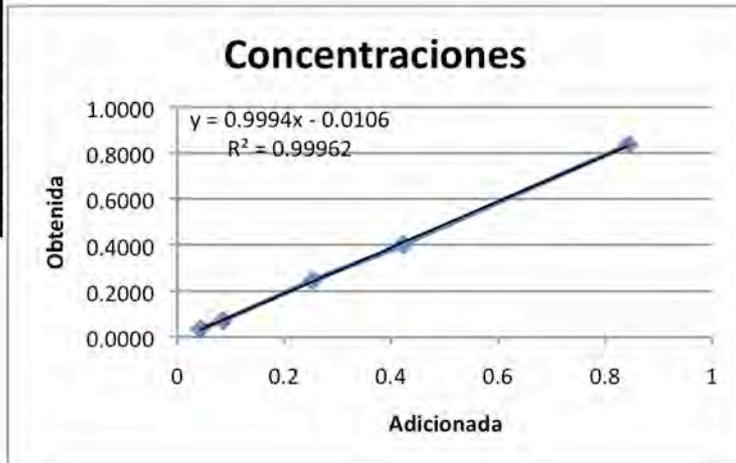
c) Graficar la concentraci3n obtenida (y) vs la concentraci3n adicionada (x).

Concentracion adicionada	Concentracion obtenida
0.0422	0.0353
0.0844	0.0713
0.2532	0.2478
0.422	0.4012
0.844	0.8364

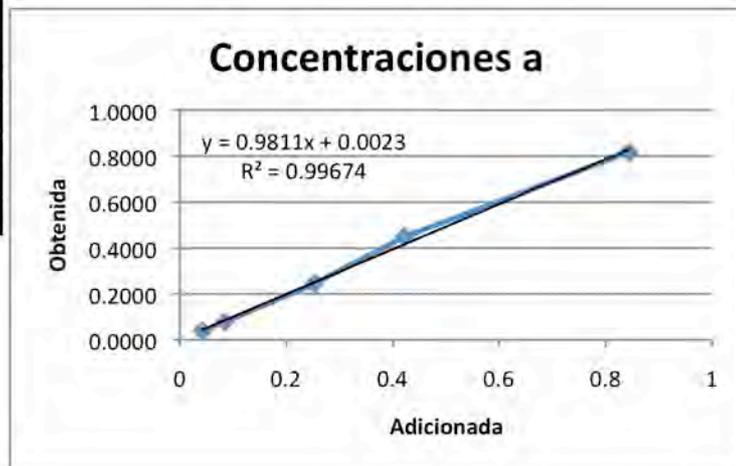


d) Calcular el coeficiente de correlaci3n y el intervalo de confianza de la pendiente.

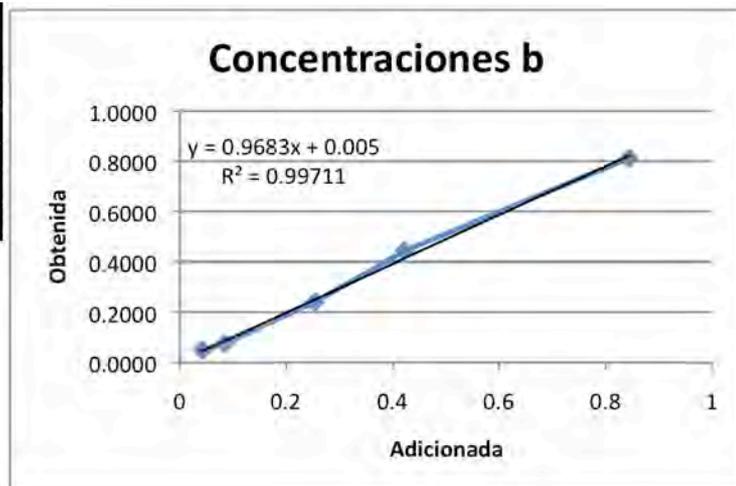
Concentracion adicionada	Concentracion obtenida
0.0422	0.0353
0.0844	0.0713
0.2532	0.2478
0.422	0.4012
0.844	0.8364



Concentracion adicionada	Concentracion obtenida
0.0422	0.0382
0.0844	0.0774
0.2532	0.2451
0.422	0.4484
0.844	0.8170



Concentracion adicionada	Concentracion obtenida
0.0422	0.0491
0.0844	0.0749
0.2532	0.2409
0.422	0.4420
0.844	0.8119



Pendiente (m)	
x=	0.9994
	0.9811
	0.9683
S=	0.9829
	0.02

## Intervalo de confianza

$$\mu = x \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}; \text{ para un 98\% de probabilidad}$$

$$\mu = 0.9829 \pm 6.965 \frac{0.02}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 0.9829 \pm 0.08$$

### 5.3. Limite de cuantificación.

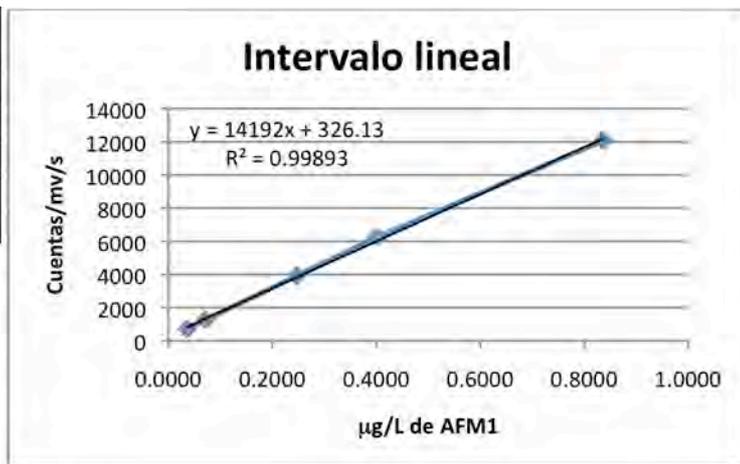
El analito (Micotoxina), cae en la categoría II, trazas, por lo que solo se determinará el limite de cuantificación.

Limite de cuantificación: Es la concentración mas baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas.

