

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E  
INVESTIGACIÓN EN SALUD



**TESIS DE GRADO**

**OPTIMIZACION DEL MÉTODO FLUOROMETRICO  
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA  
TOTALES (B1, B2, G1 y G2) EN CASTAÑA**

Tesis de grado para obtener el título de especialista en análisis  
Fármaco Químico, mención Bromatología

**POSTULANTE:** NELLY LIMACHI GUTIERREZ

**TUTOR:** ESP. DR. OSCAR ROLANDO GANDARILLAS GONZALES

**Co TUTOR:** DRA. MARÍA OTILIA TORREZ TINTAYA

La Paz –Bolivia

Agosto, 2021

## **Dedicatoria**

---

*A Dios, por la sabiduría enseñándome el camino de la superación y la luz de esperanza, para alcanzar nuevas metas y venciendo obstáculos cada vez más grandes.*

---

*A mis padres Benigno Limachi y Rosalia Gutiérrez por su apoyo incondicional, su amor y su esfuerzo quienes han sacrificado toda su vida para hacer de sus hijos personas de bien y útiles para la sociedad.*

---

*Gracias de todo corazón.*

---

*Nelly Limachi Gutierrez*

---

### **Agradecimiento**

*A Dios por ser el mudo testigo e incondicional mentor en los avatares de mi vida*

*Al Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud dependiente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Andrés por darme la oportunidad de recibir una formación académica de primer nivel*

*Al Laboratorio de Bromatología del Instituto SELADIS por la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo.*

*A todos mis docentes instructores Dra. Maria Torrez, Dra. Mercedes Morales, Dr. Arturo Mallea y Dra. Angélica Espada quienes me instruyeron y compartieron todos sus conocimientos útiles para mi vida profesional, y brindarme su apoyo y colaboración incondicional para llevar a cabo este presente trabajo*

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN: .....	1
<b>CAPITULO I</b> .....	4
<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	4
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.2. OBJETIVOS .....	5
1.2.1.Objetivo General. ....	5
1.2.2. Objetivos Específicos .....	5
<b>CAPITULO II</b> .....	6
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	6
2.1. LA CASTAÑA CARACTERÍSTICAS GENERALES .....	6
2.1.2. Origen de la Castaña.....	7
2.2. LA CASTAÑA EN BOLIVIA. ....	8
2.2.1. Importancia de la castaña en Bolivia. ....	8
2.2.2. La producción de la castaña amazónica en Bolivia .....	9
2.3. RECOLECCIÓN DE LA CASTAÑA.....	10
2.3.1.Área de producción. ....	11
2.3.2. Proceso de beneficio de la castaña comprende los siguientes pasos .....	12
2.4. CONTENIDO NUTRICIONAL .....	14
2.5. COMERCIALIZACIÓN DE LA CASTAÑA .....	15
2.5.1. Aplicación industrial. ....	16
2.5.2.Usosde la castaña .....	16
2.5.3. Panadería y la industria de cereales para desayuno.....	17
2.5.4 Industria de la confitería.....	17
2.5.5. Otras industrias de alimentos.....	18
2.6. ALTERACIONES QUE PUEDEN SUFRIR LOS ALIMENTOS .....	18
2.6.1. Principales causas de deterioro de las materias primas agrícolas.....	19
2.6.2. Los hongos y su efecto sobre los alimentos .....	20

2.6.3. Micotoxinas.....	21
2.6.4. Importancia de los hongos y las micotoxinas en producción animal .....	22
2.6.5. Efecto del tipo, tiempo y condiciones de almacenaje sobre la incidencia de hongos .	23
2.6.6. Tipos de micotoxinas que afectan a los animales .....	23
2.7 REGULACIONES .....	28
2.7.1. Niveles permitidos.....	29
2.7.2. Procedimiento de análisis y niveles máximos para las aflatoxinas .....	31
2.8. RIESGOS PARA LA SALUD CAUSADOS POR LAS AFLATOXINAS .....	33
2.9. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICOTOXINAS .....	37
2.9.1. Método fluorométrico.....	40
2.9.2. Aplicaciones de la fluorescencia .....	42
2.10 MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	44
2.10.1. Importancia de las mediciones analíticas.....	44
2.10.2. Validaciones de métodos. ....	45
2.10.3. Validaciones del método químicos .....	45
2.10.4. Fases de la validación.....	46
2.10.5. Parámetros de validación.....	47
2.10.6. Linealidad.....	48
2.10.7. Precisión. ....	49
2.10.8. Exactitud. ....	51
2.10.9. Selectividad (especificidad).....	52
2.10.10. Material de referencia.....	53
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>55</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>55</b>
3.1. PARTE EXPERIMENTAL:.....	55
3.1.1. Lugar de trabajo: .....	55
3.2. MATERIAL, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	55
3.2.1. Material de referencia.....	55
3.2.2. Patrones estándar.....	57
3.3. MATERIALES DE LABORATORIO .....	57
3.3.1 Materiales y equipos.....	57

3.3.2. Reactivos .....	58
3.4. METODOLOGÍA .....	59
3.5. PROTOCOLO DE OPTIMIZACION PARA LA EXTRACCIÓN .....	59
3.6. PROPOCOLO DE OPTIMIZACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN .....	60
3.7. PROCEDIMIENTO OPTIMIZADO PARA CUANTIFICACION .....	62
3.7.1. Fundamento del método optimizado.....	62
3.7.2 Preparación de reactivos.....	63
3.7.3 Molienda y pesaje de la muestra.....	63
3.7.4 Extracción de la muestra. ....	63
3.7.5 Purificación de la muestra .....	64
3.7.6. Cuantificación por fluorometria .....	64
3.7.7. Cálculos.....	66
3.7.8. Interferencias del método .....	67
3.8 TRATAMIENTO DE DATOS ESTADISTICOS .....	67
3.8.1 optimización del extracción de aflatoxinas en castaña.....	67
3.8.2 Linealidad y Rango Lineal .....	68
3.8.3 Límite de Detección(LD) .....	71
3.8.4 Límite de Cuantificación (LQ) .....	72
3.8.5 Selectividad .....	73
3.8.6 Exactitud .....	75
3.8.7 Precisión.....	77
3.8.8 Reproducibilidad (Precisión Intermedia).....	79
3.8.9 Cálculos para la y Precisión Intermedia .....	80
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>82</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>82</b>
4.1. CRITERIOS DE LA EXTRACCIÓN .....	82
4.2. CRITERIOS PARA LA CUANTIFICACIÓN .....	84
4.3. PROTOCOLO DE LECTURA PARA LA CUANTIFICACIÓN .....	84
4.4. TRATAMIENTO DE DATOS ESTADÍSTICOS .....	85
4.4.1 Protocolo de evaluación del solvente para la extracción.....	85
4.4.2 Linealidad y Rango Lineal .....	88

4.4.3 Verificación e la Homocedasticidad .....	100
4.4.4 Límite de detección y límite de cuantificación .....	101
4.4.5 Selectividad .....	103
4.4.6 Precisión .....	107
4.4.7 Exactitud .....	109
<b>CAPITULO V</b> .....	114
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	114
5.1. CONCLUSIONES .....	114
5.2. RECOMENDACIONES .....	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	117
ANEXOS .....	120
Anexo 1. MUESTRAS DE CASTAÑA CONTAMINADAS CON AFLATOXINA.....	120
Anexo 2. SOLUCIONES ESTANDAR: AFLA-MIX .....	120
Anexo 3. AFLA-MIX: DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	121
Anexo 4. CURVA DE CALIBRACIÓN .....	121
Anexo 5. PROCEDIMIENTO DE LA PARTE EXPERIMENTAL.....	122
Anexo 6. TRATAMIENTO DE DATOS ESTADÍSTICOS.....	125
Anexo 7. COEFICIENTES DE LA RECTA .....	126
Anexo 8. SELECTIVIDAD - MATRIZ SIN ANALITO NO DISPONIBLE.....	127
Anexo 9. TEST T PARA IGUALDAD DE PENDIENTES .....	128
Anexo 10. MATRIZ CON ANALITO .....	129
Anexo 11. PRECISIÓN INTERMEDIA .....	130
Anexo 12. EXACTITUD .....	131
Anexo 13. DETERMINACIÓN DE INTERVALOS DE CONFIANZA .....	132

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	CLASIFICACIÓN DE LA CASTAÑA .....	14
Cuadro 2	CONTENIDO NUTRICIONAL .....	15
Cuadro 3	NIVELES MÁXIMOS Y NIVELES E REFERENCIA AFLATOXINAS PRESENTES EN ALIMENTOS .....	30
Cuadro 4	MUESTRAS DE REFERENCIA.....	56
Cuadro 5	COMPARACIÓN DE SOLVENTES PARA LA DISOLUCIÓN DE AFLATOXINA .....	61
Cuadro 6	CONCENTRACIÓN PATRONES DE AFLATOXINAS MIX .....	65
Cuadro 7	COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN POR TRIPLICADO .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Árbol Castaño	6
Figura 2	El coco que contiene la castaña	7
Figura 3	Exportaciones bolivianas de castaña	8
Figura 4	Beneficiado de la castaña	13
Figura 5	Componentes de un Fluorimetro	41
Figura 6	Muestras de castaña	56
Figura 7	Revelado de la placa de TLC	83
Figura 8	Comparación de la intensidad de fluorescencia a diferentes concentraciones	84
Figura 9	Curva de calibración del día 1 donde se relaciona la concentración de afla-mix ( $\mu\text{l/l}$ ) versus la intensidad de la fluorescencia	89
Figura 10	Curva de calibración del día 2 donde se relaciona la concentración de afla-mix ( $\mu\text{l/l}$ ) versus la intensidad de la fluorescencia	92
Figura 11	Curva de calibración del día 3 donde se relaciona la concentración de afla-mix ( $\mu\text{l/l}$ ) versus la intensidad de la fluorescencia	95
Figura 12	Curva de calibración global del afla-mix	98
Figura 13	Datos residuales para la homocedasticidad	101
Figura 14	Inclinaciones de la recta solvente más patrón para determinar la selectividad el método	104
Figura 15	Inclinaciones de la recta matriz más el patrón para determinar la selectividad el método	105
Figura 16	Inclinaciones de las recta para la comparación del efecto matriz para determinar la selectividad del método	106
Figura 17	Figura de intervalo superior e inferior de confianza	112
Figura 18	Límites superior e inferior expresado en porcentaje de la exactitud del método	113

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	TIPO DE MÉTODO.....	48
Tabla 2	ESQUEMA PARA LA EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO ...	69
Tabla 3.	PLANIFICACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE SELECTIVIDAD DEL METODO.....	74
Tabla 4	ESQUEMA PARA EL ESTUDIO DE LA REPETITIVIDAD .....	78
Tabla 5	ESQUEMA PARA EL ESTUDIO DE A REPRODUCTIVIDAD .....	80
Tabla 6	COMPORTAMIENTO DESOLVENTES ADECUADOS PARA LA DISOLUCIÓN DE AFLAXTOXINAS AFLATOXINA - Mix.....	83
Tabla 7	LECTURAS DE FLUORESENCIA PARA DETERMINAR EL MEJOR SOLVENTE PARA LA EXTRACCIÓN .....	85
Tabla 8	COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN DE SOLVENTES MÁS ÓPTIMOS PARA LA EXTRACCIÓN.....	87
Tabla 9	PRUEBA F PARA VARIANZAS DON MUESTRAS .....	87
Tabla 10	REPARCION DE ESTANDARES PARA CURVAS DE CALIBRACION DE AFLATOXINA MIX. ....	88
Tabla 11	RESULTADOS PROMEDIOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AFLATOXINAS - DIA 1.....	89
Tabla 12	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 1 .....	90
Tabla 13	RESULTADOS PROMEDIOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AFLATOXINAS - DÍA 2.....	91
Tabla 14	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 2.....	93
Tabla 15.	RESULTADOS PROMEDIOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AFLATOXINAS – DIA 3 .....	94
Tabla 16	RESULTADOS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 3 .....	96
Tabla 17	COMPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS TRES DÍAS.....	97
Tabla 18	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN GLOBAL DEL AFLA-MIX.....	99

Tabla 19	HOMOCEATICIDAD (TEST E COCHRAN).....	101
Tabla 20	RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN .....	102
Tabla 21	DATOS PARA DETERMINAR LA SELECTIVIDAD .....	103
Tabla 22	DATOS ESTADÍSTICOS PARA LA ADICIÓN DE PATRÓN .....	106
Tabla 23	RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS PARA LA DETERMINAR REPETIBILIDAD DEL MÉTODO .....	107
Tabla 24	RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.....	108
Tabla 25	RESULTADOS DE LOS CÁLCULOS DE REPRODUCIBILIDAD .....	108
Tabla 26	RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD.....	111

## RESUMEN

La castaña (*Bertholletia excelsa*) amazonia tiene características importantes desde el punto de vista nutritivo, es por esto que sus niveles de exportación en Bolivia representa el 60% de la oferta mundial de castaña provenientes de Bolivia. Así también contiene un gran problema de contaminación por aflatoxina que son metabolitos secundarios producidos por algunas de las especies de *Aspergillus* que crecen en productos alimenticios y que por su consumo pueden ser carcinógenas, mutagenicas, teratogenicas y hepato toxicas. Las principales aflatoxinas identificadas son B1, B2, G1 y G2.

El propósito de este trabajo es optimizar el método Fluorometrico para la cuantificación de Aflatoxinas Totales (B1, B2, G1 y G2) como un método rápido de detección y con menor costo; donde para la optimización del método se combinó tres técnicas de detección de aflatoxinas en cereales la primera de un compendio de análisis químico de alimentos y dos técnicas aprobadas de la AOAC para la Determinación de Micotoxinas 13<sup>th</sup> edición y la Técnica de AflaTest® de VICAM.

En la combinación de las diferentes técnica se optimizo el método que se basa en la extracción de aflatoxinas en cloroformo, filtración y purificación con solventes para posteriormente el extracto se cuantifique por fluorometria. También se estableció que el método optimizado de extracción se puede separar las toxinas por cromatografía en capa fina volviéndose de esta manera un método semi-cuantitativo por (TLC) realizando una redisolución con cloroformo, donde el solvente para la corrida es cloroformo/acetona.

Mediante el cálculo estadístico se concluyó que el método es selectivo donde si hay influencia de la matriz con el analito debiendo controlarse los puntos críticos del proceso de extracción e identificación; debido a que existen interferencias en la matriz por su alto contenido en aceites es necesario el uso de un control positivo y negativo cada vez que se pretenda cuantificar. El límite de detección encontrado es de 1,935 µg/kg y el límite de cuantificación encontrado es de 6,260 µg/kg de Aflatoxinas totales en castaña lo cual indica que el método puede medir concentraciones a partir de los 6 µg/kg (ppb); con

exactitud y precisión; según normativa vigente que acepta un nivel máximo permitido de 10 µg/kg (ppb) para aflatoxinas totales.

El método es lineal ya que existe una alta correlación entre las concentraciones y la fluorescencia ya que tiene un coeficiente de correlación de 0,993. El método presenta un porcentaje de exactitud de 100,558 con un error relativo 0,558 porcentaje de recuperación de 97,40%, una precisión con un CV menor a 6% y la reproducibilidad demuestra que no existe diferencia estadística entre los resultados calculando su análisis de varianza.

Palabras claves: castaña, aflatoxina, cuantificación por fluorometria, extracción por VICAM, método semi- cuantitativo

## SUMMARY

The Amazon chestnut (*Bertholletia excelsa*) has important characteristics from the nutritional point of view, which is why its export levels in Bolivia represent 60% of the world supply of Brazil nuts from Bolivia. Likewise, it also contains a great problem of contamination by aflatoxin, which are secondary metabolites produced by some of the *Aspergillus* species that grow in food products and which, due to their consumption, can be carcinogenic, mutagenic, teratogenic and hepato-toxic. The main aflatoxins identified are B1, B2, G1 and G2

The purpose of this work is to optimize the Fluorometric method for the quantification of Total Aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) as a rapid method of detection and with lower cost; Where for the optimization of the method, three aflatoxin detection techniques in cereals were combined, the first from a compendium of food chemical analysis and two techniques approved by the AOAC for the Determination of Mycotoxins 13th edition and the AflaTest® Technique from VICAM.

In the combination of the different techniques, the method based on the extraction of aflatoxins in chloroform, filtration and purification with solvents was optimized, so that the extract was subsequently quantified by fluorometry. It was also established that the optimized extraction method can separate toxins by thin layer chromatography, thus becoming a semi-quantitative method by (TLC) performing a redissolution with chloroform, where the solvent for the run is chloroform / acetone.

By means of the statistical calculation it was concluded that the method is selective where if there is influence of the matrix with the analyte, the critical points of the extraction and identification process must be controlled; Due to the fact that there are interferences in the matrix due to its high oil content, it is necessary to use a positive and negative control each time it is intended to quantify. The detection limit found is 1,935  $\mu\text{g} / \text{kg}$  and the quantification limit found is 6,260  $\mu\text{g} / \text{kg}$  of total Aflatoxins in Brazil nuts, which indicates that the method can measure concentrations from 6  $\mu\text{g} / \text{kg}$  (ppb); with

accuracy and precision; according to current regulations that accept a maximum permitted level of 10 µg / kg (ppb) for total aflatoxins.

The method is linear since there is a high correlation between concentrations and fluorescence since it has a correlation coefficient of 0.993. The method presents a percentage of accuracy of 100.558 with a relative error 0.558, percentage of recovery of 97.40%, a precision with a CV less than 6% and the reproducibility shows that there is no statistical difference between the results calculating its analysis of variance.

Keywords: chestnut, aflatoxin, quantification by fluorometry, extraction by VICAM, semi-quantitative method

## INTRODUCCIÓN:

La castaña (*Bertholletia excelsa*) es originada en la amazonia que abarca los países de Venezuela, Colombia, Bolivia, Perú, Guayana y Brasil tiene varias características interesantes desde el punto de vista nutritivo, el aceite es de alta calidad, por esta causa es de gran importancia en Bolivia por sus niveles de exportación (Lucas Viñuela, Enedina FAO). Así también contiene un gran problema de contaminación por aflatoxinas que son metabolitos secundarios provenientes por algunas de las especies de *Aspergillus* que crecen en productos alimenticios; esta contaminación por micotoxina es considerada casi inevitable por encontrarse en mohos esparcidos en todo el mundo y encontrar fácilmente las condiciones ideales para su producción. Su consumo puede afectar el metabolismo de casi todos los seres vivos, incluyendo los humanos y los animales. Las aflatoxinas son consideradas como carcinógenas mutagénicas, teratogénicas y hepatotóxicas para los seres humanos, por lo cual debemos ser protegidos al máximo de su consumo o contacto con estas micotoxinas. Las principales aflatoxinas identificadas son B1, B2, G1 y G2, de las cuales, la más tóxica es la aflatoxina B1 (Gemio & Martins, 2004)

Esta toxina se forma cuando los hongos de *Aspergillus* invaden una serie de productos alimenticios, entre los que se incluye la castaña. Lamentablemente, este alimento constituye un substrato en el cual los hongos producen altos niveles de aflatoxinas y además el ambiente en el que se realiza su beneficiado es propicio para su contaminación (Arellano, 2003) (Gemio & Martins, 2004). La toxicidad va a depender de la dosis, del grado de exposición, la edad, el estado nutricional del consumidor.

La normativa española y el Codex Standard 193-1995 fija un valor límite de 10 µg/Kg para la suma de Aflatoxinas Totales (B1, B2, G1, G2) para almendras o también denominada nuez del Brasil y un valor de 5 µg /Kg para la Aflatoxina B<sub>1</sub>, estos valores también son usados por Red de laboratorios oficiales de análisis de alimentos (RELOAA). Aunque para las exportaciones en algunos países del continente Europeo

son más exigentes permitiendo el ingreso de alimentos por exportación con un nivel máximo de 5µg /Kg para Aflatoxinas Totales (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) y 2µg. /Kg para la aflatoxina B<sub>1</sub> debido a esto se están regulando los contenidos o niveles máximos no solo de aflatoxinas sino de varias toxinas (Codex para los contaminantes, 1995); por esta razón y con fines de contar con datos de base y referenciales de la presencia de aflatoxinas en la castaña de producción nacional, es necesario en primera instancia contar con técnicas cuantitativas rápidas confiables, sencillas y de bajo costo que puedan ser puestas al servicio del sector industrial procesadoras de castaña y en beneficio de la comunidad en general ya que existen normativas vigentes que se tienen que cumplir para determinar la calidad e inocuidad de la castaña o también llamada nuez del Brasil, por su gran aporte nutricional por la presencia de ácidos grasos esenciales. (Arellano, 2003).

La hipótesis de la cual partió el trabajo fue que si las aflatoxinas y sus derivados se absorben en la región ultravioleta cercano y presentan fluorescencia, será posible llevar a cabo una identificación y cuantificación dentro los rangos de interés toxicológico según normativas vigentes, por el método de fluorescencia después de una extracción adecuada de la muestra combinando distintos métodos normalizados de la AOAC y otros métodos científicos no normalizados

Por la gran importancia de contar con técnicas analíticas para la cualificación de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) el presente trabajo tiene como objetivo optimizar e Implementar el método Fluorométrico para la cuantificación de Aflatoxinas Totales (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) en castaña, en el laboratorio de Bromatología del Instituto SELADIS como un método rápido de detección y con menor costo. Pretendiendo combinar normativas vigentes y de revisión de artículos científicos para la extracción, purificación y aprovechando la fluorescencia que presentan las aflatoxinas realizar la debida cuantificación por el equipo de fluorometría utilizando estándares de referencias para determinar su selectividad, linealidad, sensibilidad precisión (repetitividad y

reproducibilidad) y exactitud del método para así poder demostrar que el método es adecuado para su propósito.

El diseño metodológico es cuantitativo ya que se cuenta con una muestra de concentración conocida y cuantificada por HPLC proporcionada por la empresa TAHUAMANO.

# CAPITULO I

## MARCO METODOLÓGICO

### 1.1. JUSTIFICACIÓN

La producción de castaña en el país representa más del 75% del movimiento económico de la zona Norte de Bolivia, departamentos de Pando, Beni y la provincia Iturralde del departamento de La Paz. En el año 2005, el 60% de la oferta mundial de castañas beneficiada provenía de Bolivia, 27% de Brasil y 13% de Perú (Lucas Viñuela, Enedina FAO) (Williams & Wilson, 1999). Motivo por el cual la demanda de un método analítico para la cuantificación de aflatoxina es recurrente ya que es un toxina casi inevitable para esto se tiene que contar con métodos confiables y seguros con el fin de cumplir con las exigencias normadas y legislación con respecto a sus niveles permitidos y de esta manera comprobar la inocuidad del alimento, para esto es muy importante contar con técnicas que primeramente tienen que ser implementadas para luego ser validadas.

Las implementaciones de nuevas técnicas analíticas como respuesta a las necesidades de la población son de gran importancia para cualquier laboratorio para coadyuvar al consumo de alimentos inocuos y seguros. En muchas oportunidades no se cuentan con normativas de análisis o métodos de referencia que se puedan implementar dentro el laboratorio, motivo para que el presente trabajo pretende optimizar la detección y cuantificación de aflatoxinas en castaña debido al alto requerimiento por el sector industrial.

Actualmente no se cuenta con muchos laboratorios que presten servicios a la población con respecto la cuantificación de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) que sean métodos rápidos de detección que abarquen el campo de trabajo y que sean de bajo costo, motivo por el cual la optimización del método que tendría un impacto económico relevante para la industria manufacturera de castaña en el país por su accesibilidad en costos comparados con un método por HPLC o el método VICAM para la extracción

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. Objetivo General.**

Optimizar el método Fluorométrico para la cuantificación de Aflatoxinas Totales (B1 B2 G1 y G2) en castaña, en el laboratorio de Bromatología del Instituto SELADIS como un método rápido de detección y con menor costo comparado con el método HPLC

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Adecuar un método para la extracción y purificación de aflatoxinas totales en castaña con la combinación de métodos normalizados, dos métodos de la AOAC y una de revisión científica.
- Establecer un método de lectura para la cuantificación del extracto de aflatoxinas totales en castaña por fluorometría utilizando el equipo Fluorometro Synergy-HT con lector Multimodal de Microplacas.
- Validar el método analítico determinando selectividad, linealidad, sensibilidad precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y robustez del método para así poder demostrar que el método es adecuado para su propósito del método implementado.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. LA CASTAÑA CARACTERÍSTICAS GENERALES

El árbol de la castaña (*Bertholletia excelsa*) es una especie no maderable de alto valor ecológico, cuya altura asciende a más de 20 metros. Produce semillas comestibles, las cuales se conocen como castaña amazónica o “nuez del Brasil”, mismas que el país son extraídas y exportadas en un 99%. La actividad de la exportación y beneficio de la zona norte de Bolivia, que comprende la totalidad del Departamento de Pando, la provincia Vaca Diez del Beni y la provincia Iturrealde del departamento de la Paz. (Williams & Wilson, 1999).

La castaña amazónica es el fruto del árbol de la castaña que se encuentra en forma natural y silvestre solamente en los bosques amazónicos de Bolivia, Brasil, Perú, Guayana y Colombia; sin embargo, solamente en los tres primeros países se encuentran la castaña de forma comercial.

La importancia de la castaña no solo radica en su aporte a la economía de la mencionada región, sino por su componente ecológico en la preservación de nuestra selva amazónica, ya que su explotación permite frenar la depredación de los bosques



**Figura 1**Árbol Castaño  
**Fuente:** (Williams & Wilson, 1999)



**Figura 2** El coco que contiene la castaña  
**Fuente:** (Williams & Wilson, 1999)

Como consecuencia de la desaparición de la actividad gomera en el país, Bolivia empezó a desarrollar la actividad castañera. Nuestro país ha ido paulatinamente tomando el control del mercado mundial a partir del año 1996, mejorando su tecnología, compitiendo con precios y calidad, lo cual ha permitido al país convertirse en el primer productor de la castaña en el mundo.

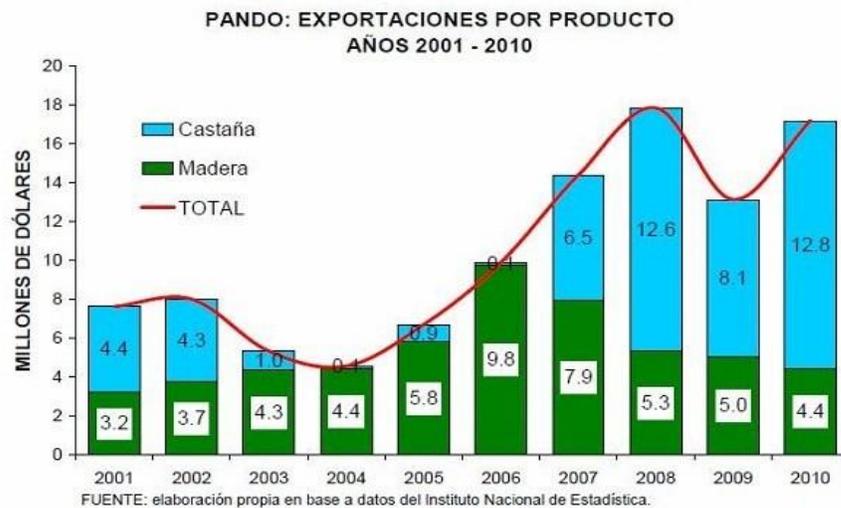
### **2.1.2. Origen de la Castaña.**

Durante algún tiempo se ha pensado que el origen de la castaña se encontraba en Oriente, y que fue introducida en Europa a lo largo de la época de los romanos. Sin embargo, estudios actuales afirman que los castaños ya estaban presentes en Europa en esos tiempos. Hacia el siglo V a.C. llegó a Grecia, pero no fue hasta cinco siglos después cuando llegó a Francia y España. (Codex para los contaminantes, 1995)

El castaño tiene preferencia por los lugares frescos y abrigados dentro de climas templados pero húmedos. Se encuentra de forma natural en el sur de Inglaterra, Mar Caspio, Península Ibérica, Canarias, norte de Marruecos y Argelia. También se pueden encontrar ejemplares de castaño en el norte de Alemania, Estados Unidos, China y Japón.

