



Instituto de
Calidad Industrial

Especialización en
Calidad Industrial de Alimentos

ESTUDIO SOBRE LA UTILIZACIÓN Y EL CONTROL DE CALIDAD DE MATERIALES DE REFERENCIA EN MICOTOXINAS

Por: Lic. Tomás López Seal

Docentes: Dr. Joaquín Valdés

Dra. Marcela Álvarez

2020

INDICE

RESUMEN	3
MARCO TEÓRICO	4
ORGANIZACIÓN	4
INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL	4
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL	5
MICOTOXINAS: PROBLEMÁTICA Y LEGISLACION	6
CARACTERIZACION DE LAS MICOTOXINAS	9
AFLATOXINAS	9
DEOXINIVALENOL	9
FUMONISINAS	10
OCRATOXINA A	10
MEDICIÓN DE MICOTOXINAS	11
TRAZABILIDAD	12
DESARROLLO	14
INTI: MATERIALES DE REFERENCIA DISPONIBLES	14
CONTROL ESTADÍSTICO DE PROCESOS	16
PROCESO: CALIBRACIÓN DE EQUIPOS	16
GRAFICOS DE CONTROL	16
ANÁLISIS DE ESTABILIDAD	19
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	19
ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE	21
COMPARACIÓN DE RESULTADOS	24
ANÁLISIS DE RESULTADOS HISTÓRICOS	25
PDCA: IMPLEMENTACIÓN DE MEJORAS	28
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEOXINIVALENOL	34
ANEXO B – CARTAS DE CONTROL DE LOS PROCESOS DE CALIBRACIÓN	35

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de ciertos hongos filamentosos que pueden encontrarse en alimentos y en piensos. Su ingesta da lugar a una serie de trastornos y enfermedades en seres humanos y en animales. Existe numerosa legislación a nivel mundial para la regulación de micotoxinas en el comercio de alimentos y materias primas, generalmente estableciendo las concentraciones máximas admitidas. En el año 2019 a través de la Resolución Conjunta 22/2019 del Ministerio de Salud y Desarrollo Social se establecieron límites máximos para el deoxinivalenol, las fumonisinas y la ocratoxina A. Esta reglamentación se suma a la que ya existe sobre aflatoxinas.

Una legislación más extendida trae aparejada un mayor control de los bienes comercializados. Para dar respuesta a la necesidad de controles se han desarrollado múltiples métodos analíticos para la detección y cuantificación de micotoxinas. Estos hacen uso de curvas de calibración con Soluciones Calibrantes de concentración conocida, preparadas a partir de Materiales de Referencia que son adquiridos a proveedores internacionales por un elevado precio. Es frecuente que los Materiales de Referencia sean utilizados durante muy largos períodos de tiempo ya que las micotoxinas son moléculas muy estables y se utiliza muy poco Material de Referencia cada vez que se realiza un análisis. La validez y trazabilidad de las Soluciones Calibrantes y Materiales de Referencia es un requisito en la norma ISO/IEC 17025 y por lo tanto se debe cumplir para la acreditación de los métodos.

El presente trabajo tiene como objetivo analizar y discutir las herramientas utilizadas en el Departamento de Análisis Instrumental del Instituto Nacional de Tecnología Industrial para asegurar la estabilidad de los Materiales de Referencia utilizados en el análisis de rutina de micotoxinas. En primer lugar, se detallan las características de los Materiales de Referencia disponibles en el Departamento. Luego se profundiza en el control de Soluciones Calibrantes mediante control estadístico de procesos utilizando cartas de control. Por último, se describe un método espectrofotométrico para la cuantificación de analitos en solución, se realiza una estimación de su incertidumbre, se comparan los resultados históricos obtenidos y se identifican oportunidades de mejora.

Las micotoxinas que abarcan los temas anteriormente mencionados son aquellas contempladas por la legislación argentina hasta el momento: aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatoxina M1, fumonisina B1 y B2, deoxinivalenol y ocratoxina A.

MARCO TEÓRICO

ORGANIZACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL

El Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) es un ente autárquico que nació el 27 de diciembre de 1957 mediante el Decreto Ley 17.138, donde se estableció que su objetivo principal es *“Realizar investigaciones y estudios con el fin de mejorar las técnicas de elaboración y proceso de las materias primas y desarrollar el uso de materiales y materias primas de origen local o más económicos y el aprovechamiento de subproductos”*. En tal sentido, se diseñó la creación de los Centros de Investigación, que mediante estrecha vinculación con los industriales del país buscarían la implementación de dichos desarrollos para impulsar la producción nacional. Por otro lado, se buscaría una relación constante con el ámbito científico y académico, tanto público como privado, para mantenerse a la vanguardia del conocimiento y dar soporte a investigaciones de interés para el desarrollo de la industria nacional [1].

En un principio el INTI se estableció en el Parque Tecnológico Miguelete en el Partido de General San Martín, Provincia de Buenos Aires. Con el correr de los años el alcance del Instituto se fue expandiendo con el fin de promover el desarrollo industrial en todo el país, especialmente, acompañando a los sectores productivos característicos de cada región. Este proceso fue posible gracias a la articulación con diversos actores que han sido fundamentales para determinar las necesidades y oportunidades en cada rincón, entre ellos cabe mencionar a cámaras empresarias, empresas públicas, universidades, laboratorios estatales y otras organizaciones presentes en todo el territorio nacional. En este sentido, la integración de las cámaras e industrias dentro de la conducción de los Centros de Investigación ha asegurado que sus actividades sean relevantes para atender a necesidades y demandas concretas [2]. En los últimos años las autoridades del Instituto han propulsado un proceso de reestructuración en su organización que finalmente fue formalizado mediante la Decisión Administrativa 1945/2018. Bajo la hipótesis alcanzar una institución más dinámica, eficiente, visible y con nuevas oportunidades de negocio se delineó un nuevo modelo organizacional basado en cuatro unidades estratégicas: Servicios Industriales, Desarrollo Tecnológico e Innovación, Metrología y Calidad, y Desarrollo Regional [3].