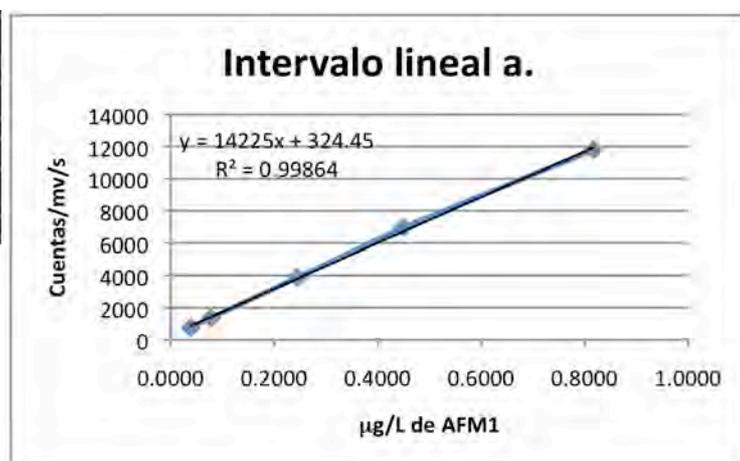
Utilizar los datos obtenidos en la estimación del intervalo lineal.

a) Calcular la pendiente (m) y la desviación estándar de la ordenada al origen ( $sb_0$ ) a partir de la respuesta analítica (y) vs. nivel de concentración adicionado (x).

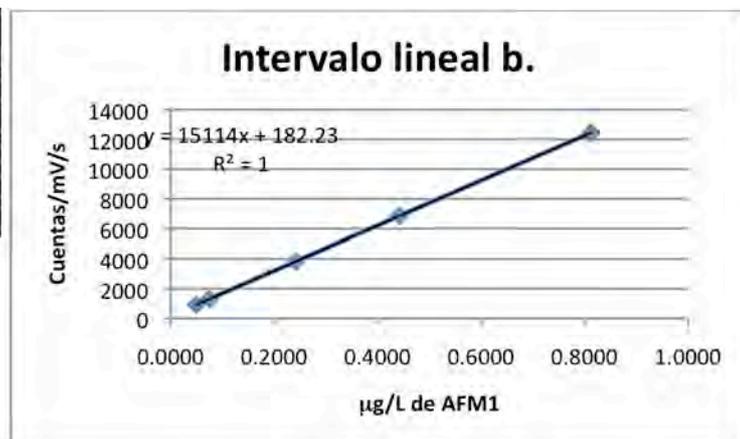
$\mu\text{g/L}$ de AFM1 en la muestra	Areas Cuentas/ mV/ s
0.0353	716.55
0.0713	1260.42
0.2478	3927.33
0.4012	6246.03
0.8364	12074.52



$\mu\text{g/L}$ de AFM1 en la muestra	Areas Cuentas/ mV/ s
0.0382	759.25
0.0774	1352.91
0.2451	3887.16
0.4484	6959.66
0.8170	11794.31



$\mu\text{g/L}$ de AFM1 en la muestra	Areas Cuentas/ mV/ s
0.0491	923.93
0.0749	1314.53
0.2409	3823.56
0.4420	6862.34
0.8119	12453.3



	Ordenada (b)	Pendiente (m)
	326.13	14192
	324.45	14225
	182.23	15114
x=	277.60	14510.33
S=	82.60	523.05

b) Estimar el límite con la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10 * sb_0}{m}$$

$$LC = \frac{10 * 82.60}{14510.33}$$

$$LC = 0.06 \mu\text{g}/L$$

#### **5.4. Recuperación y sesgo.**

Recuperación: cantidad del analito recuperada cuando la muestra de prueba es conducida a través del método analítico completo. Es un parámetro cuantitativo para evaluar la exactitud.

Sesgo: Es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de referencia aceptado o conocido. Es un parámetro cuantitativo para evaluar la exactitud.

Utilizar los datos obtenidos en la estimación del intervalo de trabajo.

Concentracion adicionada	Concentracion obtenida	% de Recobro
0.0422	0.0353	83.73
0.0844	0.0713	84.50
0.2532	0.2478	97.86
0.422	0.4012	95.07
0.844	0.8364	99.10

Concentracion adicionada	Concentracion obtenida	% de Recobro
0.0422	0.0382	90.43
0.0844	0.0774	91.75
0.2532	0.2451	96.81
0.422	0.4484	106.26
0.844	0.8170	96.80

Concentracion adicionada	Concentracion obtenida	% de Recobro
0.0422	0.0491	116.25
0.0844	0.0749	88.74
0.2532	0.2409	95.15
0.422	0.4420	104.73
0.844	0.8119	96.20

Concentracion adicionada	Concentracion obtenida (Promedio)	Direrencia
0.0422	0.0409	-0.0013
0.0844	0.0746	-0.0098
0.2532	0.2446	-0.0086
0.422	0.4305	0.0085
0.844	0.8218	-0.0222
Sesgo		-0.0335

a) Determinar el intervalo de confianza de la recuperación.

**Intervalo de confianza por nivel de adición.**

**Nivel 1**

x=	96.80
s=	17.17
n=	3
Raiz (n)=	1.73
t=	4.303

$$\mu = x \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}; \text{ para un 95\% de probabilidad}$$

$$\mu = 96.80 \pm 4.303 \frac{17.17}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 96.80 \pm 42.65\%$$

**Nivel 2**

x=	88.33
s=	3.64
n=	3
Raiz (n)=	1.73
t=	4.303

$$\mu = 88.33 \pm 4.303 \frac{3.64}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 88.33 \pm 9.05\%$$

**Nivel 3**

x=	96.60
s=	1.37
n=	3
Raiz (n)=	1.73
t=	4.303

$$\mu = 96.60 \pm 4.303 \frac{1.37}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 96.60 \pm 3.40\%$$

**Nivel 4**

x=	102.02
s=	6.07
n=	3
Raiz (n)=	1.73
t=	4.303

$$\mu = 102.02 \pm 4.303 \frac{6.07}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 102.02 \pm 15.07\%$$

**Nivel 5**

x=	97.37
s=	1.53
n=	3
Raiz (n)=	1.73
t=	4.303

$$\mu = 97.37 \pm 4.303 \frac{1.53}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 97.37 \pm 3.81\%$$

## 5.5. Repetibilidad.

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista usando los mismos instrumentos y métodos en intervalos cortos de tiempo.

a) Considerar los resultados obtenidos (% de recobro) para los niveles; inferior, medio y superior estimados en el intervalo de trabajo como los datos para el analista 1, equipo 1, día 1.