## 2.2. LA CASTAÑA EN BOLIVIA.

De acuerdo a los datos del comercio mundial, Bolivia es el principal exportador de nuez del Brasil en el mundo. Por ejemplo, en el año 2005, el 60% de la oferta mundial de castañas provenía de Bolivia, 27% de Brasil y 13% de Perú. El 100% de las exportaciones bolivianas prácticamente es de castaña beneficiada o pelada, apenas 0,5% de las castañas es exportada con cáscara. Las exportaciones bolivianas en los últimos años han alcanzado cifras superiores a USD 70 millones, (Williams & Wilson, 1999), (Lucas Viñuela, Enedina FAO)



**Figura3** Exportaciones bolivianas de castaña

**Fuente:** (Williams & Wilson, 1999)

### 2.2.1. Importancia de la castaña en Bolivia.

La actividad de la explotación y beneficio de la castaña representa más del 75% del movimiento económico de la zona Norte de Bolivia, que comprende la totalidad del Departamento de Pando, la provincia Vaca Diez del Departamento del Beni y la provincia Iturralde del Departamento de La Paz. La importancia de la castaña no sólo radica en su aporte a la economía de la mencionada región, sino por su componente

ecológico en la preservación de nuestra selva amazónica, ya que su explotación permite frenar la depredación de los bosques.

Como sector exportador, la castaña ocupa el segundo lugar en valor de las exportaciones agroindustriales, después de la soya, y entre los primeros cuatro rubros más importantes de las exportaciones no tradicionales, en Bolivia. En 2001 el valor total de exportación de castaña llegó a \$us27 millones según el Banco Central de Bolivia. En 2003, este valor llegó a 36 millones de dólares. (Williams & Wilson, 1999).

### **2.2.2. La producción de la castaña amazónica en Bolivia**

El árbol de la castaña (*Bertholletia Excelsa*) es una especie no maderable de alto valor ecológico, cuya altura asciende a más de 20 metros. Produce semillas comestibles, las cuales se conocen como castaña amazónica o "*BrazilNuts*", mismas que en el país son extraídas y exportadas en un 99%.

La actividad de la explotación y beneficiado de la castaña representa más del 75% del movimiento económico de la zona norte de Bolivia, que comprende la totalidad del Departamento de Pando, la provincia Vaca Diez del Beni y la provincia Iturrealde del Departamento de La Paz. La importancia de la castaña no sólo radica en su aporte a la economía de la mencionada región, sino por su componente ecológico en la preservación de nuestra selva amazónica, ya que su explotación permite frenar la depredación de los bosques.

La castaña amazónica es el fruto del árbol de la castaña que se encuentra en forma natural y silvestre solamente en los bosques amazónicos de Bolivia, Brasil, Perú, Guayana y Colombia; sin embargo, solamente en los tres primeros países se encuentra la castaña de forma comercial. En Bolivia existen condiciones aptas para el desarrollo del árbol de la castaña en un área extensa de la Amazonía que abarca más de 100,000 km<sup>2</sup>(un 10% de la superficie total del país).

Como consecuencia de la desaparición de la actividad gomera en el país, Bolivia empezó a desarrollar la actividad castañera. Nuestro país ha ido paulatinamente tomando el control del mercado mundial a partir del año 1996, mejorando su tecnología, compitiendo con precios y calidad, lo cual ha permitido al país convertirse en el primer productor de la castaña en el mundo.

### **2.3. RECOLECCIÓN DE LA CASTAÑA**

El árbol de la castaña produce desde el mes de noviembre en el que se encuentran los primeros frutos, pero es recomendable iniciar recién la zafra en la segunda quincena de diciembre, hasta este momento, ya han caído alrededor del 80% de los frutos, lo cual permite recolectar la mayor parte de la producción.

La zafra se prolonga hasta el mes de marzo, expandiéndose hasta las zonas más alejadas y en algunos casos volviendo a recorrer los lugares donde se recogió en diciembre. Este período de cosecha o zafra está marcado fuertemente por el período de lluvias, dificultando el trabajo de recolección notablemente debido a que familias enteras se trasladan al bosque, teniendo que enfrentar un sin número de dificultades y peligros.

A pesar de las condiciones adversas, más de 15,000 familias se internan al bosque y no vuelven sino hasta febrero o marzo. Desde marzo hasta diciembre se procede al beneficiado, la mano de obra que participó en la recolección se traslada a las plantas beneficiadoras, donde se requiere más de 5,000 puestos de trabajo.

El proceso de recolección consiste en el recojo y recolección de los cocos que se encuentran bajo los árboles, los cocos se desprenden de los árboles por maduración natural.

Posteriormente, proceden a cortar la parte superior de cada coco por donde se extraen las semillas, el corte se hace a mano con ayuda de un machete. Una vez terminado este proceso se reúnen las castañas con cáscaras y se las coloca en bolsas para ser transportados a los payoles que son precarios y rústicos galpones que sirven para

protegerlos de la lluvia. Algunas explotaciones no cuentan con payoles por lo que las semillas son dejadas a la intemperie bajo la lluvia que ocasiona serios problemas de deterioro y contaminación al producto.

La castaña es transportada por diversos medios hasta los lugares de almacenamiento de las beneficiadoras. Las condiciones climáticas son el principal obstáculo para hacer una buena recolección de la castaña que debe ser trasladada lo antes posible a depósitos y silos con condiciones de almacenamiento controladas. Las mayores pérdidas de la semilla se producen en este proceso que se debe mejorar en cada zafra para obtener castaña de excelente calidad.

Uno de los principales problemas que ocasiona la mala recolección y acopio es la contaminación con aflatoxinas que son metabolitos del hongo llamado *Aspergillus flavus*. Según estudios preliminares se cree que son cancerígenos y dañinos a la salud en ciertas concentraciones. (Gemio & Martins, 2004).

### **2.3.1. Área de producción.**

La zona castañera de Bolivia se encuentra ubicada en la zona norte del país, comprende todo el departamento de Pando, la Provincia Vaca Diez del Beni e Iturralde de La Paz con una superficie aproximada a 100,000 km<sup>2</sup>, una superficie equivalente al 10% de la superficie total del país.

El área castañera está ubicada entre los paralelos 9° 38' y 12° 30' latitud sur y entre 69° 35' y 65° 17' longitud oeste. De esta superficie estimada, 63,827 km<sup>2</sup> corresponden a la extensión del Departamento de Pando, 22,424 km<sup>2</sup> a la provincia Vaca Diez del Beni y el resto a la provincia Iturralde de La Paz.

Nueve mil toneladas contra 7.5 mil toneladas de Bolivia. A partir del año 1996 Bolivia se convierte en el primer productor mundial de castaña, superando al Brasil.

El año 1999 Bolivia exportó 10,880 tn contra 2,500 tn del Brasil, representando para nuestro país el 73% del mercado mundial de castaña.

Prácticamente, el 99 % de la producción nacional está destinada al mercado de exportación. En términos monetarios la producción de castaña pasó de 15.6 millones de dólares en 1990 a 31.3 millones en el 2000. (Codigo para la prevencion de reduccion de contaminantes por aflatoxina CAC/RCP 59-2005).

### **2.3.2. Proceso de beneficio de la castaña comprende los siguientes pasos**

#### **2.3.2.1. Transporte y almacenaje**

Entre la fecha de recolección y el momento del procesamiento de la castaña pueden transcurrir hasta unos 10 meses. Ello explica la gran importancia que tiene el adecuado almacenaje así como la pronta organización del transporte. De no lograrse estos puntos, bajo las influencias climáticas tropicales será inevitable la afección del moho. Como las vías fluviales suelen ser la única vía de transporte, se recomienda prestar especial atención al fenómeno citado. Una vez arribada la castaña a los centros de procesamiento, se almacenará durante un considerable tiempo hasta que someta a procesamiento en las llamadas "Beneficiadoras", plantas que poseen gran capacidad de almacenaje y que reciben materia prima de lugares de recolección cercanos y de otros ubicados a cientos de kilómetros. Las semillas se depositarán sobre tarimas de madera formando montones de varios metros de altura debiendo ser ventiladas continuamente por remoción manual. Otra alternativa de almacenaje se da con silos cilíndricos de metal ventilados automáticamente. (Arellano, 2003)

#### **2.3.2.2. Sancochado**

La materia prima en cáscara sufre un proceso de autoclave con vapor y después enfriado con agua. En estas condiciones la pepa se separa de la cáscara, aflojada por la presión.

### 2.3.2.3. Descascarado

Se desprende la cáscara que protege la pepa por medio manual con una “gata” mecánica o utilizando máquinas centrífugas especiales.

### 2.3.2.4. Selección:

Se separa la castaña en sus distintos tamaños y calidades.

### 2.3.2.5. Deshidratado

Una vez seleccionada la castaña se deshidrata bajando la humedad de la castaña de un 10 - 12% que es la condición de comercialización del producto para su mejor conservación.

### 2.3.2.6. Envasado y Empaquetado

La almendra seleccionada y deshidratada es envasada al vacío en bolsas de aluminio y empaquetadas en cajas de cartón de 20 Kg., lo cual favorece la mayor duración y conservación de las cualidades del producto.

Antes de su empaque las castañas se limpiarán de sus impurezas (piedrecillas, residuos de cáscaras, etc.) y se clasificarán en las siguientes categorías.



**Figura 4** Beneficiado de la castaña  
**Fuente:** (Williams & Wilson, 1999)

Las castañas levemente dañadas durante la rotura de la cáscara dura y que presentan ligeras quebraduras, por regla general no se someten a la clasificación por tamaño, sino se comercializan bajo el rubro de "chipped". Las castañas rotas se comercializan generalmente bajo el rubro "broken".

Categoría	Número de almendras con cáscara por pound (454 g)
Extra large	35-40
Large	40-45
Extra medium	50-55
Medium	57-62
Small	Más de 70

**Cuadro 1** CLASIFICACIÓN DE LA CASTAÑA ROTA "BROKEN" POR LONGITUD

**Fuente:** (Williams & Wilson, 1999)

## 2.4. CONTENIDO NUTRICIONAL

La castaña se comercializa pelada o con su cáscara (secas); en los mercados locales se consumen frescas. Las almendras contienen aprox. 56 - 66% de grasa, 15% de proteínas y 9% de hidratos de carbono, estas características se detallan a continuación. (Arellano, 2003)

Contenido bromatológico (por cada 100 gr de castaña pelada)		Contenido ácidos grasos	
Agua	5%	Ácidooleico	73.73%
Proteínas	20%	Acidolinóleo	7.67%
Grasa	45%	Acido palmítico	0.89%
Carbohidratos	26%	Acido esteárico	11.24%
Fibra	1-5%	Ácidolignocélico	0.15%
Energía Calorías 654 kcal			
Calcio	186 mg	Vitamina A	850 UI
Hierro	693 mg	Vitamina B1	1,09 mg
Potasio	715 mg.	Acido ascórbico	10 mg
Magnesio	225 mg.	Riboflavina	0.12 mg
Selenio	375 mg.	Colesterol	0.00 mg

**Cuadro 2** CONTENIDO DE PROTEÍNAS, GRASA E HIDRATOS DE CARBONO Y SU  
COMPOSICIÓN QUÍMICA EN 100 G DE ALMENDRAS COMESTIBLES, SECAS

**Fuente:** (Williams & Wilson, 1999)

## 2.5. COMERCIALIZACIÓN DE LA CASTAÑA

Una gran proporción de las almendras son usadas en industria de repostería (particularmente en la industria del turrón) mientras el resto es mayormente consumido como bocadillos. Las avellanas son usadas en la confitería, repostería y productos de chocolate, también son usadas para bocadillos y a menudo vienen en bocadillos empaquetados. Las nueces son consumidas por la industria de alimentos, como bocadillos o son usadas en la cocina del hogar. Las nueces con cáscara son principalmente consumidas durante el otoño (especialmente en noviembre y diciembre) y en invierno, mientras las nueces sin cáscara son populares a lo largo del año. Productos derivados, como ser aceite de nuez, son usados como ingredientes en la pastelería, panadería e industrias de queso. (Codex para los contaminantes, 1995).

### **2.5.1. Aplicación industrial.**

La industria de alimentos procesados es el más grande consumidor de nueces comestibles, frutas secas y vegetales. En este segmento del mercado, las nueces comestibles son usadas como ingredientes en un gran rango de productos de alimentos. Las siguientes industrias son los principales clientes.

### **2.5.2. Usos de la castaña**

Las semillas contienen almendras que son el componente de mayor utilidad y valor económico, con alto valor nutritivo, comparable con la carne de vacuno en la cantidad y calidad de los aminoácidos que presenta. Puede ser consumida al natural o como ingrediente de una gran variedad de dulces y manjares.

La leche de castaña, obtenida a partir de almendras frescas trituradas, es empleada en platos típicos regionales y en el tratamiento de las manchas de la piel.

El aceite, procedente de almendras deshidratadas, presenta un buen coeficiente de digestibilidad, pudiendo ser empleado también como lubricante y en la fabricación de jabones finos y cosméticos.

Del residuo de la extracción de aceite se obtiene una harina rica en proteína, que puede ser utilizada mezclada con harina de trigo para la fabricación de pan. La harina también puede ser usada en mezclas con alimentos prefabricados o para la alimentación animal. La madera presenta características que posibilitan su uso en la construcción civil y naval y en la fabricación de muebles y de madera prensada.

La cáscara del tronco es fuente de estopa que puede ser empleada en el calafateo de embarcaciones y en la fabricación de esteras. La cáscara del fruto y de la semilla tiene alto poder calórico, siendo usada para precalentar calderos. También se usan en la fabricación artesanal de adornos y objetos de decoración

La castaña tiene varias características interesantes desde el punto de vista nutritivo. Primero, el aceite es de alta calidad y apto para el uso comestible. Segundo, la semilla contiene casi un 17% de proteínas, ricas en aminoácidos esenciales y especialmente rica en metionina. También, la castaña es uno de los pocos productos comestibles con un alto contenido de selenio micro-nutriente. Por lo tanto esta nuez se puede considerar como una parte importante de la dieta humana. (www.tecnovit.net, 2016).

Actualmente la industria castañera es responsable del 70% de la actividad económica de la región y ha sido el motivo principal para la preservación del ecosistema. (www.tecnovit.net, 2016)

### **2.5.3. Panadería y la industria de cereales para desayuno**

Estas industrias usan almendras, avellanas, nueces, nueces de pacana y varias frutas secas en la producción de bizcochos, cereales de desayuno. Las panaderías tienden a comprar más productos procesados, como descascarados, pre cortados, rodajeados o nueces pre-procesadas. Por lo tanto, procesadores y empaquetadores cada vez más hacen mezclas que son más multi-funcionales para las panaderías.

### **2.5.4 Industria de la confitería**

Los confiteros de dulces y chocolates son los más grandes consumidores industriales de nueces comestibles. El crecimiento de las ventas de confitería de chocolates, se debe a la alta demanda para ocasiones especiales (por ejemplo, Día de los enamorados, Pascua o Navidad) y además son buscados paquetes con chocolates atractivos para personas jóvenes (por ejemplo, chocolates para niños o chocolates extra nutritivos para después de los deportes). Además, los productores están lanzando cada vez más variedades de chocolate “ligero”, “bajo en grasas” y “enriquecidos con vitaminas”. La adición de nueces a las barras de chocolate mejoran su valor para la salud

y por consiguiente, esto está interesando a los consumidores, como es el caso de las barras saludables, barras multi-frutas.

### **2.5.5. Otras industrias de alimentos**

Muchas otras industrias de alimentos usan nueces comestibles como ingredientes de una manera u otra. Lo incluyen en el helado, comida de bebé e industrias de licor. El uso de las nueces por estas industrias varían desde maní hasta avellanas, almendras, etc. Una gran parte de los cacahuates son procesados para la nuez de mantequilla.

## **2.6. ALTERACIONES QUE PUEDEN SUFRIR LOS ALIMENTOS**

Partiendo que en Guatemala los granos constituyen del 40% al 60% de los alimentos balanceados de la dieta animal utilizados en granjas, es muy importante que estos sean, microbiológicos, sanitaria y nutricionalmente de calidad. Frecuentemente se detecta un alto contenido de hongos y por consiguiente micotoxinas tanto en los granos importados, como en los nacionales, siendo estos perjudiciales para las explotaciones pecuarias, se hace necesario la implementación de medidas para evitar la contaminación de hongos en los granos almacenados así como también de encontrar un buen medio de detección en los alimentos que ya están afectados para que no sean utilizados en la elaboración de alimentos. (www.tecnovit.net, 2016).

En Guatemala como en la mayoría de países de América Latina, la producción agrícola se ve gravemente afectada por la forma del manejo y conservación de los productos agrícolas durante la cosecha y almacenamiento.

Las alteraciones más comunes en la post-cosecha se pueden clasificar en forma general en dos categorías:

1. Factores abióticos; incluyen las alteraciones físicas y operacionales como: humedad, temperatura, transporte y almacenamiento.

2. Factores Bióticos o Biológicos; agrupan los agentes que ocasionan daños como: insectos, hongos, aves y roedores.

Sin embargo, como la anterior es una clasificación muy amplia, se verá más adelante otra en forma detallada, la cual es de uso frecuente y al mismo tiempo cumple los fines de esta investigación.

### **2.6.1. Principales causas de deterioro de las materias primas agrícolas**

El concepto de deterioro generalmente significa los "Cambios indeseables" en los productos agrícolas. Es necesario clasificar el tipo y magnitud de las alteraciones para entender mejor el deterioro.

A fin de facilitar su estudio y comprensión, las alteraciones se clasifican de la siguiente manera:

#### **2.6.1.1. Alteraciones Biológicas**

Los microorganismos que alteran los alimentos se clasifican en bacterias, hongos y levaduras. El deterioro de granos y semillas es ocasionado principalmente por hongos en el periodo post-cosecha.

#### **2.6.1.2. Alteraciones Físicas**

Recuérdese que las semillas machacadas o partidas no se conservan bien, especialmente si están expuestas a una atmósfera húmeda y son propensas al enmohecimiento debido a cambios por fermentaciones. Mientras el grano está completo e intacto continúa siendo esencialmente una entidad viviente. Cuando se muele, tritura, etc. se le mata y al igual que ocurre en todos los organismos muertos, comienzan los procesos de deterioro y descomposición.

### **2.6.1.3. Alteraciones Bioquímicas**

Las principales reacciones bioquímicas que intervienen en el deterioro de los productos agrícolas son la respiración y el proceso de maduración.

La respiración es el proceso mediante el cual las plantas convierten los elementos primarios que absorben del suelo en energía, para realizar sus funciones vitales.

Por otro lado aunque el proceso de maduración es un proceso importante para generar productos de excelente calidad, esta puede generar cambios indeseables cuando el punto óptimo es sobrepasado.

### **2.6.1.4. Alteraciones Químicas**

Las alteraciones químicas de los productos agrícolas se producen básicamente por las sustancias químicas que produce la misma planta; estas sustancias químicas son las hormonas vegetales, también la caramelización de los azúcares y liberación de enzimas que deterioran los vegetales.

## **2.6.2. Los hongos y su efecto sobre los alimentos**

Los hongos han sido considerados tradicionalmente como "Semejantes a las Plantas". Muchas especies crecen por extensión continua y formando estructuras ramificadas semejantes a yemas. Son inmóviles y sus paredes celulares son muy semejantes en espesor, composición química y estructura ultramicroscópica a las plantas. Crecen como células únicas (Levaduras) o como colonias filamentosas multicelulares (mohos). Debido a su abundante distribución en el aire, sus esporas son frecuentemente molestos contaminantes.

Los hongos de almacén se caracterizan por no presentar una invasión importante antes de la cosecha, las esporas siempre están presentes donde se maneja y almacena el

producto. Se desarrollan en productos con un contenido de humedad mínima de 13 a 13.5% o en humedad relativa de equilibrio entre 68 y 90%. Los principales hongos corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, entre algunos otros.

### **2.6.3. Micotoxinas**

Los tóxicos producidos por los mohos han sido conocidos desde hace muchos años, pero solo en las últimas décadas han adquirido verdadera importancia al irse comprendiendo su acción patógena en los organismos y sus muchas veces graves efectos en la economía. (Codex para los contaminantes, 1995) (Codigo para la prevencion de reduccion de contaminantes por aflatoxina CAC/RCP 59-2005).

En la actualidad la amenaza de las micotoxinas para la salud de los animales es constante, sobre todo en países que, como Guatemala, las condiciones ambientales son ideales para el crecimiento de los mohos en los alimentos.

Las micotoxinas son metabolitos producidos por hongos, los cuales crecen en productos agrícolas (cereales y leguminosas) sometidos a condiciones adversas durante el cultivo, manejo y almacenamiento. La mayoría de las toxinas se encuentran presentes en los cereales, y un aumento de ellas o de alguna en especial puede ser nocivo para todos los organismos.

Pueden dañar la salud humana, causan pérdidas económicas para el productor y mortalidad en los animales.

Posiblemente las toxinas más conocidas son las aflatoxina, producidas por los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales se pueden producir desde el cultivo de los cereales por efecto del almacenamiento inadecuado (humedad del grano arriba de 14%) y la alta incidencia de grano quebrado.

Estos son factores que favorecen la formación de aflatoxinas. Para dicha formación es necesaria la presencia de minerales (zinc, magnesio, hierro, molibdeno), carbohidratos (glucosa y sucrosa) y fuentes de nitrógeno.

Otro grupo de toxinas que causan problema, especialmente en el maíz, son aquellas producidas por los hongos del grupo *Fusarium*; las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, crecen como saprófitos sobre vegetales muertos o como parásitos en plantas vivas.

#### **2.6.3.1. Micotoxinas y su impacto económico**

Se estima que alrededor del 25 % de las cosechas a nivel mundial son afectadas anualmente por los hongos, causando además de la pérdida total de una gran cantidad de el producto, reducción de la capacidad nutritiva de los alimentos que no fueron afectados en su totalidad. (www.salud.gob.mx, 2005)

Otro impacto económico importante es la susceptibilidad marcada que le producen los hongos a las cosechas para ser afectadas por otro tipo de infecciones.

#### **2.6.4. Importancia de los hongos y las micotoxinas en producción animal**

En un principio, las observaciones al respecto se concentraron en el producto almacenado, pues las dos especies productoras de toxinas, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, se consideraban hongos de almacenamiento. Los principales factores que afectan el desarrollo de toxinas en el almacenamiento son: humedad, temperatura, concentración de oxígeno y substrato. Sin embargo la presencia de hongos de almacenamiento en el campo se ha demostrado que los mismos factores ambientales que afectan a los hongos en condiciones de almacenamiento, afectan en diversos grados los procesos de infección/contaminación en el campo. Los alimentos que son microbiológicamente estables tienen normalmente un bajo contenido de humedad (10-

12%), y por ende, no están sujetos a la degradación. Tan pronto como la humedad empieza a aumentar en los alimentos, se inicia el crecimiento de hongos seguido por el de levaduras y bacterias. Las causas principales de descomposición de los alimentos son:

- La humedad y la resequedad
- La alta temperatura
- El crecimiento y la actividad de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). La humedad y la resequedad.

#### **2.6.5. Efecto del tipo, tiempo y condiciones de almacenaje sobre la incidencia de hongos**

El daño mecánico hecho al grano de maíz lo hace mucho más vulnerable a la invasión de hongos de almacenamiento incluyendo *Aspergillus flavus*. Bajo cualquier condición ambiental se contaminan con mayor facilidad los granos dañados (quebrados), que los granos enteros. Las grietas y rupturas en los granos de maíz son causadas principalmente por la cosechadora y el equipo de manejo, así como también cuando el grano es horadado por insectos y éstos causan el rompimiento del pericarpio.

#### **2.6.6. Tipos de micotoxinas que afectan a los animales**

Hasta la fecha se han reconocido más de 300 micotoxinas, las cuales ejercen efectos muy diversos sobre los animales, los efectos se pueden resumir en los siguientes: (www.tecnovit.net, 2016).

- Reducción en la absorción y/o el aprovechamiento de nutrientes
- Trastornos reproductivos
- Disminución del consumo de alimento
- Reducción de la inmuno competencia

Pero dentro de las más reconocidas podemos mencionar las siguientes:

Existen otras micotoxinas más que causan una infinidad de enfermedades, pero por cuestiones de la presente investigación solamente se van a describir brevemente las siguientes tres:

- Aflatoxinas
- Fumonisinias
- Ocratoxinas

#### **2.6.6.1. Aflatoxina**

Las aflatoxinas son diversos metabolitos, señalados como Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1, producidos por diversos géneros y especies de mohos, entre las cuales se señala de manera especial *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Las aflatoxinas se producen a temperaturas que están entre 25 y 35 grados centígrados y su máxima producción en relación a la Aflatoxina B, se realiza entre los 28 y 30 grados centígrados.

Las aflatoxinas presentes en los piensos son ingeridas por los animales y se excretan en la leche aparecen como residuo en carnes y huevos.

Numerosa es la bibliografía que reporta al maní como el mejor sustrato para el desarrollo de aflatoxinas, que están consideradas como la materia más contaminante después de las radioactivas. Los órganos más afectados son el hígado, los riñones y el cerebro, no obstante, los daños más específicos dependen del tipo de mico toxinas presentes en el alimento y generalmente se potencian los efectos por estar presentes más de un tipo

Las propiedades de estos metabolitos son compuestos tóxicos que presentan bajo peso molecular y algo muy importante a tener en cuenta es que no pierden su toxicidad

ni por tratamiento térmico ni por la acción de las enzimas del subsistema digestivo, siendo consideradas por esto de mayor acción tóxica. (Torres Salvador & Diaz García).

#### **2.6.6.2. Propiedades de las aflatoxinas**

Las aflatoxinas son potentes toxinas carcinogénicas metabolizadas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Se considera que las toxinas son especialmente peligrosas para los animales jóvenes. En muchos países se han definido niveles permisibles de aflatoxinas, pero no existe una armonización internacional de los límites aceptables. Ciertos países estipulan una tolerancia de cero y en otros los límites permisibles fluctúan entre 2 y 50 ppb. Las toxinas tienen distintas estructuras químicas (B1, B2, G1, G2) y se detectan mediante una variedad de técnicas inmunológicas, químicas y físicas. Ciertos compuestos metabolizados por hongos en ciertas cosechas se hacen fluorescentes al ser expuestos a la luz ultravioleta. La toxina se forma cuando estos ubicuos hongos invaden una serie de productos alimenticios, entre los que se incluye la castaña. Lamentablemente, esta nuez constituye un sustrato en el cual los hongos producen altos niveles de aflatoxinas y el ambiente en el que se procesa es propicio para la contaminación. Otros productos con problemas de aflatoxinas son: maní, maíz, semilla de algodón, higos, dátiles, almendras y pistacho. También se sabe que ciertas aflatoxinas metabolizadas pueden presentarse en la leche. (Codigo para la prevencion de reduccion de contaminantes por aflatoxina CAC/RCP 59-2005) (Forno).

