

**ESTANDARIZACION Y VALIDACIÓN DE UN METODO PARA EL ANÁLISIS
CUANTITATIVO DE AFLATOXINA M1 EN DULCE DE LECHE**

ISABEL CRISTINA GARNICA VILLAMIZAR

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRIA EN QUIMICA
BUCARAMANGA
2004**

**ESTANDARIZACION Y VALIDACIÓN DE UN METODO PARA EL ANÁLISIS
CUANTITATIVO DE AFLATOXINA M1 EN DULCE DE LECHE**

ISABEL CRISTINA GARNICA VILLAMIZAR

**Trabajo de investigación presentado como requisito
Para obtener el título de Maestría en Química**

**Director
JANETH AIDE PEREA VILLAMIL
Química, PHD.**

**Codirector
GONZALO J. DIAZ
Médico Veterinario, PHD.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

AGRADECIMIENTOS

- ✓ La Universidad Industrial de Santander, por la amnistía dada para terminar la Maestría.
- ✓ La empresa, por patrocinar esté trabajo incondicionalmente.
- ✓ Miguel Angel Gutiérrez mi Jefe y amigo, por creer en esté trabajo.
- ✓ Germán Téllez, mi gran Jefe por apoyar esté trabajo.
- ✓ Dr. Gonzalo Díaz, por darme los conocimientos y prestar el laboratorio para poder llevar a cabo la parte experimental.
- ✓ Dra. Aidé Perea mi amiga, por su apoyo incondicional.
- ✓ Richard Rodríguez, Diamir Ariza, Gustavo Prias y Gabriel Rolón mis compañeros, por su apoyo.
- ✓ Luz Marina Velandía mi secretaria, quien amablemente transcribía todos mis documentos.
- ✓ Los equipos de control calidad y ambiental, quien con su apoyo me dieron el tiempo para dedicar a esta tesis.

A la memoria de mi madre **CARMEN IRENE** por su apoyo y fortaleza que me brindo durante el tiempo que me acompaño y a mis hijos **DANIEL ALBERTO Y OSCAR DAVID** por colaborarme con el tiempo que dedique a esté trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	18
1 ANÁLISIS DE LA LITERATURA	20
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICOTOXINAS	20
1.1.1 Marco histórico	20
1.1.2 Los hongos	20
1.1.3 La micotoxicosis	21
1.2 LAS MICOTOXINAS	21
1.2.1 Tipos ecológicos de hongos	27
1.2.2 Relación hongo-micotoxina	27
1.3 CONTAMINACION FUNGICA DE ALIMENTOS PARA ANIMALES	28
1.3.1 Contaminación de origen externo	28
1.3.2 Contaminación en el interior de la fábrica.	28
1.3.3 Contaminación fuera de la fábrica de alimentos concentrados	28
1.4 LAS AFLATOXINAS	29
1.5 LA AFLATOXINA M1	30
1.5.1 Prevención y control	33
1.5.2 Estrategias de manejo	34
1.5.3 Toxicidad de las aflatoxinas	35
1.6 LA AFLATOXINA M1 EN EL AMBITO MUNDIAL Y NACIONAL	36
1.7 METODO DE ANÁLISIS DE MICOTOXINAS	36
1.7.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Adsorción	39
1.7.2 Técnicas de extracción para la determinación de aflatoxinas	40

1.7.3 Purificación de micotoxinas en columnas mediante anticuerpos	41
1.8 VALIDACIÓN DE METODOS	42
1.9 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	43
1.9.1 Selectividad	43
1.9.2 Exactitud	43
1.9.3 Precisión	45
1.9.4 Repetibilidad	46
1.9.5 Precisión intermedia	47
1.9.6 Reproducibilidad	47
1.9.7 Limite de detección y Limite de cuantificación	47
1.9.8 Linealidad	49
2. PARTE EXPERIMENTAL	50
2.1 SELECCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN CROMATOGRAFICO PARA AFLATOXIMA M1	51
2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	53
2.2.1 Estándar primario	53
2.2.2 Solución stock	53
2.2.3 Solución Intermedia	53
2.2.4 Solución de trabajo	53
2.3 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN Y ANALISIS DE AFLATOXINA M1 EN DULCE DE LECHE	54
2.3.1 Toma de muestras y almacenamiento de las muestras	54
2.3.2 Preparación de las muestras	55
2.4 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	59
2.5 POSIBLES INTERFERENCIAS EN EL ANÁLISIS CROMATOGRAFICO	59
2.6 NORMAS DE SEGURIDAD	60
2.7 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACION	60
2.7.1 Linealidad	60
2.7.2 Sensibilidad	63
2.7.3 Limite de detección y Límite de cuantificación	63

2.7.4	Precisión	63
2.7.5	Exactitud	63
2.7.6	Robustez	64
2.8	ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES POR CROMATOGRAFÍA	65
2.9	SELECCIÓN DE LA TECNICA DE ELISA	65
2.10	FUNDAMENTO DEL TEST RIDASCREEN® FAST AFLATOXIN M1	66
2.11	CURVA DE CALIBRACIÓN	66
2.12	PREPARACION Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y DULCE DE LECHE POR ELISA	68
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	71
3.1	ANÁLISIS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	71
3.1.1	Linealidad del sistema	71
3.1.2	Sensibilidad	75
3.1.3	Límite de detección y límite de cuantificación	75
3.1.4	Precisión	76
3.1.5	Exactitud	81
3.1.6	Robustez	83
3.2	DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M1 CON EL METODO VALIDADO	85
3.3	ANALISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y DULCE DE LECHE POR CROMATOGRAFÍA	87
4.	CONCLUSIONES	91
5.	RECOMENDACIONES	93
	BIBLIOGRAFÍA	94
	ANEXOS	100

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas (Smith, 1.985).	24
Tabla 2. Tipos ecológicos de Hongos	27
Tabla 3. Dosis letal 50 (DL ₅₀) sobre patitos de un día de vida.	35
Tabla 4. Límites de porcentajes de recuperación según la Concentración.	44
Tabla 5. Valor de la repetibilidad según la concentración (Whorwitz. AOAC, 2002)	46
Tabla 6. Método analítico resumido para la determinación y cuantificación de AFM1 en dulce de leche (Adaptado de Tuistra y col., 1993).	57
Tabla 7. Resultados preliminares de análisis de Aflatoxina M1 para el dulce de leche.	58
Tabla 8. Diseño experimental propuesto por Youden y Steiner para evaluar el parámetro de robustez.	64

Tabla 9. Resultados de AFM1 por ELISA en muestras de leche y dulce de leche.	70
Tabla 10. Tabla de Concentración vs. Área para el sistema.	71
Tabla 11. Prueba t Student para el sistema.	72
Tabla 12. Tabla ANOVA de regresión lineal simple	73
Tabla 13. Límites de confianza superior e inferior del intercepto.	75
Tabla 14. Resultados de repetibilidad para concentraciones alta, media y baja.	76
Tabla 15. Resultados de precisión intermedia para concentraciones de 10, 50 y 100ng/L de AFM1.	78
Tabla 16. Resultados de precisión Intermedia para la concentración de 10 ng/L de AFM1.	78
Tabla 17. Resultados de precisión Intermedia para la concentración de 50 ng/L de AFM1.	79
Tabla 18. Resultados de precisión Intermedia para la concentración de 100 ng/L de AFM1.	79
Tabla 19. Resultados límite de detección para cada una de las concentraciones 10ng/L, 50ng/L y 100ng/L de	

AFM1 y total de todas las concentraciones.	81
Tabla 20. Porcentajes de recuperación para concentración baja 10ng/L (AFM1).	82
Tabla 21. Porcentajes de recuperación para concentración media 50ng/L(AFM1).	82
Tabla 22. Porcentajes de recuperación para concentración alta 100ng/L (AFM1).	82
Tabla 23. Variables y condiciones escogidas para la prueba de Robustez.	83
Tabla 24. Resultados prueba de robustez de las variables escogidas en la Tabla 23.	84
Tabla 25. Resultados de porcentajes de recuperación de AFM1.	85
Tabla 26. Resultados de AFM1 para muestras reales aplicando la metodología de validación.	86
Tabla 27. Resultados por cromatografía de AFM1 en muestras de leche y dulce de leche.	87
Tabla 28. Resultados de AFM1 en dulce de leche obtenidos por cromatografía vs. ELISA.	88
Tabla 29. Valores de aflatoxina M1 por cromatografía en la leche y dulce de leche y esperados en el dulce de leche de acuerdo	

al factor de concentración del proceso de fabricación.	89
Tabla 30. Resultados degradación de la AFM1 en el dulce de leche debido al proceso térmico.	90
Tabla 31. Resultados iniciales para linealidad del sistema.	106
Tabla 32. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración baja, 10ng/L.	108
Tabla 33. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración media, 50ng/L.	108
Tabla 34. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración alta, 100ng/L.	109
Tabla N° 35. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración baja, 10ng/L (2° día).	109
Tabla 36. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración media, 50ng/L	110
Tabla 37. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración alta, 100ng/L	110

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Curva de Calibración método ELISA	67
Gráfica 2. Curva de Calibración para el sistema en el análisis de Aflatoxina M1 (AFM1) por HPLC.	72
Grafica 3. Diagrama de residuales y comportamiento de residuales.	74
Gráfica 4. Comportamiento de la repetibilidad del sistema	77

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Formulas para el análisis simple de la regresión	100
Anexo B. Hipótesis para la regresión lineal y el análisis de la varianza	102
Anexo C. Resultados para linealidad del sistema	106
Anexo D. Calculo limites detección y cuantificación	107
Anexo E. Resultados obtenidos para la precisión intermedia	108
Anexo F. Porcentajes de recuperación	111
Anexo G Cromatogramas	113

ABREVIATURAS

AFM1	Aflatoxina M1
AFB1	Aflatoxina B1
Aw	Agua disponible
CO ₂	Monóxido de Carbono
CV	Coefficiente de variación
ELISA	Inmunoensayo enzimático
FDA	Food and Drug Administration
F _{exp.}	F de Fisher experimental
FLD	Detector de fluorescencia
F _{tabla}	F de Fisher de tabla
°C	Grado Centígrado
gl	Grados de libertad
HACCP	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRE	Humedad relativa de equilibrio
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas
Kg	Kilogramo
DL ₅₀	Dosis Letal 50

LC	Límite de cuantificación
LCI	Límite de confianza inferior
LCS	Límite de confianza superior
LD	Límite de detección
LLE	Extracción líquido-líquido
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Espectrometría de masas
ng	nanogramo
nm	nanómetros
O ₂	Oxígeno
pH	Potencial de hidrógeno
ppb	Partes por billón
ppt	Partes por trillón
%	Porcentaje
R	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
s	Desviación estándar
SPE	Extracción en fase sólida
t _{exp.}	t student experimental
t _{tabla}	t student de tabla

t_R Tiempo de retención

μg Microgramo

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios capaces de inducir efectos adversos en animales o humanos que las consumen; pueden ser producidas por los hongos en diferentes sustratos pero especialmente en granos y cereales comúnmente utilizados en nutrición humana y animal. Las aflatoxinas son el grupo de micotoxinas más tóxico que se conoce, siendo la más tóxica de estas la aflatoxina B1 (AFB1). Hembras lactantes que consumen AFB1 eliminan en la orina, heces y la leche un metabolito hidroxilado de esta, conocido como aflatoxina M1 (AFM1) (Díaz, 1996).

El nombre de esta aflatoxina refleja su origen ya que la M proviene de la palabra inglesa "milk". La AFM1 conserva la toxicidad y carcinogenicidad de la AFB1 y es por lo tanto, estrictamente regulada en diversos países.

En Colombia, no se han llevado a cabo estudios para determinar la incidencia y niveles de contaminación con AFM1 en leche de vaca, pero el compuesto que la origina, la AFB1, es comúnmente encontrado en alimentos tanto de consumo humano como animal (Bhat, y col., 1997). Debido a su toxicidad es importante monitorear continuamente las raciones para vacas lecheras con el fin de evitar que consuman alimentos contaminados con niveles de AFB1 por encima del nivel máximo permisible. Dadas las actuales exigencias en materia de inocuidad de los alimentos, muchos países consumidores de productos lácteos han procedido a la revisión de los aspectos científicos sobre la importancia de la Aflatoxina M1 en la salud humana, y establecieron su legislación para impedir la importación de productos que contengan ciertos niveles de dicha toxina (Martínez, 1996). Es así como la Comunidad Europea, uno de los principales mercados, ha venido

exigiendo la verificación de la aflatoxina M1 en el dulce de leche, para lo que se tendrán en cuenta los resultados de las investigaciones y medidas de prevención que hayan adoptado. Por ello y dadas las reglamentaciones mencionadas con relación al contenido de aflatoxina M1, se hace indispensable contar con una metodología de análisis confiable como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) que permita detectar y cuantificar dicha toxina en el dulce de leche ya que su principal materia prima es la leche y en el proceso térmico aplicado durante la fabricación, esta se concentra. Asimismo, se busca determinar la viabilidad de utilizar métodos alternativos a HPLC, como por ejemplo el ELISA competitivo, en la determinación económica y rápida de AFM1 en dulce de leche.

1. ANÁLISIS DE LA LITERATURA

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICOTOXINAS

1.1.1 Marco histórico. El hombre conoce los hongos que crecen en los alimentos desde la antigüedad y los ha utilizado en su propio beneficio como alimento directo, para mejorar alimentos y especialmente con fines terapéuticos (antibióticos). Sin embargo, el estudio de los hongos como tóxicos no se inició hasta los años 60, como consecuencia de una intoxicación masiva que provocó la muerte de 100.000 pavos y que se encontró asociada a una contaminación por hongos. La micología es la rama de la biología que históricamente ha estudiado a los hongos (mohos y levaduras).

1.1.2 Los hongos. Son vegetales carentes de clorofila pertenecientes al tipo de talofitas. Esta carencia de clorofila no es solo una característica que distingue a los hongos de los otros vegetales, también es un condicionante importante en la actividad biológica de estos. El hecho de carecer de este compuesto hace que ellos no sean capaces de sintetizar materia orgánica utilizando la luz solar como fuente energética, por este motivo deben desarrollarse sobre un sustrato que contenga materia orgánica. Este factor condiciona los lugares de crecimiento. Así cada producto alimenticio es un sistema ecológico especial en el que la interacción de factores químicos, físicos y biológicos tienen un papel fundamental en el deterioro del alimento debido al crecimiento y proliferación fúngica.

Los hongos tienen la capacidad de infectar tejidos vegetales vivos, aumentado con el poder de invasión, diseminación y deterioro de los productos almacenados. A todo esto se añaden los problemas de micosis que pueden

ocasionar y la capacidad genética que algunos de ellos tienen para producir metabolitos secundarios tóxicos denominados micotoxinas con la consecuente posibilidad de producir micotoxicosis en los animales que consumen el alimento contaminado. Este conjunto de factores hace que los hongos formen un grupo importante dentro de la microbiología de los alimentos (Almudena y Lizaso, 2.001)

⇒ Los géneros de mohos y levaduras de mayor interés son:

MOHOS

<i>Absidia</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Monilia</i>	<i>Sporotrichum</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Trichotecium</i>
<i>Botrytis</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Penecillium</i>	<i>Thamnidium</i>

LEVADURAS

<i>Candida</i>	<i>Mycoderma</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Torulopsis</i>
----------------	------------------	--------------------	-------------------

1.1.3 La micotoxicosis. Es el nombre que se da al grupo de enfermedades y trastornos originados en el hombre y en los animales por metabolitos tóxicos que son producidos por algunas especies fúngicas.

1.2. LAS MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por algunas especies fúngicas. Metabolitos primarios son aquellas moléculas sintetizadas durante el crecimiento del hongo. Cuando la fase de crecimiento termina o cuando hay deficiencia de nutrientes esenciales, los procesos de síntesis del hongo se

encaminan hacia la producción de metabolitos secundarios incluyendo pigmentos, antibióticos y micotoxinas, los cuales son excretados de manera abundante en esta fase estacionaria del hongo. Cuando las micotoxinas son producidas en granos de alimentos destinados a la alimentación de animales o humanos se convierten en un peligro potencial para la salud y/o producción. (Díaz, 1996).

Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos, éstos ácidos grasos son metabolitos primarios los cuales son utilizados como reservorio de energía.