		Analista 1		
		Nivel 1	Nivel 3	Nivel 5
		% de recobro	% de recobro	% de recobro
Día 1		83.73	97.86	99.10
		90.43	96.81	96.80
		116.25	95.15	96.20
Día 2		103.05	77.72	103.87
		102.32	78.93	100.96
		101.73	78.61	103.48
	x=	99.58	87.51	100.07
	s=	11.29	10.00	3.27
	$\sigma$ =	10.30	9.13	2.99
	C.V=	11.33	11.43	3.27
	$s^2$ =	127.38	100.07	10.70
	$\sigma^2$ =	106.15	83.39	8.92
	N=	6.00	6.00	6.00
	$\chi^2$ =	6.00	6.00	6.00

Criterio de aceptación:

% de recobro	
$\leq 1 \mu\text{g/L}$	Intervalo
	50 a 120 %

Repetibilidad y precisión intermedia	
$\leq 1 \mu\text{g/L}$	Coefficiente de variación
	CV $\leq$ 35%

$\chi^2$
$\chi^2_{0,95} = 11.05$ para 5 gl
$\chi^2$ calculada $\leq \chi^2$ tablas

## 5.6. Precisión intermedia.

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por días, analistas o instrumentos diferentes usando el mismo método. Es un parámetro cuantitativo para evaluar la precisión.

a) Considerar los resultados obtenidos (% de recobro) para los niveles; inferior, medio y superior estimados en el intervalo de trabajo como los datos para el analista 1 y 2.

		Nivel 1	Nivel 3	Nivel 5
		% de recobro	% de recobro	% de recobro
Analista 1	Día 1	83.73	97.86	99.10
		90.43	96.81	96.80
		116.25	95.15	96.20
	Día 2	103.05	77.72	103.87
		102.32	78.93	100.96
		101.73	78.61	103.48
x=		99.58	87.51	100.07
s=		11.29	10.00	3.27
C.V=		11.33	11.43	3.27
s <sup>2</sup> =		127.38	100.07	10.70

		Nivel 1	Nivel 3	Nivel 5
		% de recobro	% de recobro	% de recobro
Analista 2	Día 1	91.20	97.21	100.46
		91.90	97.04	98.91
		92.21	97.61	99.85
	Día 2	108.33	119.14	100.27
		100.58	116.68	100.20
		105.78	115.77	97.41
x=		98.33	107.24	99.52
s=		7.62	10.96	1.17
C.V=		7.75	10.22	1.17
s <sup>2</sup> =		58.04	120.17	1.37

F <sub>fisher</sub> =	2.1948	1.2009	7.8316
-----------------------	--------	--------	--------

		Nivel 1	Nivel 3	Nivel 5
		% de recobro	% de recobro	% de recobro
Analista 1	Día 1	83.73	97.86	99.10
		90.43	96.81	96.80
		116.25	95.15	96.20
	Día 2	103.05	77.72	103.87
		102.32	78.93	100.96
		101.73	78.61	103.48
Analista 2	Día 1	91.20	97.21	100.46
		91.90	97.04	98.91
		92.21	97.61	99.85
	Día 2	108.33	119.14	100.27
		100.58	116.68	100.20
		105.78	115.77	97.41
x=		98.96	97.38	99.79
s=		9.20	14.36	2.36
C.V=		9.30	14.75	2.36

Criterio de aceptación:

% de recobro	
≤ 1 µg/L	Intervalo
	50 a 120 %

Repetibilidad y precisión intermedia	
≤ 1 µg/L	Coefficiente de variación
	CV ≤ 35%

F <sub>Fisher</sub>
F <sub>Fisher</sub> = 11; para 5 gl
F <sub>Fisher</sub> calculada ≤ F <sub>Fisher</sub> tablas

### 5.7. Incertidumbre (U).

Estimación que caracteriza el intervalo de valores, dentro de los cuales se encuentra el valor convencionalmente verdadero de la magnitud medida.

#### Valor convencionalmente verdadero.

Valor atribuido a una magnitud particular y aceptado, algunas veces por convención, como un valor que tiene una incertidumbre apropiada para un propósito determinado.

La incertidumbre esta asociada al modelo matemático para la determinación de la magnitud buscada, en otras palabras, para determinar la incertidumbre del método de AFM<sub>1</sub>, se deben obtener y combinar todas las incertidumbres relacionadas al modelo matemático siguiente.

Modelo Matemático:

$$\text{ng/mL de AFM}_1 = \mu\text{g/L de AFM}_1 = \frac{\text{ng AFM}_1}{50 \text{ mL } (50 \mu\text{L} / 200 \mu\text{L})} = \frac{\text{ng AFM}_1}{12.5 \text{ mL}}$$

En donde:

ng AFM<sub>1</sub>= ng obtenidos por interpolación de la curva de calibración.

50 mL= porción de la muestra en la que se realiza el análisis.

50  $\mu\text{L}$  = cantidad de muestra que se inyecta al cromatógrafo.  
 200  $\mu\text{L}$  = cantidad de disolvente utilizado para reconstituir la muestra extraída de la columna de inmunoafinidad.

### Fuentes de Incertidumbre

$U_{\text{ng AFM1}}$	$U_{50 \text{ mL}}$	$U_{50 \mu\text{L}}$	$U_{200 \mu\text{L}}$
$U_1$ coeficiente de extinción molecular del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	$U_{\text{tol } \pm}$	$U_{\text{tol } \pm}$	$U_{\text{tol } \pm}$
$U_2$ preparación de la curva de calibración	$U_{\text{rep}}$	$U_{\text{rep}}$	$U_{\text{rep}}$
$U_3$ valores de y (lecturas de las muestras)	$U_{\text{Aforo}}$	$U_{\text{Aforo}}$	$U_{\text{Aforo}}$
$U_4$ valores de x (ng de AFM <sub>1</sub> )	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

### Desarrollo Matemático:

$U$  de la preparación de las soluciones de dicromato:

$U_a$  de solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.018 N

$U_b$  de solución de Dicromato 0.25 mM

$U_c$  de solución de Dicromato 0.125 mM

$U_d$  de solución de Dicromato 0.0625 mM

$$\frac{U_a}{0.018 \text{ N}} = \sqrt{\left[\frac{U_{1 \text{ mL}}}{1 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{U_{1 \text{ L}}}{1000 \text{ mL}}\right]^2} = \sqrt{\left[\frac{0.0040 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{0.3366 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}\right]^2}$$

$$U_a = \sqrt{0.0040^2 + 0.0003366^2} = 0.004 \times 0.018 \text{ N} = 0.000072 \text{ N}$$

$$\frac{U_b}{0.25 \text{ mM}} = \sqrt{\left[\frac{U_{0.0735 \text{ g}}}{0.0735 \text{ g}}\right]^2 + \left[\frac{0.3366 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{0.000072 \text{ N}}{0.018 \text{ N}}\right]^2}$$

$U$  de calibración según reporte para masas de 0.1g a 1.0 g = 0.00010 g

$$U_c = 0.10 \text{ mg} / 2 = 0.05 \text{ mg}$$

$U$  de la repetibilidad del pesaje según bitácora de verificación S = 0.0142 mg

$$U_c = \sqrt{U_{\text{cal.}}^2 + U_{\text{rep.}}^2} = \sqrt{0.05^2 + 0.0142^2} = \mathbf{0.052 \text{ mg}}$$

$$\frac{U_b}{0.25 \text{ mM}} = \sqrt{\left[ \frac{0.000052 \text{ g}}{0.0735 \text{ g}} \right]^2 + [0.0003366]^2 + [0.004]^2 = \sqrt{0.00070^2 + 0.00034^2 + 0.004^2}}$$

$$U_b = 0.0041 \times 0.25 \text{ mM} = \mathbf{0.001 \text{ mM}}$$

$$\frac{U_c}{0.125 \text{ mM}} = \sqrt{\left[ \frac{U_{0.25 \text{ mM}}}{0.25 \text{ mM}} \right]^2 + \left[ \frac{U_{25 \text{ mL}}}{25 \text{ mL}} \right]^2 + \left[ \frac{U_{50 \text{ mL}}}{50 \text{ mL}} \right]^2}$$

$$\frac{U_c}{0.125 \text{ mM}} = \sqrt{\left[ \frac{0.001 \text{ mM}}{0.25 \text{ mM}} \right]^2 + \left[ \frac{0.0184 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right]^2 + \left[ \frac{0.0367 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \right]^2}$$

$$U_c / 0.125 \text{ mM} = \sqrt{0.004^2 + 0.00074^2 + 0.00073^2} = 0.0041$$

$$U_c = 0.125 \text{ mM} \times 0.0041 = \mathbf{0.00051 \text{ mM}}$$

$$\frac{U_d}{0.0625 \text{ mM}} = \sqrt{\left[ \frac{0.00051 \text{ mM}}{0.125 \text{ mM}} \right]^2 + \left[ \frac{0.0184 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right]^2 + \left[ \frac{0.0367 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \right]^2}$$

$$U_d / 0.0625 \text{ mM} = \sqrt{0.0041^2 + 0.00074^2 + 0.00073^2} = 0.0042$$

$$U_d = 0.0042 \times 0.0625 \text{ mM} = \mathbf{0.00026 \text{ mM}}$$

Incertidumbres de las disoluciones de dicromato:

0.25 mM	0.001 mM
0.125 mM	0.00051 mM
0.0625 mM	0.00026 mM

Incertidumbre del coeficiente de extinción molecular ( $\xi$ ) para el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .

$$\xi = \frac{\text{Absorbancia} \times 1000}{\text{concentración Mm}}$$

Nota: Es necesario obtener U de las lecturas de  $\xi$  y de las lecturas de la concentración de AFM<sub>1</sub>, por lo que se utilizan datos de otras determinaciones anteriores.

Disolución	$\xi$	$\xi$	$\xi$	$\xi$	Promedio de los Coeficientes  3156.10 UA/mM
0.0625 mM	3132.8	3238.4	3158.4	3070.4	
0.125 mM	3192.0	3172.0	3157.6	3125.6	
0.25 mM	3138.8	3173.6	3150.8	3162.8	
Promedio	3154.5	3194.7	3155.6	3119.6	
S	32.59	37.88	4.18	46.49	
Us = S/ $\sqrt{3}$	18.81	21.87	2.41	26.84	

U combinada de los  $\xi$  del K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> referida al promedio de los coeficientes:

$$U_{\xi_1/3156.1} = \sqrt{\left[\frac{18.81}{3154.5}\right]^2 + \left[\frac{21.87}{3194.7}\right]^2 + \left[\frac{2.41}{3155.6}\right]^2 + \left[\frac{26.84}{3119.6}\right]^2}$$

$$U_{\xi_1/3156.1} = \sqrt{[0.0059]^2 + [0.0068]^2 + [0.00076]^2 + [0.0086]^2} = 0.0125$$

$$U_{\xi_1} = 3156.1 \times 0.0125 = \mathbf{39.45 \text{ UA mL/mM}}$$

Incertidumbre del factor de corrección

Coeficiente para el dicromato = 3160 UA mL/mM

$$F_c = 3160 / \xi = 3160 / 3264.89 = 0.97$$

$$U_{fc} = 0.97 \times 0.0125 = \mathbf{0.0121}$$

Incertidumbre de la solución Stock de Aflatoxina M1

Modelo Matemático:

$$\mu\text{g/L de AMF}_1 = \frac{A \times PM \times 1000 \times F_c}{\xi}$$

En donde:

A= absorbancia de la solución Stock de AFM1

PM= peso molecular de AFM1

F<sub>c</sub> = factor de corrección

ξ = coeficiente de absortividad de AFM1

Fuentes de Incertidumbre

U de la absorbancia	U del coeficiente ξ	U de factor
0.0016 UA	39.45 UA mL/mM	Ya esta involucrada

Valor al que se hace referencia de AFM1

$$\text{ng}/\mu\text{L de AFM1} = \frac{0.1315 \times 328 \times 1000 \times 0.97}{19850} = 2.1077 \approx 2.11 \mu\text{g}/\text{mL} = \text{ng}/\mu\text{L}$$

$$\text{Análisis dimensional} = \frac{UA \times 1000 \times 0.97}{UAL/gmol} = \mu\text{g}/\text{mL}$$

Concentración de la solución de stock de AFM<sub>1</sub>=2.11 μg/mL= 2.11 ng/μL

$$\frac{U_{st}}{2.11 \text{ ng}/\mu\text{L}} = \sqrt{\left[\frac{U_A}{0.1315 \text{ UA}}\right]^2 + \left[\frac{U_x}{3156.1}\right]^2} = \sqrt{\left[\frac{0.0016 \text{ UA}}{0.1315 \text{ UA}}\right]^2 + \left[\frac{39.45}{3156.13}\right]^2}$$

$$\frac{U_{st}}{2.11 \text{ ng}/\mu\text{L}} = \sqrt{[0.012]^2 + [0.0125]^2} = 0.017$$

$$U_{st} = 2.11 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 0.017 = \mathbf{0.036 \text{ ng}/\mu\text{L}}$$

Incertidumbre de la curva de calibración

Preparación de la curva de trabajo de AFM<sub>1</sub>.