Las especies *Aspergillus* que producen aflatoxinas, y en consecuencia la contaminación de los alimentos por aflatoxinas, están muy difundidas en zonas del mundo con climas cálidos y húmedos. *El Aspergillus flavus* y *el Aspergillus parasiticus* no pueden crecer o producir aflatoxinas cuando la actividad acuosa es menor de 0,7, la humedad relativa es inferior al 70 por ciento y las temperaturas se mantienen por debajo de los 10 °C. En condiciones difíciles, como la sequía o la infestación por insectos, la probabilidad de contaminación por aflatoxinas es elevada. Unas condiciones de almacenamiento inadecuadas también pueden favorecer la contaminación por

aflatoxinas después de la recolección. Generalmente, el calor y la humedad favorecen tanto la proliferación de mohos en los alimentos almacenados como elevados niveles de aflatoxinas. (Moscoso, 2001).

Entre los procedimientos utilizados para reducir y prevenir la producción de aflatoxinas cabe señalar los siguientes: 1) seleccionar variedades resistentes, si es posible; 2) reducir al mínimo la presencia de insectos y otras plagas en el huerto durante la fase de crecimiento; 3) reducir al mínimo los daños físicos causados a las nueces durante la recolección y el transporte y 4) asegurarse de que las nueces se limpian, secan y etiquetan adecuadamente cuando se conservan en un almacén dotado de controles de temperatura y humedad. (Medidas de control de micotoxinas, 2010)

#### **2.6.6.2.1. Cosechas afectadas**

Maíz, sorgo, nueces, algodón, entre otros granos.

#### **2.6.6.2.2. Animales Afectados**

Vacas lecheras sobre todo, cerdos, aves y humanos

#### **2.6.6.2.3. Clima**

Calor (mayores a 70 grados Fahrenheit o 23 grados Centígrados), humedad mayor a 14%.

Las Aflatoxinas al ser metabolitos secundarios producidos por algunas de las especies de *Aspergillus* que crecen en productos alimenticios y que por su consumo pueden afectar el metabolismo de casi todos los seres vivos, incluyendo los humanos y los animales. Las aflatoxinas son consideradas como el carcinógeno más potente producido en la naturaleza. Estos tóxicos son considerados muta génicas, teratogénicos y hepatotóxicos para muchas especies vivas incluyendo los humanos, por lo cual debemos

ser protegidos al máximo de su consumo o contacto con estas micotoxinas. La producción de aflatoxinas es considerada casi inevitable por encontrarse estos mohos esparcidos en todo el mundo y encontrar fácilmente las condiciones ideales para su producción, especialmente en países tropicales y subtropicales. Sin embargo, todos los esfuerzos deben ir encaminados a controlar la producción de estos tóxicos y la prevención debe ser la herramienta más importante para los:

- Efectos patológicos de la aflatoxina;
- Hepatotoxicidad (atrofia del hígado)
- Hiperplasia del conducto biliar
- Hemorragias en intestino y riñón
- Carcinoma (tumores de hígado).

### **Propiedades fisicoquímicas de las Aflatoxinas**

Las AF son cristales sólidos de color que va del blanco al amarillo, sin olor, sin sabor e incoloros, son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido), cuando las AF están en cloroformo o benceno son estables por años en refrigeración y oscuridad. Las AF en solución son sensibles a la luz, se descomponen en el aire, oxígeno, soluciones alcalinas o de ácidos suaves y se nombran según el color de la fluorescencia que emana con luz UV de onda larga, en color azul B (= blue) con anillo de ciclopentano o verde G (= green) con anillo de lactona, lo que permite detectarlas en trazas de 0.5 ng o menos, en cromatografía de capa fina. Las AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> tienen difuranos saturados, y AFB<sub>2a</sub> y AFG<sub>2a</sub> tienen una unidad difurano hidratada. Los subíndices 1 ó 2 de las AF tipo B, G, M o P indican la movilidad que tienen en la cromatografía de capa fina según su peso molecular, de 298 (AFP<sub>1</sub>) a 330 (AFG<sub>2</sub> y AFM<sub>2</sub>), que da diferentes coeficientes de retención (RF) que las identifican. Los máximos picos de absorbancia de luz UV son de 265 nm a 362 nm, con

una emisión a 425 nm, en la tabla se muestra las propiedades fisicoquímicas de las AF y sus hidroxilados naturales:

Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	Absorción ultravioleta ( $\epsilon$ )		Emisión de fluorescencia (nm)
				265 nm	360- 362 nm	
<b>B<sub>1</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269	12,400	21,800	425
<b>B<sub>2</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	12,100	24,000	425
<b>G<sub>1</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246	9,600	17,700	450
<b>G<sub>2</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	330	237-240	8,200	17,100	450
<b>M<sub>1</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O	328	299	14,150	21,250 (357 nm)	425
<b>M<sub>2</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293	12,100 (264 nm)	22,900 (357 nm)	-----
<b>P<sub>1</sub></b>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	298	>320	11,200 (267 nm)	15,400 (362 nm)	-----
<b>Q<sub>1</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	-----	11,450 (267 nm)	17,500 (366 nm)	-----
<b>Aflatoxicol</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	230-234	10,800 (261 nm)	14,100 (325 nm)	425

Las AF entran al organismo con la comida, a través de la piel o son inhaladas, resisten altas temperaturas de 237 °C (AFG<sub>2</sub>) a 320 °C (AFP<sub>1</sub>), se descomponen de 237 °C a 306 °C, según el tiempo de calentamiento, la humedad del alimento y el pH. Así, las AF no se rompen con la ultrapasteurización, cocción, freído o hervido, fermentación, ni nixtamalización, pero se pueden destruir si se calientan en autoclave con amonio o hipoclorito de sodio. Actúan en trazas de millonésimas de gramo (microgramos por kilogramo =  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) o menos.

Durante la nixtamalización (pH de 8 a 12), el anillo de lactona de la AF se abre y pierde su fluorescencia y se puede pensar que están ausentes, pero en contacto con soluciones ácidas (pH de 1 a 3) del jugo gástrico, y regresando después a un pH neutro, las AF se reactivan y fluorescen otra vez (Carvajal, 2013).

## 2.7 REGULACIONES

Recientemente, la Unión Europea revisó las micotoxina que se presenta en la mayoría de los productos alimenticios.

Las regulaciones entrará en efecto a partir de enero de 1999 y prohíben la importación de alimentos que puedan estar contaminados con aflatoxinas, si el nivel de éstas excede las 4 ppb (partes por billón). En las regulaciones se estipula un protocolo de muestreo uniforme para todas las mercancías con diferentes envases. (2002) (Codex para los contaminantes, 1995).

Aunque en muchos casos las exportaciones de granos van acompañadas con certificados de análisis acreditados emitidos por entidades conocidas mundialmente las cuales proporcionen resultados que se encuentran dentro de los niveles tolerados de micotoxinas por el país exportador, pero los niveles de micotoxinas que se encuentran en el lugar de origen, pueden ser diferentes al nivel que tengan a su arribo al lugar de destino. Además puede ser que el nivel de origen reportado no corresponda con los niveles tolerados en el país de destino por las diferentes condiciones de producción existentes. (Borges Flores, 1998).

### **2.7.1. Niveles permitidos**

Según el Codex Standard 193-1995 que tiene como título “Norma general del Codex para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y Piensos” determina aflatoxinastotales (<http://www.del.org.bo>, 2002).

Referencia al JECFA: 31 (1987), 46 (1996), 49 (1997), 68 (2007)

- Orientación toxicológica: Estimaciones de la capacidad cancerígena de las aflatoxinas B, G, M (1997, la ingestión debe reducirse a los niveles más razonablemente bajos que sea posible).
- Definición del residuo: Total de aflatoxinas (B1 +B2 + G1 + G2)

- Código de prácticas relacionado: Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por aflatoxinas en el maní (CAC/RCP 55-2004)
- Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por aflatoxinas en las nueces de árbol (CAC/RCP 59-2005)
- Código de prácticas para la prevención y reducción la Aflatoxina B1 presente en las Materias Primas y los Piensos Suplementarios para Animales Productores de Leche (CAC/RCP 45-1997)

Código de Producto	Nombre	Nivel mg/kg	Sufijo	Tipo	Referencia	Notas/observaciones
SO 0697	Cacahuetes	15		NM		El NM se aplica a los cacahuetes destinados a ulterior elaboración El plan de muestro figura en el anexo 1 abajo.
TN 0660	Almendras	15		NM		El NM se aplica a los almendras destinados a ulterior elaboración El plan de muestro figura en el anexo 2 abajo
	Nueces del Brasil	10		NM		El NM se aplica a las nueces del Brasil, sin cáscara, listas para el consumo. El plan de muestro figura en el anexo 2 abajo
	Nueces del Brasil	15		NM		El NM se aplica a las nueces del Brasil sin cáscara, destinadas a ulterior elaboración El plan de muestro figura en el anexo 2 abajo
TN 0666	Avellanas	15		NM		El NM se aplica a los avellanas destinados a ulterior elaboración El plan de muestro figura en el anexo 2 abajo
TN 0675	Pistachos	15		NM		El NM se aplica a los pistachos destinados a ulterior elaboración El plan de muestro figura en el anexo 2 abajo
TN 0660	Almendras	10		NM		El NM se aplica a los almendras listos para el consumo El plan de muestro figura en el anexo 2 abajo
TN 0666	Avellanas	10		NM		El NM se aplica a los avellanas listos para el consumo El plan de muestro figura en el anexo 2 abajo
TN 0675	Pistachos	10		NM		El NM se aplica a los pistachos listos para el consumo El plan de muestro figura en el anexo 2 abajo

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas muy tóxicas, producidas por hongos del género *Aspergillus*. Las cuatro aflatoxinas principales que aparecen en productos vegetales contaminados son la B1, B2 y G2, y forman un grupo de difuranocumarinas estructuralmente relacionado, que suelen presentarse en diversas proporciones, y de las cuales la AFB1 es por lo general la más importante. Estos compuestos representan un peligro considerable para la salud humana y animal. La IARC (1992) clasificó la aflatoxina B1 en el Grupo 1 (cancerígeno humano) y la AFM en el Grupo 2B (probable cancerígeno humano). El hígado es el principal órgano afectado.

### **Cuadro 3 NIVELES MÁXIMOS Y NIVELES E REFERENCIA AFLATOXINAS PRESENTES EN ALIMENTOS**

**Fuente: (Moscoso, 2001)**

## **2.7.2. Procedimiento de análisis y niveles máximos para las aflatoxinas**

Los niveles máximos para las nueces de árbol (almendras, avellanas, pistachos y nueces del Brasil sin cáscara) “destinados a ulterior elaboración” y “listos para el consumo” son de 10 y 15 µg/kg respectivamente. (Codex para los contaminantes, 1995).

### **2.7.2.1. Nueces de árbol destinadas a ulterior elaboración**

- Nivel máximo: 15 µg/kg total de aflatoxinas
- Número de muestras de laboratorio: 1
- Tamaño de la muestra de laboratorio: 20 kg
  - Almendras - sin cáscara
  - Avellanas - sin cáscara
  - Pistachos - con cáscara (equivalente a cerca de 10 kg sin cáscara, calculado sobre la base de la porción comestible de la muestra)
  - Nueces del Brasil - sin cáscara

Preparación de las muestras: la mezcla será triturada y mezclada completamente utilizando un procedimiento, por ejemplo molido en seco con un molino tipo mezcladora y cortadora vertical, que ha demostrado que proporciona la varianza más baja en la preparación de la muestra. Preferiblemente las nueces del Brasil se molerán como pasta.

Método analítico: basado en el funcionamiento

Regla para las decisiones: Si el resultado del análisis de aflatoxinas es inferior o igual a 10 µg/kg (ppb) del total de aflatoxinas, se acepta el lote. De otra forma, se rechaza el lote.

### **2.7.2.2. Nueces de árbol listas para el consumo**

- Nivel máximo: 10 mg/kg total de aflatoxinas
- Número de muestras de laboratorio: 2
- Tamaño de la muestra de laboratorio: 10 kg
  - Almendras - sin cáscara
  - Avellanas - sin cáscara
  - Pistachos - con cáscara (equivalente a cerca de 5 kg sin cáscara por muestra para análisis, calculado sobre la base de la porción comestible de la muestra)
  - Nueces del Brasil - sin cáscara

Regla para las decisiones: Si el resultado del análisis de aflatoxinas es inferior o igual a 10 µg/kg (ppb) del total de aflatoxinas en las dos muestras para análisis, se acepta el lote. De otra forma, se rechaza el lote.

En la República Federal de Alemania existe un reglamento sobre contenidos máximos de aflatoxinas que se permiten en alimentos. La castaña amazónica es uno de los alimentos que se analizan para verificar su afección con aflatoxinas. Si se detectan más de 4 µg/kg (ppb) de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, o si el contenido de aflatoxina B1 sobrepasa los 2 µg/kg (ppb), la mercancía no podrá ingresar a los circuitos de comercio. Dentro de una misma muestra se pueden presentar castañas que contienen aflatoxinas con una dispersión extremadamente heterogénea, por lo que los resultados de los análisis pueden ser también diferentes. El problema de los productores radica en que los hongos productores de aflotoxinas penetran en la cáscara y atacan a la semilla sin

que ello se pueda reconocer exteriormente. A ello se suma la inexistencia de laboratorios que puedan realizar análisis antes de realizar los despachos. (Borges Flores, 1998).

La normativa española, fija un valor límite de 10 µg/kg (ppb) para la suma de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y un valor de 5 µg/kg (ppb) para la aflatoxina B<sub>1</sub> sola. En cuanto a los valores límites de AFB<sub>1</sub> en la leche, éste país no ha establecido un valor, aunque sí se han regulado los contenidos destinados a la alimentación del ganado lechero (máximo 10µg/kg) (Codex para los contaminantes, 1995) (Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1).

Las aflatoxinas son consideradas “contaminantes inevitables” de algunos alimentos; por lo tanto, el consumo ocasional de pequeñas cantidades de éstas micotoxinas ofrece poco riesgo durante la vida y no es práctico intentar quitar la aflatoxina del producto alimenticio contaminado, con el fin de volverlo comestible. (Codex para los contaminantes, 1995) (Codigo para la prevencion de reduccion de contaminantes por aflatoxina CAC/RCP 59-2005) , (Norma oficial mexicana nom-188-ssA1-2002, productos y servicios. control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal especificaciones sanitarias, 2002)

## **2.8. RIESGOS PARA LA SALUD CAUSADOS POR LAS AFLATOXINAS EN LA DIETA**

Por más de 30 años se ha deliberado sobre los riesgos para la salud causados por la presencia de aflatoxinas en la dieta humana y se ha llegado a la conclusión de que existen riesgos causados por la exposición a esta toxina. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial para la Salud ha determinado que existe suficiente evidencia para clasificar la aflatoxina B<sub>1</sub> y aflatoxina G<sub>1</sub> como probables carcinogénicos para humanos. No obstante, debido a que estos compuestos se producen naturalmente, no existe forma de evitarlos: (www.tecnovit.net, 2016) (Salvador Torres & Díaz García)

No existe un “nivel sin efecto” que sirva como base para regulaciones gubernamentales al respecto, de modo que todos los países encararan el problema de regular el contenido de aflatoxinas en los alimentos para la venta. Cada país trata este asunto de diferente manera. (Gemio & Martins, 2004).

La Comisión del Codex Alimentarius de la FAO/OMS cuenta con un comité experto en aditivos de los alimentos, que también tiene a su cargo la contaminación por aflatoxinas. Este comité evaluó el tema de la influencia de las aflatoxinas en una reunión realizada en junio de 1997. En ésta, se llegó a la conclusión de que las aflatoxinas deben tratarse como contaminantes carcinogénicos y que su consumo debe ser lo más bajo posible.

Recientemente, el Gobierno de Bolivia expresó su preocupación a la Organización Mundial de Comercio, con respecto a las regulaciones de la UE y sus efectos sobre el comercio.

Las conclusiones sobre los riesgos de cáncer que se presentan en el informe del Codex indican que la disminución del contenido permisible de aflatoxinas en alimentos de 20 a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , no tendría un efecto mensurable en cuanto a la incidencia de riesgo de cáncer del hígado en Europa. Esta conclusión se basó en el bajo consumo de aflatoxinas de la dieta promedio europea. Sin embargo, el riesgo de cáncer por influencia de las aflatoxinas, combinado con la hepatitis B en África y Asia podría ser significativo en poblaciones con alto consumo de estas toxinas, en vista del consumo limitado de castaña en la dieta de los países desarrollados y la índole única de esta nuez, se deberían crear regulaciones especiales para aflatoxinas, que se apliquen específicamente para este producto en dichos países. Es poco probable que, aún con concentraciones de 50 ppb, el consumo de castaña aumente el riesgo de cáncer.

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por diversos hongos que crecen en los granos de los cereales, leguminosas y en alimentos que se han formulado en base de los mismos. Las micotoxinas pueden causar daños a la salud animal y del

hombre cuando son ingeridas en forma gradual y constante en pequeñas dosis. Los hongos que producen micotoxinas se encuentran en todo el mundo y los alimentos pueden contaminarse cuando éstos se desarrollan en el campo, durante la cosecha, en el almacenamiento o durante el procesamiento. Las cosechas contaminadas frecuentemente incluyen: maíz, sorgo, cebada, trigo, centeno, arroz y semilla de algodón.

Determinadas condiciones ambientales de temperatura y humedad favorecen el desarrollo de los hongos y por consiguiente la generación de micotoxinas. Esto ocurre principalmente en granos, pastas de oleaginosas y en alimentos terminados, siendo en algunos casos inevitable, en la industria pecuaria latinoamericana, el tener que utilizar granos contaminados, sobre todo en el caso de importaciones, por ser prácticamente imposible su devolución. Los alimentos son deteriorados por hongos cuando sufren cambios inaceptables en su apariencia, textura, olor y gusto o cuando están contaminados con niveles potencialmente peligrosos de una o más micotoxinas.

Los granos y semillas son invadidos por hongos durante su formación en la planta o cuando éstas han madurado en espera de la cosecha. Por lo regular, los granos y semillas, una vez cosechados, son sometidos al secado, evitando con ello la proliferación micótica en cierta medida.

A consecuencia de la presencia de micotoxinas en alimentos para animales en todo el mundo, éstos son habitualmente consumidos especialmente por el ganado productor de leche. Estos niveles típicamente bajos de micotoxinas son asociados con pérdidas subclínicas de la producción de leche, aumento de enfermedades y desarrollo reproductivo reducido. En algunos casos, las concentraciones de micotoxinas en alimentos son suficientemente altas para ser asociadas con diversos problemas incluyendo la muerte. El diagnóstico de una micotoxicosis es difícil a consecuencia de síntomas no específicos, dificultades en muestreo de alimentos y su análisis, de interacciones con otros factores estresantes. Sin embargo, las micotoxinas deben ser consideradas como un factor causante cuando existen problemas no identificados.

Los grupos de aflatoxinas, zearalenonas, ocratoxinas y tricotricos han sido los más estudiados; sin embargo, la detección y conocimiento sobre las micotoxinas continúan creciendo rápidamente. Nuevos conocimientos sobre las interacciones entre micotoxinas están alterando el concepto de la actual toxicología de estos metabolitos. El aumento del intercambio de ingredientes alimenticios en los mercados mundiales de exportación/importación ha incrementado el potencial de mezcla de hongos y toxinas que antiguamente se pensaban localizados regionalmente (Blanco Ticona, 2003)

Las micotoxicosis son enfermedades causadas por el consumo de micotoxinas. Estas enfermedades incluyen cáncer, hemorragias, tumores, también puede causar abortos y defectos al nacimiento entre muchas más.

En la actualidad se conocen más de 400 micotoxinas con composición química y efectos toxicológicos muy diversos para cada especie animal, dependiendo de su susceptibilidad y metabolismo, así como en el ser humano dependiendo del metabolito de la micotoxina o que se llegara a consumir, a través de productos agropecuarios contaminados con dichos xenobióticos, e inclusive del tiempo de exposición de Aflatoxinas. De las micotoxinas identificadas hasta ahora, las aflatoxinas son las de mayor importancia en la avicultura. Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *Penicillium puberulum*. Las principales aflatoxinas son cuatro: B1, B2, G1 y G2 y se han clasificado según su fluorescencia en presencia de luz ultravioleta. La aflatoxina B1 generalmente se le encuentra en mayores concentraciones que las otras y es la más potente, además de ser carcinogénica, teratogénica y mutagénica. (Santos Chona)

Las aflatoxinas pueden causar: daño al hígado, afectar el comportamiento reproductivo, reducir la producción de leche, muerte embrionaria, defectos al nacimiento, tumores, así como suprimir la función inmune. Otras consecuencias de las aflatoxinas son reacciones alérgicas, fallas en el desarrollo de los animales, pérdida de apetito, inmunosupresión, que se traduce en una menor resistencia a las infecciones por

microorganismos o parásitos y una menor protección generada por las inmunizaciones aplicadas, reducción en la conversión de los alimentos y mortalidad

Los signos clínicos aparecen dentro de las seis semanas que siguen a la alimentación con ingredientes contaminados, el desarrollo y crecimiento de los animales disminuye, la eficiencia en la conversión alimenticia está reducida, el pelaje de los animales se observa hirsuto, hay inapetencia, se puede reducir la producción de leche de las madres, los lechones lactantes se pueden desarrollar lentamente a causa de las aflatoxinas en la leche, la espalda de los animales está arqueada, tienen apatía, ictericia, ataxia, convulsiones y la muerte se puede producir de 3 a 10 días.(ocasionada por una hepatitis aguda). En las lesiones se destaca la ictericia que aparece en el cadáver del animal, el hígado puede estar de un color blanco, café o amarillo brillante, el hígado está friable y con mucha sangre en los sinusoides, puede existir edema de la vejiga en los casos agudos, está alterada la coagulación y se pueden observar líquidos serosos o sanguinolentos en las cavidades torácica y abdominal, pueden ocurrir hemorragias en diversos órganos, petequias y equimosis son observadas en las superficies serosas y mucosas. Diversas micotoxinas se han asociado al aumento de la incidencia de cáncer en las personas, ellas incluyen a las aflatoxinas. (Blanco Ticona, 2003)

La mayoría de los alimentos y materias primas están libres de aflatoxinas al tiempo de ser cosechados. Las excepciones a lo anterior son el algodón, el maíz y el cacahuate. El maíz es infectado en el campo si las espigas están sujetas al ataque de insectos seguido de una invasión e infección con *Aspergillus flavus* y la subsecuente formación de aflatoxinas

## **2.9. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICOTOXINAS**

- Cromatografía de capa fina (TLC)
- Cromatografía de gases líquida (GLC)
- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)
- Espectroscopia de masa

- Columnas de luminiscencia – fluorometria (VICAM)
- Inmuno ensayos enzimáticos (ELISA).

Por situaciones de la presente investigación se describirán únicamente la metodología de detección de micotoxinas por ELISA y por las columnas de luminiscencia o fluorescencia (VICAM). (Luminiscencia Molecular, s.f.)

En primer lugar, debemos hablar de los métodos clásicos fisicoquímicos de cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía líquida de gases (GLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos métodos son los más usados y cuentan con una serie de limitaciones. Por ejemplo, se necesita muchísimo tiempo para realizar la purificación. A eso se une una instrumentación costosa, procedimientos largos y productos químicos peligrosos. Para completar el equipamiento, es necesario contar con personal entrenado.

Los últimos estudios demuestran que es necesario contar con sistemas de detección de micotoxinas en las instalaciones de producción o engorde del ganado. Los métodos de ensayo utilizan anticuerpos concretos para cada tipo de micotoxina, pudiendo detectar la mayoría de estas en muestras complejas, por lo que requieren una mínima purificación de la muestra. La tecnología de inmuno ensayo más fiable es ELISA, cuyo método puede ser puesto en práctica de cuatro formas diferentes: micro titulación, copa, tarjeta y sonda. Tanto la tecnología ELISA como la de Columna de Inmuno Afinidad pueden medir todas las aflatoxinas B1, B2 y G2. Ambas son sensibles a 1 ppb de aflatoxina pueden aplicarse a muestras de maíz, semilla de algodón y maní. (AOAC. Official Method 990:33, 2010) (OAC. Official Method 999.07, 2010) (Blanco Ticona, 2003)

En caso de la Columna de Inmuno Afinidad, la muestra se fuerza lentamente a través de una columna donde los anticuerpos capturan la aflatoxina. La fluorescencia de la columna se compara con la fluorescencia de un producto químico de referencia incluido en la columna, que lanza destellos a la misma longitud de onda que la aflatoxina. Al medir las diferencias en intensidad entre la muestra y la referencia se

puede determinar la concentración real de la muestra. (AOAC. Official Method 972.26, 2010)

Otra diferencia radica en que ELISA está disponible en varias presentaciones. Es un sistema fácilmente adaptable a varios tipos de dispositivos, con cuatro presentaciones. Por su parte, la Columna de Inmuno Afinidad es un método único que implica el uso sólo de columnas. Es también un formato para análisis individuales y no se adapta bien al análisis en serie de gran número de muestras.

Por límite inferior de detección determinamos la cantidad o concentración más pequeña de analito que puede ser diferenciada de las señales de fondo. La reactividad cruzada es la medida en la que el ensayo responde sólo al analito especificado y no a otras sustancias de la muestra. La reproducibilidad es la habilidad del ensayo para duplicar y repetir determinaciones. La variabilidad intra-ensayos se realiza entre determinaciones replicadas en el mismo ensayo. Por variabilidad inter-ensayo entendemos determinaciones replicadas en diferentes grupos de ensayo. La correlación de referencia se determina por el grado de proximidad de la correlación lineal entre los resultados de las muestras y los ensayos de referencia que comprende el rango completo del test. La sensibilidad es la habilidad de la prueba para detectar muestras positivas, mientras la especificidad es la habilidad para detectar muestras negativas. La exactitud total es la capacidad para detectar todo tipo de muestras. Por estabilidad entendemos el tiempo práctico de almacenamiento del producto de diagnóstico bajo condiciones de almacenamiento específicas.

Son diez pasos a seguir: extracción de la muestra, mezclar el conjugado con la muestra, mezclar el conjugado con los controles positivos que luego se adicionan al anticuerpo, lavado de pozos, adición del substrato, agregar el reactivo y leer los resultados. El color azul es positivo y el rosado negativo. .

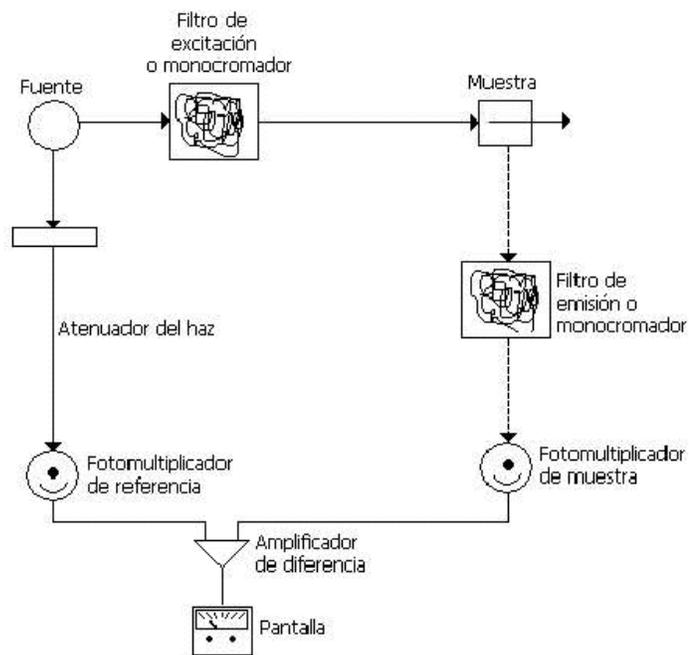
### **2.9.1. Método fluorométrico**

Los componentes de un fluorómetro o espectro fluorómetro son muy similares a los de un espectrómetro Visible- UV. Un diagrama simplificado de los componentes de un fluorómetro son los que aparecen en la Figura 5.