En la actualidad el INTI cumple con diversas funciones dentro del entramado que ha constituido con los sectores productivos y la sociedad. Entre ellos se destaca que mediante la Ley 19.511 y el Decreto 788/03 se ha constituido como el Instituto Nacional de Metrología, es decir, el máximo organismo técnico de la Argentina en el área. La función principal del mismo es realizar y mantener los patrones de las unidades de medida según el Sistema Internacional de Unidades (SI) y diseminarlos en los ámbitos de la metrología científica, industrial y legal. A fin de asegurar la comparabilidad y validez de mediciones, patrones nacionales y sus certificados de medición y calibración, el INTI participa de intercomparaciones con Institutos Nacionales de Metrología de otros países y es firmante del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo de Patrones Nacionales de Medida y Certificados de Calibración y de Medición redactado por Comité Internacional de Pesas y Medidas (CIPM-MRA).

Además de las anteriormente mencionadas, las responsabilidades como Instituto Nacional de Metrología incluyen tareas como llevar a cabo investigación y desarrollo en capacidades de medición y calibración, patrones nacionales y materiales de referencia, instrumentos y tecnologías de medición industriales, también desarrollar laboratorios de calibración y defender a la industria nacional frente a barreras técnicas de carácter metrológico que puedan afectar el comercio.

Por último, a fin de reflejar fielmente el objetivo final del Instituto al que aspiran las autoridades y el camino que debe tomar para alcanzarlo, se transcriben la Visión y la Misión y el Compromiso con la calidad en la gestión:

Visión

Ser el Instituto líder en el campo de la innovación a nivel nacional y regional, consolidando a la vez su rol y prestigio en materia de servicios industriales, calidad y Metrología para el desarrollo industrial y la calidad de vida de las personas.

Misión

Fortalecer la competitividad industrial en todo el país a través de la transferencia de tecnología, el cumplimiento de la legislación metrológica y el impulso al desarrollo tecnológico, y la innovación en todos los sectores productivos.

Compromiso con la calidad en la gestión

Es nuestro compromiso favorecer el desarrollo y la sustentabilidad industrial, contribuyendo a la articulación de las políticas y estrategias definidas por el Estado Nacional; actualizar la infraestructura disponible asignando los recursos necesarios para ello; e implementar y mejorar los sistemas de gestión conforme a los requisitos de las normas nacionales e internacionales reconocidas en los diferentes ámbitos de aplicación

DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

El Departamento de Análisis Instrumental dentro de la Sugerencia Operativa de Alimentos nació en el año 2019 a partir de la reestructuración que fue llevada a cabo en el INTI. Surgió por la combinación del Laboratorio de Toxicología y Nutrición con otros tres laboratorios con el objetivo de nuclear los análisis de alimentos que requieren mayor complejidad analítica. En consecuencia, se pueden identificar tres funciones del Departamento, la primera es la detección y cuantificación de micronutrientes y contaminantes en matrices alimentarias, principalmente cereales, oleaginosas, aceites, carnes, lácteos y los productos derivados de ellos. La segunda radica en la caracterización y análisis de calidad de aceites y productos derivados; por último, la cuantificación de azúcares en materias primas y productos elaborados.

Se destaca que el Departamento cuenta con varios equipos de cromatografía líquida con detectores de DAD-UV, fluorescencia, IR y MS/MS, y cromatografía gaseosa con detectores ECD, FID, MS y MS/MS. En materia de recursos humanos, cuenta con seis agentes técnicos y seis

agentes profesionales altamente calificados con vastas trayectorias en ensayos analíticos. Dentro del área de micotoxinas, el Departamento tiene capacidad para determinar las siguientes micotoxinas en distintas matrices alimentarias: aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, aflatoxina M1, fumonisina B1 y B2, deoxinivalenol, ocratoxina A, patulina y zearalenona.

Entre los logros alcanzados se destacan la acreditación bajo la Norma ISO/IEC 17025 de cinco métodos analíticos, tres de ellos en el área de micotoxinas y dos de caracterización de aceites. Además, el Departamento es reconocido por el Consejo Oleícola Internacional para la realización de ensayos de calidad en aceite de oliva.

El Departamento ha participado de distintos estudios y proyectos internacionales vinculados con temas de metrología. Ha participado de dos ensayos interlaboratorios del National Institute of Standards and Technology (NIST) de los Estados Unidos para establecer los valores de los materiales de referencia SRM1565 (micotoxinas en maíz), SRM 1869 (vitaminas en fórmula nutricional para infantes o adultos) y del Instituto Nacional de Metrología Turco el UME CRM 1302 (aflatoxinas en higos deshidratados). Por otro lado, el Lic. Tomás López Seal ha realizado una estadía en el NIST para asignar los valores de referencia al SRM 1565 anteriormente mencionado y el Lic. Mariano Simón ha visitado la Oficina Internacional de Pesas y Medidas (BIPM) para recibir una capacitación sobre producción y evaluación de un Material de Referencia Certificado de zearalenona en acetonitrilo.

Entre los últimos trabajos publicados se destaca un paper de elaboración propia “Incidence of Deoxynivalenol in Wheat Flour in Argentina and GC–ECD Method Validation” [4] y otros en colaboración, “Development and Characterization of a Multimycotoxin Reference Material” [5], “Mycotoxin metrology: Gravimetric production of zearalenone calibration solution” [6] y “Microbiological quality, fungal diversity and aflatoxins contamination in carob flour (*Prosopis flexuosa*)” [7]. Por último, también se ha participado en congresos nacionales e internacionales presentando posters principalmente sobre investigaciones propias o en colaboración con otros organismos y sobre desarrollo y validación de métodos.

MICOTOXINAS: PROBLEMÁTICA Y LEGISLACION

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos y pueden ser encontradas en diversos alimentos y alimentos balanceados. Cuando las micotoxinas son ingeridas pueden tener efectos crónicos o agudos que son denominados micotoxicosis. Las afecciones crónicas, tales como el cáncer, la inmunosupresión y la inhibición del desarrollo, producidas por la exposición frecuente a bajas concentraciones de micotoxinas son las que tienen un mayor impacto en la salud humana a nivel mundial [8]. Los géneros de hongos de mayor relevancia en este asunto son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* ya que son los responsables de la producción de las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, fumonisinas y zearalenona [9].