Se han identificado hasta ahora más de 200 micotoxinas, sin embargo las que se pueden encontrar de una forma más frecuente como contaminantes naturales en los alimentos para animales y para humanos son: *aflatoxinas*, *ocratoxinas*, *zearalenona*, *tricotecenos*, *citrinina*, *patulina*, *ácido penicílico*, *sterigmatocistina*, *toxinas de alternaria*, *alcaloides ergot*, *toxinas tremorgénicas*, *rubratoxinas A y B*, *luteoskirina*, y *fumonisininas*. Todas ellas generan en mayor o menor grado una serie de cuadros clínicos patológicos, trastornos y efectos tóxicos en los animales y seres humanos.

Los hongos pueden crecer en condiciones ambientales variadas dentro de las cuales la humedad relativa y la temperatura son los más importantes.

La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y para la producción de

micotoxinas. Sin embargo no sólo influye la cantidad de agua sino también la forma como se encuentra en el alimento pudiendo ser en forma libre o en forma combinada.

El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente en los procesos vitales. La forma combinada esta presente en los tejidos vegetales y animales, formando parte integrante de las células que los componen y en unión con las proteínas y los glúcidos. Para la germinación de las esporas de los hongos, es necesario que el agua se encuentre en forma libre.

- **Humedad relativa de equilibrio (HRE):** Es la cantidad de humedad de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE se expresa en porcentaje varia de unos alimentos a otros conforme su riqueza en glúcidos o en materia grasa.

- **Agua disponible (aw):** La aw es la cantidad de agua libre disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema: alimento/ medio ambiente. Los valores de aw que los diversos grupos de hongos necesitan varían de acuerdo con el sustrato y la temperatura, pero generalmente oscila entre 0.6-0.9.

- **Temperatura:** La temperatura óptima para el desarrollo de los hongos se encuentra entre 25 y 35°C; el límite máximo entre 40 y 45°C. La mayor parte de hongos no crecen por debajo de 5°C, sin embargo hay hongos como el

Aspergillus flavus, *Aspergillus candidus* y *Aspergillus fumigatus* que pueden crecer sin problemas hasta los 55°C y otros como el *Penicillium expansum* y el *Penicillium cyclopium* que son capaces de crecer a 0°C. En la Tabla 1, se muestra la temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos hongos y para la producción de micotoxinas:

Tabla 1. Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas (Smith, 1.985).

MOHOS	°C	MICOTOXINAS	°C
<i>Aspergillus flavus</i>	10	<i>Aflatoxinas</i>	10
<i>Aspergillus clavatus</i>	10	<i>Patulina</i>	10
<i>Aspergillus alutaceus</i>	10 – 12	<i>Ocratoxina</i>	12
<i>Penicillium expansum</i>	0	<i>Patulina</i>	0 – 24
<i>Penicillium cyclopium</i>	0	<i>Ocratoxina</i>	12
<i>Penicillium cyclopium</i>	0	<i>Acido penicílico</i>	4
<i>Fusarium roseum</i>	15	<i>Zearalenona</i>	10

A pesar de la temperatura mínima necesarias para el crecimiento de algunos hongos de la Tabla 1., se encuentra que las condiciones óptimas para el crecimiento y proliferación fúngica son: aw superior a 0,75, temperatura superior a 20°C y humedad del sustrato de 14% o más (Gimeno, 2001).

Dependiendo del sistema de almacenamiento el desarrollo de hongos puede verse favorecido. En el caso de los granos, alimentos considerados de alto

riesgo por la producción de micotoxinas, se encuentra que en un silo pueden existir pequeñas zonas del alimento con alto contenido de humedad susceptibles de desencadenar un desarrollo fúngico, lo cual puede después provocar un aumento general de humedad en el sustrato y consecuentemente una mayor contaminación fúngica y predisposición para la producción de micotoxinas. Adicionalmente, dependiendo de la época del año dentro de los silos ocurren migraciones de humedad que sufren las materias y piensos almacenados, lo cual tiene una importancia decisiva en el desarrollo fúngico y en la posible producción de micotoxinas.

Además la integridad física de los granos, como los tegumentos intactos dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico. Los granos partidos son más susceptibles a la invasión y desarrollo fúngico por el fácil contacto con la parte interna del grano (Gimeno, 2.001)

Otros factores afectan además el desarrollo de los hongos así:

- **pH:** Los hongos toleran un gran intervalo de pH (2,5 - 7,5), de un modo general soportan mejor el medio ácido que el medio alcalino. Es de destacar que ellos mismos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del alimento o los excretados por bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el período de deterioro del alimento.

- **Composición del sustrato:** Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional y ellos se nutren de los micro y macro elementos existentes en

el sustrato donde se desarrollan. Sin embargo la composición del sustrato está muy ligada a la producción de la micotoxina.

- **Nutrientes minerales:** Están relacionados con la composición del sustrato y a pesar de que el hierro y el zinc son los elementos más importantes para el desarrollo fúngico, tanto estos como otros pueden ser necesarios para la producción de micotoxinas. En el caso de aflatoxinas, son necesarios sustratos que contengan zinc y ciertos aminoácidos para que el *Aspergillus flavus* sintetice la aflatoxina.

- **Potencial de oxi-reducción (O₂ / CO₂):** La mayor parte de hongos son aerobios y por lo tanto necesitan oxígeno para el desarrollo de sus reacciones metabólicas. Una carencia de oxígeno condiciona el crecimiento de los hongos y la ausencia total puede llegar a producir la muerte de estos. El anhídrido carbónico puede inhibir la formación de algunas micotoxinas, como las aflatoxinas.

- **Factores biológicos:** La presencia de insectos actúa como agente de diseminación de la de microflora y por lo tanto contribuye al crecimiento y multiplicación de los hongos. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido de humedad del sustrato y además si este rompe el pericarpio permite la infección del interior del grano.

1.2.1 Tipos ecológicos de hongos. En la literatura se encuentran tres tipos de flora fúngica contaminante de alimentos para animales (Gimeno, 2.001). Las floras de campo, intermedia y de almacenamiento.

En la tabla 2, se detallan las condiciones de proliferación de los tres tipos de hongos.

Tabla 2. Tipos ecológicos de Hongos

TIPOS DE HONGOS	HRE	TEMPERATURA DE PROLIFERACIÓN	O ₂ /CO ₂	SUSTRATO	HONGOS
Flora de Campo	95% ó >	Baja	Aerobia	Fitopatógeno Plantas vivas	<i>Fusarium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i> <i>Cephalosporium</i> <i>Helminthosporium</i>
Flora de Intermedia	95% ó >	Relativamente baja	Aerobia	Cereal recién recogido, aún húmedo	Algunos <i>Fusarium</i>
Flora de almacenamiento	95% ó >	20 – 25 °C, optima a 25°C	Anaerobia Facultativa	Material fisiológicamente inactivo	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Mucorales</i>

1.2.2 Relación hongo-micotoxina. La presencia del hongo no implica la producción de la micotoxina, se ha visto que más allá de la capacidad genética del hongo es necesario que ciertos condicionantes sean satisfechos para que el hongo produzca la micotoxina. También se ha detectado la micotoxina sin la presencia del hongo productor, debido a que las formas vegetativas y germinativas pueden ser inactivadas por procesos químicos o por alteración de factores

ecológicos, no ocurriendo lo mismo con las micotoxinas, que permanecen en el sustrato (Almudena y Lisazo, 2.001)

1.3 CONTAMINACION FUNGICA DE ALIMENTOS PARA ANIMALES

1.3.1 Contaminación de origen externo. Por utilización de alguna o algunas materias primas contaminadas, se podrán contaminar los alimentos para animales que se fabriquen, así como las instalaciones de la fábrica.

1.3.2 Contaminación en el interior de la fábrica. En la fábrica de alimentos para animales a lo largo del proceso de fabricación de ellos se genera polvo de las materias primas, este se queda adherido a las paredes de los silos, transportadores, elevadores, tolvas, mezcladores. Este polvo puede provenir de materias primas contaminadas en mayor o menor grado y si no se limpia y desinfecta periódicamente, con condiciones de humedad y temperatura adecuadas, el crecimiento de hongos y la posible producción de micotoxinas puede tener lugar en el polvo acumulado diariamente, dando lugar a un proceso de contaminación crónico que afecta la calidad de las materias primas que pasan diariamente por estos focos contaminados, repercutiendo todo ello en la calidad y conservación del alimento final y los cuales son fuente de alimentación del ganado.

1.3.3 Contaminación fuera de la fábrica de alimentos concentrados. Un alimento para animales puede estar en perfectas condiciones a la salida de la fábrica, sin embargo, se puede contaminar durante el transporte (focos de contaminación dentro de los carros) o bien, dañarse en la propia finca por problemas de residuos contaminados en el interior de silo, por infiltraciones o

condensación del agua dentro los mismos, así como por falta de higiene en los comederos.

1.4 LAS AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos heterocíclicos estrechamente relacionados entre sí, sintetizados principalmente por los hongos *Aspergillus flavus Link* y *Aspergillus parasiticus Speare*.

El origen, química y toxicología de las aflatoxinas fueron revisados por Leeson y col., (1995). Las aflatoxinas fueron inicialmente identificadas como el agente causal de la enfermedad “X” de los pavos, una enfermedad que causó la muerte a más de 100.000 pavos jóvenes en Inglaterra (Asplin y Carnaghan, 1961).

Las aflatoxinas constituyen una importante preocupación en salud humana ya que son reconocidos carcinógenos y juegan un importante papel en la elevada incidencia de carcinoma hepatocelular humano en ciertas áreas del mundo (Choy, 1993). Se reconocen al menos 14 metabolitos de las aflatoxinas pero solo cuatro son producidas por los hongos de manera natural: B1, B2, G1 y G2 (Díaz, 1996). La aflatoxina B1 (AFB1) es la más común de las cuatro y presenta la mayor toxicidad. En animales, la exposición a las aflatoxinas, particularmente a AFB1 puede ocasionar hepatotoxicidad, mutagenesis, inmunosupresión, teratogénesis o carcinogénesis (Lesson y col., 1995).

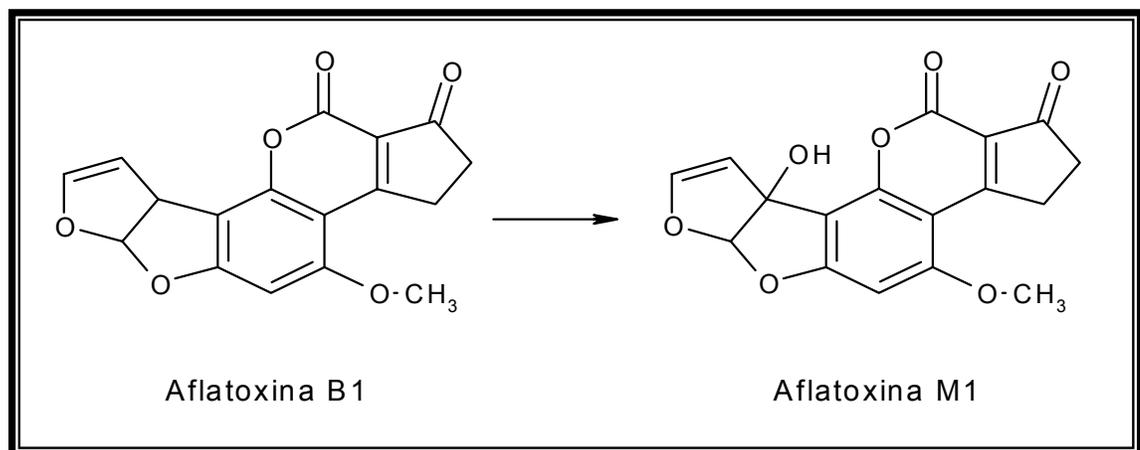
La incidencia y niveles de contaminación con aflatoxinas en alimentos humanos o animales es continuamente monitoreada a nivel mundial (Jelinek y col., 1989, Pittet, 1998). Sin embargo, mientras decenas de estudios de monitoreo son

llevados a cabo año en países industrializados, muy poca información es generada en países en desarrollo. La falta de adecuados laboratorios y recursos económicos puede ser una de las causas de la limitada información sobre ocurrencia de micotoxinas en países en desarrollo. Los hongos productores de aflatoxinas son comunes en lugares geográficos que presentan altos niveles de humedad y temperaturas promedio superiores a los 25°C (Díaz, 1996).

En Colombia, Céspedes y Díaz (1997) y Díaz y col., (2001) han reportado la presencia de aflatoxina B1 en alimentos tanto de consumo animal como humano. En un total de 200 muestras de materias primas y alimentos terminados empleados en nutrición animal, se encontró una incidencia del 29.0% con niveles de muestras positivas que oscilaron entre 1.0 y 66.1 ppb (Céspedes y Díaz, 1997). En 280 muestras de alimentos de consumo humano se halló una incidencia menor a la anterior (8.9%) pero con niveles más altos a los encontrados en alimentos animales ya que las muestras oscilaron entre 1.0 y 103.3 ppb (Díaz, 2001).

1.5 LA AFLATOXINA M1

Figura 1. Biotransformación de la aflatoxina B1 en aflatoxina M1



La AFM1 es el derivado 4-hidroxi de la AFB1 (Figura 1), es excretada en la leche de las hembras de mamíferos que consumen AFB1 en la dieta (Díaz, 2.001). En vacas lecheras, el paso de AFB1 a la leche en forma de AFM1 está relacionado de manera lineal con la producción de leche, Veldman y col. (1992) y Zarba y col. (1.992) calculan que el porcentaje de AFB1 de la dieta excretada en la leche en forma de AFM1 corresponde al 0.09 - 0.43% de la dosis consumida.

La presencia de AFM1 ha sido reportada en leche producida en todos los países del mundo en donde se han realizado estudios de monitoreo y sus niveles máximos permisibles están estrictamente regulados por diversas agencias internacionales (Díaz, 2001). En la mayoría de países de la Unión Europea no se aceptan leches para consumo humano cuyo contenido de AFM1 sea superior a 50 ng/L, mientras que la agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) permite hasta 500ng/L (Van Egmond, 1995). En Colombia el Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC ha fijado un límite máximo provisional de 400ng/L para leche cruda, basándose en los estudios realizados en otros países y en regulaciones establecidas por agencias externas. Sin embargo, no existen en Colombia estudios de incidencia y niveles de contaminación con aflatoxina M1 que permitan establecer estos límites con un criterio más racional acorde con la situación local.

La AFB1 es absorbida vía tracto gastrointestinal dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada para el hígado donde se metaboliza. Una porción de aflatoxina es activada y fijada en los tejidos hepáticos. Algunos metabolitos conjugados de la AFB1 solubles en agua, son excretados a través de la bilis y van a las heces. Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la AFB1 y metabolitos no conjugados de ésta, son excretados en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen sistémicamente. Algunos de esos residuos

mencionados van a la leche, contaminándola (Dennis, 1981). Los parámetros que están relacionados con el nivel de residuos de AFB1 son especie y raza del animal, concentración de AFB1, cantidad y duración del consumo de alimento contaminado, estado de salud del animal y periodo que transcurre desde la retirada del alimento contaminado a la toma de muestras para análisis. Con relación a la raza de las vacas lecheras la relación entre la concentración de AFB1 en la ración y la AFM1 excretada en la leche oscila entre 34:1 a 1600:1 como consecuencia de los parámetros antes mencionados. Se reportan estudios en vacas lecheras Holstein consumiendo raciones con 80, 86, 470, 557, 1493 y 1089 ppb de AFB1 (Con base en materia seca) que eliminaron concentraciones de AFM1 en leche del orden de 1.5, 0.25, 13.7, 4.7, 12.4 y 20.2ppb, respectivamente. En vacas Brindle la contaminación en la ración fue de 540ppb de AFB1 y en leche fue de 0.92ppb de AFM1 y en otras vacas los valores de contaminación en la ración oscilaron entre 64 y 1799 ppb de AFB1 dando unos residuos en leche entre 0.35 y 14.2ppb de AFM1 (Rodricks and Stoloff, 1977). Con una ingesta de AFB1 correspondiente a 2 - 60mg/vaca/día, los residuos de AFM1 en leche podrían oscilar entre 1 a 50ppb (George, 1979). Esto representaría raciones finales contaminadas con 57 a 1714ppb de AFB1 para consumos de 35Kg de ración/vaca/día. La vaca puede transformar AFB1 en AFM1 dentro de las 12 - 24 horas posteriores a la ingestión del alimento contaminado.