El diagrama de doble haz es sumamente útil para compensar por las fluctuaciones en la intensidad de la fuente de excitación. El haz de referencia pasa a través de un atenuador de radiación y se ajusta éste hasta hacer que la intensidad de este haz sea igual a la intensidad del haz de fluorescencia que pasa por el recipiente de muestra cuando se encuentra en éste un blanco.

El haz de radiación dirigido al recipiente de muestra pasa por un filtro (fluorómetro) o por un monocromador (espectrofluorómetro), donde se selecciona la longitud de onda de la radiación que va a incidir en la muestra. La radiación fluorescente emitida por la muestra es en todas direcciones pero es más convenientemente medida a un ángulo de 90° con respecto al haz incidente ya que la radiación dispersada por la solución y por la celda misma puede interferir con la radiación emitida por la especie fluorescente. (Luminiscencia Molecular, s.f.).

Tanto el haz de referencia como el haz de muestra son dirigidos a un sistema de foto tubos y posteriormente a un amplificador diferencial que se encuentra conectado a un sistema de lectura, tal como una escala digital o de aguja.



**Figura5** Componentes de un Fluorómetro

La selección en la compra de un espectrofluorímetro o un fluorímetro radica esencialmente en el costo y en la finalidad del trabajo que se desea hacer con un instrumento de este tipo. Un espectro fluorímetro es mucho más costoso que un simple fluorímetro de filtros. Con el primero es posible hacer estudios sofisticados sobre una estructura electrónica y de niveles energéticos en moléculas o iones además de análisis cuantitativo.

Un fluorímetro de filtros es de mucho menos precio y funciona en forma completamente satisfactoria en aspectos de trabajo rutinario y con técnicas ya establecidas (Ejemplo: laboratorios de análisis clínicos, laboratorios de control de calidad), por lo que en laboratorios de análisis, es mucho más frecuente encontrar fluorímetros simples que espectrofluorímetro (Método de cuantificación con la técnica de Afla Test® de VICAM, 2010).

### 2.5.9.1.1 Componentes de fluorímetros

- a) **Fuentes de excitación.**- La lámpara de tungsteno ordinaria no da suficiente intensidad para ser utilizada en fluorescencia. Son comunes las lámparas de Xenón y de Mercurio.
- b) **La lámpara de xenón** es más versátil que la lámpara de mercurio. La lámpara de xenón produce una intensa radiación por el paso de corriente en una atmósfera de xenón; el espectro de este tipo de lámpara es continuo de 250 a 600 nm. Con un pico de máxima intensidad a 470 nm.
- c) **Filtros y monocromadores.**- Para fluorímetros de filtros se utilizan frecuentemente filtros de absorción y filtros de interferencia. Los espectrofluorímetros generalmente utilizan rejillas de difracción como monocromadores.
- d) **Detectores.**- Debido a que la señal de fluorescencia es de baja intensidad se requiere de un potente sistema de amplificación. Por esto son preferidos los tubos fotomultiplicadores, aunque también se usan comúnmente los fototubos en aparatos de menor precio.
- e) **Celdas.**- En fluorescencia se utilizan celdas de vidrio común cuando la radiación que se maneja es de rango visible. Para Ultravioleta es necesario utilizar sílice o cuarzo.

### 2.9.2. Aplicaciones de la fluorescencia

Durante un tiempo y no hace muchos años, la espectroscopia de fluorescencia molecular estuvo restringida en sus aplicaciones cuantitativas a unos cuantos químicos raros.

Hoy día la fluorescencia es de primordial importancia en la química analítica. Una de sus más espectaculares aplicaciones ha sido en la detección y cuantificación de sustancias que son separadas a través del uso de la cromatografía de líquidos.

Muchos sistemas bioquímicos son de estructura tal que frecuentemente presentan fluorescencia o pueden ser transformados a especies de este tipo si originalmente no lo son.

Por otro lado, especies inorgánicas que son difíciles de detectar y cuantificar por espectroscopia UV-Visible o por Absorción Atómica se utilizan por fluorescencia. (Manual de instrucciones de Aflatest VICAM, diciembre 12,2000)

Adicionalmente a esto los niveles de detección son del orden de partes por billón, cantidades que por otras técnicas son difíciles de detectar. Estas entre otras son las razones de la importancia creciente de la fluorescencia molecular.

Algunas de las especies que pueden ser analizadas por fluorescencia son las siguientes:

Compuestos Orgánicos y Bioquímicos como : adenina, ácido antranílico, cisteína, hidrocarburos aromáticos policíclicos, indol, naftol, proteínas, ácido salicílico, escatol, triptófano, ácido úrico, adrenalina, alquilmorfina, LSD, penicilina, fenobarbital, procaína, reserpina, clorofila, alcaloides, flavonoides, esteroides, ácido ascórbico, ácido fólico, nicotinamida, piridoxal, cortico esteroides, estrógenos, progesterona, andrógenos, ácidos biliares, colesterol, triglicéridos, creatinina, deshidrogenasas, transaminasas, fosfatasas, peroxidadas, ATP, luciferina, luciferasa, vitaminas: A, B1, B2, B6, C y la E (Método de cuantificación con la técnica de Afla Test® de VICAM, 2010).

Sin duda alguna las aplicaciones más importantes en la fluorometría son en análisis de alimentos, de productos farmacéuticos, de productos naturales y en análisis clínicos. (Método de cuantificación con la técnica de Afla Test® de VICAM, 2010).

Como por ejemplo en el área de alimentos existe el método cuantitativo para la Detección de Micotoxinas por Columnas de Luminisencia (VICAM) o también denominadas - Aflatest VICAM®; este es un método rápido para la detección de Aflatoxinas, en muchos productos. Sin el uso de solventes. (Manual de instrucciones de Aflatest VICAM, diciembre 12,2000)

## **2.10 MÉTODOS DE ANÁLISIS**

Conviene aplicar un enfoque basado en criterios, por el que se establece una serie de criterios de actuación al que deberá ajustarse el método de análisis utilizado. Tal enfoque tiene la ventaja de que, al evitar que se establezcan detalles específicos del método utilizado, pueden incorporarse las novedades metodológicas sin tener que volver a examinar o modificar el método especificado. Los criterios de actuación establecidos para los diferentes métodos deberían incluir todos los parámetros que han de aplicar los laboratorios, tales como límite de detección, coeficiente de repetición de la variación, coeficiente de reproductibilidad de la misma y porcentaje de recuperación necesario para diferentes límites reglamentarios. Con este enfoque, los laboratorios tendrían la libertad de utilizar el método de análisis más adecuado para sus instalaciones. Se pueden utilizar los métodos de análisis aceptados por los químicos a nivel internacional (como los de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales). Estos métodos van supervisándose y mejorándose constantemente dependiendo de los avances tecnológicos. (<http://www.del.org.bo>, 2002).

### **2.10.1. Importancia de las mediciones analíticas**

Millones de mediciones analíticas se realizan diariamente en miles de laboratorios alrededor del mundo. Hay innumerables razones para realizar esas mediciones por ejemplo: como una forma de evaluar bienes para propósitos de comercio; como apoyo a la salud; para verificar la calidad del agua para consumo humano; el análisis de la composición elemental de una aleación para confirmar su conveniencia en la

construcción de aeronaves; en análisis forenses de fluidos corporales en investigaciones criminales. Virtualmente, cada aspecto de la sociedad está apoyado de algún modo por mediciones analíticas.

El costo de realizar estas mediciones es elevado y surgen costos adicionales de las decisiones tomadas en base a los resultados. Por ejemplo, las pruebas que muestran que algún alimento no es adecuado para su consumo pueden resultar demandas por compensación; pruebas que confirmen la presencia de drogas prohibidas podrían ocasionar multas, encarcelamiento o más aún, la ejecución en algunos países. Claramente es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrarlo.

### **2.10.2. Validaciones de métodos.**

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del ensayo químico. Sin embargo, la percepción de su importancia, por qué debe hacerse y cuándo, y exactamente que necesita hacerse, parece ser deficiente entre los químicos analíticos. En la literatura técnica existe mucha información relacionada a la validación de métodos, especialmente en lo que concierne a métodos específicos, pero muy frecuentemente es subutilizada. Algunos ensayistas ven la validación de métodos como algo que sólo puede hacerse en colaboración con otros laboratorios y por consiguiente no la realizan. (Delgado, 2013-2014)

### **2.10.3. Validaciones del método químicos**

La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Es fundamental que los laboratorios dispongan de medios y criterios objetivos para demostrar por medio de la validación que los métodos de ensayo reproducen resultados confiables y adecuados a la calidad deseada

El objetivo de la e la validación es probar la aptitud de los métodos, así como la capacidad del personal y el laboratorio. La validación se apoya en los parámetros estadísticos del procedimiento.

El laboratorio debe confirmar que puede aplicar correctamente el método normalizado previo a su uso en ensayos o calibraciones. Cualquier variación en el método normalizado implica la repetición de dicha confirmación.

Para el caso de metodologías de ensayo o de calibración desarrolladas por el laboratorio los métodos deben ser adecuados y totalmente validados antes de su uso.

Los procedimientos y el alcance de la validación no son siempre los mismos y deben ser establecidos individualmente.

Dependiendo del rango de concentración del analito, puede no ser necesaria una determinación de los límites de detección y de cuantificación.

Ejemplo: Determinación de sacarosa en dulces (componentes en mayor contenido, 1 a100%).

Son considerados como de menor concentración entre 0,01% a 1% y elementos a nivel trazas para concentraciones debajo de 0,01%

#### **2.10.4. Fases de la validación**

1. Planeamiento de los experimentos
2. Ejecución de los experimentos
3. Cálculos estadísticos
4. Análisis de los resultados

5. Documentación

6. Aplicación de la información adquirida

#### **2.10.5. Parámetros de validación**

- Selectividad y especificidad
- Linealidad
- Rango de trabajo y Rango lineal de trabajo
- Sensibilidad
- Límite de detección (L.D.)
- Límite de cuantificación (L.Q.)
- Exactitud y tendencia (bias)
- Precisión (repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad)
- Robustez
- Incertidumbre de medición (\*)

**Tabla 1 TIPO DE MÉTODO**

TIPO DE MÉTODO	NIVEL DE VALIDACIÓN	PARÁMETROS
Cualitativo	Pequeño	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selectividad</li> <li>• Límite de detección</li> </ul>
Semi-cuantitativo	Medio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selectividad</li> <li>• Límite de detección</li> <li>• Límite de cuantificación</li> <li>• Precisión</li> <li>• Exactitud</li> </ul>
Cuantitativo	Grande	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selectividad</li> <li>• Límite de detección</li> <li>• Límite de cuantificación</li> <li>• Precisión</li> <li>• Exactitud</li> <li>• Linealidad/Rango de trabajo</li> <li>• Sensibilidad</li> <li>• Robustez</li> </ul>

**Fuente:** Elaboración Propia

### **2.10.6. Linealidad.**

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método.

Los estimadores de regresión para un nivel de significación ( $\alpha$ ) dado (en la mayoría de trabajos químicos  $\alpha = 0,05$  [5 %]) son:

- a. **Coeficiente de correlación ( $r$ )**. Muchos autores plantean que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,999. Hay algunos que consideran la mejor forma de indicar la linealidad del método estudiado será realizar una prueba estadística de t (t de Student), en la cual se calculará la correlación lineal significativa ( $t_r$ ) a partir de la hipótesis nula de no correlación entre las magnitudes estudiadas ("x" y "y").
- b. **Pendiente** (conocida también como *coeficiente de regresión*). Indica la sensibilidad de calibración o del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito. La sensibilidad analítica relaciona la aleatoriedad de la respuesta con la aleatoriedad debida a la variación de la concentración, es inversamente proporcional a la capacidad de detectar pequeñas diferencias en la concentración del analito, y se obtiene dividiendo la pendiente de la curva de calibración por la desviación estándar de las respuestas en cada punto o concentración. Se considera que a mayor pendiente, mayor sensibilidad y que mientras más pequeño sea el coeficiente de variación de la pendiente mayor será la linealidad (coeficientes de variación de la pendiente mayores que el 5,0 % indican falta de linealidad).
- c. **Intercepto**. Es el estimador que se relaciona con la presencia de interferencias o errores sistemáticos. El intervalo de confianza del intercepto debe incluir al cero para cumplir con el requisito de proporcionalidad (como se exige para el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en los métodos espectrofotométricos).

(31)

### 2.10.7. Precisión.

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. Aunque la USP XXII expresa que la precisión es la expresión del grado de la reproducibilidad, incluye

dentro de este acápite la repetibilidad, la reproducibilidad y la robustez del método analítico, mientras que la Norma Británica incluye sólo la repetibilidad y la reproducibilidad.

- a) *Repetibilidad.* Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto.

El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media.

- b) *El coeficiente de variación máximo aceptable* en función de los límites de aceptación y del número de réplicas o el número necesario de repeticiones para un cierto nivel de aceptación

- c) *Reproducibilidad.* Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad. De un estudio de reproducibilidad inter-laboratorios, el coeficiente de los coeficientes de variación del estudio de repetibilidad y reproducibilidad debe tener un valor comprendido entre 1,5 y 2,3, relacionando valores mayores que 2,3 a un método muy personal y valores menores que 1,5 a una pobre repetibilidad de algún analista. la mayoría de los métodos analíticos el coeficiente de variación de la reproducibilidad debe ser menor que un 2,0 %.

d) *Robustez (tolerancia)*. Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante la ejecución del método sobre una misma muestra variando algunas condiciones operacionales como, por ejemplo, diferentes laboratorios, reactivos, analistas, equipos, temperaturas de ensayo, etcétera. Se determina como una función de las variables seleccionadas en la ejecución y los resultados se comparan con los resultados del estudio de reproducibilidad del método para obtener una medida de la tolerancia del método analítico. el resultado más real es el que se obtiene en las pruebas inter-laboratorios, sin embargo, éstos resultan muy costosos y consumen una gran cantidad de tiempo. Para la determinación de este parámetro en los métodos se proponen cambiar la composición de la fase móvil adicionando disoluciones tampones, variar el flujo, cambiar la columna, manteniendo la temperatura y utilizando el modo isocrático. (Delgado, 2013-2014)

#### **2.10.8. Exactitud.**

Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él. Cuando existen interferencias en el método por falta de selectividad (desviación por exceso en los resultados), o cuando se trata de métodos analíticos muy laboriosos, con varias etapas, como extracciones, purificaciones, etcétera (desviación por defecto en los resultados), el método se considera no exacto o sesgado.<sup>1</sup>Para asegurar una buena exactitud, es necesario eliminar los errores que no están sujetos a tratamiento estadístico (calibración o control incorrectos de equipos), los errores inherentes a blancos (errores constantes) y los que dependen de la cantidad del analito presente (errores proporcionales). Ellos opinan que la mejor manera de identificar estos errores será realizando una prueba inter-laboratorio.

a) *Comparar el valor medio* obtenido por el método propuesto para la determinación del analito contra el valor medio obtenido por un método ya validado o el valor teórico (100 %).

El valor de  $t_{exp}$  debe ser menor que el valor tabulado de  $t$  para poder afirmar que ambos valores no difieren significativamente para el nivel de significación seleccionado.

- b) *Analizar cantidades conocidas del analito* (para materias primas) o cantidades conocidas del analito añadidas a sistemas placebo (para formulaciones) para calcular el recobrado por comparación de las cantidades teóricas con los valores determinados. Para ello se grafica la masa encontrada en el eje "x" contra la masa agregada en el "y". La ecuación de la línea de regresión y sus estimadores se determina por el método de los mínimos cuadrados. El coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,997. Para descartar cualquier error de tendencia constante, el intervalo de confianza del intercepto debe incluir al cero y para descartar cualquier error proporcional el intervalo de confianza de la pendiente debe incluir el 1. Si se observa un error proporcional el método es válido siempre que se utilice la curva de calibración previamente calculada. <sup>(31)</sup>

#### **2.10.9. Selectividad (especificidad).**

Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra. Se expresa como el grado de inexactitud del método. La evaluación de este parámetro es especialmente importante en el caso de los métodos analíticos diseñados para la cuantificación del analito en formulaciones y en estudios de estabilidad.

Aunque la especificidad y la selectividad se consideran términos equivalente, algunos autores los diferencian, considerando la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y a la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto. La selectividad se determina comparando

los resultados del análisis de muestras con los resultados del análisis de las muestras en presencia de productos relacionados. Recomienda el análisis de muestras del analito sometidas a condiciones de degradación artificial hasta el 20 % de degradación, lo cual constituye un criterio de especial interés cuando se desconocen los productos de degradación.

Los métodos espectroscópicos (UV, IR, colorimetría, etcétera) frecuentemente adolecen de selectividad. Sin embargo, han demostrado que la utilización de la espectrofotometría UV de derivadas incrementa considerablemente la selectividad del método, permitiendo la determinación cuantitativa simultánea de varios productos que posean un máximo de absorción en la misma zona espectral. (Física-)

#### **2.10.10. Material de referencia**

Un material de referencia, es un material o sustancia que tiene una o varias de sus propiedades suficientemente bien establecidas para calibrar el aparato o instrumento, validar un método analítico o asignar un valor a un material o sistema.

El material de referencia tiene una gran importancia ya que son un componente clave de todo programa de calidad, en el campo de la analítica se recurre a material e referencia para garantizar la exactitud y ajustese a un sistema valido de medidas.

Un material de referencia puede presentarse bajo la forma de un gas, un líquido o un sólido, puro o compuesto.

Para que no exista la ambigüedad cuando se trata de materiales de referencia sean consagrados algunos términos prácticos las cuales son:

- a) *Material de referencia interno (IRM).*- es todo material preparado por un laboratorio para uso exclusivo uso interno

- b) *Material de referencia externo (ERM)*.- es el suministro por un laboratorio ajeno al del propio usuario
- c) *Material de referencia estándar (SRM)*.- es aquel material e referencia certificado por entidades reconocidas internacionalmente

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1. PARTE EXPERIMENTAL:**

Se tiene como **pregunta de investigación** si el método fluorométrico podrá cuantificar aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en castaña y será un método confiable y seguro para determinar concentraciones dentro los límites máximos permitidos.

**Formulando la hipótesis** Debido a que las aflatoxinas y sus derivados se absorben en la región ultravioleta cercano y presentan fluorescencia, será posible llevar a cabo una identificación y cuantificación dentro los rangos de interés toxicológico según normativas vigentes, por método de fluorescencia después de una extracción adecuada de la muestra combinando distintos métodos normalizados de la AOAC y otros métodos científicos no normalizados.

##### **3.1.1. Lugar de trabajo:**

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de servicios de laboratorios en diagnóstico e investigación de la salud (SELADIS) en el laboratorio de bromatología dependientes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Andrés.

#### **3.2. MATERIAL, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **3.2.1. Material de referencia**

La materia prima (muestra de castaña) se obtuvo con la colaboración de la empresa TAHUAMANO la misma nos facilitó 2 Kg e castaña contaminada con aflatoxina; se facilitó de la muestra control por la misma empresa con su concentración conocida ya

que se determinó por el método de HPLC implementado por la empresa para sus exportaciones.

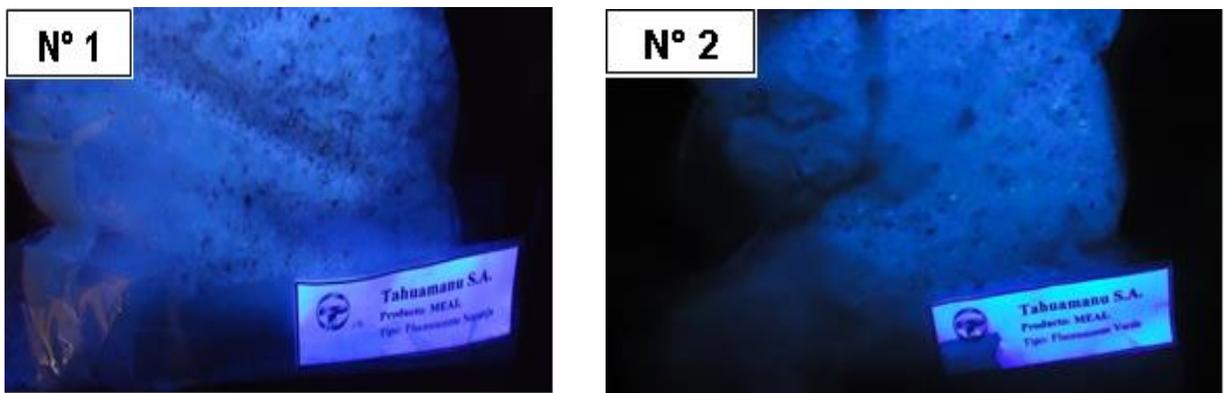
La muestra es almacenada en condiciones que evite el deterioro y/o incremento de contaminación por micotoxinas controlando temperatura y humedad el ambiente (10°C y 40%HR)

El tipo de diseño metodológico utilizado es cuantitativo utilizado una muestra de referencia y los estándares de aflatoxinas.

N°	MUESTRA	CONCENTRACIÓN	OBSERVACIONES
		AFLATOXINA (ppb)	
1	Fluorescentes naranja –chia	65.31	Muestra enviadas a La Paz UMSA
2	Fluorescentes verde –chia	1142.11	

**Cuadro 4** MUESTRAS DE REFERENCIA PROPORCIONADA POR LA EMPRESA TAHUAMANO, CON CONCENTRACIONES DETERMINADAS POR HPLC.

Fuente: Elaboración Propia



**Figura 6** Muestras de castaña proporcionada por la empresa TAHUAMANO visto con lámpara Uv.

### **3.2.2 .Patrones estándar**

Se emplearon aflatoxinas de aspecto cristalina de aflatoxina B1 suministradas en viales de 1 mg de la marca Supelco

- a) Estándar de Aflatoxinas B1
- b) Estándar de Aflatoxinas MIX (B1, B2, G1, G2 )

Ambos en forma líquida en viales de 1ml con concentración de ug/ml según concentración de cada aflatoxina (Sigma Chemical) cuentan con su certificado de análisis del proveedor

#### **3.2.2.1. Soluciones de trabajo.**

A partir de los patrones o estándares certificados se elaboraron soluciones de trabajo a diferentes concentraciones de acuerdo a los puntos que se determinaran para la curva de calibración la cual pueda abarcar el rango de trabajo de aflatoxinas Mix, con diferentes solventes como metanol y benceno: acetonitrilo y cloroformo.

### **3.3. MATERIALES DE LABORATORIO**

#### **3.3.1 Materiales y equipos**

- Probetas de 10, 50,100 y 250 ml
- Embudo de vidrio
- Papel filtro
- Varilla de vidrio
- Vaso de precipitado de 250ml

- Erlenmeyer de 25, 50, 250 ml
- Baño maría
- Cámara cromatografica de vidrio
- Placas de silica gel G60 activadas
- Microjeringas de 10,20ul
- Cámara de luz ultravioleta (longitud de onda de 254 y 360nm)
- Placas negras resistentes a solventes de 96 pocillos (parar fluorometria)
- Fluorometro Synergy HT - Lector multiplacas

### **3.3.2. Reactivos**

- Metanol p.a.
- Solución de cloruro de sodio 4 % p.a.
- Solución de sulfato de cobre al 10 % p.a.
- Celite
- Agua destilada
- hexano
- Cloroformo p.a.
- Acetona p.a.

### **3.4. METODOLOGÍA**

Para establecer la metodología de análisis se tomó como referencia e normativas vigentes para su combinación y su optimización las cuales fueron:

- a) El método de detección de aflatoxinas en cereales según el Manual de Análisis Químicos de alimentos – Instituto Adolfo Lutz – Brasil 1988.
- b) Determinación de Micotoxinas en Alimentos provenientes de la técnica de la AOAC (Official Methods of Analysis 13 th ed. Association of )
- c) También se combinó con el método de cuantificación con la técnica de AflaTest® de VICAM cuyo método es aprobado por AOAC y FGIS

Los tres métodos mencionados se combinaron para su optimización y cuantificación. El método a y b que son métodos cualitativos y semi cuantitativo respectivamente ya que se detectan la presencia de aflatoxina por cromatografía en capa fina (TLC) mediante la comparación de la intensidad de la fluorescencia del extracto problema y los valores de Rf de los patrones de la aflatoxina. Se vuelve cuantitativo cuando después de re disolver con cloroformo el extracto obtenido de aflatoxinas totales se lleva a leer la intensidad de la fluorescencia en el equipo del Fluorometro según la técnica VICAM.

### **3.5. PROTOCOLO DE OPTIMIZACION PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN CASTAÑA**

Tomando como referencia los métodos ya mencionados anteriormente se estableció al metanol y cloroformo como solventes ideales para la extracción la cual se observa con mayor nitidez las manchas de fluorescencia en placas de silica gel las cuales serán evaluados por la cromatografía en capa fina (TLC)

Se evaluó por triplicado los solventes para la extracción al metanol, cloroformo acetónitrilo y acetónitrilo: benceno, la cual se demuestra estadísticamente su eficacia de los solventes para la extracción de aflatoxinas en castaña en la tabla N° 1

### **3.6. PROTOCOLO DE OPTIMIZACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAMIX EN CASTAÑA**

Una vez escogida la metodología de extracción y purificación de las aflatoxinas en castaña se procedió a realizar pruebas en el laboratorio, estableciendo las condiciones del proceso de análisis. La estandarización del método para la determinación de aflatoxinas totales en castaña utilizando solventes para la extracción con solventes y cuantificación con el fluorómetro se realizó con un estándar de aflatoxina mix de pureza > 98 %

Para establecer las condiciones del sistema de medición del fluorómetro se realizó pruebas en el equipo, tomando como referencia de análisis para aflatoxinas totales en castaña según la técnica del AflaTest® de VICAM la cual está aprobado por AOAC y FGIS.

- Programa de software Gen 5.0
- Longitud de onda excitación 360/40 ,emisión 460/40
- Placas negras resistentes a solventes de 96 pocillos
- Volumen de inyección en cada placas : 300 µl

Optimización de solvente para lectura en el fluorómetro lector multiplaca Gen 5.0 Para la lectura se realizó pruebas con varios solventes en la etapa de redisolución para usarla como blanco; con los resultados de TLC.

Se evaluó los solventes utilizados para la redisolución una vez realizada la extracción.

Las cuales fueron:

- a) Se disolvió el residuo en 1000  $\mu\text{L}$  de tolueno: acetonitrilo (98:2) agitar vigorosamente para disolver adecuadamente y con jeringa de 20  $\mu\text{L}$  sembrar en placas de silica gel como fase estacionaria, como fase móvil mezclar cloroformo: acetona (9:1). El revelado se realiza bajo luz ultravioleta de onda larga
- b) Se disolvió el residuo en 2000  $\mu\text{L}$  de cloroformo agitar vigorosamente para disolver adecuadamente y con jeringa de 20  $\mu\text{L}$  sembrar en placas de silica gel como fase estacionaria, como fase móvil mezclar cloroformo: acetona (9:1). El revelado se realiza bajo luz ultravioleta de onda larga
- c) Extraer con éter de petróleo y acetonitrilo y se re disolvió el residuo en 2000  $\mu\text{L}$  de tolueno: acetonitrilo(98:2) agitar vigorosamente para disolver adecuadamente y con jeringa de 20  $\mu\text{L}$  sembrar en placas de silica gel como fase estacionaria, como fase móvil mezclar cloroformo: acetona (9:1). El revelado se realiza bajo luz ultravioleta de onda larga.