Niveles bajos de ciertas micotoxinas en determinados alimentos se consideran inevitables y seguros, sin embargo, existen factores como condiciones climáticas inusuales, daños por plagas de insectos, prácticas agronómicas y de almacenamiento inadecuadas que llevan a altas

concentraciones [10]. Entre ellos, cabe destacar que la humedad y la temperatura son los parámetros más influyentes en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas [11].

Además de ser un riesgo para la salud humana las micotoxinas tienen un gran impacto en la economía y el comercio nivel mundial [11]. Las principales consecuencias de esta contaminación global son la pérdida de cosechas, el descarte de cereales contaminados, la caída en la producción animal, el incremento en los costos de salud humana y animal, el incremento en los costos de controles y regulaciones y la inversión en investigación [12]. La globalización del comercio de alimentos ha contribuido a las pérdidas económicas debido a micotoxinas en los países en desarrollo. Estos tienden a exportar los alimentos menos contaminados para cumplir con las reglamentaciones y de esta forma exponen a su propia población en mayor medida. Incluso en algunas ocasiones los alimentos exportados son rechazados por regulaciones rigurosas dando como resultados millones de dólares de pérdidas [10]. El desarrollo de regulaciones para la gestión de riesgos de micotoxinas busca alcanzar un balance entre la protección de la salud humana y los intereses económicos [13].

El Código Alimentario Argentino establece en su Artículo 156 bis mediante la Resolución 612 (10/05/1988) y su posterior ampliación mediante la incorporación de la Resolución GMC 025/02 del MERCOSUR los límites máximos admisibles en ciertos productos [14].

	Aflatoxina M1	Aflatoxina B1+B2+G1+G2 (µg/kg)	Aflatoxina B1 (µg/kg)
Leche fluida	0,5 µg/l	-	-
Leche en polvo	5 µg/kg	-	-
Maíz en grano (entero, partido, aplastado, mondado)	-	20	5
Harinas o sémolas de maíz	-	20	5
Maní (sin descascarar, descascarado, crudo o tostado)	-	20	5
Maní en pasta (Pasta de maní o manteca de maní)	-	20	5

Tabla 1. Resumen de la Resolución 612 (10/05/1988) y la Resolución GMC 025/02 del MERCOSUR

El 22 de julio de 2019 se publicó en el Boletín Oficial la Resolución Conjunta 22/2019 dictada por la Secretaría de Regulación y Gestión Sanitaria y la Secretaría de Alimentos y Bioeconomía de la República Argentina. En la misma se estableció la incorporación de dos nuevos artículos al Código Alimentario Argentino (CAA) con referencia a este tema. El artículo 156 quarter establece niveles máximos para tres micotoxinas en determinados alimentos, aclarando a qué parte del producto se aplica el nivel máximo y el plan de muestreo que se debe utilizar [15].

	Deoxinivalenol (µg/kg)	Fumonisin (F1 + F2) (µg/kg)	Ocratoxina A (µg/kg)
Alimento a base de cereales para lactantes y niños pequeños	200	-	0,5
Harina de maíz y sémola de maíz	1000	2000	3
Harina, sémola, semolina y hojuelas o copos de trigo	1000	-	3
Café soluble (instantáneo)	-	-	10
Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	-	-	5
Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	-	-	10

Tabla 2. Resumen del Artículo 156 quarter: Límites para micotoxinas.

Además, se incorporó el artículo 1414 tris donde se establecen los parámetros de referencia que deben cumplir los métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en alimentos. Es ampliamente reconocido que es necesario contar con métodos analíticos adecuados para asegurar la calidad de los resultados para el establecimiento de regulaciones y el control de mercaderías [16].

Deoxinivalenol					
Contenido (µg/kg)	Repetibilidad	Precisión Intermedia	Recuperación (%)	Límite de Detección	Límite de Cuantificación
>1000 y ≤500	%CV ≤ ½ de CV de Horwitz	%CV ≤ 2/3 de CV de Horwitz	60 a 120	LOD ≤ LM 1/5	LOQ ≤ LM 2/5
>500			70 a 110		
Contenido (µg/kg)	Ocratoxina A				
<1	%CV ≤ ½ de CV de Horwitz	%CV ≤ 2/3 de CV de Horwitz	50 a 120	LOD ≤ LM 1/5	LOQ ≤ LM 2/5
≥1			70 a 110		
Contenido (µg/kg)	Fumonisinás (FB1 y FB2 por separado)				
≤500	%CV ≤ ½ de CV de Horwitz	%CV ≤ 2/3 de CV de Horwitz	60 a 120	LOD ≤ LM 1/5	LOQ ≤ LM 2/5
>500			70 a 110		

Tabla 3. Parámetros de referencia para métodos analíticos vigentes según art. 1414 tris. LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; LM: límite especificado en la normativa vigente; CV: coeficiente de variación de Horwitz

CARACTERIZACION DE LAS MICOTOXINAS

AFLATOXINAS

Las aflatoxinas fueron aisladas por primera vez en la década de 1960 en Inglaterra a partir de un alimento a base de maní enmohecido que había provocado la muerte de 100.000 pavos [17]. *Aspergillus flavus* es la especie de mayor importancia entre todos los hongos que producen aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 dentro del género de los *Aspergillus* y la aflatoxina B1 es la forma más abundante y tóxica de todas las micotoxinas en general. Esta especie es un contaminante común en los cultivos y se desarrolla en climas templados y cálidos, por lo que el calentamiento global expandiría las áreas afectadas [18], además es posible encontrar aflatoxinas en climas tropicales y subtropicales [19]. Los alimentos más frecuentemente afectados son el maíz, el maní y la pasta de maní, pero es encontrada en una amplia gama de productos como cereales, oleaginosas, frutos secos y especies.