Algunos autores (Resumen en: Gimeno, 2001) refieren que el nivel de residuos de AFM1/día (mg) en leche podría ser aproximadamente 2.2% de la ingesta diaria de AFB1 (mg) entre 42-59%. Al dividir el resultado obtenido por el número de litros de leche producidos/vaca/día y multiplicar por 1000 se obtendría la concentración de AFM1 (ppb) en la leche (Patterson y col., 1980). Otros (Sieber y Blanc, 1978) dicen que esta relación estaría comprendida entre 0 y 4% con una media del 1%, incluso estos autores proponen la siguiente ecuación:

$$y = -2.55 + 0.84x$$
$$(r^2 = 0.73; n = 43)$$

donde

x = mg AFB1/ vaca / día;

y = microgramos AFM1/ litro de leche

Calculando una media de 20 litros de leche/vaca/día

Parece ser que existen discordancias entre autores probablemente debidas al sistema metabólico de un poligástrico lo cual provoca que las concentraciones de AFM1 varíen de un animal a otro, de un día para otro y de una producción de leche a la siguiente.

Tanto la AFB1 como la AFM1 son compuestos hepatotóxicos y carcinogénicos y sus efectos sobre la salud pública constituyen una permanente preocupación (Chu, 1991). La presencia de AFM1 ha sido reportada en leche materna (Saab y col., 1995) y su detección es considerada como un biomarcador de exposición a AFB1 (Elnejami y col., 1995)

1.5.1. Prevención y control. De acuerdo con la discusión anterior, al parecer existe una relación lineal entre los niveles de AFB1 en el alimento contaminado y el contenido de AFM1 en la leche, la cual correspondería a la siguiente ecuación:

$$\text{ng de AFM1/Kg de leche} = [1.19 * \mu\text{g de AFB1 consumidos por vaca por día}] + 1.9$$

De acuerdo con esta relación la producción de leche con un contenido de AFM1 de 400ng / L (Límite Nacional Provisorio, ICONTEC, 1968) requeriría un consumo diario de AFB1 de aproximadamente 335µg.

Si la vaca consume 10kg de alimento concentrado al día, el nivel de contaminación del alimento debe estar alrededor de los 33.5µg/kg. Estas cifras indican que los alimentos para ganadería de leche no deben contener más de 30ppb (30µg/kg) de AFB1. La mayoría de países del mundo han fijado un nivel máximo permisible de 20ppb de AFB1 en alimentos para vacas lecheras. En Colombia, es importante que tanto los productores de alimentos para ganadería como los productores de leche sean conscientes de la importancia que para la salud pública representan las aflatoxinas y desarrollen programas de monitoreo permanente para garantizar que no se presenten niveles por encima del máximo permisible ni en el alimento de los animales (20 a 30ppb, dependiendo del consumo de concentrado) ni en la leche de consumo humano (400ng/L). Este control constituye una responsabilidad social de quienes tienen a su cargo la producción de alimentos de origen animal (Díaz, 2001).

1.5.2. Estrategias de manejo. Es indispensable evitar que ingredientes contaminado con AFB1 sean utilizados en la elaboración de alimento para vacas lecheras. Los ingredientes contaminados con AFB1 a niveles por encima del máximo permisible pueden ser utilizados en la fabricación de alimentos para pollos de engorde y/o aves de postura ya que estas aves tienen una resistencia intrínseca a la AFB1 que les permite tolerar niveles que serían letales para una especie sensible como el cerdo. Los alimentos contaminados pueden también adicionarse de cierto tipo de aluminosilicatos, los cuales tienen la capacidad de adsorber o "atrapar" las aflatoxinas. Es importante, sin embargo, tener en cuenta que los aluminosilicatos son adsorbentes universales (similares al carbón

activado) y pueden atrapar compuestos de importancia nutricional además de las aflatoxinas. La mejor estrategia para prevenir la presencia de niveles potencialmente tóxicos de AFM1 en la leche es prevenir que las vacas consuman alimentos contaminados con AFB1 a través del continuo monitoreo de sus raciones (Díaz, 2.001)

1.5.3. Toxicidad de las aflatoxinas. Los datos relativos a la toxicidad de las aflatoxinas más nocivas se reportan en la Tabla 3. en orden decreciente de toxicidad de acuerdo con la dosis letal 50 (DL₅₀), obtenida en experiencias con patitos de un día de vida, suministrando la aflatoxina por vía oral durante siete días. Adicionalmente hay que tener en cuenta posibles interrelaciones entre las micotoxinas y su efecto sobre la salud, ya que estas pueden ser sinérgicas, aditivas, antagónicas y potenciales (Gimeno, 2001)

Tabla 3. Dosis letal 50 (DL₅₀) sobre patitos de un día de vida.

AFLATOXINA	DL₅₀ (mg / Kg. de peso vivo)
B1	0.364
M1	0.320
G1	0.784
M2	1.228
B2	1.696
G2	3.450

Las aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica. El principal síndrome que producen es el hepatotóxico, pudiendo también provocar problemas renales. Los principales órganos afectados son el hígado, riñón y cerebro.

También se asocia al consumo de alimentos animales contaminados con aflatoxinas el incremento en la susceptibilidad a la salmonelosis, candidiasis y coccidiosis en aves, fasciolosis en bovinos así como salmonelosis y disentería en cerdos.

1.6 LA AFLATOXINA M1 EN EL AMBITO MUNDIAL Y NACIONAL

La presencia de AFM1 ha sido reportada en leche producida en todos los países del mundo en donde se han realizado estudios de monitoreo y niveles máximos permisibles están estrictamente regulados por diversas agencias internacionales. En la mayoría de países de Unión Europea no se aceptan para el consumo humano leches cuyo contenido de AFM1 sea superior a 50ng/L, mientras que la agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) y el Codex Alimentarius permiten hasta 500ng/L (Van Egmond, 1995). En Colombia el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC ha fijado un límite máximo provisional de 400ng/L para leche cruda, basándose en los estudios realizados en otros países y en regulaciones establecidas por agencias externas. Sin embargo, no existen en Colombia estudios de incidencia y niveles de contaminación con AFM1 que permitan establecer estos límites con un criterio más racional acorde con la situación local.

1.7 METODO DE ANÁLISIS DE MICOTOXINAS

A finales de la década del 70 se inició el desarrollo de metodologías inmunoquímicas para la identificación y cuantificación de las micotoxinas. Todas

las metodologías inmunoquímicas comprenden la reacción antígeno-anticuerpo, pero difieren en el sistema de reconocimiento de dicho complejo. Así en la inmunoafinidad se utiliza una columna que retiene el complejo; otros métodos utilizan marcas como un compuesto fluorescente (IF), un isótopo radioactivo (RIA) o una enzima (EIA). Para esta última existen las modalidades homogénea (EMIT) y heterogénea (ELISA), técnicas éstas que fijan el complejo a un soporte sintético. En la ELISA llamada directa se marca el antígeno o el anticuerpo primario y en la ELISA indirecto se marca un anticuerpo secundario contra el anticuerpo primario. El principio básico de éstos es la afinidad de las micotoxinas por anticuerpos específicos fijados en un soporte.

La reacción de competición entre la micotoxina y el conjugado (coloreado) que se tiene indica la ausencia de la micotoxina cuando el resultado es coloreado y la presencia de las mismas cuando no hay color. Estas técnicas permiten el control de las micotoxinas “in situ” de un modo rápido, fiable y simple (Pestka y col., 1.995).

Se han descrito numerosos métodos analíticos para detectar hongos toxigénicos basados en producción de la toxina en substrato natural o sintético seguido por extracción, purificación y detección por cromatografía de capa delgada (TLC) o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector con arreglo de diodos.

Los métodos rutinariamente usados hoy para el análisis de micotoxinas son principalmente basados en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), cromatografía de capa delgada (TLC) o ensayos con inmunosorbentes (ELISA), aunque el cromatógrafo de gases (GC) y en particular GC/MS es la técnica actualmente preferida para analizar tricoticonos.

La TLC se ha vuelto un método sumamente poderoso, rápido y en la mayoría de los casos la técnica de separación más barata en micotoxicología. Los aspectos técnicos generales de la TLC de micotoxinas incluyen extracción y limpieza, TLC bidimensional, TLC de alto rendimiento (HPTLC), cuantitativo y TLC preparativo (PLC). La cromatografía de capa fina es un método de multidetección por el cual se puede determinar la mayoría de micotoxinas de interés. La extracción de la micotoxinas se realiza con un único diluyente, utilizándose luego diluyentes de desarrollo específicos y reacciones de identificación selectivas para cada una de las micotoxinas. Con esta técnica se pueden detectar aflatoxinas, OTA, *citrinina*, *zearalenona*, *toxina T2* y *patulina* (Pestka y col., 1.995).

Diversos métodos de análisis por HPLC se han desarrollado para la mayoría de micotoxinas siendo bastante, y con niveles de detección generalmente muy bajos por lo cual se consideran buenos métodos cuantitativos. El HPLC separa una mezcla de compuestos, normalmente presente en un extracto de una muestra, por afinidad relativa. La toxina pasa por un detector de ultravioleta o fluorescencia dependiendo de las características físicas y químicas del analito de interés y el detector permite cuantificar los compuestos específicos presentes en la muestra original inyectada hacia la columna. Para muchas micotoxinas, el tiempo de análisis es menos de 15 minutos (Tuinstra y col., 1995).

Se han reportado diversos métodos para la determinación de Aflatoxina M1 en alimentos, la mayoría se basa en cromatografía líquida (LC) usando columnas de fase reversa con detector de fluorescencia. Sin embargo, los problemas analíticos como coelución de compuestos interferentes o cambios de tiempo de retención pueden llevar a un positivo erróneo o a resultados negativos. Este problema puede ser superado por el acoplamiento directo de LC y espectrometría de masas (MS).

La combinación del sistema de HPLC con espectrómetro de masas junto con analizador de cuadrupolo de termospray resulta más específico y sensible para analizar una gama amplia de micotoxinas en muestras biológicas. Este último método combina la selectividad y la información estructural proporcionada por MS con las ventajas de LC. La sensibilidad de LC - MS depende del tipo de interfase usada y también es afectado por la estructura del compuesto.

La técnica de HPLC con detector de fluorescencia (FLD) se ha vuelto el método más popular para la cuantificación de Aflatoxina M1 en leche. Se han realizado separaciones cromatográficas usando normalmente columnas de fase reversa RP-C18 elusión isocrática con acetonitrilo acidificado diluido (Tuinstra y col., 1993). Sin embargo la cromatografía de pares iónicos, HPLC- MS, o electroforesis con láser, la fluorescencia inducida también se han propuesto. El método por HPLC y detector de fluorescencia ha sido adoptado por la AOAC y constituye el método de referencia en diversos estudios colaborativos a nivel internacional (Scott y Truckness, 1.997), (Dragacci y Grosso, 2001).

1.7.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La cromatografía líquida de alta resolución o de alta eficiencia es esencialmente un método de separación de componentes en mezcla, la cual ocurre por interacción del analito en dos fases; un lecho o fase estacionaria y una fase móvil líquida (García de Marina y Del Castillo, 1988). La separación tiene lugar por diferentes mecanismos como:

- Adsorción
- Partición
- Exclusión
- Afinidad
- Intercambio iónico.

Se conocen, de acuerdo con la polaridad de la fase estacionaria y de la fase móvil, dos clases de cromatografía: en fase normal, caracterizada por una fase estacionaria polar y una fase móvil poco polar y en fase reversa, en la cual la fase estacionaria es poco polar y la fase móvil es de naturaleza más polar.

En cromatografía de fase reversa la fase estacionaria se obtiene por reacción de los grupos activos Si-OH del soporte del sólido, con grupos dimetil, octil y octadecil (ODS), dando como resultado una fase estacionaria de baja polaridad o apolar, en cuyo caso se usan fases móviles polares o más polares que la fase estacionaria.

La fuerza y selectividad de la fase móvil se logra a partir del agua, la cual es adicionada a diferentes cantidades de disolventes orgánicos acuosos de polaridad menor que la del agua. Los más empleados son el metanol en primera instancia y luego el acetonitrilo y el tetrahidrofurano. El agua debe ser calidad HPLC, desionizada, bidestilada, libre de solventes orgánicos y de partículas mayores a 0,2µm (Quattrocchi y Laba, 1992).

1.7.2 Técnicas de extracción para la determinación de aflatoxinas. Son amplias las técnicas de extracción que han sido aplicadas para la preparación de muestras, siendo la tendencia actual a la disminución del tiempo de extracción y el uso de solventes orgánicos para minimizar el impacto ambiental y los riesgos a que están expuestos los analistas en los laboratorios.

La extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE), han sido hasta el momento técnicas muy difundidas y aceptadas por organismos como la EPA y ASTM para los diversos procedimientos de extracción de analitos, el método que se presenta como innovador es la extracción en fase sólida, en el cual el uso de solventes se elimina de la misma manera que se disminuye el uso de

grandes volúmenes de muestra así como el tiempo de análisis. Los laboratorios de química analítica, continúan en la búsqueda de métodos alternativos para la extracción y análisis que disminuyan costos, tiempo de análisis, selectividad por el analito y eliminar la posibilidad de contaminación cruzada. El vasto desarrollo que la extracción en fase sólida ha experimentado en los últimos años permite operar en columnas con relleno de diferentes materiales y polaridades ampliando así el espectro de su aplicación

1.7.3 Purificación de micotoxinas en columnas mediante anticuerpos. La purificación de la muestra utilizando columnas de inmunoafinidad, se basa en la tendencia específica de un ligando monoclonal o policlonal (fase estacionaria) hacia un compuesto en particular o una serie homóloga de compuestos en una muestra, aquellos compuestos con afinidad por el relleno de la columna son retenidos y luego eluidos mediante una fase móvil selectiva (Scott y Truckness, 1.997).

Las columnas de inmunoafinidad específicas para aflatoxinas, son utilizadas como un método preparativo de la muestra (Tuinstra y col.,1993, ISO 14501, 1998); utilizan una fase estacionaria constituida de anticuerpos monoclonales específicos contra una determinada micotoxina. Cuando la micotoxina pasa a través de la zona de anticuerpos específicos (fijados a un soporte sólido), ésta es retenida por el anticuerpo en la columna y se forma un complejo anticuerpo-antígeno. Después, la columna es lavada con agua o solución de lavado adecuada para eliminar impurezas. Posteriormente es eluida por un solvente adecuado y la micotoxina se libera del anticuerpo y puede ser extraída.

1.8 VALIDACIÓN DE METODOS

Una vez se desarrolla y estandariza el método de análisis, es necesario validarlo con el fin de confirmar y documentar, a través de una serie de parámetros, que los resultados producidos son confiables. Así se verifica que el método es capaz de dar un resultado satisfactorio dentro del laboratorio. El propósito primario de validar un método de análisis es mostrar que el método es adecuado para su propósito intencional.

La validación es el proceso tendiente a demostrar o confirmar las características de la ejecución de un método de análisis.

La validación es un proceso que consume tiempo y sólo debe realizarse después de que el método se ha perfeccionado y estabilizado porque los cambios subsecuentes requerirán la revalidación. La estabilidad de la aprobación también debe ser verificada por el examen periódico de un material de referencia permanente (Whorwitz, AOAC, 2002).

Los parámetros en la validación son la selectividad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad. Según la USP 25, los parámetros a validar varían dependiendo del procedimiento que se lleva a cabo, de la matriz que se analiza, y de las cantidades que se manejan, con base en esto la USP 25 divide los métodos en tres categorías:

Categoría I	Métodos analíticos que cuantifican grandes cantidades de sustancias en drogas o ingredientes activos
Categoría II	Métodos analíticos para determinación de impurezas en drogas o compuestos degradados
Categoría III	Métodos de análisis para la determinación de características de ejecución
Categoría IV	Ensayos de identificación

Según esta clasificación se sugieren para unos grupos ciertos parámetros que no se consideran en otros como en la categoría I donde se tienen en cuenta los parámetros de exactitud, precisión, especificidad y linealidad.

1.9 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN (Quattrochi y Laba, 1992), (Eurache, 1998).

1.9.1 Selectividad. Es el grado en que el analito designado puede cuantificarse en la presencia de interferentes u otros analitos en la matriz. Esto normalmente se logra por el aislamiento del analito a través de solventes de extracción específicos, cromatografía, u otras separaciones en fase sólido-líquido, o por la aplicación de técnicas analito-específicas como las reacciones bioquímicas (las enzimas, anticuerpos) o instrumentación (espectrometría de masas).

Para evaluar la selectividad deben probarse los métodos en la presencia de analitos, productos de degradación o componentes de la matriz que probablemente puedan interferir.