<b>TÉCNICA</b>	a	b	c
Solventes utilizados	<b>Tolueno: acetonitrilo (98:2)</b>	<b>cloroformo</b>	<b>Éter de petróleo: acetonitrilo (98:2)</b>

**Cuadro5** COMPARACIÓN DE SOLVENTES ADECUADO PARA LA DISOLUCIÓN DEL ESTÁNDAR DE AFLATOXINA –MIX

**Fuente:** Elaboración Propia

Teniendo a la técnica adecuada y el mejor solvente para la extracción y la redisolución la cual se verificara sembrando placas en silica gel. Para poder observar la fluorescencia que presenta.

El método cualitativo se vuelve semi-cuantitativo sembrando una línea imaginaria situada a 1,5 del borde inferior de la placa de 10 cm de alto x 4 de ancho, aplicar con microjeringa un depósito de 20 µl del extracto problema con solvente (b) limpiar la jeringa con 5 descargas de cloroformo.

Sembrar depósitos de 2 µL y 4 µL de solución de trabajo de aflatoxina además, depositar 2µL de patrón de aflatoxina Mix. Sobre uno de los depósitos de 10 µL del extracto problema (serviría como patrón interno a efecto de identificación).

Colocar la placa en posición vertical dentro la cámara de saturación con 50 ml de cloroformo: acetona (45+5) .desarrollar hasta que el solvente haya recorrido aproximadamente 7,5 cm.

Sacar la placa y dejar enfriar unos minutos en la oscuridad, observar la placa bajo la luz UV A 365 y 254 nm considerar si la placa contiene sustancias fluorescentes. Las aflatoxina aparece como manchas fluorescentes de color azul (B1,B2) o verde (G1,G2).

Comparar la intensidad de la fluorescencia entre la fluorescencia del extracto problema y las de la escala de concentraciones del patrón de aflatoxina.

### **3.7. PROCEDIMIENTO OPTIMIZADO PARA LA CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS EN CASTAÑA**

#### **3.7.1. Fundamento del método optimizado**

El fundamento del procedimiento desarrollado en el trabajo esta basados en la extracción de las aflatoxinas en cloroformo, previamente se realiza la extracción con solvente metanol y hexano, la solución de cloruro de sodio dándole una medio estable para la extracción, luego se usa al sulfato de cobre pentahidratado como un catalizador para que inicie la extracción y el celite para agente inerte que coadyuve en la filtración y retener proteínas o analitos con alto peso molecular que interfieren en la extracción y por

último la purificación con distintos solventes por excelencia el cloroformo Evaporación del extracto y redisolución en cloroformo y cuantificación por fluorometria usando las microplacas negras resistente a solventes .

### **3.7.2 Preparación de reactivos**

- a) Solución de cloruro de sodio al 4 %: pesar 4 g de cloruro de sodio p.a. disolver con agua destilada y transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml, aforar con agua destilada.
- b) Solución de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) al 10% : pesar 25 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  disolver con agua destilada hasta disolución completa, aforar a 250 ml de agua destilada.
- c) Utilizar celite p.a. aprox de 2,5 g para cada extracción

### **3.7.3 Molienda y pesaje de la muestra**

- a) Moler 500 g de la castaña pelada en un molino, obtener un tamaño de partícula de aprox 1 mm
- b) Colocar en un frasco de vidrio o en bolsas de polietileno con cierre hermético de primer uso número de identificación de la muestra, proceder a homogenizar la muestra.

### **3.7.4 Extracción de la muestra.**

- a) Pesar 12,5 gramos de muestra bien molida previamente homogenizada en un vidrio de reloj.

- b) Homogenizar en un licuadora durante 5 min con 50 ml de metanol, añadir 7 ml de la solución de NaCl al 4 %.
- c) Decantar y filtrar el papel whatman N° 1 tomar 37,5 del filtrado y agitar con celite aprox de 2,5 g y 37,5 ml de la solución de sulfato de cobre al 10%.

### **3.7.5 Purificación de la muestra**

- a) Filtrar con papel filtro watman N° 1, tomar 37,5 del filtrado anterior y llevar a un embudo de separación con 25 ml de agua y extraer con 4 ml de cloroformo, repetir una segunda extracción con 3ml y una tercera con 3ml de cloroformo gastando un total de 10 ml del solvente.
- b) Llevar a sequedad y re disolver con metanol colocar una alícuota de 300ul del extracto en los pocillos según corresponda su posición del protocolo de análisis del Fluorometro y llevar a leer inmediatamente. Conjuntamente con la curva de calibración de concentraciones conocidas (1, 2, 5, 10,20 ppb) disuelto en cloroformo

### **3.7.6. Cuantificación por fluorometria**

La calibración del fluorómetro debe hacerse con una solución patrón de concentración conocida usando una solución patrón.

Inicialmente se realizó lecturas con agua la cual no emiten fluorescencia. Para eliminar el ruido que pueda presentar el equipo. Para solución blanco se utilizó el solvente usado en la extracción

#### **3.7.6.1 Preparación de las soluciones patrón para la construcción de la curva de calibración**

Alícuotas de solución madre de aflatoxina Mix de concentración de 1 mg/ml

<b>CONCENTRACIÓN PATRONES DE AFLATOXINAS MIX</b>		
<b>Identificación</b>	<b>Volúmenes de alícuota (µl) de la solución patrón</b>	<b>Concentración patrones de aflatoxinas Mix</b>
Blanco	<b>0</b>	<b>0</b>
Patrón 1	<b>10</b>	<b>1</b>
Patrón 2	<b>20</b>	<b>2</b>
Patrón 3	<b>50</b>	<b>5</b>
Patrón 4	<b>100</b>	<b>10</b>
Patrón 5	<b>200</b>	<b>20</b>
Patrón 6	<b>500</b>	<b>50</b>
Patrón 7	<b>1000</b>	<b>100</b>

**Cuadro 6**CONCENTRACIÓN PATRONES DE AFLATOXINAS MIX

**Fuente:** Elaboración Propia

### **3.7.6.2**Protocolo para lectura

- a) Elaboración de protocolo de lectura en el fluorometro MULTI-MODAL DE MICROPLACAS Synergy HT
- b) Según el programa de software: Gem 5.0 seguir los pasos.
- c) Abrir el programa de lectura del fluorometro seleccionando en el monitor
- d) Seleccionar (crear protocolo nuevo)

Seleccionar lectura:

- ✓ pocillos negros de 96 -----OK
- ✓ fluorescencia-----OK
- ✓ Longitud de onda 360/40 , 460/40-----OK
- ✓ Utilizar blanco -----seleccionar colores y posición----OK
- ✓ Curva de calibración-----seleccionar colores y posición----OK
- ✓ Lectura simple-----seleccionar colores y posición-----OK

Posición de la placa lectora:

	1	2	3	4	5	10
A	BLANCO					
B	1ppb	2ppb	5ppb	10ppb	20ppb	
C	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple
D	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple
E	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple	Lectura/simple

Puntos para Curva de calibración

Lectura de las muestra

### 3.7.7. Cálculos

Realizar cálculo de la recta de la curva de calibración

$$Y = ax + b$$

*Y= area*

*X= concentración*

$$X = \frac{Y - b}{a}$$

Determinar la concentración ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de según la siguiente fórmula:

$$C = \frac{L * D (ml)}{Cm (g)}$$

C: concentración de aflatoxinasen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ppb

L: concentración calculada según recta en ppb

D: dilución utilizada para extracción en (ml)

Cm: cantidad de muestra en (g)

### 3.7.8. Interferencias del método

Algunas situaciones pueden generar interferencia en el método a implementar.

- a) El solvente de extracción ideal para la cualificación y cuantificación, ya que la muestra presenta alto porcentaje de grasa. La cual puede interferir.
- b) Someter un medio tampón de solución salina para la extracción controlar el pH.
- c) La extracción realizarla al abrigo de la luz ya que las aflatoxinas son sensible a la luz.
- d) La presencia del contenido elevado de grasa la cual es propia de la muestra, puede interferir en la extracción.

## 3.8 TRATAMIENTO DE DATOS ESTADISTICOS

### 3.8.1 optimización del extracción de aflatoxinas en castaña

Protocolo de evaluación del solvente para la extracción por triplicado

SOLVENTE	REPLICAS	CONCENTRACION DE AFLA-MIX DE 20 µL
METANOL	1	
	2	
	3	
CLOROFORMO	1	
	2	
	3	
ACETONITRILO	1	
	2	
	3	
ACETONITRILO: BENCENO	1	
	2	
	3	

**Cuadro 7** COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN POR TRIPLICADO

**Fuente:** Elaboración propia

Se observara los resultados de análisis con los diferentes solventes y así hallar el más adecuado para la extracción, esto se definirá calculando la varianza que existe entre solventes para esto se utiliza la aplicación estadística test F

### **3.8.1.1. Test F- Snedecor: Comparación de varianzas**

Calcular valor de F (F calculado)

$$F_{cal} = \frac{S^2 M}{S^2 m}$$

Comparar con valor de F tabulado (Ftab)

$S^2_M$ = Mayor varianza

$S^2_m$ = menor varianza

Comparación del valor de F calculado con el valor F tabulado se adopto un nivel de confianza de 95%

### **3.8.1.2. Hipótesis para Test de F-Snedecor**

- Hipotesis nula: Si  $F_{calc} < F_{tab}$ : las varianzas son estadísticamente iguales
- Hipotesis alterna: Si  $F_{calc} > F_{tab}$ : las varianzas son estadísticamente diferentes

### **3.8.2 Linealidad y Rango Lineal**

La linealidad del metodo se evaluo relacionando la funcion de respuesta del equipo con la concentracion del estandar certificado de Mix de Aflatoxinas (B1,B2,G1 y G2) utilizand el siguiente protocolo de analisis.

**Tabla 2** ESQUEMA PARA LA EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO

CONCNRACION ESTANDAR	RESPUESTA DEL EQUIPO		
	Día 1	Día 2	Día 3
P1			
P2			
P3			
P4			
P5			
P6			
p7			

Fuente: **elaboración Propia**

La ecuación de la recta que relaciona dos variables es:

$$Y = ax + b$$

Donde:

y = respuesta de la medida ( absorbancia, altura o área de pico, etc)

x= concentración

a= Inclinación de la curva de calibración (sensibilidad) *pendiente*

b= intersección con el eje y cuando x=0 *intersepto*

con los resultados obtenidos se realizo el estudio de regresion lineal , evaluando los siguientes parametros:

- Coeficiente de correlacio (**r**)

$$r = \text{varia de } (-1) \text{ a } (+1)$$

Manera mas comun de evaluar la consistencia de una ecuacion de regresion.

(**r<sup>2</sup>**) es el mas utilizao da una idea porcentual decorrelacion de los puntos de la recta. Cuanto mas proximo es de 1 es el **r<sup>2</sup>**se acepta adecuado si es mayor que 0,90. un valor mayor a 0,995 es usualmente requerido, mas esto depende del ensayo.

- Pendiente (m)

$$m = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = \frac{S_{yx}}{S_{xx}}$$

- Intercepto (L)

$$L = \frac{\sum y - m \sum x}{n} = \bar{y} - m \bar{x}$$

- Desviacion estandar de la pendiente

$$S_m = \sqrt{\frac{S^2_{yx}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} = \frac{S_{yx}}{\sqrt{S_{xx}}}$$

- Error tipico

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 2}}$$

- Limite de confianza de la pendiente

$$m : m \pm t.S_m$$

- Limite de confianza del intercepto

$$L : L \pm t.S_L$$

- Prueba t-student para el coeficiente de correlacion

Comparar t calculado con la formula y comparar con el t tabulado

$$T_{\text{calc}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\text{ESD} \sqrt{\frac{1}{S_{xx} \text{ da calib.}} + \frac{1}{S_{xx} \text{ da ad. padr.}}}}$$

El error estandar (ESD) es calculado de RSD de cada curva:

$$\text{ESD} = \sqrt{\frac{GL_1 (RSD)^2 + GL_2 (RSD)^2}{GL_1 + GL_2}}$$

GL = grados de libertad del residuo = (n-2)

ESD = Error estandar

RSD = Desviación estandar del residuo

Si t calculado < t tabulado:

- **$b_1 = b_2$  (no hay efecto matriz)**

OBS: Consultar t tabulado para  $GL_1 + GL_2$

**Hipotesis nula ( $H_0$ ):** no correlacion entre X (concentracion) e Y (area) ( $r=0$ )

**Hipotesis alterna ( $H_1$ ):** "r" NO debe ser significativamente diferente de uno ( $r \neq 0$ )

**Criterio de aceptacion :** el valor de t calculado ( $t_r$ ) debe ser mayor a t tabla. La hipotesis nula se rechaza, existiendo una correlacion lineal significativa por lo tanto  $r \neq 0$

### 3.8.3 Límite de Detección(LD)

Utilizando el estudio de regresión lineal, se evaluó el límite de detección con la siguiente relación

- a) Cálculo para blanco de muestras la cual solo es válido si los blancos presentan desviación estándar diferente a 0

$$LD = X + 3S$$

X: promedio

S: desviación estándar

Cálculo utilizado para blanco de muestras con adición de concentraciones más bajas que el analito

$$LD = 0 + 3S$$

S: desviación estándar

### 3.8.4 Límite de Cuantificación (LQ)

Utilizando el estudio de regresión lineal, se evaluó el límite de cuantificación con la siguiente relación:

$$LQ = x + 10S$$

$$LQ = 3,3 LD$$

X: promedio

S: desviación estándar

### **3.8.5 Selectividad**

La selectividad se realizara por caso matriz sin analito no disponible donde se validada por la comparación de las inclinaciones de las curvas de adición de patrón.

Done se preparó dos grupos de muestras que contengan la misma adición de analíto para cada nivel de concentración. Un grupo contiene la matriz de la muestras (conteniendo un nivel básico de analito) y otro grupo no incluye la matriz de muestra.

Con un Número de muestras de 3 réplicas por nivel de concentración en cada grupo. Este estudio puede ser hecho juntamente con la linealidad.

**Tabla 3.** PLANIFICACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE SELECTIVIDAD DEL METODO

Concentración (ul/kg)	AREA- fluorescencia	
	Solvente + Patrón	Matriz + Patrón
1		
1		
1		
2		
2		
2		
5		
5		
5		
10		
10		
10		
20		
20		
20		
50		
50		
50		
100		
100		
100		

Fuente: Elaboración Propia

a) El caculo que se realizara es Test t para igualdad de inclinaciones

Calcular t por la formula abajo y comparar con t tabulado

$$T_{\text{calc}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\text{ESD} \sqrt{\frac{1}{S_{xx} \text{ da calib.}} + \frac{1}{S_{xx} \text{ da ad. padr.}}}}$$

b) El error estandar (ESD) es calculado a partir de RSD de cada curva:

$$\text{ESD} = \sqrt{\frac{GL_1 (RSD)^2 + GL_2 (RSD)^2}{GL_1 + GL_2}}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

GL = grados de libertad del residuo = (n-2)

ESD = Error estándar

RSD = Desviación estándar del residuo

Si  $t$  calculado <  $t$  tabulado:

**Done si :  $b_1 = b_2$  ( no hay efecto matriz)**

### 3.8.6 Exactitud

La exactitud o concordancia entre resultados de un valor de ensayo y un valor de referencia que es convencionalmente verdadero. La tendencia (bias) o error sistemático de un sistema de medición.

La exactitud puede ser calculada como porcentaje de recuperación del analito adicionado o en este caso uso del material de referencia proporcionado por la empresa TAHUAMANO que realizó un análisis de la misma muestra por el método de HPLC.

Para validar la exactitud a través del material de referencia es preciso determinar la media, desviación estándar en una serie de ensayos triplicados y comparar con valores caracterizados por materiales de referencia.

Se realizó un total de 34 análisis a la muestra teniendo como muestra referencia MRC = 65,31  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) determinado por HPLC con el método de la empresa TAHUAMANO.

**a) Error relativo**

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \times 100$$

Dónde:

$X_{lab}$  = valor obtenido experimentalmente – media aritmética de los valores Obtenidos.

$X_v$  = valor aceptado como verdadero (valor certificado del MRC)

**b) Test de hipótesis**

El laboratorio puede verificar la existencia de errores sistemáticos asociados a la metodología, por medio de test de hipótesis, comparando el valor promedio obtenido con el valor de referencia (test t).

Hipótesis Nula       $H_0$

$$H_0: X = \mu$$

Hipótesis Alternativa

$$H_1: X \neq \mu$$

Comparar el valor de  $t_{cal}$ , con valor de  $t_{tab}$ . Si  $t_{cal} < t_{tab}$ , entonces  $H_0$  es aceptada, lo que significa que la exactitud es aceptable

**c) Ensayo de recuperación**

Para el material de referencia la recuperación, para el calculo de exactitud multiplicar el valor medio  $P$  medio por cien dividido entre el valor certificado  $P_c$ .

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{V \text{ medio} \times 100}{V_c}$$

Vmedio= valor medio obtenido

Vc = valor del certificado

### **3.8.7 Precisión**

#### **3.8.7.1 Repetitividad**

Para determinar el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de una misma muestra.

Donde las condiciones de medición a seguir fueron:

- Mismo procedimiento de medición
- Mismo observador
- Mismo instrumento usado en las mismas condiciones
- Mismo laboratorio
- Repeticiones en espacio de periodos corto de tiempo

Para determinar la repetitividad y precisión intermedia se realizó mediciones dentro del intervalo lineal a distintas concentraciones, realizadas en muestras naturales contaminada con aflatoxinas (B1,B2,G1 y G2) con estándares certificados y muestra de concentración conocida por HPLC proporcionada por la empresa de TAHUAMANO, mediante el esquema.

**Tabla 4** ESQUEMA PARA EL ESTUDIO DE LA REPETITIVIDAD

REPLICAS	Nivel µg/kg	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	P1			
2				
3				
1	P2			
2				
3				
1	P3			
2				
3				
1	P4			
2				
3				
1	65,13.-			
2				
3				

**Fuente:** Elaboración Propia

### 3.8.7.2 Cálculos para la Repetitividad y Precisión Intermedia

Para los cálculos mediante estos resultados se realizó un análisis de varianza y se evaluó la desviación estándar y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa.

Determinar el:

- calculo del promedio a cada nivel

$$\hat{m}_j = y_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}}$$

- Criterio establecido (CV )

$$CV = \frac{S}{X} * 100$$

- Calculo para repetitividad

$$S_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)}$$

- calculo para el límite de repetitividad (r)

$$r = 2,8 * Sr$$

Sr: desviación estándar de la repetitividad asociada a los resultados

### 3.8.8 Reproducibilidad (Precisión Intermedia)

Para hallar el grado de concordancia entre los resultados de las mediciones, efectuadas sobre condiciones variadas e medición.

La validación de la dispersión sobre condiciones variadas, donde los resultados son obtenidos con el mismo método, variando días, operadores se denomina precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia se realizó mediciones y muestra contaminada con aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) de concentración conocida por HPLC proporcionada por la empresa de TAHUAMANO mediante el siguiente esquema.

**Tabla 5 ESQUEMA PARA EL ESTUDIO DE A REPRODUCTIVIDAD**

ANALISTA	REPLICAS	DIA 1	DIA 2	DIA 3
<b>A</b>	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
<b>B</b>	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
<b>C</b>	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			

Fuente: Elaboración Propia, 2020

### 3.8.9 Cálculos para la y Precisión Intermedia

Para los cálculos mediante estos resultados se realizó un análisis de varianza y se evaluó la desviación estándar y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa.

Determinar el:

- calculo del promedio a cada nivel

$$\hat{m}_j = \bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}}$$

- Criterio establecido (CV )

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

- calculo para precisión intermedia

$$S_{wj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)}$$

- calculo para el límite de reproducibilidad (R)

$$R = 2,8 * S_R$$

$$S_R = \sqrt{S_{tab}^2 + S_r^2}$$

Siendo:

**SR** = varianza de reproducibilidad

**Slab** = promedio de las varianzas de los resultados de cada laboratorio

**Sr**=varianza de los promedios de los laboratorios.

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tomando como referencia los tres métodos de detección de aflatoxinas en cereales según el Manual de Análisis Químicos de alimentos- Brasil 1988, el Método de la A.O.A.C 13 th y el Método VICAM las cuales se combinaron para volver un método de adecuado de extracción e identificación a bajo costo para posteriormente cuantificar por fluorometria usando el Fluorometro Biotek con lector - Multiplaca y análisis de Software Gen 5.0

En la selección del solvente de extracción más adecuado se realizó pruebas con varios solventes (acetonitrilo, cloroformo y metanol), donde se evaluó por cromatografía en capa fina ( TLC ) , teniendo al metanol como ideal para la extracción y al cloroformo como purificador la cual se observa mejor las manchas de fluorescencia en placas de silica gel.

En la optimización de método se estableció un rango de longitud de onda para la lectura tanto de emisión como de excitación de 360/40 y 460/40 nm; utilizando placas negras de 96 pasillos resistentes a solventes.

#### **4.1. CRITERIOS DE LA EXTRACCIÓN**

Se evaluó los solventes utilizados para la redisolución y posterior cuantificación una vez realizada la extracción, los resultados fueron:

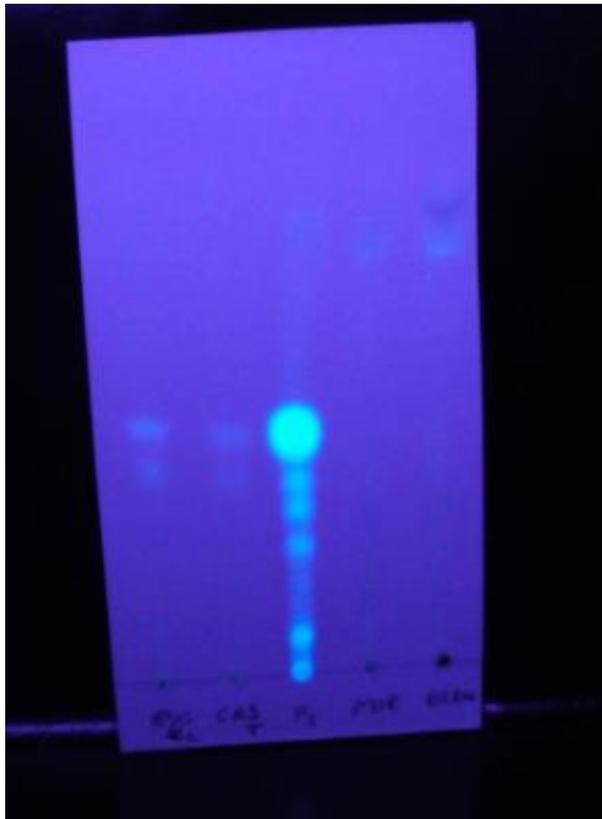
**Tabla 6 COMPORTAMIENTO DE SOLVENTES ADECUADOS PARA LA DISOLUCIÓN DE AFLATOXINAS - Mix**

<b>Técnica</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Solventes utilizados	<b>Tolueno: acetonitrilo (98:2)</b>	<b>cloroformo</b>	<b>Éter de petróleo: Acetonitrilo(98:2)</b>
Sembrados por TLC en placas de silica gel	++	+++	+

+ *Bajo*, ++ *Medio* y +++ *Alto*

**Fuente:** Elaboración Propia

Se tiene como resultados a la **técnica B** la más adecuada para la extracción y la redisolución la cual se aprecia la fluorescencia en las placas. Fig. 7

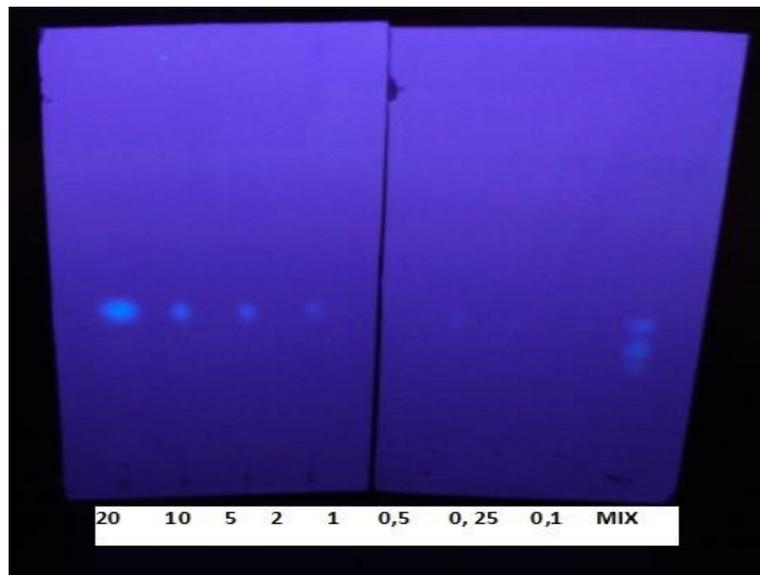


**Figura 7**Revelado de la placa de TLC

**Fuente:** Elaboración Propia

## 4.2. CRITERIOS PARA LA CUANTIFICACIÓN

Este método cualitativo se vuelve semicuantitativo comparando la intensidad visualmente de la fluorescencia presente en TLC entre la fluorescencia del extracto problema y las de la escala de concentraciones del patrón de aflatoxina



**Figura 8** Comparación de la intensidad de fluorescencia a diferentes concentraciones

Fuente: Elaboración Propia

## 4.3. PROTOCOLO DE LECTURA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAMIX EN CASTAÑA

Para establecer las condiciones del sistema de medición del fluorómetro se realizó pruebas en el equipo, tomando como referencia de análisis para aflatoxinas totales en castaña según la técnica del AflaTest® de VICAM la cual está aprobado por AOAC y FGIS.

- Programa de software Gen 5.0
- Longitud de onda excitación 360/40 ,emisión 460/40
- Placas negras resistentes a solventes de 96 pocillos
- Volumen de inyección en cada placas : 300 µl

Para la lectura por el lector multi placa Gen 5.0 se realizó pruebas con varios solventes en la etapa de redisolución para usarla como blanco; con los resultados de TLC. Usando alícuotas de solución madre de aflatoxina Mix de concentración de 1mg/ml a diferentes concentraciones con 7 puntos para la calibración.

#### 4.4. TRATAMIENTO DE DATOS ESTADÍSTICOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

##### 4.4.1 Protocolo de evaluación del solvente para la extracción

El tratamiento de datos estadísticos se realizó por triplicado

**Tabla 7 LECTURAS DE FLUORESCENCIA PARA DETERMINAR EL MEJOR SOLVENTE PARA LA EXTRACCIÓN**

SOLVENTE	REPLICAS	CONCENTRACIÓN DE AFLA-MIX DE 20 µL	MEDIA
METANOL	1	20,56	<b>20,510</b>
	2	20,36	
	3	20,61	
CLOROFORMO	1	20,06	<b>20,073</b>
	2	20,02	
	3	20,14	
ACETONITRILO	1	15,78	15,530
	2	15,83	
	3	14,98	
ACETONITRILO: BENCENO	1	14,67	14,553
	2	14,76	
	3	14,23	

**Fuente:** Elaboración Propia

Observando los resultados con los diferentes solventes los más adecuados son el metanol y el cloroformo para lo cual se definió con la varianza de cada solventes la cual se realizó con el siguiente calculo.