Las aflatoxinas son asociadas tanto con toxicidad aguda como crónica en animales y humanos, y las enfermedades resultantes son denominadas en forma genérica como aflatoxicosis. La intoxicación aguda debido a una alta exposición se caracteriza por daño hepático severo, ictericia, hemorragia, edema y eventualmente la muerte, mientras que en forma crónica las aflatoxinas tienen efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, inmunosupresores e inhibidores de desarrollo infantil. El hígado es el órgano que se ve más afectado en aves de corral, peces, roedores y primates que son alimentados con aflatoxina B1 existiendo grandes diferencias de susceptibilidad entre e intra especies [20]. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) considera que hay suficiente evidencia para afirmar que se ha establecido una relación causal entre el cáncer y la exposición a las aflatoxinas, especialmente la Aflatoxina B1, quien es considerada como un evidente cancerígeno en humano y en animales de experimentación, que le han permitido su clasificación como un carcinógeno clase 1 y como el más potente hepatocarcinógeno teniendo en cuenta las evidencias epidemiológicas y experimentales [21].

Los mamíferos expuestos a aflatoxina B1 en su dieta la convierten en aflatoxina M1 que es excretada en la leche y es tan citotóxica como la aflatoxina B1 [22] pero tiene tan solo un 10% de sus efectos cancerígenos e inmunosupresores [23]. La conversión de aflatoxina B1 en alimento balanceado a aflatoxina M1 en leche de vaca se ha establecido entre el 0,3% y 6,2%. [24]

DEOXINIVALENOL

El deoxinivalenol (DON) es la micotoxina de la familia de los tricotecenos más frecuentemente encontrada en trigo [25]. Es producida principalmente por *Fusarium graminearum* durante una infección conocida como fusariosis de espiga de trigo en las etapas de floración y espigación de la planta. Esta enfermedad agrícola es un problema en todas las zonas productoras de trigo del mundo [26]. La presencia de hongos es normal en cultivos y granos

almacenados, y en general se acepta que la contaminación con DON no se puede evitar en bajas concentraciones. La alta variabilidad de los factores climáticos produce que la fusariosis de la espiga de trigo al igual que la producción de DON cambie ampliamente entre los distintos años y lugares de siembra [27].

Los tricotecenos son sospechosos de haber sido responsables de brotes de las enfermedades taumalgetriede y leucopenia toxica alimentaria entre 1890 y 1940 en Rusia debido al consumo de cereales enmohecidos. Estas enfermedades afectan a los sistemas inmune, nervioso y digestivo, y alcanzaron una mortalidad del 60% de las personas afectadas. Los principales síntomas que se presentan son vómito, anorexia, dolor abdominal, diarrea, malnutrición, dolor de cabeza y mareos [28]. A nivel molecular, DON interfiere en la señalización celular, diferenciación, crecimiento y síntesis de macromoléculas [28].

FUMONISINAS

Las fumonisinas fueron descubiertas por primera vez en 1988 y son una familia grande de compuestos de los cuáles las fumonisinas B1, B2 y B3 son los de mayor preocupación, siendo la fumonisina B1 la más común en el maíz y productos de maíz. [29] [30]. Además, contaminan otros alimentos como sorgo, espárragos, arroz, cerveza y ciertos porotos. Son producidas por numerosas especies, pero *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum* se encuentran entre los hongos más comúnmente encontrados en el maíz tanto en granos sanos como dañados [31]. Estas especies causan una importante enfermedad en los cultivos de maíz en climas cálidos denominada fusariosis del maíz. Existe una fuerte correlación entre el daño por insectos y la fusariosis de especies como *F. graminearum*, donde el hongo aprovecha la ruptura de los tejidos vegetales para colonizar los granos.

Mientras que las fumonisinas están asociadas enfermedades en animales como leucoencefalomalacia (necrosis de la sustancia blanca del cerebro) equina, edema pulmonar en cerdos y cáncer de hígado y riñón en roedores, los efectos en humanos aún continúan siendo ampliamente estudiados [32] [33] [34]. Por el momento, IARC ha caracterizado a las fumonisinas como posibles agentes cancerígenos para humanos incluyéndolas en el grupo B2. El consumo de maíz altamente contaminado con fumonisinas ha sido asociado con altas tasas de cáncer de esófago en Italia y en Sudáfrica [35]. Además, existe evidencia que también podría generar defectos en el tubo neural y retardo en el crecimiento infantil.

OCRATOXINA A

La ocratoxina A es producida en mayor medida por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* (entre otras especies de *Aspergillus*) y por *A. carbonarius* creciendo junto a *A. niger* en bajas proporciones. Estos tres grupos de especies difieren en su nicho ecológico, en los commodities que afectan y en la frecuencia de ocurrencia en distintas regiones geográficas [36].

Esta micotoxina es un contaminante común en los alimentos a base de cereales en climas templados, además se encuentra frecuentemente en el cacao, el café, pasas de uvas, especies y vino, y en menor medida en la harina de mandioca, el pescado, el maní, la leche, las legumbres y la soja.

Su toxicidad se descubrió a raíz de un brote de enfermedad renal de cerdos en Escandinavia. Hoy en día se tiene un amplio conocimiento respecto a la toxicidad renal y es caracterizada como un importante nefrotóxico. Además, está clasificada como posible cancerígeno humano (grupo 2B) por la IARC [37]. En estudios realizados con animales se ha documentado que es nefrotóxica, inmunosupresora, cancerígena y teratogénica [38] [25]. Se cree que es responsable de al menos dos enfermedades crónicas: la nefropatía endémica de los Balcanes y la nefropatía intersticial crónica en el Norte de África [39].

MEDICIÓN DE MICOTOXINAS

Para obtener la concentración de una micotoxina en un lote de un producto de manera exacta y precisa es necesario atravesar por tres etapas de igual importancia: muestreo, preparación de la muestra y cuantificación.

Es difícil obtener un valor estimado preciso y exacto del valor real de micotoxina en un lote cuando un plan de muestreo solo analiza una pequeña porción de este. El plan, que establece cómo y qué muestra será obtenida, debe ser definido teniendo en cuenta el método analítico que se utilizará y los límites de aceptación o rechazo con los que será comparado el resultado. El muestreo es la principal fuente de incertidumbre en la determinación de micotoxinas ya que la contaminación dentro de los lotes suele ser extremadamente inhomogénea. Por ejemplo, en un lote de un cereal solo un pequeño porcentaje de granos se encuentra contaminado, e incluso la contaminación varía ampliamente dentro de un único grano [40].