Identificación	Descripción	Concentración
Solución de trabajo	1.25 mL de disolución de 2.11 ng/μL, aforo a 5 mL	0.53 ng/ μL
Nivel 1	0.1 mL de disolución de 0.53 ng/μL, aforo a 5 mL*	0.53 ng
Nivel 2	0.2 mL de disolución de 0.53 ng/μL, aforo a 5 mL*	1.06 ng
Nivel 3	1 mL de disolución de 0.53 ng/μL, aforo a 5 mL*	5.30 ng
Nivel 4	2 mL de disolución de 0.53 ng/μL, aforo a 5 mL*	10.60 ng

\*Considerar la multiplicación por el valor del loop 50  $\mu\text{L}$

Incertidumbre del material volumétrico

Material	$U_{\text{exp.}\pm}$	$U_c$
Pipeta 500 $\mu\text{L}$	0.0004 mL	0.0002 mL
Pipeta 1 mL	0.0080 mL	0.0040 mL
Pipeta 2 mL	0.0116 mL	0.0058 mL
Pipeta 5 mL	0.0174 mL	0.0087 mL
Pipeta 10 mL	0.0236 mL	0.0118 mL
Pipeta 15 mL	0.0354 mL	0.0177 mL
Pipeta 25 mL	0.0368 mL	0.0184 mL
Pipeta 50 mL	0.0626 mL	0.0313 mL
Pipeta 100 mL	0.1044 mL	0.0522 mL
Matraz 5 mL	0.0464 mL	0.0232 mL
Matraz 10 mL	0.0468 mL	0.0234 mL
Matraz 25 mL	0.0478 mL	0.0239 mL
Matraz 50 mL	0.0734 mL	0.0367 mL
Matraz 100 mL	0.1252 mL	0.0626 mL
Matraz 1000 mL	0.6732 mL	0.3366 mL

Incertidumbre de la preparación de la solución de trabajo de 0.53  $\text{ng}/\mu\text{L}$

$$\frac{U_{\text{AFM1}}}{0.53 \text{ ng}/\mu\text{L}} = \sqrt{\left[\frac{U_{2.11 \mu\text{g/mL}}}{2.11 \mu\text{g/mL}}\right]^2 + \left[\frac{U_{1.25 \text{ mL}}}{1.25 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{U_{5 \text{ mL}}}{5 \text{ mL}}\right]^2}$$

$$\frac{U_{\text{AMF1}}}{0.53 \text{ ng}/\mu\text{L}} = \sqrt{\left[\frac{0.036 \mu\text{g/mL}}{2.11 \mu\text{g/mL}}\right]^2 + \left[\frac{0.0002 \text{ mL}}{1.25 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{0.0232 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}\right]^2}$$

$$\frac{U_{\text{AMF1}}}{0.53 \text{ ng}/\mu\text{L}} = \sqrt{[0.0171]^2 + [0.00016]^2 + [0.00464]^2} = 0.0177$$

$$U_{0.53\mu\text{g/mL}} = 0.0177 \times 0.53 \mu\text{g/mL} = 0.0093 \mu\text{g/mL} = \mathbf{0.0093 \text{ ng}/\mu\text{L}}$$

Incertidumbre para los niveles de la curva de trabajo:

$$\frac{U_{\text{AMF1}}}{0.53 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + \left[\frac{U_{0.1 \text{ mL}}}{0.1 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{U_{5.0 \text{ mL}}}{5.0 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{U_{50 \mu\text{L}}}{50 \mu\text{L}}\right]^2}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{0.53 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + \left[\frac{0.0002 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{0.0232 \text{ mL}}{5.0 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{0.3 \mu\text{L}}{50 \mu\text{L}}\right]^2}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{0.53 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + [0.002]^2 + [0.00464]^2 + [0.006]^2} = 0.0193$$

$$U_{AFM1} = 0.53 \text{ ng} \times 0.0193 = \mathbf{0.0102 \text{ ng}}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{1.06 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + \left[\frac{U_{0.2 \text{ mL}}}{0.2 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{U_{5.0 \text{ mL}}}{5.0 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{U_{50 \mu\text{L}}}{50 \mu\text{L}}\right]^2}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{1.06 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + \left[\frac{0.0002 \text{ mL}}{0.2 \text{ mL}}\right]^2 + [0.00464]^2 + [0.006]^2}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{1.06 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + [0.001]^2 + [0.00464]^2 + [0.006]^2} = 0.0193$$

$$U_{AFM1} = 1.06 \text{ ng} \times 0.0193 = \mathbf{0.0205 \text{ ng}}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{5.3 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + \left[\frac{0.004 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}\right]^2 + [0.00464]^2 + [0.006]^2}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{5.3 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + [0.004]^2 + [0.00464]^2 + [0.006]^2} = 0.0197$$

$$U_{AFM1} = 5.3 \text{ ng} \times 0.0197 = \mathbf{0.1044 \text{ ng}}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{10.60 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + \left[\frac{0.0058 \text{ mL}}{2 \text{ mL}}\right]^2 + [0.00464]^2 + [0.006]^2}$$

$$\frac{U_{AMF1}}{10.6 \text{ ng}} = \sqrt{[0.0177]^2 + [0.0029]^2 + [0.00464]^2 + [0.006]^2} = 0.0195$$

$$U_{AFM1} = 10.6 \text{ ng} \times 0.0195 = \mathbf{0.2067 \text{ ng}}$$

Incertidumbres de los niveles.