#### 4.4.1.1. Test F- Snedecor: Comparación de varianzas

Calcular valor de F (F callado)

$$F_{cal} = \frac{S^2 M}{S^2 m}$$

Comparar con valor de F tabulado (Ftab)

$S^2_M$ = Mayor varianza

$S^2_m$ = menor varianza

Comparación del valor de F calculado con el valor F tabulado se adopto un nivel de confianza de 95%

#### 4.4.1.2. Hipótesis para Test de F-Snedecor

- Hipotesis nula: Si  $F_{calc} < F_{tab}$ : las varianzas son estadísticamente iguales
- Hipotesis alterna: Si  $F_{calc} > F_{tab}$ : las varianzas son estadísticamente diferentes

**Tabla 8** COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN DE SOLVENTES MÁS ÓPTIMOS PARA LA EXTRACCIÓN

SOLVENTE	REPLICAS	CONCENTRACION DE AFLA-MIX DE 20 µL	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	VARIANZA
METANOL	1	20,56	20,51	0,10801234	0,0117
	2	20,36			
	3	20,61			
CLOROFORMO	1	20,06	20,0733333	0,06110101	0,0037
	2	20,02			
	3	20,14			

**Fuente:** Elaboración Propia

De acuerdo a los resultados que obtuvimos se determinó el valor de F para aceptar la hipótesis alterna.

**Tabla 9** PRUEBA F PARA VARIANZAS DON MUESTRAS

	Variable 1 (METANOL)	Variable 2 (CLOROFORMO)
Media	20,51	20,0733333
Varianza	0,0175	0,00373333
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F cal	4,6875	-
P(F<=f) una cola	0,17582418	-

**Fuente:** Elaboración Propia

Se acepta la Hipotesis alterna: Si  $F_{cal} > F_{tab}$ : las varianzas son estadísticamente diferentes tomando el cuenta el 95% de confiabilidad . donde analizando la varianza para el metanol es de 0,0175 y para el cloroformo es de 0,0037; determinando que la que tiene menor varianza o variación es re disolver con el cloroformo para la lectura de Aflatoxina Mix en el fluorometro lector-multiplacas Gen 5.0

#### 4.4.2 Linealidad y Rango Lineal

Para evaluar este parámetro se utilizó un estándar de aflatoxina Mix de pureza > 98 %, a partir del cual se preparó una solución madre del mismo disuelto en benceno: acetonitrilo (98:2 v/v) de acuerdo a la concentración requerida, la determinación de la concentración exacta de la solución madre de Aflatoxinas Totales se realizó utilizando el fluorómetro de acuerdo a la técnica VICAM.

A partir de la solución madre de Aflatoxina Mix mediante disoluciones sucesivas, se preparó un estándar de trabajo para elaborar las curvas de calibración, este estándar se ajustó a una concentración de 100 µl/L. Partiendo de esa solución se preparó 7 estándares mediante disolución con cloroformo, en las concentraciones que se muestra en la siguiente tabla

**Tabla 10** REPARACION DE ESTANDARES PARA CURVAS DE CALIBRACION DE AFLATOXINA MIX.

P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
1 µl/L	2 µl/L	5 µl/L	10 µl/L	20 µl/L	50 µl/L	100 µl/L

**Fuente:** Elaboración Propia

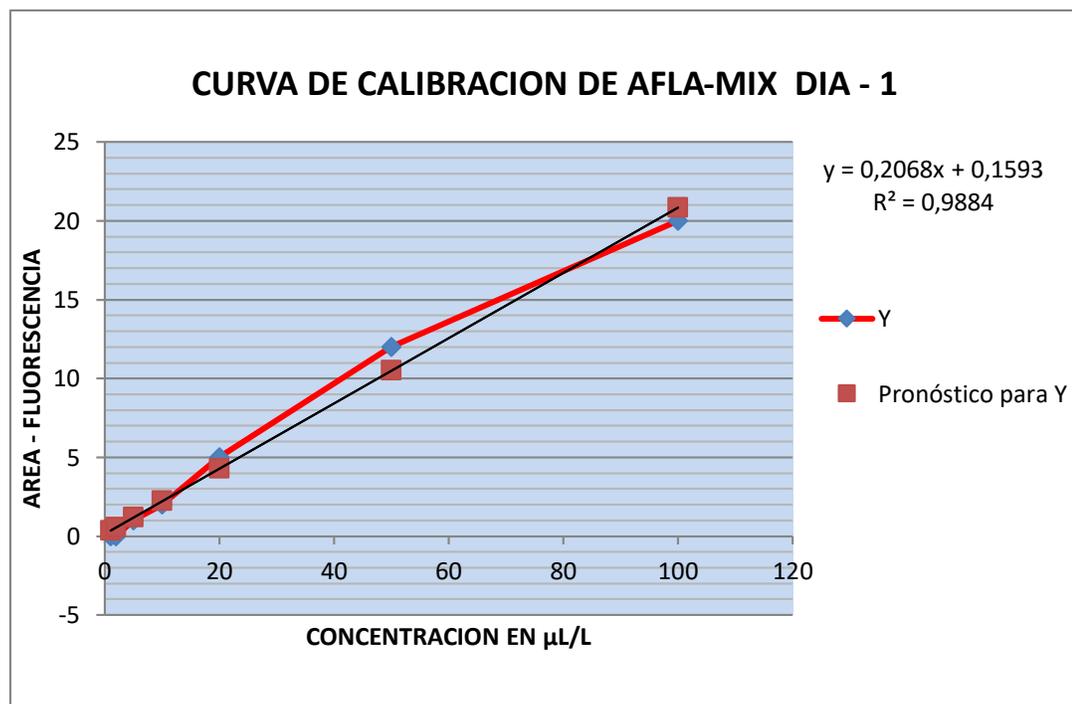
Una vez preparados los estándares se realizaron tres curvas de calibración para lo cual se realizó la lectura por triplicado en tres días diferentes los resultados promedios de la curva de calibración de aflatoxina-Mix para el día 1 se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11** RESULTADOS PROMEDIOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AFLATOXINAS -  
DIA 1

CONCENTRACION ( $\mu\text{l/L}$ )	1	2	5	10	20	50	100
AREA DE FLUORESCENCIA	0	0	1	2	5	12	20

Fuente: Elaboración Propia

En base a los resultados obtenidos en la tabla N° 11 se grafico la concentracion adicionado de aflatoxinas totales ( $\mu\text{l/l}$ ) versus el area de fluorescencia para el dia 1



**Figura 9** Curva de calibracion del dia 1 donde se relaciona la concentracion de afla-mix ( $\mu\text{l/l}$ ) versus la intensidad de la fluorescencia.

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 9 se puede observar la ecuación obtenida para la primera curva de calibración, encontrándose un valor de la pendiente de 0,2068 y de la ordenada al origen 0,1593, el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  obtenido fue de 0,988, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de AFL-TOTAL. Como resultados se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 1. Los resultados se observan en la tabla N° 12 que se detalla a continuación

**Tabla 12** RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 1

PARAMETROS	CURVA	
Coefficiente de correlación	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,988</b>
Pendiente	<b>m=</b>	<b>0,207</b>
Intercepto	<b>Lo=</b>	<b>0,159</b>
Error típico	<b>S<sub>x, y</sub>=</b>	<b>0,895</b>
DS de la pendiente	<b>S<sub>m</sub>=</b>	<b>0,010</b>
DS del intercepto	<b>S<sub>Lo</sub>=</b>	<b>0,432</b>
T tabulado	<b>t=</b>	<b>2,570</b>
T calculado	<b>t<sub>r</sub>=</b>	<b>20,647</b>
Pendiente min	<b>m min=</b>	<b>0,181</b>
Pendiente max	<b>m max=</b>	<b>0,232</b>
Intercepto min	<b>Lo min=</b>	<b>-0,951</b>
Intercepto max.	<b>Lo max=</b>	<b>1,270</b>

**Fuente:** Elaboración Propia

En la tabla N° 12 se presenta los resultados de análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r, el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (área), observando los resultados se pueden establecer en el valor de  $t_r$  calculado es 20,647 y el valor de t de las tablas 95 % de confianza es de 2,570 por lo que se puede establecer que el valor de  $t_r > t$  tabla lo que indica que existe una alta correlación lineal entre X y Y.

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 1, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 0,207 y de la ordenada al origen (Lo) de 0,159 además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (Sm) y desviación estándar de la ordenada al origen (SLo), con valores de 0,010 y 0,432 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95 % de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 0,181 a 0,232 y del intercepto de - 0,951 a 1,270.

De igual manera en el tabla N° 12 se presenta los valores para el error típico  $S_{x,y}$  en la curva de calibración del día 1 con un valor de 0,895, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado.

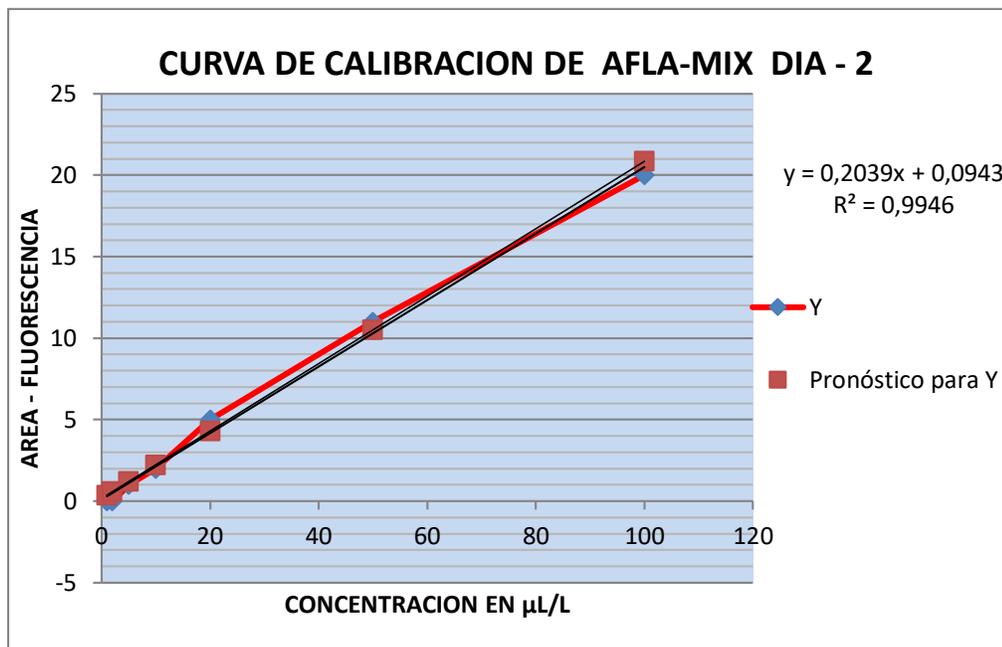
Los resultados de la curva de calibración de AFLA-TOTALES para el día 2 se muestran en la Tabla N° 13

**Tabla 13** RESULTADOS PROMEDIOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AFLATOXINAS -  
DÍA 2

CONCENTRACION ( $\mu\text{l/L}$ )	1	2	5	10	20	50	100
AREA DE FLUORESENCIA	0	0	1	2	5	11	20

**Fuente:** Elaboración Propia

En base a los resultados obtenidos en el tabla N° 13 se grafico la concentracion adicionado de aflatoxinas totales ( $\mu\text{l/l}$ ) versus el area de fluorescencia para el dia 2



**Figura 10** Curva de calibracion del dia 2 donde se relaciona la concentracion de afla-mix (µl/l) versus la intensidad de la fluorescencia.  
**Fuente:** Elaboración Propia

En figura 10 se puede observar la ecuacion para la segunda curva de calibracion obteniendo un valor de la pendiente 0,2039 y de la ordenada al origen de 0,0943 el coefeciente de correlacion lineal  $R^2$  obtenido es de 0,9946, el mismo que nos indica que existe un correlacion lineal entre los resultados de as areas obtenidas en funsion de la concentracion de AFLA-TOTALES. Con los resultados obtenidos se realizo un analisis de regresion lineal para la curva de calibracion correspondiente al dia 2.

**Tabla 14** RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 2

PARAMETROS	CURVA	
Coficiente de correlación	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9946</b>
Pendiente	<b>m=</b>	<b>0,207</b>
Intercepto	<b>Lo=</b>	<b>0,159</b>
Error típico	<b>Sx, y=</b>	<b>0,895</b>
DS de la pendiente	<b>Sm=</b>	<b>0,010</b>
DS del intercepto	<b>SLo=</b>	<b>0,432</b>
T tabulado	<b>t=</b>	<b>2,570</b>
T calculado	<b>tr=</b>	<b>20,647</b>
Pendiente min	<b>m min=</b>	<b>0,181</b>
Pendiente max	<b>m max=</b>	<b>0,232</b>
Intercepto min	<b>Lo min=</b>	<b>-</b>
		<b>0,951</b>
Intercepto max.	<b>Lo max=</b>	<b>1,270</b>

**Fuente:** Elaboración Propia

En esta tabla se presenta los resultados del analisis mediante la prueba t-student para el coefeciente de correlacion r, el mismo que nos permite verificar si existe correlacion lineal significativa entre os valores X (concentracion) y Y (area), observando los resultados se puede establecer que el valor  $t_r$  calculado es 20,647 y el t de las tablas al 95% de confianza es de 2,570, por o cual se puede establecer que el valor de  $t_r > t$  tabla, lo que nos indica que existe una correlacion lineal entre X y Y.

Del analisis de regresion lineal realizado para la curva de calibracion en el dia 2, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) 0,207 y de ordenada en el oregon (Lo) 0,159, ademas se presenta los valores de desviacion estandar de la pendiene (Sm) y desviacion estndar de la ordenada al origen (SLo), con valores de 0,010 y 0,432 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parametro, se establecieron los limites de confianza mediante el paramero

estadístico t-student al 95 % de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de lapendiente aceptable entre 0,181 a 0,232 y del intercepto de -0951 a 1,270.

De igual manera en en la tabla N° 14 se presento los valores para el error típico Sxy en la curva de calibracion del dia2 con los valores de 0,895, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibracion, es decir el grado de dispercion de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedio de la curva de calibracion de AFLA-TOTAL

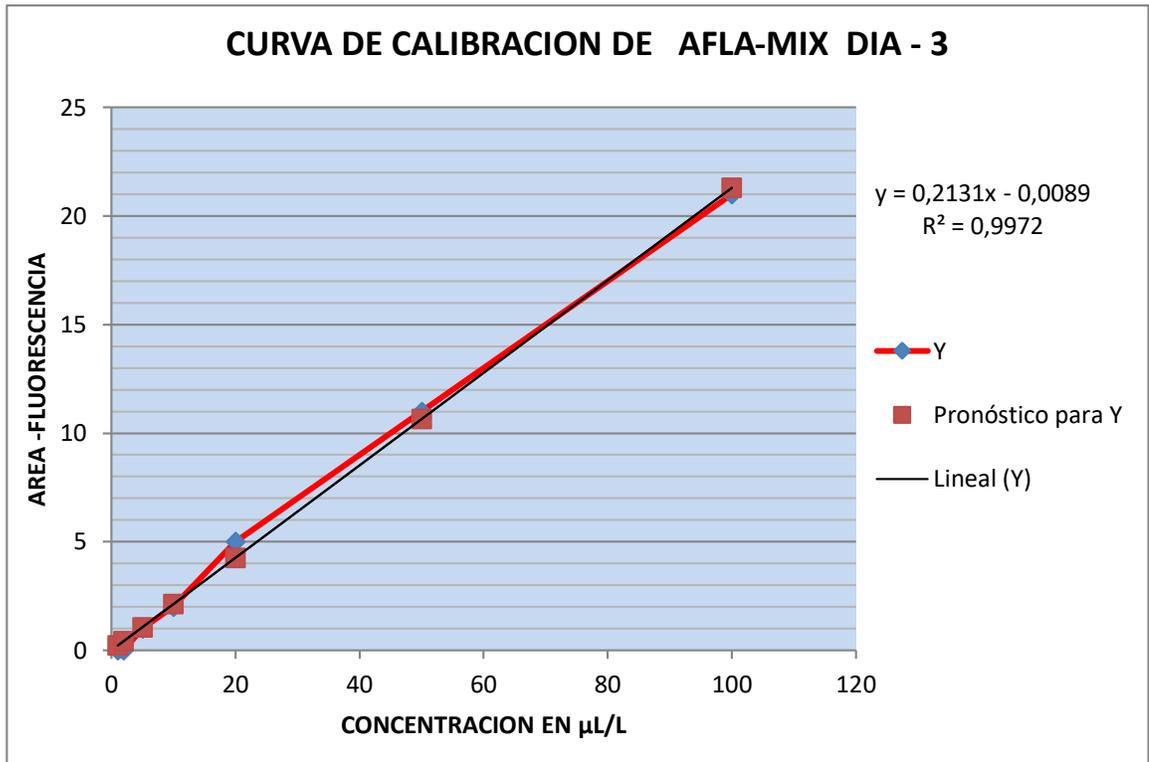
Los resultados de la curva de calibración de AFLA-TOTALES para el día 3 se muestran en la Tabla N° 15

**Tabla 15.** RESULTADOS PROMEDIOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AFLATOXINAS – DIA 3

<b>CONCENTRACION</b> (µl/L)	1	2	5	10	20	50	100
<b>AREA DE FLUORESENCIA</b>	0	0	1	2	5	11	21

**Fuente:** Elaboración Propia

En base a los resultados obtenidos en en la tabla N°15 se grafico la concentracion adicionado de aflatoxinas totales (µl/l) versus el area de fluorescencia para el dia 3.



**Figura 11** Curva de calibración del día 3 donde se relaciona la concentración de afla-mix (µl/l) versus la intensidad de la fluorescencia.

**Fuente:** Elaboración Propia

En esta figura se puede observar la ecuación para la tercera curva de calibración obteniendo un valor de la pendiente 0,2131 y de la ordenada al origen de 0,0089 el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  obtenido es de 0,9972, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de AFLA-MIX. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 3, los resultados se observan en la tabla N° 16

**Tabla 16** RESULTADOS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 3

PARAMETROS	CURVA	
Coefficiente de correlación	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,997</b>
Pendiente	<b>m=</b>	<b>0,207</b>
Intercepto	<b>Lo=</b>	<b>0,159</b>
Error típico	<b>Sx, y=</b>	<b>0,894</b>
DS de la pendiente	<b>Sm=</b>	<b>0,010</b>
DS del intercepto	<b>SLo=</b>	<b>0,432</b>
T tabulado	<b>t=</b>	<b>2,570</b>
T calculado	<b>tr=</b>	<b>20,647</b>
Pendiente min	<b>m min=</b>	<b>0,181</b>
Pendiente max	<b>m max=</b>	<b>0,232</b>
Intercepto min	<b>Lo min=</b>	<b>-0,951</b>
Intercepto max.	<b>Lo max=</b>	<b>1,270</b>

**Fuente:** Elaboración Propia

En la tabla N° 16 se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación  $r$ , el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (área), observando los resultados se puede establecer que el valor  $t_r$  calculado es 20,647 y el  $t$  de las tablas al 95% de confianza es de 2,570, por lo cual se puede establecer que el valor de  $t_r > t$  tabla, lo que nos indica que existe una correlación lineal entre X y Y.

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 3, se puede observar un valor de pendiente de la recta de  $(m)$  0,207 y de ordenada en el origen  $(Lo)$  0,159, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente  $(Sm)$  y desviación estándar de la ordenada al origen  $(SLo)$ , con valores de 0,010 y 0,432 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95 % de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la

pendiente aceptable entre 0,181 a 0,232 y del intercepto de -0951 a 1,270. se presento los valores para el error tipico  $S_{xy}$  en la curva de calibracion del dia 3 con los valores de 0,894, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibracion, es decir el grado de dispersion de los datos respecto al valor esperado.

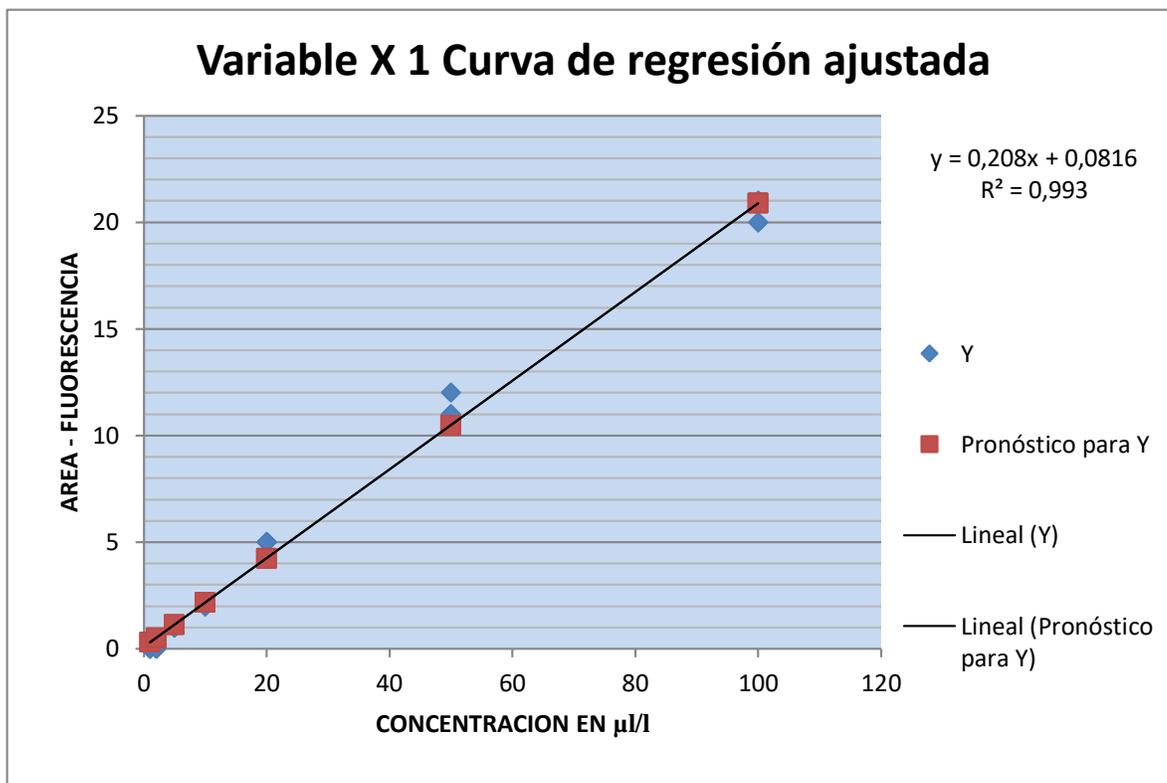
Se comparo los resultados de las lecturas de los tres diferentes dias

**Tabla 17** COMPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS TRES DÍAS

CONCENTRACION( $\mu\text{l/L}$ )	1	2	5	10	20	50	100
<b>AREA FLUORESCIENCIA</b>							
<b>Dia 1</b>	0	0	1	2	5	12	20
<b>Dia 2</b>	0	0	1	2	5	11	21
<b>Dia 3</b>	0	0	1	2	5	11	21

**Fuente:** Elaboración Propia

En base a los resultados obtenidos de la tabla N° 17 se grafico los promedios de las concentraciones adicionado de aflatoxinas totales ( $\mu\text{l/l}$ ) y el area que emite la fluorescencia obtenidas en el equipo durante los tres dias.



**Figura 12** Curva de calibración global del aflatoxina

**Fuente:** Elaboración Propia

En la figura se puede observar la ecuación global para curva de calibración con respecto a las concentraciones adicionadas y obtenidas obteniendo un valor de la pendiente 0,208 y de la ordenada al origen de 0,0816 el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  obtenido es de 0,993, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las concentraciones obtenidas en función de la concentración de AFLA-MIX. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al promedio de concentraciones, los resultados se observan en el cuadro resumen que se calculó con Microsoft Excel.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99651533
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99304281
R <sup>2</sup> ajustado	0,99267664
Error típico	0,61789245
Observaciones	21

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1035,41264	1035,41264	2711,98751	5,7722E-22
Residuos	19	7,25403048	0,38179108		
Total	20	1042,66667			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0,08156422	0,17228627	0,47342262	0,64130571	-0,2790351	0,44216354
Variable X 1	0,20795594	0,00399326	52,0767464	5,7722E-22	0,19959795	0,21631393

Estos resultados se interpretan en la tabla N° 18 las cuales fueron tabulados en excel

**Tabla 18** RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN GLOBAL DEL AFLA-MIX

PARAMETROS			CURVA
Coefficiente de correlación		<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9926</b>
Pendiente		<b>m=</b>	<b>0,2079</b>
Intercepto		<b>Lo=</b>	<b>0,0815</b>
Error típico		<b>Sx, y=</b>	<b>0,6178</b>
DS de la pendiente		<b>Sm=</b>	<b>0,0039</b>
DS del intercepto		<b>SLo=</b>	<b>0,1722</b>
T tabulado		<b>t=</b>	<b>2,0930</b>
T calculado		<b>tr=</b>	<b>52,0767</b>
Pendiente min		<b>m min=</b>	<b>0,1995</b>
Pendiente max		<b>m max=</b>	<b>0,2163</b>
Intercepto min		<b>Lo min=</b>	<b>-0,2790</b>
Intercepto max.		<b>Lo max=</b>	<b>0,4421</b>

**Fuente:** Elaboración Propia

En la tabla N° 18 se presenta los resultados del analisis mediante la prueba t-student para el coefeciente de correlacion r , el mismo que nos permite verificar si existe correlacion lineal significativa entre os valores X (concentracion adicionada) y Y

(concentracion obtenida), observando los resultados se puede establecer que el valor  $t_r$  calculado es **52,0767** y el  $t$  de las tablas al 95% de confianza es de 2,093, por lo cual se puede establecer que el valor de  $t_r > t$  tabla, lo que nos indica que existe una alta correlacion lineal entre X y Y.

Del analisis de regresion lineal para la curva de calibracion global de los promedios de los tres dias en el, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) **0,2079** y de ordenada en el origen (Lo) **0,0815**, ademas se presenta los valores de desviacion estandar de la pendiente (Sm) y desviacion estandar de la ordenada al origen (SLo), con valores de **0,0039** y **0,1722** respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parametro, se establecieron los limites de confianza mediante el parametro estadistico t-student al 95 % de seguridad. De este analisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre **0,1995**, **0,2163** y del intercepto de **-0,2790** y **0,4421**

De igual manera se presento los valores para el error tipico  $S_{xy}$  en la curva de calibracion global de los dia 3 con el valores de **0,6178**, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibracion, es decir el grado de dispersion de los datos respecto al valor esperado.