1.9.2 Exactitud. Significa la aproximación de resultados de la prueba al verdadero o valor aceptado. Sin embargo el resultado de la prueba puede ser un

valor individual, el promedio de un grupo de valores, o el promedio de muchos grupos de valores. Por consiguiente, siempre que el término se use, el número de valores que representa y su relación siempre debe declararse, por ejemplo, como un resultado individual, como el promedio de duplicados o n reproducciones, o como el promedio de un grupo de ensayos.

La recuperación aceptable es una función de la concentración y del propósito del análisis. Algunos valores de límites de recuperación aceptables para los ensayos individuales son los recomendados en Whorwitz. AOAC, (2002), actualmente en proceso de oficialización, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Límites de porcentajes de recuperación según la concentración

CONCENTRACIÓN	LIMITE DE RECUPERACIÓN
100%	98 – 101%
10%	95 – 102%
1%	92 – 105%
0,1%	90 – 108%
0,01%	85 – 110%
10 (ppm)	80 – 115%
10 (ppb)	70 – 125%

La exactitud se estima mediante el porcentaje de recuperación del analito el cual puede ser evaluado por el análisis de muestras contaminadas con cantidades

conocidas de analito. Por ejemplo, tres concentraciones diferentes alta, media y baja, o dos concentraciones como la alta y la baja.

Generalmente se expresa como:

$$\%R = [CX / CA] * 100$$

Donde:

CX = Concentración promedio de las determinaciones

CA = Concentración real adicionada

%R = Porcentaje de recuperación

1.9.3 Precisión. Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas.

Este parámetro se expresa en términos de desviación estándar (s) o coeficiente de variación.

$$CV = (s * 100) / X$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación

s = Desviación estándar

X = Promedio de las determinaciones

La precisión generalmente se evalúa a través de los parámetros de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

1.9.4 Repetibilidad. Se refiere al grado de acuerdo de resultados cuando se mantienen las condiciones tan constantes como sea posible, la misma muestra, el mismo método, el mismo laboratorio, por el mismo operador que usa el mismo equipo, dentro de intervalos cortos de tiempo. Normalmente se refiere a la desviación estándar, desviación estándar relativa o coeficiente de variación, de duplicados simultáneos o copias.

Tabla 5. Valor de la repetibilidad según la concentración (Whorwitz. AOAC, 2002)

CONCENTRACIÓN	LIMITE DE RECUPERACIÓN
100%	1%
10%	1.5%
1%	2%
0,1%	3%
0,01%	4%
10 (ppm)	6%
10 (ppb)	15%

1.9.5 Precisión intermedia. Es la precisión obtenida cuando los resultados obtenidos del ensayo se realizan, en días diferentes, por diferentes analistas, con diferentes instrumentos, diferentes reactivos, solventes, y columnas.

Se expresa como la desviación estándar relativa, coeficiente de variación, o desviación estándar.

1.9.6 Reproducibilidad. La reproducibilidad es evaluada por medio de ensayos Inter-laboratorios, en diferentes días, con diferentes analistas, diferentes equipos, diferentes reactivos, diferentes instrumentos. Esta debe ser considerada en caso de la estandarización de un procedimiento analítico. La Reproducibilidad puede ser expresada como la desviación estándar, coeficiente de variación e intervalos de confianza.

1.9.7 Limite de detección y Limite de cuantificación. El límite de detección es la cantidad más pequeña o concentración de un analito que puede detectarse con la confiabilidad aceptable. También se refiere a la concentración más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse.

El límite de cuantificación es la más baja concentración de un analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones declaradas del análisis. Frecuentemente es tomado como diez veces la relación señal/ruido.

El límite de detección y el límite de cuantificación pueden determinarse de varias formas:

- Para los métodos instrumentales es generalmente aceptable, estimar el límite de detección como la proporción de señal: ruido de 3:1. Algunos analistas calculan el límite de detección determinando la desviación del ruido de fondo obtenida por análisis de muestras blanco y multiplicando este valor por un factor de tres.
- A partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

Para ello:

- Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs. Respuesta) en el rango apropiado: b .
- Se obtiene otra curva de calibración, inyectando cada uno por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores del analito, determinándose la ecuación para esta nueva recta de calibración y extrapolando la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl} .
- Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración y se hace una gráfica de concentración vs. S y se extrapola como en el caso anterior, la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} correspondiente a desviación estándar del blanco. Se calcula el límite de detección y el límite de cuantificación, para n medidas individuales como:

Límite de detección

$$\frac{Y_{bl} + 3S_{bl} * \frac{1}{\sqrt{n}}}{b}$$

Límite de cuantificación

$$\frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

1.9.8 Linealidad. La linealidad es la habilidad de un método analítico para producir respuestas que son directamente proporcionales a la concentración de analito, dentro de un intervalo dado de concentración.

Para evaluar la linealidad se preparan soluciones de concentraciones exactamente conocidas, dentro del intervalo de interés y se evalúan por lo menos tres réplicas de cada concentración. Se recomienda a menudo un coeficiente de correlación >0.99.

Se puede establecer la linealidad de un método por regresión lineal usando el método de mínimos cuadrados y aplicando las pruebas de hipótesis para la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación (prueba t de student y análisis de varianza de la regresión).

2. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se desarrollo en las siguientes etapas:

- Selección del sistema cromatográfico y detector para análisis de aflatoxina M1 teniendo como base la literatura y experiencia del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia en análisis de micotoxinas.
- Estandarización del método de análisis cromatográfico de aflatoxina M1.
- Estandarización de la etapa preparativa de muestra:
 - Separación de la grasa
 - Purificación de la aflatoxina M1 en columnas de inmunoafinidad mediante anticuerpos monoclonales específicos.
- Validación de método de análisis cromatográfico para determinación de aflatoxina M1.
- Análisis de muestras de dulce de leche empleando la técnica cromatográfica validada.
- Análisis de muestras de dulce de leche empleando la técnica de ELISA.
- Análisis de muestras de leche por cromatografía y ELISA.

- Análisis de resultados.

2.1 SELECCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN CROMATOGRÁFICO PARA AFLATOXINA M1

Teniendo como base la literatura y los trabajos realizados por el Laboratorio de Toxicología del Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia en diferentes micotoxinas, se seleccionaron las condiciones cromatográficas, se seleccionaron los parámetros más adecuados del sistema mediante la evaluación de factores considerados como críticos en el proceso de análisis cromatográfico como son composición de la fase móvil y flujo. Se realizaron inyecciones por duplicado para identificar los picos característicos y la separación de éstos.

A continuación se dan todos los detalles del sistema cromatográfico:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Perkin-Elmer series 1000 LC.
 - Bomba cromatográfica cuaternaria serie 410
 - Horno Perkin-Elmer LCI-100
 - Detector: Perkin-Elmer 650-15 de longitudes de onda variables
 - ▶ Longitud de onda de excitación: 360nm
 - ▶ Longitud de onda de emisión: 460nm
 - ▶ Response: slow, Sensitivity: high, Range:1
 - Integrador Shimadzu CR4-A (Attn: 4, speed: 2mm/min., run time: 18 min.)
File "AF-M1"
 - Fase Móvil: Agua:Acetonitrilo:Metanol: (50:30:20), flujo 0.8mL/min
 - Columna analítica: Merck LiChroCART® 125-4HPLC-Cartridge
LiChroCART® 100 RP-18 (5 µm)

- Precolumna Merck LiChroCART® 4-4 4HPLC-Guard columna LiChroCART® 100 RP-18 (5 µm)
- Temperatura: Ambiente
- Presión 76 Kg/cm² con columna y precolumna nuevas
- Inyector: Manual, Rhecclyne 7125.
- Tamaño del loop 50 µL

Otros equipos y materiales empleados fueron los siguientes:

- Balanza analítica con precisión de $\pm 0,0001$, calibrada.
- Desgasificador en línea con helio.
- Baño de ultrasonido
- Sistema para purificación de agua miliQ
- Sistema para filtrar solventes.
- Micropipetas , verificadas por Metrología
- Balones aforados de 100, 250, 500 y 1000 mL tipo A y verificados por Metrología
- Papel de filtro semicuantitativo
- Embudos
- Erlenmeyer de 150 mL
- Viales de 1mL, 4 mL.
- Columnas de inmunoafinidad AFLAPREP® M de R- Biopharm Rhone LTD, P04(Con anticuerpos monoclonales selectivos para Aflatoxina M1, refrigeradas a una temperatura de 2 - 8 °C.)
- Pipetas aforadas de 20 mL tipo A, verificadas por Metrología
- Sistema de vacío
- Tanque de nitrógeno
- Jeringa de 100µL

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua grado HPLC
- Estándar primario de Aflatoxina M1, 50mg, from *Aspergillus Flavus*, catálogo Sigma A-6428, lote 10K4092.

2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

2.2.1 Estándar primario. Se tomó el estándar primario: Aflatoxina M1, 50mg Sigma A-6428, lote 10K4092 y se disolvió el contenido del vial con 4 mL de metanol grado HPLC, concentración de aflatoxina M1: 12,5µg/mL. Se verifica la concentración por espectrofotometría UV.

2.2.2 Solución stock. Se tomaron 160µL(2000 ng) de estándar primario y se llevaron a 1 mL de metanol grado HPLC en vial ámbar silanizado de 1,5 mL. Concentración de Aflatoxina M1: 2000ng/mL.

2.2.3 Solución Intermedia. Se diluyó la solución stock diez veces (1:10). Concentración final de Aflatoxina M1 200ng/mL.

2.2.4 Solución de trabajo. Para preparar las soluciones de trabajo se tomaron 50µL (10ng) de la solución intermedia y se llevaron a 1 mL con fase móvil en un

vial ambar silanizado de 1,5 mL. Concentración final del estándar de trabajo: 10ng/mL.

De la solución stock se tomaron 20µL y se llevaron a 1,0mL con metanol grado HPLC, para una concentración final de 40ng/mL. De esta solución se tomaron 25µL y se completo a volumen de 1,0 mL con metanol grado HPLC. Concentración final 1ng/mL.

Con estas soluciones se preparó la curva de calibración para aflatoxina M1.

2.3 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN Y ANALISIS DE AFLATOXINA M1 EN DULCE DE LECHE

2.3.1 Toma de muestras y almacenamiento de las muestras. Las muestras de producto terminado de dulce de leche se tomaron a lo largo del año, para que fueran representativas de la leche de todo el año.

El producto tiene como material de empaque vaso en poliestireno y foil de aluminio y se conserva a temperatura ambiente y tiene una vida útil de 150 días.

Contramuestras de los mismos lotes se analizaron microbiológicamente en Recuento total de microorganismos mesófilos, coliformes totales, hongos, levaduras y *bacilos cerius*, no se observo ningún crecimiento microbiológico en ninguna de ellas.

2.3.2 Preparación de las muestras

- ▢ Se pesaron 33,3333 g de dulce de leche y se llevaron a un volumen de 100 mL con agua destilada, se disolvió el arequipe en agua con una relación dulce de leche: agua 1:3.
- ▢ Se realizó un calentamiento suave (35-37°C) de la muestra
- ▢ Se homogenizó y enfrió la muestra
- ▢ Se centrifugó la muestra a 4000 r.p.m. durante 15 minutos
- ▢ Se retiró la grasa sobrenadante
- ▢ Se trasbasó la muestra, teniendo cuidado de no pasar los sólidos sedimentados.
- ▢ Se calentó la muestra en un baño maría a 35°C por 10 minutos aproximadamente.
- ▢ Se filtró la muestra en papel de filtro cualitativo.
- ▢ Se tomaron 50 mL del filtrado. El filtrado se pasó por la columna de inmunoafinidad AFLAPREP® M. (cuidando de no dejarla secar)
- ▢ La columna de inmunoafinidad se lavó con 2 volúmenes de 10 mL de agua destilada y desionizada
- ▢ Se drenó toda el agua hasta que la columna quedó seca

- Se eluyó la toxina con 1,25 mL de una mezcla Metanol: Acetonitrilo(2:3), posteriormente se pasaron 1,25 mL de agua tipo HPLC.
- La muestra recolectada se filtró a través de un filtro millipore de 0,45µs.
- Se inyectaron 50µL de muestra filtrada al cromatógrafo (HPLC)

Tabla 6. Método analítico resumido para la determinación y cuantificación de AFM1 en dulce de leche (adaptado de Tuistra y col., 1993).

NÚMERO	PASO EN LA MARCHA ANALÍTICA	OBJETIVO
1	Disolver en agua a 35-37° C una muestra de dulce de leche en una relación 1:3 (muestra: agua destilada)	Disolver el dulce de leche en el agua
2	Homogenizar la muestra mediante equipo de ultrasonido	Dispersar los glóbulos grasos
3	Centrifugar la muestra en solución a 4000 rpm durante 15 min.	Separar la grasa (sobrenadante) la fase acuosa (intermedia) y sedimento (parte de azúcares)
4	Filtrar a través de papel de filtro	Separar la grasa de la fase acuosa
5	Verificar el valor de pH (7.00-7.45) si no está en este rango ajustar con NaOH	Tener un pH adecuado para que actúen los anticuerpos monoclonales
6	Pasar una cantidad medida de filtrado a través de una columna de inmunoafinidad Aflaprep M	Atrapar la aflatoxina M1 en la columna de inmunoafinidad
7	Lavar la columna con volúmenes sucesivos de agua destilada	Remover impurezas
8	Eluir la columna con una mezcla acetonitrilo: metanol y luego con agua grado HPLC en un vial ámbar.	Recuperar la aflatoxina M1 de la columna de inmunoafinidad
9	Inyectar la muestra en el cromatógrafo HPLC	Identificar y cuantificar la aflatoxina M1

Después de poner a punto el método cromatográfico de análisis de aflatoxina M1, se pasaron 20 muestras de producto terminado de dulce de leche fabricado con leches recolectadas en diferentes épocas del año, con el fin de estimar el rango de concentración de Aflatoxina M1 que se puede encontrar en el dulce de leche como producto terminado, para realizar la curva de calibración cubriendo todo el rango de concentración de Aflatoxina M1 y realizar posteriormente la validación del método de análisis.

Tabla 7. Resultados preliminares de análisis de Aflatoxina M1 para el dulce de leche

LOTES	AREAS			CONCENTRACIONES (ng/L)		
	Inyección		Área Promedio	Inyección		Concentraciones Promedio
	1	2		1	2	
1	4247	4109	4178	26.27	25.42	25.85
2	530	640	585	3.33	4.01	3.67
3	3410	3215	3313	21.39	20.17	20.78
4	3187	2997	3092	19.99	18.79	19.39
5	3291	3413	3352	20.64	21.41	21.03
6	3480	3208	3344	21.82	20.12	20.97
7	2792	2969	2881	17.51	18.62	18.07
8	2983	3227	3105	18.71	20.24	19.48
9	6489	6396	6443	40.7	40.12	40.41
10	9304	9228	9266	58.36	57.88	58.12
11	8953	9108	9031	56.16	57.13	56.65
12	7581	7227	7404	47.55	45.33	46.44
13	3141	3086	3114	19.7	19.36	19.53
14	5847	6061	5954	36.67	38.02	37.35
15	2509	2775	2642	15.74	17.41	16.58
16	8232	8382	8307	51.64	52.58	52.11
17	6026	6161	6094	37.79	38.64	38.22
18	3717	3649	3683	23.32	22.89	23.11
19	5555	5522	5539	34.84	34.63	34.74
20	5321	5238	5280	33.38	32.86	33.12

Se estimó una concentración entre 16 y 58ng/L.

2.4 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACION

Para elaborar la curva de calibración se emplearon soluciones del estándar de Aflatoxina M1 comprendidas en el intervalo de concentración entre 10 y 100 ng/L. El intervalo fue escogido teniendo en cuenta los resultados de los análisis preliminares de AFM1 en 20 lotes diferentes de dulce de leche que cubren la leche de todo el año (Tabla 7). Se usaron seis concentraciones diferentes a saber: 10, 20, 40, 60, 80 y 100ng/L. Cada patrón se pasó por duplicado.

Los resultados de los análisis por HPLC, expresados en unidades de área fueron tratados estadísticamente a través de análisis de regresión y análisis de varianza de la regresión, con el fin de demostrar la linealidad de la respuesta en el intervalo analizado.

2.5 POSIBLES INTERFERENCIAS EN EL ANÁLISIS CROMATOGRAFICO

Con el fin de eliminar posibles interferencias en la etapa preparativa todo el material se lavó con Extran, se enjuagó con abundante agua destilada y se secó en una estufa a 30°C. El material utilizado en la estandarización de la técnica cromatográfica adicionalmente se silanizó.