Nivel	Factor de U	Uc en ng (U <sub>γ</sub> )
0.53 ng	0.0193	0.0102
1.06 ng	0.0193	0.0205
5.30 ng	0.0197	0.1044
10.60 ng	0.0195	0.2067

Incertidumbre de la lectura U<sub>y</sub>

Modelo Matemático:

$$U_y = \sqrt{\left[\frac{\delta y}{\delta x_1} U_{x1}\right]^2 + \left[\frac{\delta y}{\delta x_2} U_{x2}\right]^2 + \left[\frac{\delta y}{\delta x_3} U_{x3}\right]^2 + \left[\frac{\delta y}{\delta x_4} U_{x4}\right]^2}; \text{ considerar } \frac{\delta y}{\delta x} = m$$

Datos obtenidos de cuatro curvas:

Curva No.	Pendiente (área/ng)	Intercepto (ng)	Áreas para 0.53 ng
1	1209	182.5	633.489
2	1190	46.22	711.484
3	1196	93.07	680.548
4	1225	6.923	715.243
Promedio	1205	82.18	685.19
S	15.513	75.585	37.811
Us=S/√N	<b>7.76</b>	<b>37.79</b>	<b>18.91</b>

$$U_y = \sqrt{[1205 \times 0.0102]^2 + [1205 \times 0.0205]^2 + [1205 \times 0.044]^2 + [1205 \times 0.2067]^2}$$

$$U_y = \sqrt{1205^2 [0.0102^2 + 0.0205^2 + 0.1044^2 + 0.2067^2]} = \mathbf{280.4 \text{ cuentas/ mv/seg}}$$

**U<sub>y</sub> = 280.4 cuentas/ mv/seg**

Incertidumbre de la lectura en la curva de calibración U<sub>x</sub>

Considerando la ecuación de la recta

$$U_x = \sqrt{\left[\frac{\delta x}{\delta y} U_y\right]^2 + \left[\frac{\delta x}{\delta b} U_b\right]^2 + \left[\frac{\delta x}{\delta m} U_m\right]^2}$$

$$\frac{\delta x}{\delta y} = -\frac{1}{m} = 1/1205 = -0.00083 \text{ mV/ng}$$

$$\frac{\delta x}{\delta b} = \frac{1}{m} = 1/1205 = 0.00083 \text{ mV/ng}$$

$$\frac{\delta x}{\delta m} = \frac{-y + b}{m^2} = \frac{-685.19 + 82.18}{1205^2} = -0.0004 \text{ 2mV/ng}^2$$

$$U_x = \sqrt{\left[\frac{\delta x}{\delta y} U_y\right]^2 + \left[\frac{\delta x}{\delta b} U_b\right]^2 + \left[\frac{\delta x}{\delta m} U_m\right]^2}$$

$$U_x = \sqrt{[-0.00083 \times 280.4]^2 + [0.00083 \times 37.79]^2 + [-0.00042 \times 7.76]^2}$$

$$U_x = \sqrt{[-0.233]^2 + [0.031]^2 + [0.00325]^2} = 0.235 \text{ ng}$$

**U<sub>x</sub> = 0.235 ng**

Considerar:

El valor al que se hace referencia 0.53 ng equivalente a 0.042 µg/L

$$\text{ng/mL AFM1} = \mu\text{g/L AFM1} = \frac{\text{ngAFM1}^*}{50 \text{ mL} (50 \mu\text{L}/200 \mu\text{L})} = \frac{0.53 \text{ ng}}{12.5 \text{ mL}} = 0.042 \text{ ng/mL ó } \mu\text{g/L}$$

Incertidumbre del contenido de AMF1

$$U_{\mu\text{g/L}/0.042 \mu\text{g/L}} = \sqrt{\left[\frac{U_{0.53 \text{ ng}}}{0.53 \text{ ng}}\right]^2 + \left[\frac{U_{50 \text{ mL}}}{50 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{U_{200 \mu\text{L}}}{200 \mu\text{L}}\right]^2}$$

$$U_{\mu\text{g/L}}/0.042 \mu\text{g/L} = \sqrt{\left[\frac{0.235 \text{ ng}}{0.53 \text{ ng}}\right]^2 + \left[\frac{0.0367 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{0.2 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}}\right]^2}$$

$$\frac{U \mu\text{g/L}}{0.042 \mu\text{g/L}} = \sqrt{0.4434^2 + 0.000734^2 + 0.001^2} = 0.443$$

$$U_{\mu\text{g/L}} 0.443 \times 0.042 \mu\text{g/L} = \mathbf{0.0186 \mu\text{g/L} \approx 0.019 \text{ equivalente a } U_c}$$

$$U_{\text{exp. } \pm} = 0.019 \times 2 = \pm 0.038 \text{ mg/L}$$

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Es importante mencionar, que se pudo optar por una **validación parcial**, debido a que existe un antecedente del método experimental en cuestión, esto implica, que dicho método ya había sido validado por un organismo regulador, como lo es la COFEPRIS. Esto es de gran importancia, ya que, de no haber existido dicho antecedente, la metodología debía haberse validado bajo otros lineamientos.

Se debe tomar en cuenta que el alcance de este trabajo, únicamente abarco a las leche de vaca líquida; es importante señalarlo por que la norma NOM-243 incluye además a productos tales como; fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos, y en estos no se validó el método.

En el caso de los equipos y materiales empleados, estos contaban con una calibración y/o verificación previa, así mismo, la pureza de los reactivos y patrones de referencia fue de la mejor calidad; con esto se pudo garantizar la confiabilidad de las mediciones y por consiguiente, la de los resultados.

Elegir el tipo de muestra fue uno de los principales obstáculos, pues debido a su naturaleza tan compleja, la leche contiene diversos componentes que dificultaron su procesamiento, en específico, la cantidad de grasa presente. En algunas muestras que fueron candidatas para el análisis, las altas concentraciones de grasa, afectaron el proceso de filtrado, e incluso, algunas columnas de inmunoafinidad fueron obstruidas por completo, esto tuvo dos grandes repercusiones, la primera fue el retraso en la labor experimental y la segunda, las pérdidas económicas de reactivos e insumos, esta última, es un factor que debe cuidarse con mucho recelo dentro de un análisis.