La preparación de la muestra frecuentemente es una parte importante en las técnicas de medición ya que puede enriquecer la concentración del analito de interés y limpiar las interferencias existentes. En consecuencia, un pretratamiento eficiente es necesario para la cuantificación de micotoxinas a niveles de trazas en matrices. Extracción en fase líquida y extracción en fase sólida (SPE) son las metodologías más utilizadas en la actualidad [41]. El uso de una o varias técnicas depende de la complejidad de la matriz alimentaria y las propiedades fisicoquímicas de las micotoxinas. La principal variable a considerar en el desarrollo de un método es la elección del material adsorbente óptimo para realizar la extracción y limpieza de forma selectiva y eficiente. Existen dos tipos de columnas SPE: columnas de clean up multifuncional (MFC) y columnas de inmunoafinidad (IAC). MFC contiene material adsorbente especialmente diseñado para ciertas commodities. En general el clean up solo requiere de una etapa por lo que son rápidas y fáciles, ya que mientras la muestra atraviesa la columna las interferencias se adhieren al material y el analito lo atraviesa libremente. IAC también constituye una buena opción y se destaca por su especificidad debido a la interacción del anticuerpo con el analito. Los anticuerpos se encuentran anclados a un gel de soporte que permite que la muestra con las interferencias atraviese la columna mientras los analitos son retenidos. En una segunda y tercera etapa se realiza una limpieza y se liberan los analitos de los anticuerpos obteniéndose una muestra limpia y enriquecida. Sin embargo, tecnologías de MFC e IAC no siempre están disponibles para todas las micotoxinas por lo que otros métodos de SPE tradicionales aún continúan siendo utilizados, al igual que las extracciones líquido-líquido. Además, dependiendo de las características de la matriz, del analito y de la interacción entre ambos, es normal la necesidad de aplicar otros procedimientos de preparación de muestra, como por ejemplo, la

utilización de enzimas para la liberación de las micotoxinas, la desproteínización de la muestra, o la derivatización para incrementar la fluorescencia de un compuesto (HPLC-FL) o su volatilidad (GC).

La mayoría de los métodos actuales para la detección y cuantificación de micotoxinas incluyen técnicas cromatográficas como Cromatografía en Capa Delgada (TLC), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía Gaseosa (GC). Por otro lado, numerosos ensayos basados en inmunología como ELISA e IAC fueron desarrollados para ser utilizados en sitios de almacenamiento de granos [42]. La TLC fue una de las primeras técnicas desarrolladas para la detección, cuantificación y semi-cuantificación de micotoxinas y continúa siendo utilizada hoy debido a la posibilidad de analizar un gran número de muestras económicamente [43]. La mayoría de las técnicas modernas incluyen la cuantificación por HPLC tanto en fase normal como en fase reserva y utilizan adsorbentes acordes a las propiedades físicas y químicas de los analitos. Los métodos de detección más comúnmente utilizados son los detectores UV, de fluorescencia y de espectrometría de masa. Los primeros dependen de la capacidad de absorber luz UV y de fluorescer (FD) que algunas micotoxinas tienen natural o artificialmente mediante derivatización pre o post-columna [44]. Los detectores de masa (MS) y masa en tándem (MS/MS) son una potente herramienta para la cuantificación ya que poseen mayor sensibilidad y exactitud y permiten la determinación de múltiples analitos en forma simultánea. La principal desventaja es el alto costo de los equipamientos y la complejidad de los requerimientos de las instalaciones. La técnica de punta en este ámbito es la dilución isotópica asociada a HPLC-MS/MS, que además de contar con los beneficios anteriormente descritos es considerada un método primario relativo y simplifica aún más la etapa de preparación de muestra [45]. Por último, GC es utilizado normalmente acoplado a detectores de masa (MS), ionización de llama (FID), captura de electrones (ECD), entre otros. Este cromatógrafo es menos frecuente en el ámbito de las micotoxinas debido a la complejidad de la derivatización a fin de conseguir la volatilidad necesaria para el análisis por GC [46].

TRAZABILIDAD

La Norma ISO/IEC 17025:2017 establece que, para asegurar la propiedad de comparabilidad de los resultados, los laboratorios deben establecer y mantener la trazabilidad metrológica de los mismos. Esto implica que debe existir una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones que vinculen los resultados con referencias apropiadas. Cabe destacar, que cada eslabón de la cadena contribuye a la incertidumbre de la medición [47].

La Norma también establece que el laboratorio debe asegurar, en la medida de lo posible, la trazabilidad hasta el Sistema Internacional de Unidades (SI) ofreciendo distintos posibles caminos. Para el caso de la determinación de micotoxinas en matrices alimentarias la herramienta más frecuente es la utilización de Materiales de Referencia Certificados (MRC). El Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) define a los MRC como un caso especial de Material de Referencia (MR), este último es *“un material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas”*. En este caso, la propiedad específica es la concentración de micotoxina y el uso previsto es la calibración del equipo de medición. Un

MRC es un MR *“que viene acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos”*. Es decir, el certificado debe incluir el valor de concentración de micotoxina, informando su incertidumbre y cómo fue establecida su trazabilidad [48]. Sólo los productores competentes pueden ofrecer MRC, estos son por ejemplo, aquellos que cumplen con los requisitos de la Norma 17034. En la actualidad, pocos MRC de micotoxinas cuentan con trazabilidad hasta el SI ya que su producción es un proceso extremadamente costoso.

Los métodos cromatográficos descritos en el apartado anterior tienen en común, entre otras cosas, la necesidad de una calibración al momento de analizar las muestras donde se establece la correlación entre la señal obtenida y la concentración de micotoxina en solución. A partir del análisis de distintas concentraciones de Soluciones Calibrantes se realiza una regresión lineal que luego permite calcular la concentración en la muestra incógnita. Es mediante el uso de MRC que se establece la trazabilidad de los resultados a la vez que es utilizado para el cálculo de la incertidumbre de la medición.