2.6 NORMAS DE SEGURIDAD

Debido al carácter tóxico de la aflatoxina M1, tanto los estándares como las muestras se manejaron cumpliendo las normas de seguridad:

- ▢ Guantes
- ▢ Cabina extractora

Los residuos se segregaron y se manejaron como peligrosos para su disposición (FAO/OMS, 2001).

2.7 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACION

2.7.1 Linealidad. Se prepararon seis soluciones de concentración conocida de AFM1 en el rango de concentración de 10 a 100ng/L, basados en los resultados aflatoxina M1 de las muestras preliminares de dulce de leche. Se realizó una réplica para cada nivel de concentración y cada inyección se realizó por duplicado.

Se empleó como prueba estadística el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si los datos cumplían una regresión lineal y si se presentaba o no desviación de la linealidad.

Se aplicó además la prueba de t Student para evaluar el coeficiente de correlación, el intercepto y la pendiente de las curvas de calibración. Se emplearon los promedios de las inyecciones para cada curva de calibración trabajada. Las formulas y las graficas de cada curva aparecen detalladas en el Anexo A.

Los resultados de las curvas de calibración se sometieron a las siguientes pruebas estadísticas:

- Test de hipótesis para el coeficiente de correlación.
- Test de hipótesis para la pendiente
- Test de hipótesis para el intercepto con el eje de ordenadas
- Anova de la regresión
- Análisis de residuales

Se calcularon además los intervalos con un 95 % de confianza de:

- La pendiente
- El origen (intercepto con el eje de ordenadas)

▬ **Criterios de aceptación para la evaluación de la linealidad por la prueba t de Student**

Se plantearon las siguientes hipótesis nulas (H_0) para la prueba de la pendiente, el intercepto y la correlación por comparación con el criterio t de Student.

- ▶ Hipótesis para la pendiente:

$H_0: \beta=0$ el valor de la pendiente no es significativamente diferente de cero.

($P= 0,05$; $gl = n-2$)

- ▶ Hipótesis para el intercepto:

Ho: $\alpha=0$ el valor del intercepto no es significativamente diferente de cero.

(P= 0,05; gl = n-2)

- ▶ Hipótesis para la correlación:

Ho : No hay correlación entre X y Y

(P= 0,05; gl = n-2)

Cada una de las hipótesis se rechaza o no de acuerdo al valor de t Student experimental, de tal forma que:

Si $t_{exp} > t_{tabla}$: la hipótesis se rechaza

Si $t_{exp} < t_{tabla}$: la hipótesis se acepta

≡ **Análisis de varianza (ANOVA) de la regresión**

Las hipótesis formuladas para el análisis de varianza de la regresión lineal y la linealidad, por comparación con el criterio F de Fisher, fueron los siguientes:

- ▶ Hipótesis para la regresión:

Ho: No hay correlación entre X y Y, (P= 0,05; gl= n-1)

- ▶ Hipótesis para la linealidad

Ho: No hay desvío significativo de la linealidad (P= 0,05; gl= n-2)

Cada hipótesis es rechazada o no de acuerdo con el valor F de Fisher experimental, de tal forma que:

Si $F_{exp} > F_{tabla}$: la hipótesis se rechaza (prueba para la regresión lineal)

Si $F_{exp} < F_{tabla}$: la hipótesis se acepta (prueba para el desvío de la linealidad)

2.7.2 Sensibilidad. Se determinó como la sensibilidad de calibración que corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

2.7.3 Limite de detección y límite de cuantificación. Estos valores se obtuvieron de la curva de calibración. Tomando para el limite de detección un factor de 3,30 y para el limite de cuantificación 10,00, aplicando las formulas del Anexo D.

2.7.4 Precisión. La precisión del sistema, se evaluó como repetibilidad y como precisión intermedia. Estos parámetros se expresaron como coeficientes de variación (CV).

- **Repetibilidad** Para el estudio de repetibilidad se tomaron tres concentraciones alta, media y baja (10, 50 y 100ng/L) de la curva de calibración y se inyectaron cada una cinco veces en el cromatógrafo, usando el mismo equipo, por el mismo analista y en el mismo día. Se determinó trabajar con los resultados de áreas.
- **Precisión intermedia** Para el estudio de precisión intermedia se tomaron tres concentraciones alta, media y baja (10, 50 y 100ng/L) con dos replicas, en dos días diferentes, realizando inyecciones por duplicado. Se determinó trabajar con los resultados de áreas. Se tomo el área promedio de las dos inyecciones.

2.7.5 Exactitud. Para evaluar este parámetro se trabajó a partir de una muestra con baja contaminación de Aflatoxina M1 y se fortifico con tres concentraciones alta, media y baja de la curva de calibración (10, 50 y 100ng/L), se realizó todo el procedimiento de pre-tratamiento con columnas de inmunoafinidad, en el mismo día y con el mismo analista, realizando dos replicas de cada una. Los resultados se presentaron como porcentajes de recuperación. Se realizó el correspondiente

análisis estadístico para establecer si los porcentajes de recuperación difieren o no significativamente del 100%.

2.7.6 Robustez. La validación de este parámetro se desarrollo teniendo en cuenta dos niveles de estudio, uno normal que es el correspondiente a los parámetros establecidos para la metodología estandarizada y otro considerando condiciones anormales o alternativas.

Para llevar a cabo el estudio de robustez con varios factores de variabilidad, se utilizo el diseño factorial propuesto por Youden y Steiner (Castro y col., 1.989)

Tabla 8. Diseño experimental propuesto por Youden y Steiner para evaluar el parámetro de robustez

Factor	Ensayos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	A	A
B/b	B	B	b	b	B	B	B	B
C/c	C	c	C	c	C	c	C	C
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	E	E
F/f	F	f	f	F	F	f	F	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	G
Resultado	S	t	u	v	w	x	Y	Z

Donde las letras mayúsculas A, B, C, D, E, F Y G corresponden a los parámetros o condiciones establecidas en la metodología y las letras minúsculas a, b, c, d, e, f y g a las condiciones alternativas o anormales.

Los resultados se indican por las letras s, t, u, v, w, y, z. La comparación de las medidas de los resultados revela el efecto de cambiar el valor normal por el alternativo. A continuación se presenta el modelo para el cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro:

$$\begin{aligned}VA &= (s+t+u+v)/4 - (w+x+y+z)/4 \\VB &= (s+t+w+x)/4 - (u+v+y+z)/4 \\VC &= (s+u+w+x)/4 - (t+v+x+z)/4 \\VD &= (s+t+y+z)/4 - (u+v+w+x)/4 \\VE &= (s+u+x+z)/4 - (t+v+w+y)/4 \\VF &= (s+v+w+z)/4 - (t+u+x+y)/4 \\VG &= (s+v+x+y)/4 - (t+u+x+z)/4\end{aligned}$$

2.8 ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES POR CROMATOGRAFIA

Se analizaron por duplicado 26 muestras de lotes diferentes de producto terminado de dulce de leche, por cromatografía con el fin de aplicar la metodología validada.

2.9 SELECCIÓN DE LA TECNICA DE ELISA

Teniendo como base la literatura sobre la utilización de la técnica de ELISA para el análisis cuantitativo de aflatoxina M1 en leche (Rodríguez y col, 2003) se buscaron kit en el mercado y se selecciono el inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina M1 en leche y en leche en polvo,

RIDASCREEN® FAST Aflatoxin M1 (Art. No.:R5802) de r-biopharm, el cual reporta como validado en las matrices de leche y en leche en polvo.

2.10 FUNDAMENTO DEL TEST RIDASCREEN® FAST AFLATOXIN M1

El test RIDASCREEN® FAST Aflatoxin M1 se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Este trae 48 micropozos recubiertos con anticuerpos para la captura de aflatoxina M1, a los cuales se les adiciona los patrones o la solución de las muestras, posteriormente se adiciona el conjugado aflatoxina M1-peroxidasa y anticuerpos anti-aflatoxina M1, a los micropozos. La aflatoxina M1 libre y el conjugado aflatoxina M1 – enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-aflatoxina M1 (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti- aflatoxina M1 se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado aflatoxina M1 – enzima que no se unió es removido posteriormente en un proceso de lavado con agua destilada. El sustrato/ cromógeno es agregado a los micropozos e incubado en la oscuridad, ya que es sensible a la luz. El conjugado aflatoxina M1 – enzima unido a los micropozos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul. La adición de la solución stop (ácido sulfúrico 1N) provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450nm; siendo la absorción inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina M1 en la muestra.

2.11 CURVA DE CALIBRACION

Se elaboró la curva de calibración con estándares de aflatoxina M1 de 0, 250, 500, 1000 y 2000ng/L, los cuales vienen listos para su uso en el kit, el factor de

dilución es 1 por lo cual la concentración de aflatoxina M1 puede ser graficada directamente como se observa en la Gráfica 1.

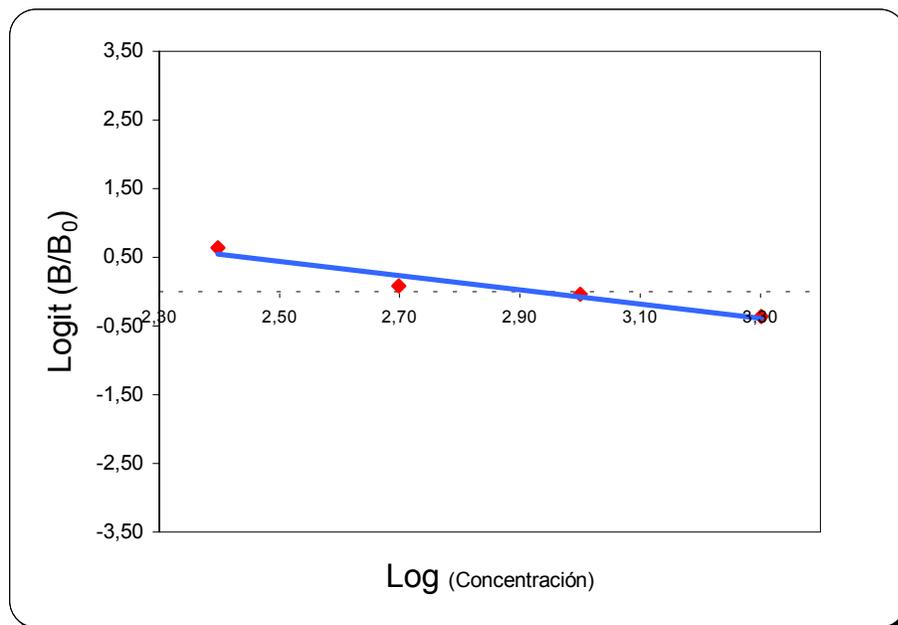
RIDASCREEN[®] FAST AFLATOXIN M1

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Aflatoxina M1

Empresa: Tesis de grado
 Analista: ISABEL CRISTINA GARNICA
 Fecha: Diciembre 17/03
 Lote KIT #: 1203
 # muestras: 8

Estándar	Abs.	B/Bo	Log (Conc.)	Logit B/Bo	Parámetros de la curva
0 ppt =	0,900				
250 ppt =	0,732	0,81	2,40	0,64	R ² = -0,9667
500 ppt =	0,493	0,55	2,70	0,08	Pendiente= -1,0335
1000 ppt =	0,429	0,48	3,00	-0,04	Intercepto= 3,0262
2000 ppt =	0,275	0,31	3,30	-0,36	

Gráfica 1. Curva de calibración método ELISA



2.12 PREPARACION Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y DULCE DE LECHE POR ELISA

- Se pesaron 33,3333 g de dulce de leche y se llevaron a un volumen de 100 mL con agua destilada, se disolvió el dulce de leche en agua en una relación dulce de leche: agua 1:3.
- Se realizó un calentamiento suave (35-37°C) de la muestra.
- Se homogenizó y enfrió la muestra a temperatura ambiente.
- Se centrifugó la muestra a 4000 rpm durante 15 minutos.
- Se retiró la grasa sobrenadante y se trasvasó la muestra, teniendo cuidado de no pasar los sólidos sedimentados.
- Se filtró la muestra en papel de filtro cualitativo.
- Se tomaron 50µL del filtrado de cada una de las muestras y se colocaron en micropozos.
- Se agregaron 50µL del conjugado aflatoxina M1-enzima a los micropozos correspondientes.
- Se agregaron 50µL de anticuerpo anti-aflatoxina M1 a cada micropozo. Se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-20 °C).
- Se vaciaron los micropozos y se golpearon energicamente, durante tres veces consecutivas, posteriormente el marco portamicropozos se invirtió sobre una

toalla de papel absorbente limpia para asegurar la eliminación completa de restos de líquido.

- Se lavaron los micropozos con 250µL de agua destilada, se vaciaron nuevamente los micropozos y esta operación de lavado se repitió dos veces más.
- Se agregaron dos gotas de substrato/cromógeno a cada micropozo, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se incubó por cinco minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Se agregaron dos gotas de solución stop a cada micropozo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente.
- Se calibró el valor de cero contra aire y se midió la absorbancia a 450nm.
- Para las muestras de leche se procedió igual desde el segundo punto.

Se realizaron las determinaciones por ELISA por duplicado obteniéndose resultados muy similares, en la tabla 9. aparecen los valores promedios, obtenidos de la curva de calibración, el factor de dilución de las muestras es 1 y por lo tanto la concentración de aflatoxina M1 en la muestra puede ser leída directamente de la curva de calibración de la Grafica 4. Las muestras de leche no se pudieron calcular en la curva de calibración ya que presentaron absorbancias mayores al blanco a pesar de que el test RIDASCREEN® FAST Aflatoxin M1 viene para hacer determinaciones entre 0-2000ppt, posiblemente hay una interferencia que hace que se presenten valores de absorbancia mayores al blanco.

Tabla 9. Resultados de AFM1 por ELISA en muestras de leche y dulce de leche

DETERMINACION DE LAS MUESTRAS POR ELISA		
Identificación de la muestra	Absorbancia	AFM1 (ppt)
LECHE 1	0,939	No se puede calcular
LECHE 2	1,036	No se puede calcular
LECHE 3	1,105	No se puede calcular
LECHE 4	1,155	No se puede calcular
DULCE DE LECHE 1	0,586	463,00
DULCE DE LECHE 2	0,696	259,00
DULCE DE LECHE 3	0,463	801,00
DULCE DE LECHE 4	0,551	545,00

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

3.1.1 Linealidad del sistema. Los resultados obtenidos para las respuestas (SISTEMA) se reportaron en unidades de área correspondientes a cada nivel de concentración utilizados, se muestran en la Tabla 10 (para mayor información ver Anexo C).

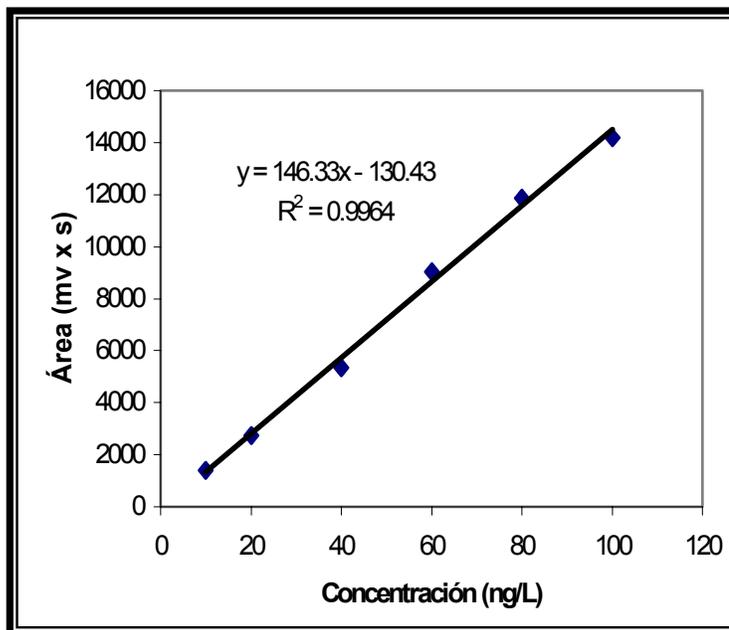
Tabla 10. Tabla de Concentración AFM1 vs. Área para el sistema

Concentración ng/L	Área
10	1403
20	2734
40	5353
60	9022
80	11878
100	14192

Con los resultados de cada nivel de concentración se realizó una gráfica de concentración vs. área (Gráfica 2) la cual fue sometida a un ajuste por mínimos cuadrados, obteniéndose como resultado una ecuación de la forma

$$Y = mx + b$$

Gráfica 2. Curva de Calibración para el sistema en el análisis de Aflatoxina M1 (AFM1) por HPLC



En la Tabla 11 se muestran los resultados de la prueba de hipótesis para la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación (R), basados en la prueba t de Student.