#### **4.4.3 Verificacion e la Homocedasticidad**

Se realiza según la comparacion de varianzas con el test de Cochran

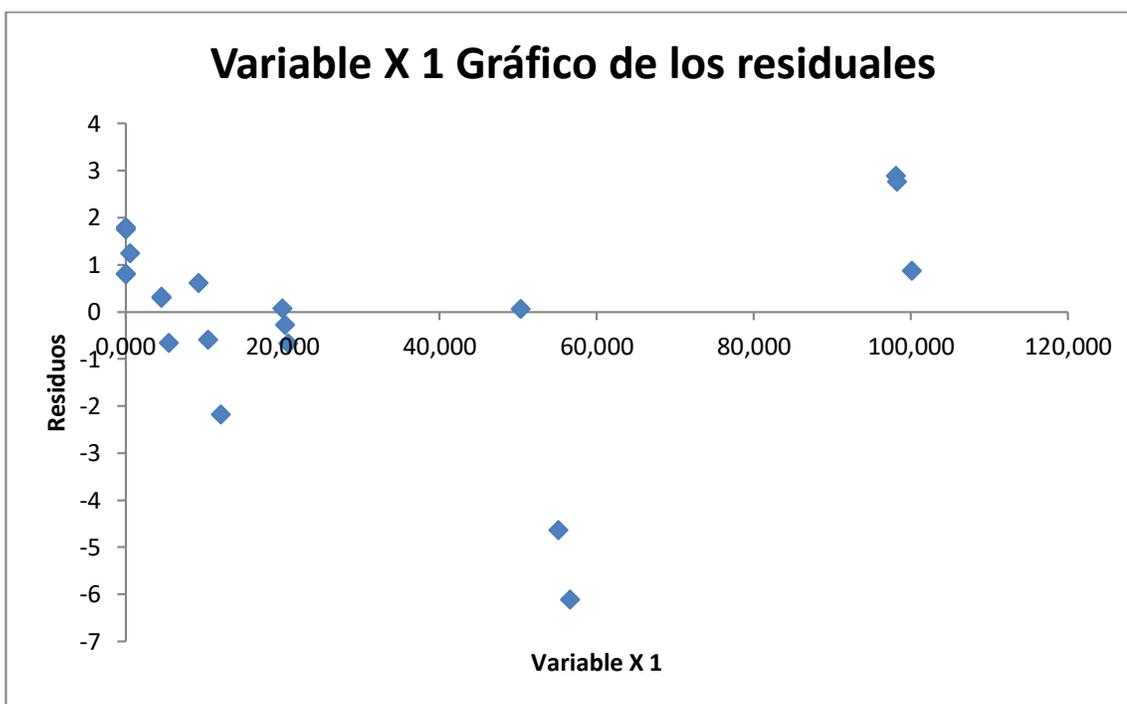
$$C = S^2_{MAX} / \sum S^2$$

Done la homocedasticidad se demuestra si (  $C_{cal} < C_{tab}$  ).

**Tabla 19** PARA DEMOSTRAR LA HOMOCEASTICIDAD (TEST DE COCHRAN)

HOMOCEATICIDAD (TEST E COCHRAN)	
C tab (l=7, n=3)	C cal
0,5612	0,5000

Fuente: Elaboración Propia



**Figura 13** Datos residuales para la homocedasticidad

Fuente: Elaboración Propia

Con la confirmación de que los datos obtenidos se demuestra el comportamiento homocedásticos, donde los datos obtenidos tienen tendencia lineal y existe una correlación significativa entre la concentración generada por la misma.

#### 4.4.4 Límite de detección y límite de cuantificación

Se realizó la estimación del límite de detección y de cuantificación en base a los resultados establecidos en el establecidos en el estudio de linealidad, esto es utilizado el

valor del intercepto (b) la cual tiene un valor de **0,0815** y también calcular su desviación estándar que tiene como valor de 0,602 la cual se denomina como para la determinación del límite de detección se aplica la ecuación descrita en la parte de metodología y para el cálculo de cuantificación se aplica la ecuación ya descrita con anterioridad de esta manera se obtuvo un límite de detección de 1,888 µl/kg y un límite de cuantificación de 6,104 µl/kg, estos resultados se transformaron a valores representativos en muestra utilizando los volúmenes para la lectura, se absorben a continuación en la tabla N° 20

**Tabla 20** RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN UTILIZANDO

Límite de detección	Límite de cuantificación
1,935	6,260

**Fuente:** Elaboración Propia

De esta manera podemos deducir que el método, presenta un límite de detección de 1,935 µg/kg y de cuantificación de 6,260 µg/kg, esto indica que el método presenta una sensibilidad para aflatoxina totales la cual es útil para determinar valores dentro el límite de referencia. La sensibilidad del método es a partir de 6 µg/kg

Pero considerando los criterios de aceptación para los métodos analíticos se debe poder cuantificar en contenido de aflatoxinas de 1 a 15 µg/kg como indica en el CODEX STAN 193-1995 para diferentes matrices.

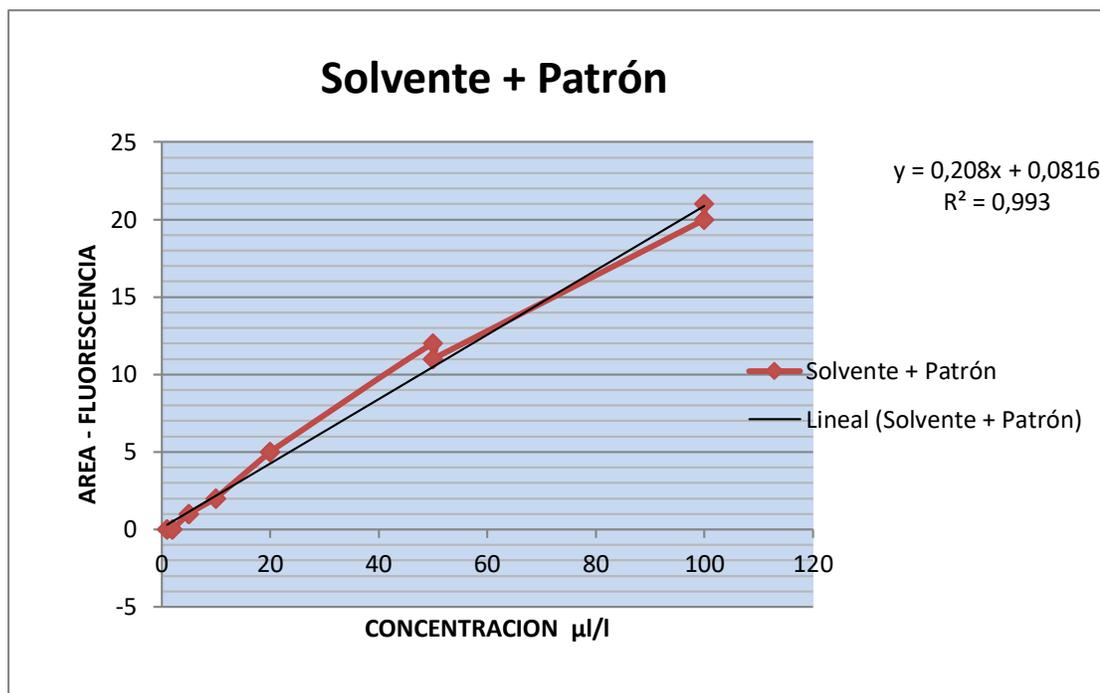
#### 4.4.5 Selectividad

**Tabla 21** DATOS PARA DETERMINAR LA SELECTIVIDAD

CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABSORBANCIA	
	Solvente + Patrón	Matriz (castaña) + Patrón
1	0	1
1	0	1
1	0	1
2	0	1
2	0	1
2	0	2
5	1	2
5	1	2
5	1	2
10	2	4
10	2	4
10	2	5
20	5	9
20	5	10
20	5	10
50	12	22
50	11	23
50	11	23
100	20	45
100	20	47
100	21	47

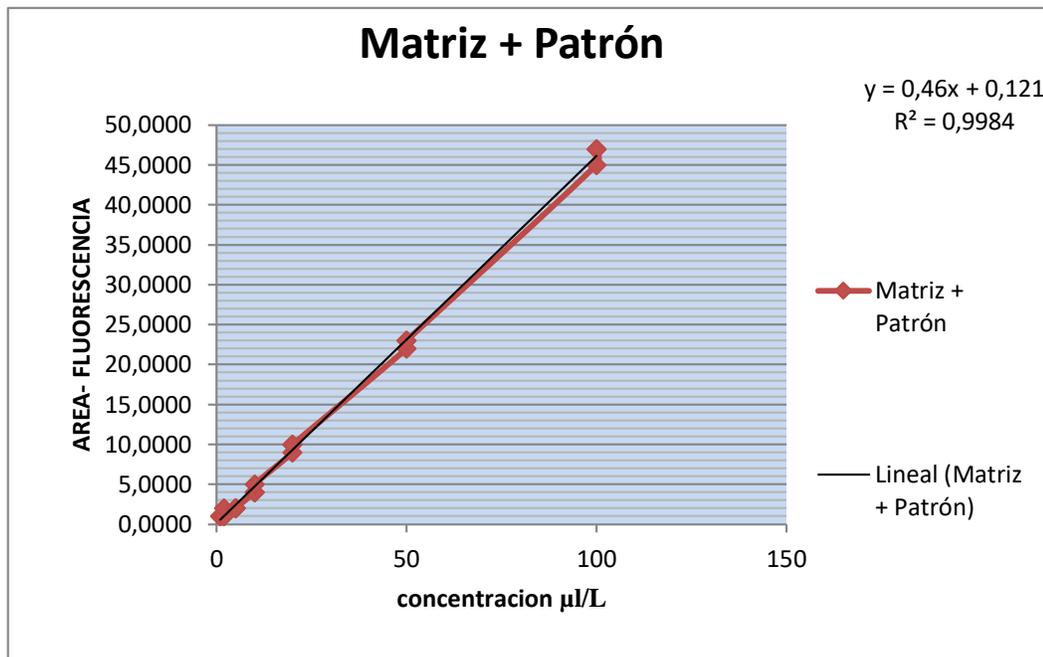
**Fuente:** Elaboración Propia

Con estos resultados determinamos las inclinaciones estadísticamente para determinar si hay efecto matriz se observa en los siguientes gráficos:



**Figura 14** Inclinaciones de la recta solvente más patrón para determinar la selectividad el método  
**Fuente:** Elaboración Propia

En esta figura se puede observar la ecuación para la segunda curva obteniendo un valor de la pendiente 0,208 y de la ordenada al origen de 0,0816 el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  obtenido es de 0,993, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de AFLA-TOTALES



**Figura 15** Inclinaciones de la recta matriz más el patrón para determinar la selectividad el método.

**Fuente:** Elaboración Propia

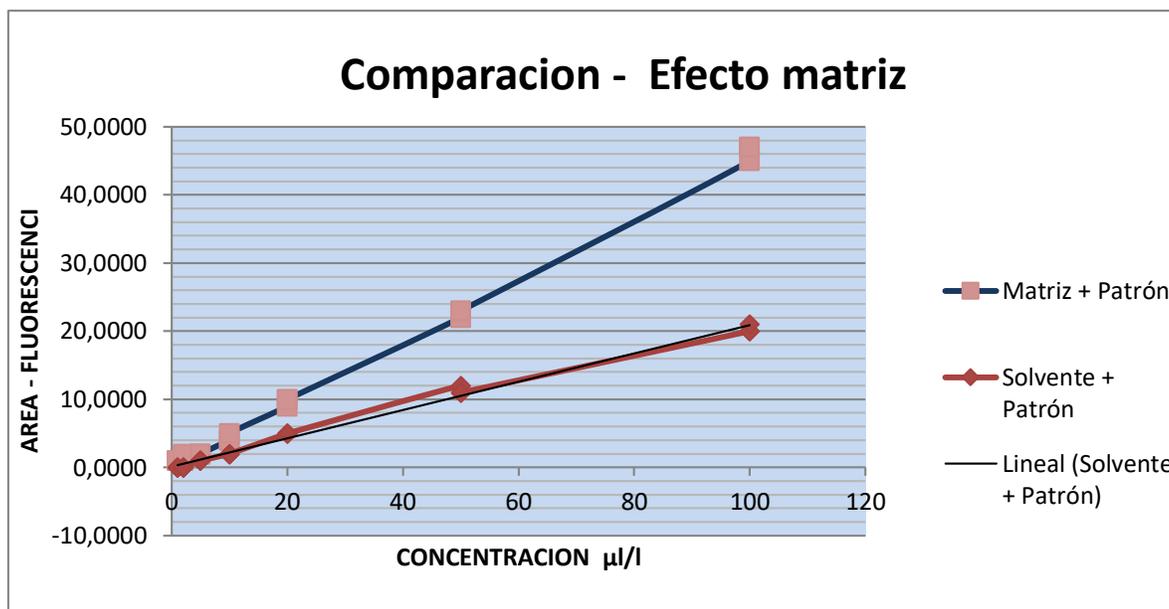
En esta figura 15 se puede observar la ecuación para la segunda curva obteniendo un valor de la pendiente 0,46 y de la ordenada al origen de 0,121 el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  obtenido es de 0,9984, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de AFLA-TOTALES donde se interactúa la matriz y el patrón.

Realizando una comparación de las inclinaciones donde se:

Determinar la ecuación donde se comparara:

- $Y_1 = a_1 + b_1x$  (analito)
- $Y_2 = a_2 + b_2x$  (analito + matriz)

Hipótesis:  $b_1 \neq b_2$  (inclinaciones son diferentes), donde se demuestra el efecto de la matriz



**Figura 16** Inclinaciones de las recta para la comparación del efecto matriz para determinar la selectividad del método

Fuente: Elaboración Propia

Para tener datos estadísticos se realizó el test t done se calcularon se detalla en la tabla siguiente.

**Tabla 22** DATOS ESTADÍSTICOS PARA LA ADICIÓN DE PATRÓN A LA MUESTRA

Error estándar(S+P)	<b>RSD1</b>	<b>0,617</b>
Error estándar(M+P)	<b>RSD2</b>	<b>0,657</b>
error estándar el residuo	<b>ESD</b>	<b>2,733</b>
Son iguales en los dos grupos	<b>Sxx</b>	<b>23942,571</b>
	<b>Tcalc</b>	<b>10,091</b>
(GL1+GL2 ; 95%)	<b>T tab</b>	<b>2,024</b>

Fuente: Elaboración Propia

El Criterio de aceptación  $t$  calculado  $>$   $t$  tabulado para 95% Donde Adición de patrón no es necesaria,  $b_1 \neq b_2$  (estadísticamente), hay influencia de la matriz por lo tanto el método es selectivo para el analito.

## 4.4.6 Precisión

### 4.4.6.1. Repetitividad

Para establecer la precisión del método se realizó el análisis de muestra de castaña contaminadas con AFLA-TOTALES (muestra control) por triplicado en tres días diferentes tomando en cuenta la diferencia de un control negativo, los resultados de estas pruebas en la siguiente tabla.

**Tabla 23** RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS PARA LA DETERMINAR REPETITIVIDAD DEL MÉTODO

N°	µg/kg	DIA 1	DIA 2	DIA 3	x (média)	s	CV%	Varianza
1	<b>5</b>	4,56	4,68	4,68	4,79	0,28	<b>5,94</b>	0,08104
2		4,77	5,46	4,46				
3		4,79	4,87	4,87				
1	<b>10,0</b>	9,14	9,54	9,11	9,72	0,46	<b>4,78</b>	0,21555
2		10,02	9,90	10,14				
3		10,13	9,23	10,24				
1	<b>20,0</b>	19,67	20,67	19,12	19,95	0,61	<b>3,04</b>	0,36750
2		20,24	19,06	20,03				
3		20,67	20,38	19,68				
1	<b>65,31</b>	65,67	64,55	64,65	65,02	0,46	<b>0,71</b>	0,21395
2		65,54	64,98	64,42				
3		65,45	65,21	64,74				

Fuente: Elaboración Propia

Según los resultados se establece el Criterio establecido del método  $CV < 6\%$

#### 4.4.6.2. Reproducibilidad.

**Tabla 24** RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

ANALISTA	NIVEL 65,31 µg/kg		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
A	64,55	63,23	64,53
	64,98	63,25	63,15
	65,21	64,56	64,66
	65,67	64,34	65,54
	65,54	65,76	65,56
	65,32	65,34	65,34
B	65,41	64,76	64,36
	65,53	64,57	64,53
	65,36	64,86	64,76
	65,57	64,87	64,78
	65,65	64,75	64,65
	65,43	64,98	64,98
C	65,32	63,75	63,65
	64,99	64,53	64,42
	64,88	64,24	64,74
	65,04	64,32	64,52
	65,32	64,40	64,98
	65,34	63,45	63,45

Fuente: Elaboración Propia

Los resultados estadísticos se muestran en la siguiente tabla

**Tabla 25** RESULTADOS DE LOS CÁLCULOS DE REPRODUCIBILIDAD

yj	Sr	Sw	Sw%	r	rw	R
<b>64,7714</b>	0,5410	0,5869	0,9061	1,5148	1,6433	2,1101251

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla N° 24 se presenta los resultados del análisis donde el promedio ( $\bar{y}$ ) la cuales de 64,7714, la desviación estándar de la repetitividad  $S_r$  es de 0,5410, la desviación estándar de la precisión intermedia  $S_w$  es de 0,9061; donde los límites de repetitibilidad ( $r$ ) y el límite de la precisión intermedia ( $rw$ ) es 1,5148 y 1,6433 respectivamente y por ultimo obtuvimos el límite de reproducibilidad ( $R$ ) es de 2.1101. Calculando los valores  $F_{calc}$  para el análisis de varianza donde se acepta la hipótesis nula de  $F_{calc} < F_{tab}$ : donde No hay diferencia estadística entre los resultados ya que el valor es menor a 2.8

*Análisis de varianza de un factor*

**RESUMEN**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	18	1175,11	65,2838889	0,08744869
Columna 2	18	1159,96	64,4422222	0,46150065
Columna 3	18	1162,6	64,5888889	0,42098693

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F tab	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7,27763333	2	3,63881667	<b>11,2548116</b>	8,9385E-05	<b>3,17879929</b>
Dentro de los grupos	16,4889167	51	0,32331209			
Total	23,76655	53				

*$F_{calc} < F_{tab}$ : No hay diferencia estadística entre los resultados.*

#### 4.4.7 Exactitud

La exactitud puede ser calculada como porcentaje de recuperacion del analito adicionado o en este caso uso del material de eferencia proporcionado por la empresa TAHUAMANO que realizo un analisis de la misma muestra por el metodo de HPLC.

Para validar la exactitud a través del material de referencia es preciso determinar la media, desviación estándar en una serie de ensayos triplicados y comparar con valores caracterizados por materiales de referencia.

Se realizó un total de 34 análisis a la muestra teniendo como muestra referencia  $MRC = 65,31 \mu\text{g/kg}$  determinado por HPLC con el método de la empresa TAHUAMANO.

Se calculó el índice  $|Z|$  para la exactitud del método cuyo valor es 0,6693; considerando el siguiente criterio (ISO 17043)

$ Z  \leq 2 =$	<b>SATISFACTORIO</b>
$2 <  Z  \leq 3 =$	CUESTIONABLE
$ Z  \geq 3 =$	INSATISFACTORIO

Evaluando que  $0,669 \leq 2$  se concluye que la exactitud del método es SATISFACTORIA

La siguiente tabla desglosa los datos obtenidos para evaluar los errores sistemáticos determinado los el TEST DE HIPOTEISIS.

**Tabla 26** RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD

	V 1	V2	promedio	GRUBBS	RR	S	N-1	N-1*S2
1	65,85	64,55	65,20	1,26	99,832	0,919	1	0,845
2	65,25	64,98	65,12	1,49	99,701	0,191	1	0,036
3	65,30	65,21	65,26	1,11	99,916	0,064	1	0,004
4	65,65	65,67	65,66	0,04	100,536	0,014	1	0,000
5	65,98	65,54	65,76	0,23	100,689	0,311	1	0,097
6	65,45	65,32	65,39	0,77	100,115	0,092	1	0,008
7	65,88	65,41	65,65	0,08	100,513	0,332	1	0,110
8	64,98	65,53	65,26	1,11	99,916	0,389	1	0,151
9	65,56	65,36	65,46	0,57	100,230	0,141	1	0,020
10	67,05	65,57	66,31	1,69	101,531	1,047	1	1,095
11	64,9	66,76	65,83	0,41	100,796	1,315	1	1,730
12	66,04	65,49	65,77	0,24	100,697	0,389	1	0,151
13	65,76	65,98	65,87	0,52	100,857	0,156	1	0,024
14	65,84	66,21	66,03	0,93	101,095	0,262	1	0,068
15	66,04	65,76	65,90	0,60	100,903	0,198	1	0,039
16	67,1	65,78	66,44	2,03	101,730	0,933	1	0,871
17	65,65	65,54	65,60	0,21	100,436	0,078	1	0,006
<b>Promedio</b>			65,67	<b>La prueba t</b>				
<b>Desviación st</b>			0,3765	Texp			3,993	
<b>Grubbtab</b>			2,62	Ttab(16,95,46,1 cola)			2,11	

Fuente: Elaboración Propia

El criterio de:  $T_{exp} < T_{tab}$  = se acepta la hipótesis nula, donde indica que la exactitud es aceptable; ahora con los datos obtenidos se rechaza la hipótesis nula demostrando que existe errores sistemáticos.

#### 4.4.7.1. Intervalo inferior y superior de confianza

<b>μ superior</b>	<b>66,2525159</b>	<b>LOS RESULTADOS SATISFACEN LAS CONDICIONES DEL SESGO</b>
<b>μ inferior</b>	65,0968958	
$\mu inferior < X < \mu superior$		

Fuente: Elaboración Propia

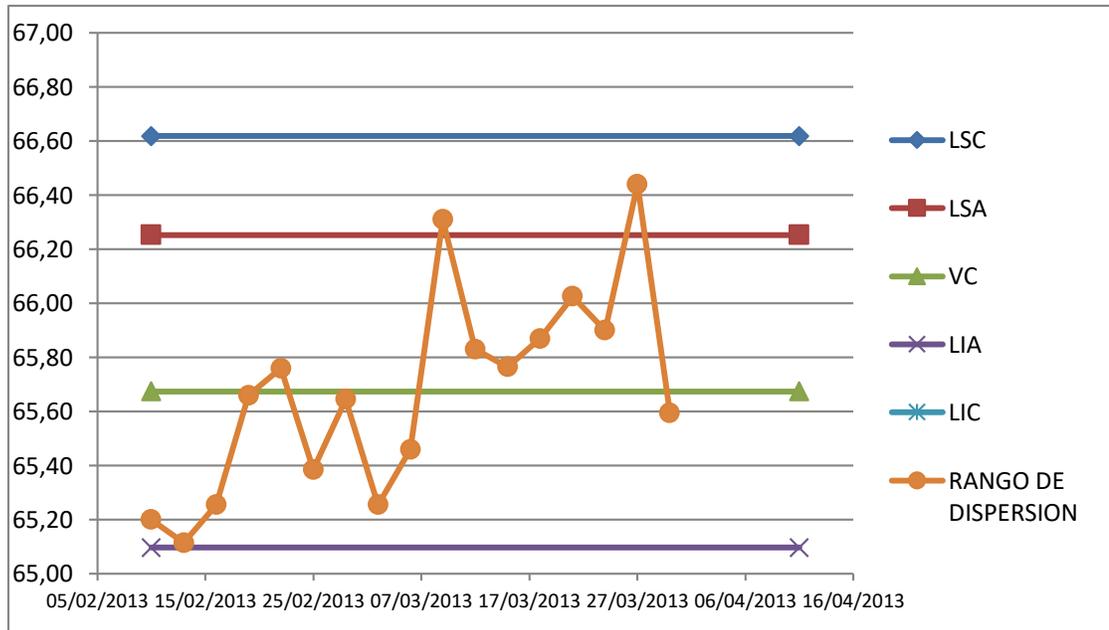


Figura 17 Figura de intervalo superior e inferior de confianza

Fuente: Elaboración Propia

#### 4.4.7.2. Error relativo (ER)

Se determinó un error relativo de **0,558** con este dato se verifica que **él % de exactitud es de 100,558423**

#### 4.4.7.3. Razón de recuperación

RR % (% EXACTITUD)	SRR
100,558	0,57658147

Hipótesis que se determina según el criterio de  $T_{exp} < t_{tab}$  donde la diferencia es

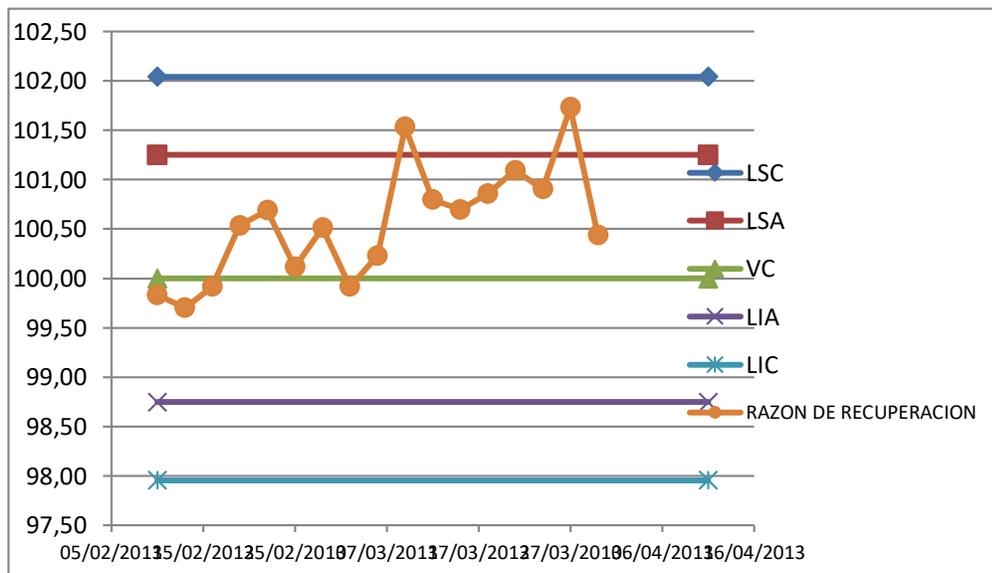
T tabulado (95%.1 cola) tiene un valor de 1,80

t experimental tiene un valor de 7,70963

Estadísticamente significativa Se debe establecer el límite mínimo de exactitud se debe calcular:

SW	<b>0,55614217</b>	error total	<b>1,69757445</b>
S	1,26710132	<b>ECMR</b>	2,59925654
b	1,12969608	<b>100-ECMR</b>	97,4007435

Donde Sw es la desviación o error relativo que tiene un valor de 0,55, con una desviación máxima S de 1,2671, teniendo como sesgo a b que tiene un valor de 1,1296 la cual nos ayuda a demostrar el error total de 1,6975 y teniendo un error cuadrático medio relativo ECMR de 2,59925. La cual se grafica en el cuadro N°14



**Figura 18** Límites superior e inferior expresado en porcentaje de la exactitud del método

**Fuente:** Elaboración Propia

En el Figura se muestra que se tiene como límite superior de control LSC es de 102,04 y como límite inferior de control LIC tiene un valor de 97,96 como límite superior de advertencia LSA es 101,25 , como límite inferior e advertencia LIA un 98,75.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

El método es selectivo al analito ya que se demuestra correlación lineal; pero presenta interferentes en la matriz, debido a que las inclinaciones son estadísticamente diferentes, es necesario el uso del método de adición de un patrón o el uso del control positivo y negativo cada vez que se pretenda cuantificar.

El límite de detección encontrado es de 1,935 ppb y el límite de cuantificación encontrado es de 6,260 ppb lo cual indica que el método implementado es funcional para la cuantificación de aflatoxinas totales ya que según norma del Codex Standard 193-1995 se acepta como nivel máximo para almendras el Brasil a 10 ppb

El método es lineal ya que existe una alta correlación entre la concentración de aflatoxinas totales ( $\mu\text{l/Lkg}$ ) y el área (fluorescencia), lo cual puede demostrarse gráficamente con un coeficiente de correlación igual a 0,993 donde este valor es aceptado por su cercanía al uno, calculando también una condición de varianza uniforme la cual se llama la Homocedasticidad donde los datos obtenidos tienen tendencia lineal y existe una correlación significativa entre la concentración generada por la misma y en casos de calibración la precisión de las medias es independiente del valor de la concentración

El método es preciso porque los valores de coeficientes de variación son menores al criterio de aceptación, la reproducibilidad se demuestra con el Test de Fisher el análisis de varianza se acepta la hipótesis nula, donde  $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ : demostrando así que no hay diferencia estadística entre los resultados obtenidos entre diferentes operadores en diferentes días de análisis y manteniendo el mismo método. Se demuestra repetibilidad según el Codex Standard 193-1995 ya que la desviación estándar relativa de repetitividad ( $RSD_r$ ) menor a 0,66 y además reproducible con una desviación estándar

relativa e reproducibilidad ( $RSD_R$ ) menor a 0,65 % cumpliendo con los parámetros expuestos la cual recomienda También el límite de reproducibilidad (R) es de 2.1101 ya que el valor es menor a 2.8

El método es exacto debido a que presenta una recuperación media de 100,558 % cumpliendo con los requerimientos para este tipo de métodos de recuperación que según el Codex 193-1995 se acepta una recuperación del contenido total de 70 a 110%.