DESARROLLO

INTI: MATERIALES DE REFERENCIA DISPONIBLES

Las Soluciones Calibrantes que son utilizadas para las calibraciones consisten en soluciones de baja concentración de micotoxinas en un solvente orgánico adecuado para el análisis cromatográfico. Las mismas se preparan volumétricamente a partir de Soluciones Stock que son de muy alta concentración y se almacenan por largos períodos de tiempo. Los principales factores a tener en cuenta para la elección del solvente son la aptitud para el análisis cromatográfico, la toxicidad, y la solubilidad y estabilidad del analito en el medio. Para Soluciones Calibrantes se utilizan solventes con un buen equilibrio entre estas características mientras que para Soluciones Stock se buscan solventes que prolonguen al máximo la vida útil de la solución, en algunas ocasiones los solventes utilizados son los mismos en ambos casos. Además, es común la necesidad de utilizar Soluciones Intermedias que son preparadas a partir de las Soluciones Stock como paso intermedio para la preparación de los Soluciones Calibrantes. Las mismas se realizan a fin de mezclar micotoxinas que serán analizadas juntas pero están separadas en distintas Soluciones Stock, por ejemplo fumonisina B1 y fumonisina B2, y para disminuir el error de dilución mediante la técnica de dilución seriada.

A nivel mundial existen pocas empresas u organizaciones que produzcan y comercialicen MR y MRC de micotoxinas en solución o en estado sólido. Algunas soluciones son de bajas concentraciones para ser utilizadas directamente, mientras que otras necesitan diluciones previas. Por otro lado, las micotoxinas en estado sólido suelen asegurar un cierto grado de pureza y deben ser disueltas en un solvente apropiado para su uso. En general, las soluciones poseen un precio mayor que los sólidos, y más aún si son MRC con la incertidumbre de la concentración. En el análisis de rutina el costo de la utilización de micotoxinas en las Soluciones Calibrantes es bajo debido a la baja concentración y el pequeño volumen que se necesita. Sin embargo, el costo de reposición de estos insumos es alto y se busca sacarles el máximo provecho una vez adquiridos.

El Departamento de Análisis Instrumental utiliza para el análisis de rutina Soluciones Stock preparadas a partir de MR sólidos que han sido disueltos en el laboratorio. A continuación, se analizan los Certificados de Análisis y la utilidad de las micotoxinas que se encuentran en uso actualmente en el Departamento. Cabe aclarar que, por más que los MR utilizados poseen un Certificado de Análisis, el mismo no cumple con las condiciones para ser considerado un MRC.

Dado que en general se adquieren envases de MR que contienen entre 1 mg y 10 mg de micotoxina y para realizar una curva de calibración se requiere en el orden de los nanogramos de analito, las Soluciones Stock son prácticamente inagotables. Para poder utilizar estas soluciones durante largos periodos de tiempo es fundamental asegurar que la concentración no varía significativamente. Por este motivo es tan importante la selección del solvente adecuado, el almacenamiento a temperaturas menores a -18 °C y el uso de las Buenas Prácticas de Laboratorio para su manipulación.

En el Departamento de Análisis Instrumental los MR fueron comprados a Fluka AG, Sigma-Aldrich y European Community Bureau of Reference a lo largo del tiempo y en algunas ocasiones

han pasado varios años hasta que fueron disueltas y utilizadas. Esto trae aparejado algunos inconvenientes, por ejemplo, los Certificados de Análisis de las aflatoxinas marca Fluka AG no se encuentran en el laboratorio y ante la solicitud de estos el proveedor ha respondido que como los productos se encuentran discontinuados ya no posee la información. En consecuencia, no es posible conocer ningún dato más que los que figuran en los envases.

Los Certificados de Análisis de los MR poseen una fecha de liberación del lote por Control de Calidad del fabricante y en algunas ocasiones figura una fecha recomendada para re-analizar. Durante este período el proveedor asegura que el producto cumple con las especificaciones y la homogeneidad siempre que el envase no haya sido abierto. Sin embargo, algunos proveedores no realizan los re-análisis que figuran en los Certificados de Análisis. Por ejemplo, el deoxinivalenol que fue adquirido a Sigma Aldrich (Anexo A) con una fecha de liberación de lote por Control de Calidad el 27 de agosto de 2014, fue disuelto por el laboratorio el 3 de octubre de 2018 y hasta la fecha no se ha emitido un nuevo certificado tal como sugiere la fecha recomendada para re-analizar de agosto de 2018. Por último, cabe destacar que en ninguno de los casos analizados se exhibe una fecha de caducidad o un tiempo de vida útil una vez abierto el producto.

Otro punto para considerar es el grado de pureza de las micotoxinas que son comercializadas. La mayor parte de los Certificados de Análisis informan purezas mayores o iguales a un cierto número sin una incertidumbre asociada. Además, el método más comúnmente utilizado es la Cromatografía en Placa Delgada (TLC) que es un método que hoy podríamos considerar primitivo frente a los avances en capacidad analítica que se han desarrollado en las últimas décadas. Las purezas de los lotes existentes en el Departamento de Análisis Instrumental son para la aflatoxina M1 $\geq 99\%$, aflatoxinas B1, B2 G1 y G2 $\geq 98\%$, deoxinivalenol $\geq 99\%$, ocratoxina A $\geq 99,5\%$, fumonisina B1 98.28% y fumonisina B2 100%. En todos los casos la pureza fue determinada mediante TLC menos en las fumonisinas que han sido analizadas mediante HPLC. Cabe destacar que ninguno de estos métodos otorga trazabilidad al SI.

En síntesis, los MR que utiliza el Departamento de Análisis Instrumental, al igual que otros organismos públicos y laboratorios privados presentan ciertas falencias o falta de información con respecto a su pureza, su trazabilidad y su vida útil. Es responsabilidad del usuario conocer las características del MR y evaluar si el mismo es adecuado para el uso propuesto. Dada la relación precio-calidad y la escasez de MRC de micotoxinas se considera que los usados son suficientemente aptos al ser combinados con otras herramientas de aseguramiento de la calidad como ensayos interlaboratorios y la utilización de MR en matriz. Es evidencia de esto que los métodos para la determinación de aflatoxinas, fumonisinas y deoxinivalenol se encuentran acreditados bajo la norma ISO/IEC 17025 en el Departamento.