Tabla 11. Prueba t Student para el sistema

CAUSA DE VARIACIÓN	RESULTADO	SE Coef	t_{exp}	gl 4 t_{tab}	P (0,05)
Intercepto	-130,2	267,3	-0,49	2,78	0,652
Pendiente	146,332	4,404	33,22	2,78	0,000
R	0,9964		47,01	2,78	

Según la Tabla 11, se encuentra que para el caso del intercepto el t_{exp} (-0,49) es $<$ t_{Tabla} (2,78), por lo tanto se acepta la hipótesis nula diciendo que el valor no es significativamente diferente de cero.

Para el análisis estadístico de la pendiente el valor de t_{exp} (33,22) es mayor que el valor de $t_{tabulado}$ (2,78), por lo tanto, la hipótesis nula para este caso se rechaza, permitiendo concluir que el valor de la pendiente es significativamente diferente a cero.

Por último en el caso del coeficiente de correlación la $t_{experimental}$ (47,01) es mayor que el valor de $t_{tabulado}$ (2,78), por lo tanto, la hipótesis nula se rechaza y se comprueba que existe una correlación entre los valores de X y Y. Entonces la estadística valida la gráfica de calibración obtenida la cual tiene un intercepto con el eje Y, una pendiente diferente de cero y una correlación entre X y Y (Miller and Miller, 1998).

En la Tabla 12, se muestran los resultados de las hipótesis planteadas para el análisis de varianza (ANOVA) de la regresión.

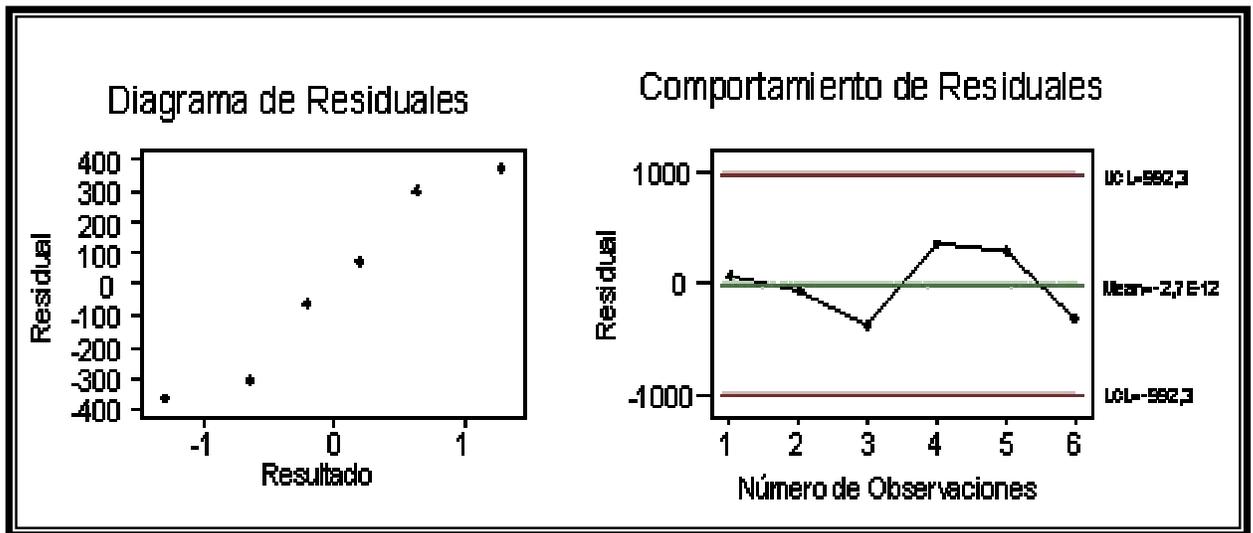
Tabla 12. Tabla ANOVA de regresión lineal simple

Fuente	gl	S.C.	S.C.M	F_{exp}	F_{tab}	P
Regresión	1	1,30E+08	1,30E+08	1103,83	7,709	0,00
Error Residual	4	4,72E+05	1,18E+05			
Total	5	1,31E+08				

Según la Tabla 12, el F_{exp} (1103,83) para la regresión es mayor que el $F_{tabulado}$ (7,709), por lo tanto, la hipótesis nula se rechaza, lo cual confirma que hay regresión lineal entre X y Y.

También para confirmar el comportamiento lineal de la curva de calibración se realizó la gráfica de residuales (Gráfica 3) donde la suma de estos debe ser cero o estar cercano a cero. Como se puede ver dicha gráfica los valores están muy cercanos a cero, lo cual corrobora el comportamiento lineal de la curva de calibración.

Gráfica 3. Diagrama de residuales y comportamiento de residuales



- Limites de Confianza.** Se calcularon además los limites de confianza superior e inferior del intercepto, de la pendiente y de cada uno de los puntos de la curva de calibración del sistema. Estos resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Límites de confianza superior e inferior del intercepto y pendiente.

Concentración AFM1 (ng/L)	*LCI	**LCS
10	252,03	2553,97
20	300,87	2505,13
40	361,58	2444,42
60	366,48	2439,52
80	314,83	2491,17
100	213,97	2592,03
Pendiente	158,54	134,06
Intercepto	612,68	-873,54

* LCI Límite de confianza inferior

** LCS Límite de confianza superior

3.1.2 Sensibilidad. La sensibilidad del sistema se obtuvo a partir de la pendiente de la curva de calibración ajustada por mínimos cuadrados (Gráfica 2), tiene un valor de 146,33.

3.1.3 Límite de detección y límite de cuantificación. Estos valores se obtuvieron de la curva de calibración. Tomando para el límite de detección un factor de 3,30 y para el límite de cuantificación 10,00. Aplicando las fórmulas del Anexo D. se obtuvo:

<p>LD = 8,69ng/L</p> <p>LC = 26,34ng/L</p>
--

LD Límite de detección

LC Límite de cuantificación

3.1.4 Precisión

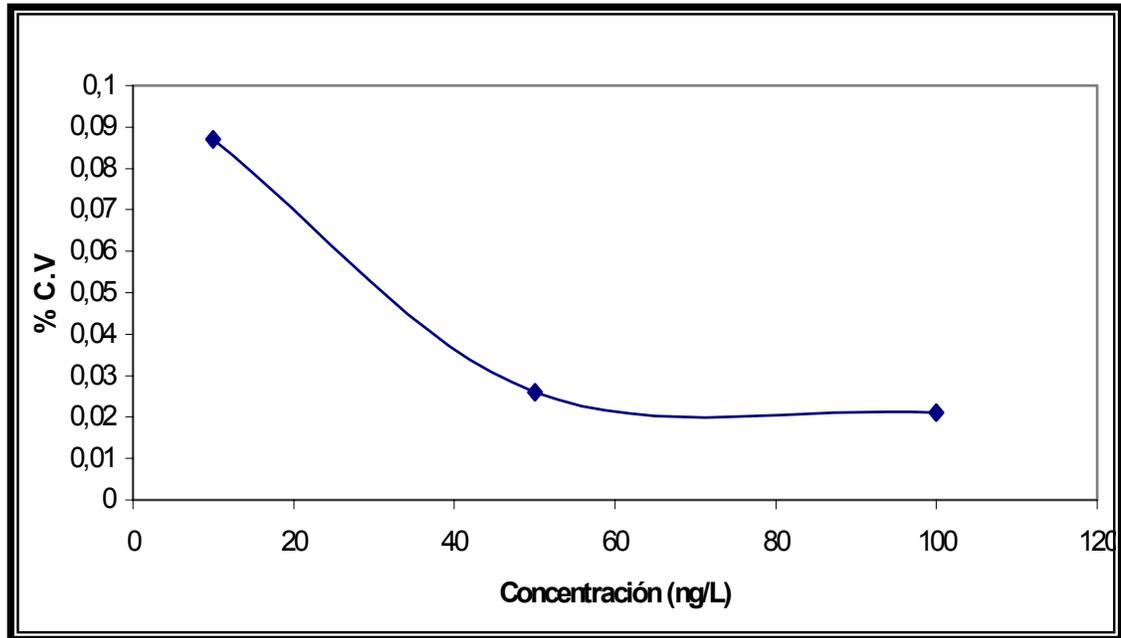
▢ **Precisión del sistema.** La precisión del sistema, se evaluó como repetibilidad y como precisión intermedia.

- **Repetibilidad.** En el estudio de repetibilidad se trabajó en tres concentraciones alta, media y baja (10, 50 y 100ng/L). Los resultados se expresaron en coeficientes de variación, estimados para cada concentración y se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados de repetibilidad para concentraciones alta, media y baja

Concentración AFM1 (ng/mL)	10	50	100
Area	1363	5902	12892
	1111	5917	12994
	1132	5545	13065
	1313	5862	13595
	1188	5673	13419
	1322	5842	13070
Promedio	1238,167	5790,167	13172,500
Desviación Estándar	107,862	148,509	272,717
Coefficiente de Variación (CV)	0,087	0,026	0,021

Gráfica 4. Comportamiento de la repetibilidad del sistema



De acuerdo a la gráfica anterior se puede observar que a medida que aumenta la concentración disminuye el coeficiente de variación.

- **Precisión Intermedia.** Se determinó trabajando con los resultados en áreas de las concentraciones alta, media y baja (10, 50 y 100ng/L) con dos replicas, en dos días diferentes. Se tomo el área promedio de las dos inyecciones.

En la Tabla 15. se presentan los resultados en áreas para las tres concentraciones, se calculó el coeficiente de variación para mirar si se presentaban diferencias significativa en las tres concentraciones.

Tabla 15. Resultados de precisión intermedia para concentraciones de 10, 50 y 100ng/L de AFM1

Concentración (ng/L)	Área				Promedio	Desviación Estándar	%C.V
	1	2	3	4			
10	3419	3383	3540	4126	3617.00	345.91	0.096
50	8635	7582	8610	7963	8197.50	514.91	0.063
100	12922	12207	13561	16015	13676.25	1654.35	0.121

En la Tabla 15. se puede observar que el coeficiente de variación entre 10 y 50ng/L tiene el comportamiento esperado ya que al aumentar la concentración disminuye el coeficiente de variación. Para la concentración de 100ng/L el coeficiente de variación es mayor y esto puede ser debido probablemente a que como se trabaja con columnas de inmunoafinidad, se saturan mas rápido los punto activos y puede pasar aflatoxina M1 sin ser atrapada.

Se compararon los coeficientes de variación para dos días diferentes en una misma concentración. Los cuales se presentan a continuación en las Tablas 16, 17 y 18.

Tabla 16. Resultados de precisión Intermedia para la concentración de 10 ng/L de AFM1

Día	Concentración 10 ng/L		Promedio	Desviación Estándar	%C.V
	1	2			
1	3419	3540	3479.50	85.56	0.025
2	3383	4126	3754.50	525.38	0.140

Tabla 17. Resultados de precisión Intermedia para la concentración de 50 ng/L de AFM1

Día	Concentración 50 ng/L		Promedio	Desviación Estándar	%C.V
	1	2			
1	8635	7582	8108.50	744.58	0.092
2	8610	7963	8286.50	457.50	0.055

Tabla 18. Resultados de precisión Intermedia para la concentración de 100 ng/L de AFM1

Día	Concentración 100 ng/L		Promedio	Desviación Estándar	%C.V
	1	2			
1	12922	12207	12564.50	505.58	0.040
2	13561	16015	14788.00	1735.24	0.117

De acuerdo a la Tabla 16. para 10ng/L se observa una variación significativa en el coeficiente de variación al realizar las extracciones en dos días diferentes, igualmente cuando se trabajó con 100ng/L (Tabla 18).

En la Tabla 17. para 50ng/L no se observa una diferencia significativa en los coeficientes de variación para dos días diferentes. Es claro que los valores de éste estimativo estadístico son menores cuando el análisis se realiza el mismo día que cuando son comparados los resultados obtenidos en días diferentes, es decir la variabilidad de las respuestas es menor dentro del lote que para lotes de análisis.

Las diferencias de los coeficientes de variación para días diferentes en las tres concentraciones se pueden atribuir a errores sistemáticos y aleatorios como:

- ▶ La preparación de fase móvil
- ▶ Temperatura ambiente
- ▶ Procesamiento de la muestra
- ▶ Variación en las inyecciones.

⇒ **Tiempo de retención** Se halló el tiempo de retención t_R para cada una de las concentraciones (10, 50 y 100ng/L) promediando seis replicas, se halló la desviación estándar y se hallaron los límites de confianza superior e inferior, se utilizó un t Student igual a 2,57 correspondiente a $gl= 5$; intervalo de confianza al 95%.

También se calculó el tiempo de retención para todo el rango de concentración promediando los 18 resultados, se halló la desviación estándar y los límites de confianza superior e inferior, se utilizó un t Student igual a 2,11 correspondiente a $gl= 17$; intervalo de confianza al 95% a partir de la siguiente fórmula:

$$\mu = X \pm t(s\sqrt{n})$$

Donde,

μ = Límite de confianza

X = Promedio

t = Valor t Student ($gl = n-1$)

n = Número de datos

s = Desviación estándar

LCI Límite de confianza inferior

LCS Límite de confianza superior

Tabla 19. Resultados límite de detección para cada una de las concentraciones 10ng/L, 50ng/L y 100ng/L de AFM1 y total de todas las concentraciones

Concentración	10ng/L	50ng/L	100ng/L	Total
	7.37	7.32	8.01	
	7.38	7.31	7.87	
	7.35	7.29	7.77	
	7.34	7.29	7.87	
	7.33	7.30	7.88	
	7.30	7.28	7.88	
Promedio	7.35	7.30	7.88	7.51
Desviación	0.0288	0.0147	0.0764	0.2752
LCS	7.38	7.31	7.96	7.64
LCI	7.31	7.28	7.80	7.37

La variación en los tiempos de retención t_R puede ser debida al efecto de la temperatura ambiente sobre la columna de separación cromatográfica.

3.1.5 Exactitud. Este parámetro se trabajó a partir de una muestra con baja contaminación de Aflatoxina M1 y se fortificó con tres concentraciones alta, media y baja de la curva de calibración (1, 50 y 100ng/L) se realizaron dos replicas de cada concentración, los resultados se presentan a continuación como porcentajes de recuperación, en las Tablas 20, 21 y 22.

Tabla 20. Porcentajes de recuperación para concentración baja 10ng/L (AFM1)

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	1443	1363	1403	
1A	3474	3363	3419	84,51
1B	3721	3359	3540	87,52

Tabla 21. Porcentajes de recuperación para concentración media 50ng/L(AFM1)

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	*****	*****	7186	
2A	8772	8498	8635	87,86
2B	7460	7703	7582	77,14

Tabla 22. Porcentajes de recuperación para concentración alta 100ng/L (AFM1)

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	14065	14318	14192	
3A	13267	12578	12922	76,77
3B	11964	12450	12207	72,52

En las Tablas 20, 21 y 22 se observa un mayor porcentaje de recuperación para concentraciones bajas 10ng/L que para concentraciones altas 100ng/L. Debido a que a menor concentración probablemente los cuerpos monoclonales atrapan mas fácilmente la toxina, en cambio a mayor concentración parte de ellos se saturan lo cual hace que pase aflatoxina sin atrapar haciendo que el porcentaje de recuperación sea menor. Los porcentajes de recuperación oscilaron entre 72,52% - 87,86%, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (AOAC, Draft, 2002) donde recuperaciones aceptables para concentraciones de (ng/mL) o menores se encuentran del orden entre 70 y 125 %.

3.1.6 Robustez. Se realizó el estudio de robustez por el modelo de Youden y Steiner, las variables escogidas y los valores de cada uno de los parámetros asignados se reportan en la Tabla 23.