Resulta imprescindible hacer mención de todos los cuidados que se tuvieron durante el procesamiento de las muestras y, aún más importante, la preparación y operación del equipo para cromatografía; a este respecto, se trabajó con gran empeño en adaptar la técnica descrita en la norma, a las condiciones de trabajo del laboratorio donde se llevó a cabo la experimentación, uno de los principales problemas a resolver fue el tiempo de retención del analito (aflatoxina M<sub>1</sub>), el cual, al montar la metodología, se

presentaba muy fluctuante. Este problema fue resuelto elaborando la mezcla para la fase móvil a una temperatura baja, y manteniendo dicha temperatura en el área de trabajo, esto se logró trabajando las muestras a tempranas horas. También fue necesario acondicionar a la columna para cromatografía ODS (octadecilsilano o C-18), esto se logró realizando una limpieza exhaustiva de todo el sistema de inyección, de esta manera, dos puntos críticos de control se adicionaron a la lista; la presión del sistema y las lecturas en el detector de luz ultravioleta. El monitoreo y la verificación de los puntos críticos de control, permitieron llevar a cabo un análisis con la certeza de obtener resultados confiables.

Una situación que es importante mencionar, debido a su relevancia e impacto en los resultados, se presentó al momento de elaborar las diluciones que servirían para la curva de trabajo. Dentro del protocolo experimental, se menciona que para preparar cada punto de dicha curva, es necesario evaporar con ayuda de una corriente de Nitrógeno, pero no se menciona que dicha evaporación debe realizarse a sequedad, pues, de no ser así, los resultados son muy inestables, por lo que no se logran linealidades en el sistema. Esta situación, también aplico para la reconstitución de las muestras de leche adicionadas.

La cromatografía de líquidos es una técnica muy sensible, esto por un lado, es de gran importancia, pues nos permite obtener lecturas de concentraciones muy bajas, a niveles traza, sin embargo, hay que tomar en cuenta, que mientras mas baja sean las cantidades de trabajo, mayor será el error experimental, debido a que la preparación de muestras se lleva a cabo por parte del analista, y aunque en la actualidad se cuenta con material de laboratorio muy especializado siempre estará inmerso el error humano. Esto es precisamente uno de los objetivos de la validación, que a través de datos experimentales y parámetros estadísticos, un analista sea capaz de asegurar que su trabajo es confiable.

Los resultados obtenidos dentro de esta validación tuvieron algunas peculiaridades. Durante la determinación del intervalo lineal, para estimar el intervalo de confianza, se requiere obtener el promedio y la desviación

estándar de tres valores de  $b$  (ordenada al origen), así que se construyeron tres curvas de trabajo cada una con su respectiva ecuación de la recta. Un problema se presentó en una de las rectas, pues al momento de graficarla, el valor de  $b$ , estaba por debajo de los otros dos valores, esto provocó que el valor del intervalo de confianza se elevara mucho, por lo que se tomó la decisión de eliminar dicho valor del cálculo del promedio y de la desviación estándar. Es importante mencionar que todos los valores de  $R^2$  estaban muy cercanos a 1. Si se observan los valores de las concentraciones obtenidas para el primer punto de cada una de las tres curvas (0.0353, 0.0382 y 0.0491  $\mu\text{g/L}$ ), se puede observar que aquel que fue mayor, fue el culpable en la disparidad de los resultados, debido a que provocó que la línea se inclinara más, además tomando en cuenta, que la concentración del primer punto era de 0.0422  $\mu\text{g/L}$ , se puede observar que este punto tuvo una recuperación de más del 100 %. Se piensa que esto pudo haber sido provocado por la acumulación de un pequeño residuo de una inyección previa, y fue arrastrado y cuantificado por el equipo como parte de la inyección posterior.

Este fenómeno se observó en muchos de los valores obtenidos, y no se logró encontrar el motivo por el cual se puede obtener recuperaciones de más del 100 %, se piensa que pudo haberse debido a la acumulación de residuos en el sistema de inyección, a la lectura de algún ruido electrónico y/o a la alta sensibilidad del equipo. Es importante mencionar, que en la guía del CCAYAC, se tiene un intervalo de aceptación del 50 al 120% de recuperación para adiciones  $\leq 1 \mu\text{g/L}$ .

El valor del límite de cuantificación corresponde a 0.06  $\mu\text{g/L}$ , es decir que cualquier valor que se encuentre por debajo de este, se podrá cuantificar pero sin precisión ni veracidad confiables, es por esta razón que el valor del intervalo de confianza para el primer nivel resultó ser tan grande, además esto explica parcialmente el hecho de que en el primer nivel de adiciones se aprecien errores tan altos.

Se considera que tres de los parámetros estadísticos con más valor dentro de una validación, son la repetibilidad y la precisión intermedia (también llamada reproducibilidad) y la incertidumbre, los dos primeros nos permiten evaluar la

eficiencia y el dominio de la técnica por parte del analista. Por su parte, el valor de incertidumbre resulta ser el mas importante de todos, debido a que al llevar a cabo el análisis y desglose de todos los factores que intervienen en dicho valor, se pueden encontrar errores de operación y ejecución del análisis.

## **7. CONCLUSIONES.**

En virtud del objetivo que se tenia planteado al inicio de este trabajo, se logro llevar a cabo la validación parcial del método en cuestión y se lograron obtener resultados satisfactorios con respecto a los parámetros estadísticos evaluados.

El presente trabajo, al ser una guía ejemplificada, podrá utilizarse como material de consulta, y como apoyo visual para cualquiera que desee aprender o ampliar su conocimiento sobre el tema.

## 8. GLOSARIO.

AF: Aflatoxinas.

AFB: Aflatoxinas B.

AFG: Aflatoxinas G.

AFM: Aflatoxinas M.

AFT: Aflatoxinas totales.

CCAYAC: Comisión de control analítico y ampliación de cobertura.

C.V: Coeficiente de variación.

FC: factor de corrección.

kDa: kilodaltones.

kGy: kilo gray.

LC: limite de cuantificación.

mM: milimolar.

Mrad: Macro rad.

N: numero de muestras.

ng: nanogramos.

nm: nanometros.

NOM: Norma oficial Mexicana.

ppb: partes por billón.

UE: Unión Europea.

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molecular.

$\chi^2$ : Ji cuadrada.

$\mu$ L: microlitros.