CONTROL ESTADÍSTICO DE PROCESOS

PROCESO: CALIBRACIÓN DE EQUIPOS

Dentro de los métodos analíticos descritos anteriormente existe un proceso que es de vital importancia para la obtención de resultados exactos: la calibración del equipo con estándar externo. Una vez que el HPLC o GC se encuentra en régimen y estabilizado, es necesario realizar una calibración para obtener la correlación entre la señal emitida, es decir, el área bajo los picos del cromatograma y la concentración de analito en solución. Esta correlación se obtiene a partir de cuantificar soluciones de concentración creciente (Soluciones Calibrantes) preparadas desde los Materiales de Referencia Certificados y será utilizada para la determinación de las muestras incógnitas.

Una vez obtenidas las áreas correspondientes a cada Solución Calibrante se comienza con el análisis de datos. El objetivo es asegurar que la recta de calibración no presente desvíos respecto a los valores históricos y cumpla con los parámetros establecidos. En primer lugar, se grafican las áreas en función de las concentraciones y se realiza una regresión lineal para comprobar que el coeficiente de determinación (R^2) sea cercano a 1 y ningún valor se aleje significativamente de la recta. La calidad de la calibración puede ser estudiada mediante el monitoreo de parámetros preestablecidos, para lo cual en este caso, se evalúan la pendiente y la ordenada al origen de la recta para verificar que no existen desvíos respecto a los valores históricos obtenidos [49].

A continuación, se describen algunas posibles desviaciones para relevar la importancia de este proceso:

- * la evaporación del solvente debido a un incorrecto almacenamiento de las Soluciones Calibrantes genera un aumento en la concentración de los analitos y un aumento en la ordenada al origen en la recta de calibración

- * la degradación del analito en las Soluciones Calibrantes de menor concentración provoca un aumento en la pendiente y una disminución de la ordenada al origen, mientras que la degradación de las soluciones de mayor concentración provoca el efecto contrario

- * el tiempo insuficiente en la estabilización de la columna cromatográfica y los detectores puede provocar menores señales y desvíos en ambos sentidos tanto en la pendiente como en la ordenada al origen

- * un error significativo en la preparación de una concentración de las Soluciones Calibrantes disminuye el coeficiente de determinación y aleja el punto área vs concentración de la recta obtenida.

GRAFICOS DE CONTROL

En la actualidad, la necesidad del Control de Calidad en un laboratorio analítico es esencial para asegurar la comparabilidad de los resultados. Control de Calidad es un sistema de herramientas, actividades y técnicas con el propósito de satisfacer todos los requerimientos de calidad. Para alcanzar este propósito, los procesos son monitoreados y ajustados siguiendo

directivas brindadas por textos como las Buenas Prácticas de Laboratorio o las Normas ISO/IEC 9001 e ISO/IEC 17025 [50]. Sin embargo, estas guías internacionales proveen solo reglas generales para desarrollar y mantener los sistemas de calidad y es responsabilidad del laboratorio definir procedimientos apropiados para alcanzar una calidad adecuada y vigilar los cambios en el rendimiento de los métodos [51].

El primer paso para garantizar que los requerimientos analíticos sean cumplidos es la validación o verificación de los métodos. La validación se basa en la confirmación empírica y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto, mientras que la verificación es la confirmación y provisión de evidencia objetiva que se han cumplido los requisitos especificados. Estos procesos son fundamentales ya que permiten conocer a fondo los métodos y sus limitaciones al caracterizar, entre otras variables, la exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad y robustez de los mismos. En una segunda instancia, durante el trabajo de rutina se deben mantener las condiciones y alcanzar las especificaciones que fueron fijadas durante la validación del método. El analista debe decidir cuándo su método satisface los criterios de calidad y cuándo se puede aceptar un resultado, a fin de tomar estas determinaciones, se deben realizar pocas pruebas especialmente seleccionadas [49].

En este sentido, se ha buscado la forma de monitorear los procesos de calibración, definiendo cuándo se encuentran bajo control y cuándo se deben tomar medidas correctivas. Además, su control rutinario permite verificar que no ha ocurrido ninguna de las desviaciones mencionadas en el apartado anterior, y en última instancia, permite hacer un seguimiento de las Soluciones Calibrantes y los Materiales de Referencia Certificados. Por lo tanto, para sistematizar la evaluación de la pendiente y la ordenada al origen a fin de garantizar la obtención de valores coherentes con los resultados históricos se ha implementado el seguimiento mediante Control Estadístico de Procesos. Los Gráficos de Control son una importante herramienta usada para monitorear y controlar la calidad y eficiencia de los procesos. Fueron desarrollados por Walter A. Shewhart en la década de 1920 y actualmente su uso es una práctica común y esperada para monitorear métodos analíticos en el ámbito comercial, regulatorio e industrial [52]. Esta herramienta brinda información sobre la performance histórica, los resultados aceptables y permite ver de inmediato si el proceso se encuentra bajo control o no y es necesario tomar alguna acción [53]. Además, constituyen una manera fácil y eficiente para demostrar calidad y competencia a clientes y auditores.

En los Gráficos de Control una variable de interés es graficada en el *eje* y a lo largo del tiempo (*eje x*) cada vez que se obtiene un valor nuevo en el trabajo de rutina. Existen diferentes tipos de gráficos en función del tipo de variable estudiada, su cálculo y las características del proceso. En general, utilizando los datos recolectados durante un cierto período de tiempo es posible establecer el promedio y cuáles son los límites máximos y mínimos que se espera que tome la variable.