Tabla 23. Variables y condiciones escogidas para la prueba de robustez

ENSAYO	VARIABLE	NIVEL "NORMAL"	NIVEL "ALTERNATIVO"
A	Tiempo de centrifugado para la separación de la grasa, (min)	15	10
B	rpm de la centrifuga para la separación de la grasa	4000	2000
C	Columna (inmunoafinidad) utilizada para separar la aflatoxina M1 de la matriz en la muestra	Conservación (2 - 8°C)	Ambiente una semana (8 - 20°C)
D	Temperatura Columna del cromatógrafo	Ambiente	30°C
E	Flujo de la fase móvil en el cromatógrafo, mL/min	0,8	1
F	Volumen de agua de lavado empleado en la columna Inmunoafinidad (mL)	20	40
G	Cal. a 37°C de la muestra antes de la filtración	Si	No

El criterio utilizado para la evaluación fue, comparar las diferencias obtenidas para el cambio efectuado sobre cada uno de los parámetros (V_x) y el producto de la desviación estándar en el estudio de repetibilidad por la raíz de dos:

$$s(\text{área}) * \sqrt{2} = 210,02$$

Los valores que son superiores al resultado de este producto indican que son variable crítica (C), que afecta el resultado del método y por lo tanto el análisis a desarrollar debe prestar especial atención a estos parámetros:

Si:

$$|V_x| > s(\text{área}) * \sqrt{2} = \text{Diferencia significativa}$$

Tabla 24. Resultados prueba de robustez de las variables escogidas en la Tabla 23.

ENSAYO	ÁREA	ÁREA	AREA PROM	EFECTO	ÁREA	CRITERIO
S	7361	7572	7466,5	VA	-46,625	N.C
T	5599	5242	5420,5	VB	275,625	C
U	7940	7228	7584	VC	15,625	N.C
V	6041	6745	6393	VD	-820,625	N.C
W	6124	6469	6296,5	VE	1602,875	C
X	8390	8260	8325	VF	-6,875	N.C
Y	5512	5771	5641,5	VG	434,375	C
Z	6750	6825	6787,5			

NC No crítico
C Crítico

Los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 24) demuestran que el método para la identificación y cuantificación de la aflatoxina M1 (teniendo en cuenta los datos de área) soporta pequeños cambios en algunos factores estudiados como lo son: tiempo de centrifugado para la separación de la grasa y el sedimento que contiene parte de azúcares, temperatura de conservación de la columna de inmunoafinidad, temperatura de la columna en el cromatógrafo y volumen de agua para limpieza de la columna de inmunoafinidad. Sin embargo se encuentra que las rpm en la centrífuga para la separación de la grasa y parte de azúcares, el flujo de la fase móvil en el cromatógrafo y el calentamiento de la muestra a 37°C antes de filtrarla influyen directamente en la variación de las respuestas instrumentales, por lo cual son consideradas como críticas debiéndose tener un control riguroso en el método analítico sobre estas variables.

3.2 DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M1 CON EL METODO VALIDADO

Se tomaron los promedios de todos los porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio de validación (Tablas 20, 21 y 22 y Anexo E).

Tabla 25. Resultados de porcentajes de recuperación de AFM1

PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN	84.51	76.77	87.61
	87.52	72.52	81.02
	87.86	81.83	83.97
	77.14	99.81	99.17
PROMEDIO			84.98

Tabla 26. Resultados de AFM1 para muestras reales aplicando la metodología de validación

LOTES	Concentración (ng/l)	Concentración real (ng/L)	Concentración muestra (ng/L)*
1	25,85	30,42	91,26
2	3,67	4,32	12,96
3	20,78	24,45	73,36
4	19,39	22,82	68,45
5	21,03	24,75	74,24
6	20,97	24,68	74,03
7	18,07	21,26	63,79
8	19,48	22,92	68,77
9	40,41	47,55	142,66
10	58,12	68,39	205,18
11	56,65	66,66	199,99
12	46,44	54,65	163,94
13	19,53	22,98	68,95
14	37,35	43,95	131,85
15	16,58	19,51	58,53
16	52,11	61,32	183,96
17	38,22	44,98	134,93
18	23,11	27,19	81,58
19	34,74	40,88	122,64
20	33,12	38,97	116,92
21	46,67	54,92	164,76
22	33,80	39,77	119,32
23	20,78	24,45	73,36
24	34,36	40,43	121,30
25	31,00	36,48	109,44
26	19,14	22,52	67,57

*Aplicando factor de dilución = 3

En la Tabla 26. se muestran los resultados de aflatoxina M1 correspondientes a 26 lotes diferentes de dulce de leche con concentraciones halladas a través de la curva de calibración preliminar y se reevaluaron para obtener la concentración real aplicando el promedio del porcentaje de recuperación obtenido en la Tabla 25 (84,98%), en la última columna aparece la concentración en la muestra inicial después de haber aplicado el factor de corrección. Los resultados muestran residuales de aflatoxina M1 en todas las muestras de producto terminado de dulce de leche a niveles, en los cuales se cumple Norma ICONTEC y FDA pero no la norma de la Comunidad Económica Europea (Díaz, 1995).

3.3 ANALISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y DULCE DE LECHE POR CROMATOGRAFIA

Se analizaron por cromatografía líquida utilizando la metodología validada las mismas muestras de leche y dulce de leche reportadas en la tabla 9 y una muestra adicional de leche y dulce de leche (muestra 5), las cuales se reportan en la tabla 27, se observa que cumplen norma ICONTEC y FDA.

Tabla 27. Resultados por cromatografía de AFM1 en muestras de leche y dulce de leche

Número de muestra	Tipo de Muestra	Concentración(ppp)	Concentración corregida por validación*(ppp)	Concentración corregida por dilución**(ppp)
1	Leche	129,22		
	Dulce de leche	51,43	60,52	181,56
2	Leche	87,34		
	Dulce de leche	43,03	50,64	151,91
3	Leche	54,31		
	Dulce de leche	29,08	34,22	102,66
4	Leche	93,76		
	Dulce de leche	39,33	46,28	138,84
5	Leche	131,51		
	Dulce de leche	52,11	61,32	183,96

* Factor de corrección obtenido en la validación del método (84,98% de recuperación)

** Factor de dilución =3

Se compararon los resultados de AFM1 obtenidos por ELISA en dulce de leche (tabla 9) con los obtenidos por cromatografía (tabla 27) para las mismas cuatro muestras de dulce de leche y no se encontró ninguna correlación entre las dos técnicas (tabla 28). Probablemente se presentan interferencias que compiten con la aflatoxina M1 libre, dando como resultado valores superiores a los encontrados por cromatografía. Se descarta que el kit tuviera problemas ya que la absorbancia del blanco fue > a 0,600.

Tabla 28. Resultados de AFM1 en dulce de leche obtenidos por cromatografía vs ELISA

Número de muestra	Muestra	Concentración (ng/L)	
		Cromatografía	ELISA
1	Dulce de leche	181,56	463,00
2	Dulce de leche	151,91	259,00
3	Dulce de leche	102,66	801,00
4	Dulce de leche	183,96	545,00

Por balance de masa teniendo en cuenta la formulación de la referencia de dulce de leche analizada y el rendimiento del proceso de fabricación, la leche se concentra aproximadamente 4,5 veces por lo cual el contenido de Aflatoxina M1 esperado en el dulce de leche sería 4,5 veces el encontrado en la leche, dichos valores se dan en la tabla 27, también se dan los valores reales encontrados y son más bajos que los esperados, la aflatoxina M1 se concentra en promedio 1,6 veces vs 4,5 veces que era lo esperado.

Tabla 29. Valores de aflatoxina M1 por cromatografía en la leche y dulce de leche y esperados en el dulce de leche de acuerdo al factor de concentración del proceso de fabricación

Número de muestra	Tipo de Muestra	Concentración de AFM1 en la leche (ppt)	Concentración esperada en el dulce de leche de AFM1(ppt)	Concentración encontrada de AFM1 en el dulce de leche (ppt)	Factor de concentración de la AFM1 en el dulce de leche
1	Leche	129,22			
	Dulce de leche		581,49	181,56	1,4
2	Leche	87,34			
	Dulce de leche		393,03	151,91	1,7
3	Leche	54,31			
	Dulce de leche		244,40	102,66	1,9
4	Leche	93,76			
	Dulce de leche		421,92	138,84	1,5
5	Leche	131,51			
	Dulce de leche		591,80	183,96	1,4
				PROMEDIO	1,6

En la tabla 30 se reportan los porcentajes de degradación del aflatoxina M1 los cuales oscilan entre el 58,00%-68,78%, lo cual concuerda con la literatura.

Tabla 30. Resultados degradación de la AFM1 en el dulce de leche debido al proceso térmico

Número de muestra	Tipo de Muestra	Concentración de AFM1 en la leche (ppt)	Concentración esperada en el dulce de leche de AFM1(ppt)	Concentración encontrada de AFM1 en el dulce de leche (ppt)	Porcentajes de degradación de AFM1 en el dulce de leche
1	Leche	129,22			
	Dulce de leche		581,49	181,56	68,78%
2	Leche	87,34			
	Dulce de leche		393,03	151,91	61,35%
3	Leche	54,31			
	Dulce de leche		244,40	102,66	58,00%
4	Leche	93,76			
	Dulce de leche		421,92	138,84	67,09%
5	Leche	131,51			
	Dulce de leche		591,80	183,96	68,92%
				PROMEDIO	64,83%

4 CONCLUSIONES

Se estandarizaron las condiciones adecuadas para la separación y cuantificación, usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), de aflatoxina M1 en dulce de leche. Dichas condiciones son: columna analítica: Merck LiChroCART® 125-4HPLC-Cartridge LiChroCART® 100 RP-18 (5µm), fase móvil: agua:acetonitrilo:metanol: (50:30:20), flujo 0.8mL/min, detector de fluorescencia: longitud de onda de excitación: 360nm, longitud de onda de emisión: 460nm, volumen de inyección 50 µL

Se validó la metodología analítica para la determinación de aflatoxina M1, en dulce de leche empleando columnas de inmunoafinidad Aflaprep M en la etapa preparativa y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en la detección y cuantificación.

Se evaluó y se comprobó para el método de determinación cromatográfica de aflatoxina M1 un intervalo lineal entre 10 y 100ng/L.

Se evaluó y comprobó la precisión de la metodología cromatográfica analítica, desde el punto de vista de repetibilidad y precisión intermedia en el intervalo de concentraciones entre 10 y 50ng/ L.

El límite de detección estimado para la aflatoxina M1 de acuerdo a la metodología descrita en el Anexo D es de 8,69ng/L.

El límite de cuantificación estimado para la aflatoxina M1 de acuerdo a la metodología descrita en el Anexo D es de 26,34ng/L.

Se estableció que la metodología cromatográfica es robusta para las variables tiempo de centrifugado para la separación de la grasa y el sedimento que contiene parte de azúcares, temperatura de conservación de la columna de inmovilización, temperatura de la columna en el cromatógrafo y volumen de agua para limpieza de la columna de inmovilización. Sin embargo se encuentra que las rpm en la centrífuga para la separación de la grasa y sedimento, el flujo de la fase móvil en el cromatógrafo y el calentamiento de la muestra a 37°C antes de filtrarla influyen directamente en la variación de las respuestas instrumentales, debiéndose tener un control riguroso en el método analítico sobre estas variables.

Se comprobó la aplicabilidad del método cromatográfico validado en muestras de dulce de leche, permitiendo la separación y cuantificación de la aflatoxina M1. Los resultados indicaron que todas las muestras contienen aflatoxina M1 en límites permitidos por la Norma Técnica Colombiana (ICONTEC) y FDA pero no la norma de la Comunidad Económica Europea.

La validación del método cromatográfico constituye un aporte significativo para el control de calidad del dulce de leche.

Dado que no se obtuvieron resultados satisfactorios con la técnica de ELISA, se recomienda comprar el detector de fluorescencia a fin de poder utilizar el cromatógrafo líquido de la empresa, en el análisis de aflatoxina M1 en el dulce de leche con la metodología validada, previa prueba interlaboratorio con el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional.

5 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un control rutinario programado, con el fin de mantener un control de los diferentes parámetros instrumentales, para el análisis de aflatoxina M1 en dulce de leche por HPLC.

Se recomienda trabajar diluciones del dulce de leche para obtener lecturas de aflatoxina M1 entre 26 y 50ng/L a fin de obtener mayores porcentajes de recuperación.

Se recomienda realizar estudios colaborativos con otros laboratorios idóneos para determinar la reproducibilidad del método para análisis de aflatoxina M1 en dulce de leche.

Se recomienda investigar el origen de la contaminación de la leche cruda por aflatoxina M1 ya que esta es la materia prima fuente de contaminación en el dulce de leche. Teniendo en cuenta que la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda proviene de alimentos para el ganado que están contaminados con aflatoxina B1, es importante establecer los proveedores de leche que tienen mayor riesgo, es decir, aquellos cuya alimentación para el ganado lechero está suplementada con alimentos concentrados es recomendable que utilicen pastura fresca o alimentos concentrados provenientes de compañías que estén en la capacidad de certificar la ausencia de aflatoxina B1 en cada lote.

BIBLIOGRAFÍA

ALMUDENA, A. y LIZASO, J. Hongos y Micotoxinas. Madrid. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. 2001.

AOAC. Requirements for single laboratory validation of Chemical Methods. Draft. 2002.

ASPLIN, F.D., and CARNAGHAN, R.B.A.. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effects on ducklings and chickens. En: Veterinary Record, Vol. 73, (1961); p. 1215-1219

BHAT, R.V., VASANTHI, S., RAO, B.S., RAO, R.N., RAO, V.S., NAGARAJA, K.V., BAI, R.G., PRASAD, C.A.K., VANCHINATHAN, S., ROY, R., SAHA, S., MUKHERJEE, A., GHOSH, P.K., TOTEJA, G.S., and SAXENA, B.N., Aflatoxin B1 contamination in maize samples collected from different geographical regions of India – a multicentre study. En: Foods Additives and Contaminants, Vol. , (1997); p. 151 –156.

CASTRO, C.M., GASCON, F.S., PUJOL, M.F. y ROCA, S.J. Monografía de Validación de Métodos Analíticos. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia. 1989; p. 1-74.

CESPEDES, A. and DIAZ. G.. Analysis of Aflatoxins in Poultry and Pig Feeds and Feedstuffs Used in Colombia. En: Journal of AOAC International. 1997. Vol. 80, No. 6 (1971); p. 1215 - 1219

CHOY, W.N. A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B1 and its implications in quantitative cancer risk. En: Mutation Research, Vol. 296, (1993); p.181-198.

CHU, F.S.. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. En: Mutation Research, Vol. 259 (1991); p. 191-306.

COMISION EUROPEA DE SANIDAD ALIMENTARIA. Observaciones de la Comunidad Europea para la Comisión del Codex Alimentarius. Proyecto de nivel máximo para la aflatoxina M1 en la leche (ALINORM 01/ 12^a-apéndice X). 2.001.

DENNIS P., HSIEH, H., International Symposium and Workshop on Micotoxins, Cairo, Egypt, 1981 p. 151-165.

DIAZ, G. Aflatoxina M1: un carcinógeno en la leche. <http://lmvltda.com/programas/ar07.html>. 2001.

_____, Micotoxinas y terrorismo avícola. En: Avicultores No. 38 (1997); p. 30-34.

_____, Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal . Primera y Segunda parte. En: Veterinaria al Día, Vol. 2 No.1 (1996); p. 28-34 y Vol. 2 No.3 (1996); p. 3-8.

_____, Micotoxinas presentes en la soya y sus subproductos. Seminario-taller control calidad y usos de la soya integral en alimentación animal. Asociación Americana de Soya. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. Cali, Colombia. 1995.

_____, Regulación de niveles máximos tolerables de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados. En: Veterinaria al día Vol. 1 No. 3 (1995); p.22-27.

DRAGASSI, S. and GROSSO, F. Immunoaffinity Column Cleanup With Chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid Milk: Collaborative Study. En: Journal of AOAC International. Vol. 84, No.2 (2001); p. 437-442.

ELNEJAMI, H.S., NICOLETTI, G., NEAL, G.E., DONOHUE, D.C., and AHOCAS, J.T.. Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia, and Thailand. En: Food and Chemical Toxicology, Vol. 33, (1995); p.173-179.

EURACHE. 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics a Focus for Analytical Chemistry in Europe. Teddington Ltd, 1998.

FAO/OMS. Codex Alimentarius. Aflatoxina M1 en la leche: Nivel máximo. Roma. 2001. (CODEX STAN 232).

_____, Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives. USA. 2001

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Action levels for poisonous or deleterious substances in human food an animal feed. 2000

GARCIA DE MARINA, A. y DEL CASTILLO, B. Cromatografía líquida de alta resolución. México: Noriega, 1998 182 p.

GIMENO, A.. Revisión Genérica del problema de los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal, ALBEITAR, No. 45 (2001); p. 46-47.