Se concluye que el laboratorio de Bromatología del instituto SELADIS perteneciente a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la UMSA ha implementado el método de cuantificación de aflatoxinas totales en castañas por el método fluorométrico; siendo un método que tiene que trabajar con estándares de referencia de concentración conocida. Este método puede ser ofertado a la población como una opcional rápida y de bajo costo.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

El método de identificación de aflatoxinas que se plantea en el presente trabajo muestra interferentes las cuales se menciona en el capítulo de desarrollo son puntos críticos de control que tienen que ser estrictamente controlados para evitar falsos positivos, como durante la extracción donde debe controlarse que no esté en contacto con la luz y si se llevara a leer entro la línea de trabajo una vez obtenido el extracto de disuelto llevar inmediatamente a lectura siguiendo el protocolo programado del equipo.

Para cuantificar concentraciones menores a 6 ppb se recomienda el uso del protocolo de extracción y purificación que se optimizo en el presente trabajo para que posteriormente puedan ser cuantificadas por HPLC excluyendo la compra de las columnas de inmuno afinidad y evitando el proceso de extracción por el método VICAM que el método normalizado recomienda para la cuantificación. Esta combinación de métodos disminuiría los costos en un aprox de 30% y si solo se realiza la cuantificación

de aflatoxinas por fluorometria la prueba disminuiría en un 70% en relación a los costos referenciales ofertados por otros laboratorios por el método HPLC

Se sugiere que el presente trabajo se puede utilizar como parámetros para las pruebas de estabilidad o para determinar el tiempo de vida útil de alimentos como el maní, almendra o castaña ya que para la determinación la estabilidad de un alimento se realiza vida estante y vida acelerada donde el alimento puede llegar a contener concentraciones altas de AFLATOXINAS TOTALES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

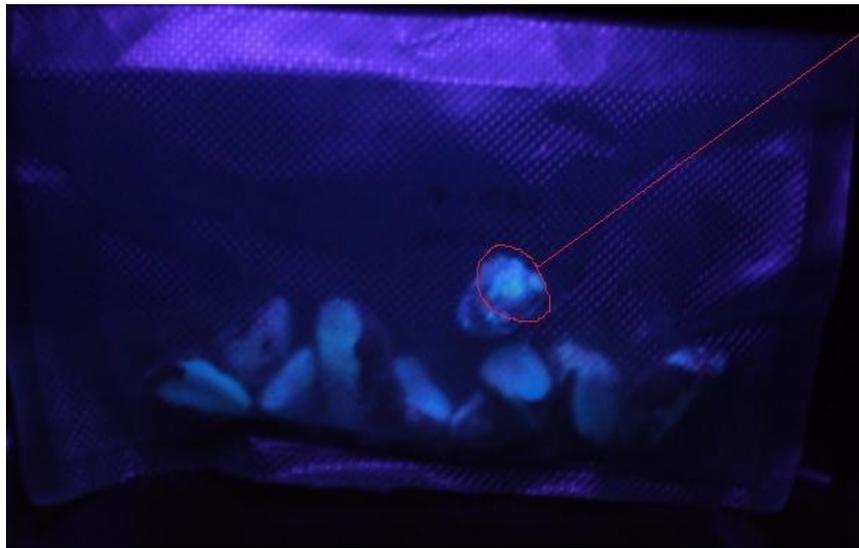
- (2002). Obtenido de <http://www.del.org.bo>:  
<http://www.del.org.bo/.../Bolivia%20primer%20productor%20de%20castan.doc>
- (2010). Recuperado el mayo de 2015, de  
<http://tecnovit.net/index.php?op=7&fam=classnoticias2&id=111>
- (16 de Agosto de 2016). Obtenido de [www.tecnovit.net](http://www.tecnovit.net):  
<http://www.tecnovit.net/index.php?op=7&fam=classnoticias2&id=111>
- Aflatoxina B1 y aflatoxinas totales en manteca de maní y pasta de pistachos y paprika en polvo. (2010).
- Aflatoxina en maíz. (2010).
- Aflatoxina en maiz y manteca de maní. (2010).
- Arellano, L. (2003). Obtenido de  
<http://biblos.usac.edu.gt/asp/getFicha.asp?glx=388028.glx&recnum=8&skin=&maxrecnum=15&searchString=%28@buscable%20S%29%20and%20%28@encabezamiento%20ANIMALES%20and%20NUTRICION%29&orderBy=>
- Blanco Ticona, B. I. (2003). *aplicacion del metodo en cadena de la polimerasa para la identificacion de Aspergillus flavus como contaminante de alimentos*. Tesis , Universidad Mayor de San Andres, La Paz.
- Borges Flores, M. A. (1998). *Determinación de aflatoxina B1 y G1 en el manicrudo y tostado de venta callejera*. La Paz - Bolivia: Tesis de Licenciatura Química Farmaceutica.
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *ELSEVIER*, 109-120.
- CODEX STAN 193-1995. (1995).
- Codigo para la prevencion de reduccion de contaminantes por aflatoxina CAC/RCP 59-2005. (s.f.).
- Delgado, M. (2013-2014). *Verificación y validación de métodos*. La Paz - Bolivia: IBMETRO.
- Fisica-, I. d. (s.f.). *Estudio sobre la deteccion de aflatoxinas en castaña mediante fluorescencia bajo luz ultravioleta*. Universidas Mayor de San Andres . La Paz: Ricardo Forno.

- Forno, R. (s.f.). *Estudios sobre la Detección de Aflatoxinas en castaña mediante fluorescencia bajo luz ultravioleta*. Instituto de Investigaciones de Física-UMSA, La Paz - Bolivia.
- Gemio , A., & Martins, M. L. (2004). Obtenido de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article.htm>
- <http://vicames.homesightllc.net/hplc-uplc>. (s.f.). Obtenido de <http://vicames.homesightllc.net/hplc-uplc>
- Lucas Viñuela, Enedina FAO. (s.f.). <http://zeolitanatural.com>. (C. I. FAO, Ed.) Recuperado el 2015, de <http://zeolitanatural.com/docs/animalavicultura.pdf> (diciembre 12,2000). *Manual de instrcciones de Aflatest VICAM*. AOAC y FGIS.
- Método de cuantificación con la técnica de Afla Test® de VICAM. (2010).
- Moscoso, F. (Marzo de 2001). (F. d. Guatemala, Ed.) Obtenido de <http://biblos.usac.edu.gt/asp/getFicha.asp?glx=388028.glx&recnum=8&skin=&maxrecnum=15&searchString=%28@buscable%20S%29%20and%20%28@encabezamiento%20ANIMALES%20and%20NUTRICION%29&orderBy=>
- (s.f.). *Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1*. Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html#regulacion>
- (2002). *Norma oficial mexicana nom-188-ssA1-2002, productos y servicios. control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal especificaciones sanitarias*. [www.del.org.bo/.../Bolivia%20primer%20productor%20de%20castan.doc](http://www.del.org.bo/.../Bolivia%20primer%20productor%20de%20castan.doc).
- Salvador Torres, F., & Díaz García, L. H. (s.f.). <http://comunidad.uach.mx>. Obtenido de <http://comunidad.uach.mx/osalvado/MICOTOXINAS.htm>.
- Santos Chona, O. M. (s.f.). <http://bases.bireme.br>. Obtenido de <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=346202&indexSearch=ID>
- Torres Salvador, F., & Diaz García, L. A. (s.f.). Obtenido de <http://comunidad.uach.mx/osalvado/MICOTOXINAS.htm>.
- Williams, J., & Wilson, D. (Enero de 1999). Obtenido de [http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PNACG757.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNACG757.pdf)
- [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx). (2005). Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html#regulacion>



## ANEXOS

### Anexo 1. MUESTRAS DE CASTAÑA CONTAMINADAS CON AFLATOXINA



Fluorescencia de  
aflatoxinas en la

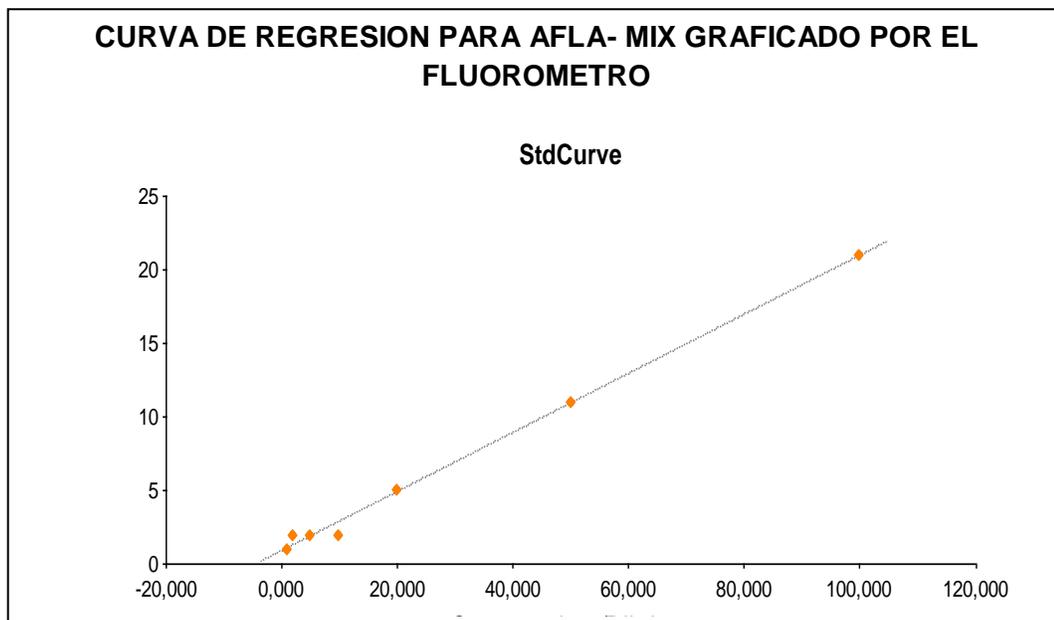
**Anexo 2. SOLUCIONES ESTANDAR:** AFLA-MIX a 100ppb disuelta en cloroformo detectado por luz uv.



**Anexo 3. AFLA-MIX: DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA ESTABLECER LA CURVA DE CALIBRACION DETECTADO POR CAMARA DE LUZ UV.**



**Anexo 4. CURVA DE CALIBRACIÓN GRAFICADA EN EL EQUIPO FLUOROMETROSYNERGY-HT CON LECTOR MULTIMODAL DE DEMICROPLACAS.**



## **Anexo 5. PROCEDIMIENTO DE LA PARTE EXPERIMENTAL**

### **PASO N° 1 - Pesado de la muestra**



### **PASO N°2 Extraccion PASO N°3 Extraccion metanol**



**PASO 4 - Uso de catalizadores PASO 5 – Purificación**



**PASO 6 extracciones cloroformo**



**PASO 7- Placas para fluorescencia resistentes a solventes**



**PASO 8- Cuantificación con fluorómetro**



## Anexo 6. TRATAMIENTO DE DATOS ESTADISTICOS

	Conc adicionada X	AREA Y	promedio	desv. est.	varianza	CV(%)
	1	0	0	0	0	0,000%
<b>C1</b>	1	0				
	1	0				
	2	0	0	0	0	0,000%
<b>C2</b>	2	0				
	2	0				
	5	1	1	0	0	0,000%
<b>C3</b>	5	1				
	5	1				
	10	2	2	0	0	0,000%
<b>C4</b>	10	2				
	10	2				
	20	5	5	0	0	0,000%
<b>C5</b>	20	5				
	20	5				
	50	12	11,3333333	0,57735027	0,33333333	5,094%
<b>C6</b>	50	11				
	50	11				
	100	20	20,3333333	0,57735027	122,864979	2,839%
<b>C7</b>	100	20				
	100	21				

### Anexo 7. COEFICIENTES DE LA RECTA

Cst	Conc adicionada X	AREA Y	(xi-x)	(xi-x)^2	(yi-y)	(xi-x)*(yi-y)	Ypred	(ypred-y)^2	resíduo	residuo^2
C1	1	0	-25,8571429	668,591837	-5,6667	146,52381	0,28952016	28,9137045	0,28952016	0,08382192
	1	0	-25,8571429	668,591837	-5,6667	146,52381	0,28952016	28,9137045	0,28952016	0,08382192
	1	0	-25,8571429	668,591837	-5,6667	146,52381	0,28952016	28,9137045	0,28952016	0,08382192
C2	2	0	-24,8571429	617,877551	-5,6667	140,857143	0,4974761	26,7205311	0,4974761	0,24748247
	2	0	-24,8571429	617,877551	-5,6667	140,857143	0,4974761	26,7205311	0,4974761	0,24748247
	2	0	-24,8571429	617,877551	-5,6667	140,857143	0,4974761	26,7205311	0,4974761	0,24748247
C3	5	1	-21,8571429	477,734694	-4,6667	102	1,12134393	20,6599588	0,12134393	0,01472435
	5	1	-21,8571429	477,734694	-4,6667	102	1,12134393	20,6599588	0,12134393	0,01472435
	5	1	-21,8571429	477,734694	-4,6667	102	1,12134393	20,6599588	0,12134393	0,01472435
C4	10	2	-16,8571429	284,163265	-3,6667	61,8095238	2,16112364	12,2888319	0,16112364	0,02596083
	10	2	-16,8571429	284,163265	-3,6667	61,8095238	2,16112364	12,2888319	0,16112364	0,02596083
	10	2	-16,8571429	284,163265	-3,6667	61,8095238	2,16112364	12,2888319	0,16112364	0,02596083
C5	20	5	-6,85714286	47,0204082	-0,6667	4,57142857	4,24068306	2,03342924	-0,75931694	0,57656221
	20	5	-6,85714286	47,0204082	-0,6667	4,57142857	4,24068306	2,03342924	-0,75931694	0,57656221
	20	5	-6,85714286	47,0204082	-0,6667	4,57142857	4,24068306	2,03342924	-0,75931694	0,57656221
C6	50	12	23,1428571	535,591837	6,3333	146,571429	10,4793613	23,1620299	-1,52063867	2,31234197
	50	11	23,1428571	535,591837	5,3333	123,428571	10,4793613	23,1620299	-0,52063867	0,27106463
	50	11	23,1428571	535,591837	5,3333	123,428571	10,4793613	23,1620299	-0,52063867	0,27106463
C7	100	20	73,1428571	5349,87755	14,3333	1048,38095	20,8771584	231,35906	0,87715844	0,76940693
	100	20	73,1428571	5349,87755	14,3333	1048,38095	20,8771584	231,35906	0,87715844	0,76940693
	100	21	73,1428571	5349,87755	15,3333	1121,52381	20,8771584	231,35906	-0,12284156	0,01509005
				23942,5714		4979				7,25403048
				SXX		SXY				0,60224706

X=	26,8571429
y=	5,66666667

LD=	1,8883054
LQ=	6,1040348

b=	0,20795594
a=	0,08156422

**Anexo 8. SELECTIVIDAD - MATRIZ SIN ANALITO NO DISPONIBLE**

Concentración	Área	
	Solvente + Patrón	Matriz + Patrón
1	0	1,0000
1	0	1,0000
1	0	1,0000
2	0	1,0000
2	0	1,0000
2	0	2,0000
5	1	2,0000
5	1	2,0000
5	1	2,0000
10	2	4,0000
10	2	4,0000
10	2	5,0000
20	5	9,0000
20	5	10,0000
20	5	10,0000
50	12	22,0000
50	11	23,0000
50	11	23,0000
100	20	45,0000
100	20	47,0000
100	21	47,0000

**Anexo 9. TEST T PARA IGUALDAD DE PENDIENTES**

Agua Fortificada					
Coef. Angular	0,207956				
Coef. Linear	0,081564				
R^2	0,993043				
conc.	Abs	Conc. Real	Y pred	Resíduo	Res^2
1	0	-0,39	0,29	-0,2895	0,083822
1	0	-0,39	0,29	-0,2895	0,083822
1	0	-0,39	0,29	-0,2895	0,083822
2	0	-0,39	0,50	-0,4975	0,247482
2	0	-0,39	0,50	-0,4975	0,247482
2	0	-0,39	0,50	-0,4975	0,247482
5	1	4,42	1,12	-0,1213	0,014724
5	1	4,42	1,12	-0,1213	0,014724
5	1	4,42	1,12	-0,1213	0,014724
10	2	9,23	2,16	-0,1611	0,025961
10	2	9,23	2,16	-0,1611	0,025961
10	2	9,23	2,16	-0,1611	0,025961
20	5	23,65	4,24	0,7593	0,576562
20	5	23,65	4,24	0,7593	0,576562
20	5	23,65	4,24	0,7593	0,576562
50	12	57,31	10,48	1,5206	2,312342
50	11	52,50	10,48	0,5206	0,271065
50	11	52,50	10,48	0,5206	0,271065
100	20	95,78	20,88	-0,8772	0,769407
100	20	95,78	20,88	-0,8772	0,769407
100	21	100,59	20,88	0,1228	0,015090
<b>Media</b>	<b>26,86</b>			<b>Suma</b>	<b>7,254030</b>
				<b>RSD1</b>	<b>0,617892</b>

## Anexo 10.MATRIZ CON ANALITO

Efluente Fortificado (matriz)							
Coef. Angular	0,460035						
Coef. Linear	0,120956						
R <sup>2</sup>	0,998382						
conc.	Abs	Conc. Real	Y pred	Resíduo	Res <sup>2</sup>		
1	1,0000	1,91	0,58099142	0,4190	0,175568		
1	1,0000	1,91	0,58099142	0,4190	0,175568		
1	1,0000	1,91	0,58099142	0,4190	0,175568		
2	1,0000	1,91	1,041026743	-0,0410	0,001683		
2	1,0000	1,91	1,041026743	-0,0410	0,001683	MEDIA	26,86
2	2,0000	4,08	1,041026743	0,9590	0,919630	ESD=	2,73315
5	2,0000	4,08	2,42113271	-0,4211	0,177353	SUMA	8,211894
5	2,0000	4,08	2,42113271	-0,4211	0,177353		
5	2,0000	4,08	2,42113271	-0,4211	0,177353	RSD2	0,657423
10	4,0000	8,43	4,721309324	-0,7213	0,520287		
10	4,0000	8,43	4,721309324	-0,7213	0,520287		
10	5,0000	10,61	4,721309324	0,2787	0,077668		
20	9,0000	19,30	9,32166255	-0,3217	0,103467		
20	10,0000	21,47	9,32166255	0,6783	0,460142		
20	10,0000	21,47	9,32166255	0,6783	0,460142		
50	22,0000	47,56	23,12272223	-1,1227	1,260505		
50	23,0000	49,73	23,12272223	-0,1227	0,015061		
50	23,0000	49,73	23,12272223	-0,1227	0,015061		
100	45,0000	97,56	46,12448836	-1,1245	1,264474		
100	47,0000	101,90	46,12448836	0,8755	0,766521		
100	47,0000	101,90	46,12448836	0,8755	0,766521		

### Anexo 11. PRECISIÓN INTERMEDIA

ANALISTA	NIVEL 65,31 µg/kg			x ij	S ij	S ij ^2	Grubbs	evaluación G	(nij-1)	(nij -1)Sij^2
	DIA 1	DIA 2	DIA 3							
A	64,55	63,23	64,53	64,1033	0,7564	0,5721	0,5905	1,156	2	1,1443
	64,98	63,25	63,15	63,7900	1,0318	1,0646	1,1533	SI	2	2,1292
	65,21	64,56	64,66	64,8100	0,3500	0,1225	1,1429	SI	2	0,2450
	65,67	64,34	65,54	65,1833	0,7332	0,5376	0,6637	SI	2	1,0753
	65,54	65,76	65,56	65,6200	0,1217	0,0148	1,1508	SI	2	0,0296
	65,32	65,34	65,34	65,3333	0,0115	0,0001	0,5774	SI	2	0,0003
B	65,41	64,76	64,36	64,8433	0,5299	0,2808	1,0693	SI	2	0,5617
	65,53	64,57	64,53	64,8767	0,5662	0,3205	1,1540	SI	2	0,6411
	65,36	64,86	64,76	64,9933	0,3215	0,1033	1,1406	SI	2	0,2067
	65,57	64,87	64,78	65,0733	0,4325	0,1870	1,1484	SI	2	0,3741
	65,65	64,75	64,65	65,0167	0,5508	0,3033	1,1499	SI	2	0,6067
	65,43	64,98	64,98	65,1307	0,2610	0,0681	1,1547	SI	2	0,1362
C	65,32	63,75	63,65	64,2400	0,9366	0,8773	1,1531	SI	2	1,7546
	64,99	64,53	64,42	64,6457	0,3007	0,0904	1,1352	SI	2	0,1808
	64,88	64,24	64,74	64,6183	0,3345	0,1119	0,7673	SI	2	0,2238
	65,04	64,32	64,52	64,6267	0,3717	0,1381	1,1121	SI	2	0,2763
	65,32	64,40	64,98	64,9000	0,4652	0,2164	0,9029	SI	2	0,4328
	65,34	63,45	63,45	64,0800	1,0912	1,1907	1,1547	SI	2	2,3814
<b>yj</b>			<b>64,7714</b>		<b>0,3444</b>				<b>36</b>	<b>12,3996</b>

resumen

yj	Sr	Sw	Sw%	r	rw	R	% DE EXACTITUD
64,7714	0,5410	0,5869	0,9061	1,5148	1,6433	2,1101251	99,1752723

**Anexo 12.EXACTITUD**

MRC		65,31		valor por HPLC				
		valor del certificado						
	V 1	V2	promedio	GRUBBS	RR	S	N-1	N-1*S2
1	65,85	64,55	65,20	1,26	99,832	0,919	1	0,845
2	65,25	64,98	65,12	1,49	99,701	0,191	1	0,036
3	65,30	65,21	65,26	1,11	99,916	0,064	1	0,004
4	65,65	65,67	65,66	0,04	100,536	0,014	1	0,000
5	65,98	65,54	65,76	0,23	100,689	0,311	1	0,097
6	65,45	65,32	65,39	0,77	100,115	0,092	1	0,008
7	65,88	65,41	65,65	0,08	100,513	0,332	1	0,110
8	64,98	65,53	65,26	1,11	99,916	0,389	1	0,151
9	65,56	65,36	65,46	0,57	100,230	0,141	1	0,020
10	67,05	65,57	66,31	1,69	101,531	1,047	1	1,095
11	64,9	66,76	65,83	0,41	100,796	1,315	1	1,730
12	66,04	65,49	65,77	0,24	100,697	0,389	1	0,151
13	65,76	65,98	65,87	0,52	100,857	0,156	1	0,024
14	65,84	66,21	66,03	0,93	101,095	0,262	1	0,068
15	66,04	65,76	65,90	0,60	100,903	0,198	1	0,039
16	67,1	65,78	66,44	2,03	101,730	0,933	1	0,871
17	65,65	65,54	65,60	0,21	100,436	0,078	1	0,006
		PROMEDIO	65,67	RR %	100,558		17	5,258
		DS	0,37656536	SRR %	0,57658147			
		GRUBB tab	2,62					

### Anexo 13.DETERMINACIÓN DE INTERVALOS DE CONFIANZA

fecha	LSC	LSA	VC	LIA	LIC
<b>10/02/2013</b>	66,62	66,25	65,67	65,10	64,73
<b>11/04/2013</b>	66,62	66,25	65,67	65,10	64,73

fecha	v1	v2	promedio	VR	RR	GRUBB
10/02/2013	65,85	64,55	65,20	65,31	99,832	-1,261
13/02/2013	65,25	64,98	65,12	65,31	99,701	-1,486
16/02/2013	65,30	65,21	65,26	65,31	99,916	-1,115
19/02/2013	65,65	65,67	65,66	65,31	100,536	-0,039
22/02/2013	65,98	65,54	65,76	65,31	100,689	0,227
25/02/2013	65,45	65,32	65,39	65,31	100,115	-0,769
28/02/2013	65,88	65,41	65,65	65,31	100,513	-0,079
03/03/2013	64,98	65,53	65,26	65,31	99,916	-1,115
06/03/2013	65,56	65,36	65,46	65,31	100,230	-0,570
09/03/2013	67,05	65,57	66,31	65,31	101,531	1,687
12/03/2013	64,9	66,76	65,83	65,31	100,796	0,412
15/03/2013	66,04	65,49	65,77	65,31	100,697	0,240
18/03/2013	65,76	65,98	65,87	65,31	100,857	0,519
21/03/2013	65,84	66,21	66,03	65,31	101,095	0,930
24/03/2013	66,04	65,76	65,90	65,31	100,903	0,598
27/03/2013	67,1	65,78	66,44	65,31	101,730	2,032
30/03/2013	65,65	65,54	65,60	65,31	100,436	-0,212
					RR-	100,558
					DS R	0,577

fecha	LSC	LSA	VC	LIA	LIC
10/02/2013	102,04	101,25	100,00	98,75	97,96
11/04/2013	102,04	101,25	100,00	98,75	97,96

fecha	v1	v2	promedio	VR	RR	S	b	ECMR	100-ECMR
10/02/2013	65,85	64,55	65,2	65,31	99,832	0,91923882	-0,11	1,418	98,582
13/02/2013	65,25	64,98	65,115	65,31	99,701	0,19091883	-0,195	0,418	99,582
16/02/2013	65,30	65,21	65,255	65,31	99,916	0,06363961	-0,055	0,129	99,871
19/02/2013	65,65	65,67	65,66	65,31	100,536	0,01414214	0,35	0,536	99,464
22/02/2013	65,98	65,54	65,76	65,31	100,689	0,31112698	0,45	0,838	99,162
25/02/2013	65,45	65,32	65,385	65,31	100,115	0,09192388	0,075	0,182	99,818
28/02/2013	65,88	65,41	65,645	65,31	100,513	0,33234019	0,335	0,723	99,277
03/03/2013	64,98	65,53	65,255	65,31	99,916	0,38890873	-0,055	0,601	99,399
06/03/2013	65,56	65,36	65,46	65,31	100,230	0,14142136	0,15	0,316	99,684
09/03/2013	67,05	65,57	66,31	65,31	101,531	1,04651804	1	2,216	97,784
12/03/2013	64,9	66,76	65,83	65,31	100,796	1,31521861	0,52	2,165	97,835
15/03/2013	66,04	65,49	65,765	65,31	100,697	0,38890873	0,455	0,916	99,084
18/03/2013	65,76	65,98	65,87	65,31	100,857	0,15556349	0,56	0,890	99,110
21/03/2013	65,84	66,21	66,025	65,31	101,095	0,26162951	0,715	1,166	98,834
24/03/2013	66,04	65,76	65,9	65,31	100,903	0,1979899	0,59	0,953	99,047
27/03/2013	67,1	65,78	66,44	65,31	101,730	0,93338095	1,13	2,244	97,756
30/03/2013	65,65	65,54	65,595	65,31	100,436	0,07778175	0,285	0,452	99,548
			65,6747059					0,951	99,049