$\mu$ : intervalo de confianza.

s: desviación estándar.

$\sigma$ : desviación estándar poblacional.

$S^2$ : varianza.

x: promedio.

$\mu$ g/kg pc/día: Microgramos por kilogramo de peso corporal por día.

## 9. BIBLIOGRAFIA.

1. Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos (CCAYAC-CR-03/0). México, CCAYAC 2014.
2. Rivera Coto G. Conceptos Introdutorios a la fitopatología. EUNED. Costa Rica 2007. Pag. 25
3. Adams, M. R., Moss, M. O. Microbiología de los Alimentos. España, Zaragoza: Acriba 1996. Pag. 287
4. Ramírez Gama, R M. Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. México, D.F: Trillas 2015. Pag. 110
5. Moreno B. Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos. Microorganismos en los Alimentos 1. España, Zaragoza: Acriba 2000. Pag. 72, 73
6. Murray Patrick R. Microbiología médica. México, D.F: Elsevier 2014. Pag. 619
7. Stanier R., Villanueva J., Guerrero R., Gacto M. Microbiología. España, Barcelona: Reverte 1992. Pag. 673
8. Soriano del Castillo José Miguel. Micotoxinas en alimentos. España, La Coruña: Díaz de Santos 2007. Pag. 3, 30, 63 a 64, 134, 168 a 195, 214
9. Monroe J. Microbiología moderna de los alimentos. España, Zaragoza: Acriba 2005. Pag. 561
10. Francois L. Leche y productos lácteos. España, Zaragoza: Acriba 1991. Pag. 216 a 216

11. Martínez Larrañaga Ma. R. Micotoxinas: Toxicología alimentaria. España, La Coruña: Díaz de Santos 2012. Pag. 289 a 293
12. Pascual Anderson R. Enfermedades de origen alimentario. España, La Coruña: Díaz de Santos 2005. Pag. 99, 95 a 96
13. Hernández Gil A. Tratado de Nutrición, tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. México, D.F: Editorial Medica Panamericana 2010. 714
14. Valderrama J. Aflatoxin synthesis induction as a Toxic capability for food contaminating fungi. *Revista Información Tecnológica*. 9 (6) 1998. Pag. 258
15. Camean A. Ma., Repetto M. Toxicología Alimentaria. España, La Coruña: Díaz de Santos 2012. Pag. 290
16. Camean A. Ma., Repetto M. Toxicología Avanzada. España, La Coruña: Díaz de Santos 1995. Pag. 238, 240
17. Engleberg N., DiRita V., Dermody S., Schaechter M., Schaechter's mechanisms of microbial disease. España, Barcelona: Wolters Kluwer Health 2013. Pag. 483
18. Calvo Carrillo Ma. C. Toxicología de los alimentos. México, D.F: Mc. Graw Hill 2012. Pag. 255
19. Gallego Martínez L. Producción Ovina y caprina. España, La Mancha: Colección Estudios 1994. Pag. 231, 235
20. Capó Martí M. Toxinología clínica, alimentaria y ambiental. España, Madrid: Editorial Complutense 2007. Pag. 68

21. García V. Introducción a la Microbiología. Costa Rica, San José: EUNED 1995. Pag. 102 a 103
22. Hardisson A. Dieta y cáncer. España, La Coruña: Díaz de Santos 2012. Pag. 601
23. Casado Cimiano P. Guía de las industrias Lácteas Españolas. España, Madrid: Tetrapack 1986. p. 205 a 208.
24. Veisseyre Roger. Lactología técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. España, Zaragoza: Acriba 1988. Pag. 79
25. Forsythe S. Alimentos Seguros. Microbiología. España, Zaragoza: Acriba 2003. Pag. 241
26. Montville T. Microbiología de los Alimentos. España, Zaragoza: Acriba 2008. Pag. 340 a 342
27. Banwart G. Microbiología básica de los alimentos. España, Barcelona: Antrophos 1982. Pag. 196 a 205
28. Ray B. Bhunia A. Fundamentos de Microbiología de Alimentos. México, D.F: Mc Graw Hill 2008. Pag. 199 a 200
29. Robinson R. Microbiología Lactológica. España, Zaragoza: Acriba 1987. Pag. 214
30. Varnam A. Leche y productos lácteos, tecnología, química y microbiología. España, Zaragoza: Acriba 1995. Pag. 31 a 32
31. Bourgeois C. Microbiología Alimentaria Vol. 1. España, Zaragoza: Acriba 1994. Pag. 131 a 132, 138

32. Ramos A. Micotoxinas y Micotoxicosis. España, Madrid: AMV Ediciones 2011. Pag. 170 a 171, 189, 195 a 196, 446
33. Carvajal M. Transformación de la aflatoxina B<sub>1</sub> de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB<sub>1</sub>-ADN. 16 (2) 2013. Pag. 109-120
34. Doyle M. Microbiología de Alimentos. España, Zaragoza: Acriba 2001. Pag. 414, 418
35. Escobar A. Monografía de Aflatoxina. Cuba, Habana: CENSA 2005. Pag. 14
36. Bruton L. Las bases Farmacológicas de la terapéutica. México, D.F: Mc Graw Hill 2012. Pag. 1859
37. Walstra P. Química y física Lactológica. España, Zaragoza: Acriba 1987. Pag. 122 a 123
38. Servicios de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. FAO. Italia, Roma 2004. Pag. Xiii, 9, 10, 15, 16, 19 a 22
39. Gimeno A. (2004). USA, Florida: Ergomix.  
[http://www.adiveter.com/ftp\\_public/articulo1790.pdf](http://www.adiveter.com/ftp_public/articulo1790.pdf)
40. Guerrero. García. Wachter, Regalado. Microbiología de Alimentos. México, D.F: Limusa 2014. Pag. 208 a 209
41. Frazier W. Microbiología de Alimentos. España, Zaragoza: Acriba 1993. Pag. 588
42. NORMA Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Cacao, productos y derivados. I Cacao. II Chocolate. III

Derivados. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial.  
Numeral 7.1.2.2

43.NORMA Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. Numeral 6.3.4.1

44.NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Numeral 6.1.7.1

45.NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. Numeral 5.2.2.5

46.CENAM/EMA, Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas. Mayo 2004.

47.EURACHEM/CITAC, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, S.L.R. Ellison, Editor. 2000.