_____, Foro de Micotoxinas, Aflatoxinas. Los hongos y la micotoxina en la alimentación animal. Conceptos, problemas y recomendaciones.
<http://www.ergonomix.com/nuevo/prueba/micotoxinasb.asp>

GEORGE, E..Conference on Mycotoxins in animal feeds and Grains related to animal helth. Rockville, Maryland, USA. 1979

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACION. Productos lácteos. Leche cruda. Bogotá: ICONTEC, 1968. (NTC 399).

_____, Industrias Alimentarias - Nivel máximo permitido de aflatoxinas en los alimentos. Bogotá: ICONTEC, 1993. (NTC 3581).

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION. Milk and Milk Powder –Determination of aflatoxin M1 content – Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography. Suiza: ISO, 1978, 9 p. (ISO 14501).

JELINEK, C.F., POHLAND, A.E., and WOOD, G.E.. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds – An update. En: Journal of the AOAC International, Vol. 72 (1989); p. 223-230.

LESSON, S., DIAZ, G.J., and SUMMERS, J.D.. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins (Guelph:University Books). 1995

MARTINEZ, B., SOLA, I., KNEETEMAN, E. A., SARQUIS, S., SANCOVICH, A.C. 1996. Survey of aflatoxin M1 in Argentine milks 1994-1995 by different immunoassays. IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Rome 27-31, 1996, p. 129-135.

MILLER, J.C. and MILLER, J.N.. Estadística para Química Analítica. 2º Ed. España: Wesley Iberoamericana, 1998. p. 87-100.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES Commission regulation (EC) No 1525/98 of 16 July 1998 amending Regulation (EC) N° 194/97 of 31 January 1997 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels. 1998.

PATTERSON, D.S., GLANCY, E.M. and ROBERTS, B.A., Food cosmetic. En: Toxicol. Vol.19, No. 1, (1980); p. 35-37.

PESTKA, J.J., ABOUZIED, M.N. and SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxin detection. En: Food technology (Feb. 1995); p. 120-128.

PITTET, A.,. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. En: Revue de Médecine Vétérinaire, Vol. 149,(1998) ; p. 479-492.

QUATTROCCHI, O.A.,and LABA, R.F.. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. California: Artes gráficas Farro, 1992, p. 312-327.

RICHARD, L. Micotoxins : Risk in Plant, Animal, and Human Systems. Council for Agricultural Science Ande Technology Ames, Iowa. USA, Enero 2003. p. 86-102.

RODRICKS, J.V., and STOLOFF, L.,. Aflatoxin Residues from Contaminated Feed in Edible Tissues of Food-Producing Animals in Mycotoxins in Human and Animal Healt. En: Pathotox, Illinois, (1977); p.67-79.

RODRIGUEZ, M.L. CALONGE, M.M. and ORDOÑEZ, D. ELISA and HPLC determination of the ocurrence of aflotoxin M1 in raw cow's Milk. En: Food Additives and contaminants. Vol. 20, No. 3, (2003); p. 276-280.

SAAB, A..M., BDELGADIR, A.M., and MOSS, M.O. Exposure of infants to aflatoxin M1 grom mothers' breast milk in Abu Dhabi, UAE. En: Food Additives and Contaminants, Vol. 12, (1995); p.255-261.

SCOTT, P. AND TRUCKESS, M. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis En: Journal of AOAC International, Vol. 80, N°5, (1997); p. 941-949.

SIEBER, R. and BLANC. B. Mitt. Gebiete Lebensm, Hyg. No. 69, (1978); p. 477-491.

SMITH, J. E. and MOSS, M. O. Mycotoxins Formation, Analysis and Significance. New York: Jhon Wiley, 1985. p. 10-31, 50-63.

TUINSTRAN, L.G.M.T., ROOS, A.H., and VAN TRIJP, J.M.P. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M1 in milk powder using immunoaffinity 1993. columns for cleanup: Interlaboratory study. En: Journal of the AOAC International., Vol. 76, No. 6 (1993); p. 1248-1254.

VAN EGMOND, H.P.. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. En: Food Additives and Contaminants, Vol. 6, (1989); p.139 – 188.

_____, Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. En: Foods Additives and Contaminants, Vol. 12, (1995); p. 321-330.

VELDMAN, A., MEIJS, J.A.C., BORGREVE, G.J., and HEERES, V.D.T.1992. Carry over of aflatoxin from cows' food to milk. En: Animal Production, Vol. 55, (1992); p. 163-168.

WHORWITZ. AOAC. Requirements for single laboratory validation for chemical methods. 2002 (Article in process of publications)

ZARBA, A., WILD. C.P., HALL, A.J., MONTESANO, R., HUDSON, G.J. and GROOPMAN, J.D. Aflatoxin M1 in human breast milk from the Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. En: Carcinogenesis, No. 13 (1992); p. 891-894.

ANEXO A.

FÓRMULAS PARA EL ANÁLISIS SIMPLE DE LA REGRESIÓN

El análisis de regresión simple permite estimar el valor de una variable llamada variable dependiente, sobre la base de otra llamada independiente, descrito por el modelo estimado de regresión poblacional:

$$y_i = a + bx_i + e_i$$

Donde b es la mejor estimación de la pendiente, a es la mejor estimación del intercepto con el eje y_i y e_i es el residuo definido como la diferencia entre el valor observado y_i y el valor "ajustado" por la mejor recta \hat{y}_i .

La evaluación de los estimativos de la pendiente y el intercepto que minimizan la suma de los cuadrados de los residuos es:

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

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

donde \bar{x} y \bar{y} , son las coordenadas promedio de la variable independiente y de la variable dependiente.

✓ Error estándar de la pendiente

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}}{n - 2}$$

- ✓ Error estándar de la ordenada en el origen

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

- ✓ Límites de confianza para la pendiente y el intercepto

$$b - t_{(\alpha/2, n-2)} S_b \leq \beta \leq b + t_{(\alpha/2, n-2)} S_b$$
$$a - t_{(\alpha/2, n-2)} S_a \leq \alpha \leq a + t_{(\alpha/2, n-2)} S_a$$

- ✓ Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \right]}}$$

ANEXO B.

HIPÓTESIS PARA LA REGRESIÓN LINEAL Y EL ANÁLISIS DE LA VARIANZA

- Hipótesis para el intercepto (α)

Ho) $\alpha = 0$

$$t_{\text{exp}} = \frac{a - \alpha}{S_a}$$

Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$, no se rechaza la hipótesis, lo que significa que el intercepto no es significativamente diferente de cero; hubo convergencia al origen.

- Hipótesis para la pendiente (β):

Ho) $\beta = 0$

$$t_{\text{exp}} = \frac{b - \beta}{S_b}$$

Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$, se rechaza la hipótesis indicando que la pendiente es significativamente diferente de cero.

- Hipótesis para el coeficiente de correlación (r)

Ho) No hay correlación entre las dos variables X y Y.

Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$, se rechaza la hipótesis.

HIPÓTESIS NULA PARA EL ANÁLISIS DE VARIANZA

- Hipótesis nula para la regresión

Ho) No hay relación entre las variables X y Y. Se espera rechazar la hipótesis.
Hipótesis.

$F_{exp} > F_{tabla}$, hubo buena regresión, existió diferencia en las respuestas para cada nivel de concentración.

- Hipótesis nula para la linealidad

Ho) No hubo desvío significativo en las respuestas, se espera no rechazar la hipótesis.

$F_{exp} > F_{tabla}$, no hubo desvío de la linealidad, no existe diferencia significativa dentro de las respuestas de una misma concentración.

Suma de cuadrados de la regresión (SCr)

$$SCr = \frac{(S_{xy})^2}{(S_{xx})^2}$$

Donde;

$$S_{xx} = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum XY - \frac{(\sum X * \sum Y)}{n}$$

- ✓ Suma de cuadrados entre concentraciones (SCec)

$$SCec = \frac{\sum(\sum Y_j)^2}{m} - \frac{(\sum Y_j)^2}{n}$$

- ✓ Suma de cuadrados del error puro (SCep)

$$SCep = \sum Y^2 - \frac{\sum(\sum Y_j)^2}{m}$$

- ✓ Suma de cuadrados para el desvío de la linealidad (SCI)

$$SCI = SCep - SCr$$

m: número de réplicas,
n: número total de observaciones

ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACIÓN	gl (GRADOS DE LIBERTAD)	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F EXP
Regresión CM1	1	SCr	$\frac{SCr}{gl}$	$\frac{CM1}{CM3}$
Linealidad CM2	K-2	SCI	$\frac{SCI}{gl}$	$\frac{CM2}{CM3}$
Error Puro CM3	n-K	SCep	$\frac{SCep}{gl}$	

ANEXO C.
RESULTADOS PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla 31. Resultados iniciales para linealidad del sistema

CONCENTRACIÓN AFM1 (NG/L)	AREAS		AREA PROMEDIO
	INYECCION 1	INYECCIÓN 2	
10	1443	1363	1403
20	2741	2726	2734
40	5586	5119	5353
60	9546	8497	9022
80	11437	12319	11878
100	14065	14318	14192

ANEXO D.
CALCULO LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACION

- ✓ Límite de detección

$$LD = (Cd * S_{x/y}) / b$$

- LD Límite de detección
Cd Coeficiente limite de detección (3,30)
 $S_{x/y}$ Error estándar de la pendiente
b Intercepto de la curva

- ✓ Límite de cuantificación

$$LC = (Cq * S_{x/y}) / b$$

- LC Límite de cuantificación
Cq Coeficiente límite de cuantificación (10,0)

ANEXO E.
RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA PRECISIÓN INTERMEDIA

Día 1

Tabla 32. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración baja, 10ng/L

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	1443	1363	1403	
1A	3474	3363	3419	84,51
1B	3721	3359	3540	87,52

Tabla 33. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración media, 50ng/L

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	*****	*****	7186	
2A	8772	8498	8635	87,86
2B	7460	7703	7582	77,14

Tabla 34. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración alta, 100ng/L

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	14065	14318	14192	
3A	13267	12578	12922	76,77
3B	11964	12450	12207	72,52

Día 2

Tabla N° 35. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración baja, 10ng/L (2° día)

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	1620	1363	1492	
1 ^a	3188	3577	3383	81.83
1B	3994	4257	4126	99.81

Tabla 36. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración media, 50ng/L

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	5110	6411	7186	
2A	8648	8572	8610	87.61
2B	7830	8096	7963	81.02

Tabla 37. Resultados % de recuperación AFM1 para la concentración alta, 100ng/L

Muestra	Área		Área Prom.	% Recuperación
	Inyección 1	Inyección 2		
Blanco	2509	2775	2642	
Estándar	13419	13595	13507	
3A	13402	13720	13561	83.97
3B	16526	15503	16015	99.17

ANEXO F. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero dando una estimación de la fidelidad de los resultados obtenidos por el método, comparados a los valores reales. El porcentaje de recuperación debe ser lo más cercano al 100%, éste se expresa como:

$$\%R = \left[\frac{X_{\text{exp}}}{X_{\text{aceptado}}} \right] * 100$$

Para determinar si el porcentaje de recuperación medio no difiere significativamente del 100%, se utiliza la prueba t-Student, mediante el planteamiento de una hipótesis nula. Ho) El porcentaje de recuperación medio no difiere significativamente del 100%.

$$t_{(n-1)} = \frac{[100-R] * \sqrt{n}}{CV}$$

Se compara el valor $t_{(n-1)}$ con el $t_{\text{crítico}}$, descartando esta hipótesis si el valor $t_{(n-1)} > t_{\text{crítico}}$ es decir, existe sesgo en el análisis de las muestras.

Los límites de confianza para el porcentaje de recuperación de cada nivel de concentración, se estiman así:

$$\% \bar{R} \pm t * \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde:

\bar{R} Porcentaje de recuperación promedio para cada nivel de concentración

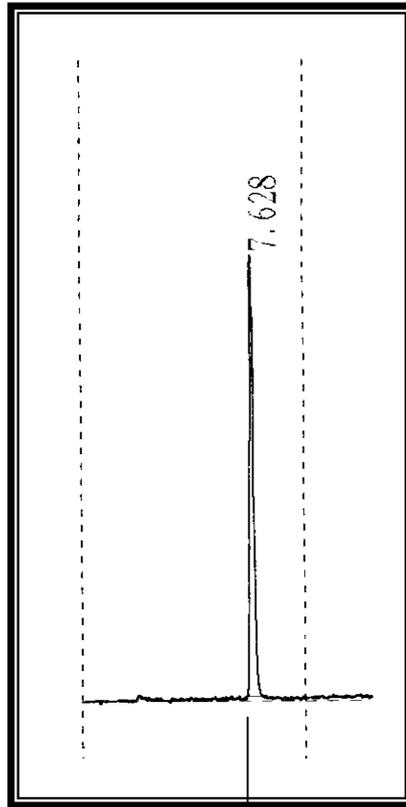
t Valor en la tabla t-Student para (n -1) grados de libertad y un 95% de confianza

s Desviación estándar de las réplicas en cada nivel de concentración

n Número de réplicas por nivel de concentración

**ANEXO G.
CROMATOGRAMAS**

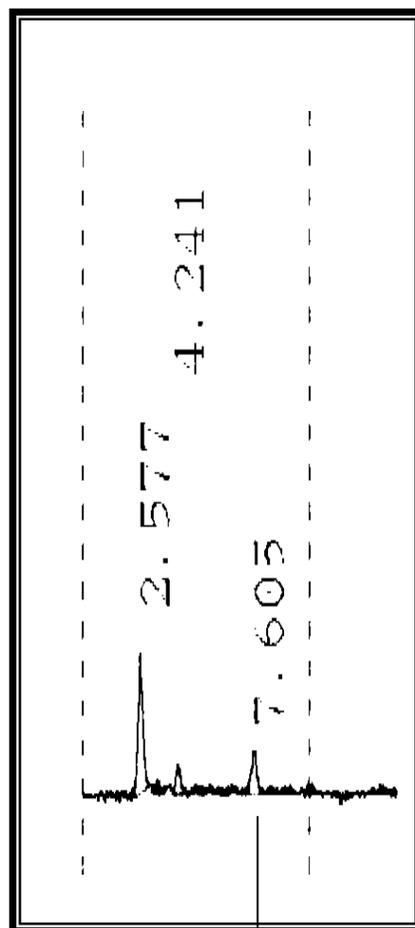
- ✓ **Cromatograma estándar de aflatoxina M1**



A

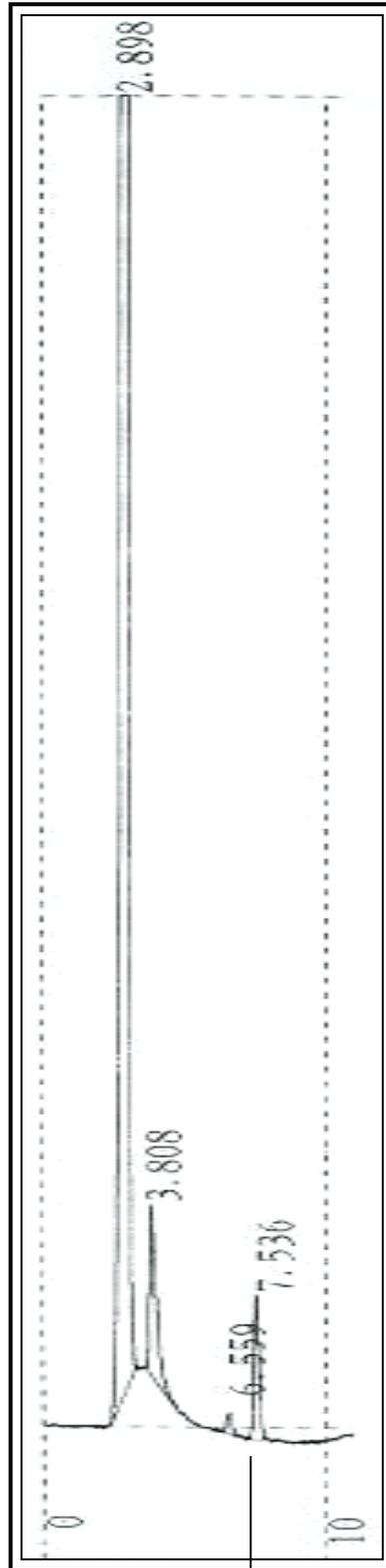
A: Aflatoxina M1

✓ Cromatograma muestra de Dulce de leche



A: Aflatoxina M1

✓ Cromatograma muestra de leche



A
A: Aflatoxina M1