En el Departamento de Análisis Instrumental se ha decidido monitorear la calibración de los equipos en el área de micotoxinas mediante el seguimiento de la pendiente y la ordenada al origen de las rectas de calibración con el uso de Gráficos de Control. Los gráficos se construyeron utilizando 10 valores históricos para calcular la media y el desvío estándar. Los límites de

advertencia y límites de acción se fijaron como dos desvíos estándar y tres desvíos estándar respectivamente. Cada vez que se analizan muestras se realiza la calibración del equipo y los valores de la pendiente y la ordenada al origen son ingresadas a los gráficos correspondientes a fin de determinar si el proceso se encuentra bajo control o no y si es necesario tomar alguna acción. Se han formalizado reglas en los Métodos de Ensayo del Sistema Integral de Calidad que describen las situaciones posibles y cómo se debe actuar, las mismas se transcriben a continuación:

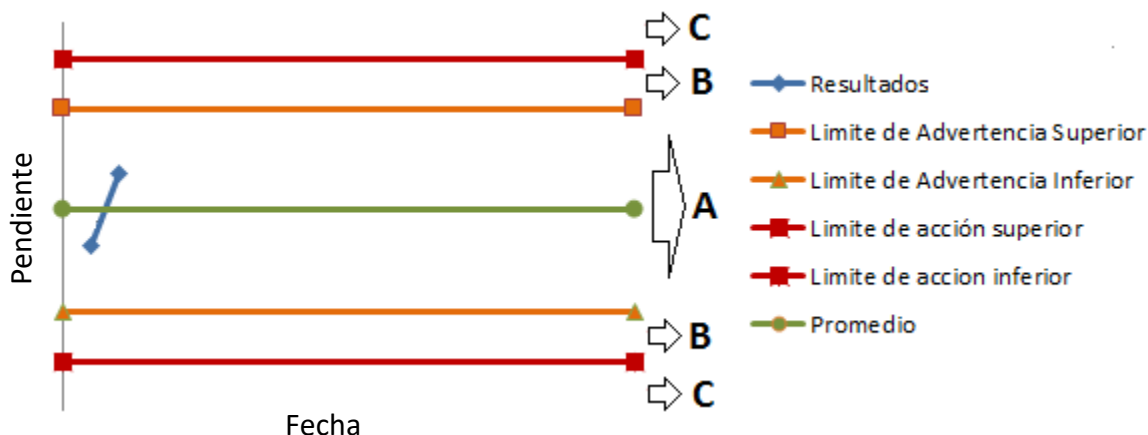


Figura 1. Ejemplo de carta de control con sus límites y zonas delimitadas.

El proceso se considera que está *bajo control* cuando:

- El valor se encuentra en la zona A.
- El valor se encuentra en las zonas B y los 2 valores previos se encuentran en la zona A.

El proceso se considera que está *en estado de advertencia* cuando:

- Diez puntos consecutivos se hallan del mismo lado de la media.
- Siete puntos consecutivos presentan una tendencia, ya sea creciente o decreciente.

Cuando el sistema se considere *en estado de advertencia* se deben tomarse medidas preventivas para evitar que el proceso pase a estar fuera de control. De todas formas, en estos casos los resultados pueden ser informados.

El sistema se considera que está *fuera de control* cuando:

- El valor se encuentra en la zona C.
- El valor se encuentra en las zonas B y al menos uno de los dos valores anteriores también está en la zona B.

Cuando el sistema se considere *fuera de control*, los resultados no deben ser informados y debe encontrarse la causa del desvío y su solución [54].

En el Anexo B se adjuntan los Gráficos de Control utilizados, destacándose que los de Aflatoxina M1 y Ocratoxina A fueron elaborados especialmente para el presente trabajo y por lo tanto los procesos comenzarán a ser monitoreados más eficientemente. Para el caso de

Ocratoxina A al utilizarse hasta el momento mayormente una calibración de un único punto y al no contar con suficientes valores de pendientes y ordenadas al origen, se decidió calcular un factor que puede ser monitoreado sin importar la concentración de Solución Calibrante utilizada. Este gráfico también fue diseñado para el presente trabajo.

Factor Ocratoxina A = área / concentración sc. calibrante (ng/ml)

ANÁLISIS DE ESTABILIDAD

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Las micotoxinas son reconocidas por la bibliografía en general como moléculas muy estables. Se han estudiado ampliamente métodos para descontaminar alimentos como así también los efectos que tienen los procesos industriales en las mismas. En general, se ha visto que los que tienen un mayor impacto en la disminución de la contaminación son aquellos relacionados con la separación de las fracciones contaminadas, como los procesos de limpieza, molienda o clasificación de granos, los tratamientos térmicos de altas temperaturas como horneado, fritura y extrusión, y los tratamientos con químicos con amoníaco, bicarbonato, ácido cítrico o bisulfito de sodio. Dada la alta estabilidad térmica de las micotoxinas se necesitan temperaturas superiores a los 150°C para conseguir reducciones significativas [55]. Por otro lado, en general las micotoxinas también son estables a la luz, siendo las aflatoxinas las más fotosensibles [56].

La estabilidad de las micotoxinas que en el ámbito industrial y comercial es un factor negativo, en el ámbito analítico es una gran ventaja. Sin embargo, para el desarrollo y mantenimiento de métodos existe la necesidad de asegurar la estabilidad de las Soluciones Stock y Soluciones Calibrantes durante todo el período que son utilizadas. Los factores más comunes que afectan la concentración de micotoxina en solución son la capacidad de los solventes de degradar los analitos, la evaporación de los solventes, la temperatura, la luz UV y la capacidad de algunos analitos a adsorberse a las superficies de vidrio de frascos y viales. Además, las soluciones son almacenadas a por lo menos -18 °C pero periódicamente son descongeladas y congeladas, por lo que la degradación puede ocurrir tanto durante el almacenamiento como durante la ejecución de los métodos.

En el Departamento de Análisis Instrumental se ha implementado hasta el momento un control rudimentario de la estabilidad de las Soluciones Stock mediante espectrofotometría. La Ley de Lambert Beer establece que la cantidad de luz absorbida por una solución está directamente relacionada con la concentración del analito, la distancia que la luz debe atravesar en la muestra y el coeficiente de extinción molar. Matemáticamente se expresa como:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A = absorbancia

ϵ = coeficiente de extinción molar o absortividad molar

l = distancia que recorre la luz

El coeficiente de extinción molar es propio de cada sustancia y cuantifica la probabilidad que hay de que el fotón de una dada longitud de onda pueda ser absorbido por la sustancia. Para la cuantificación de una solución se utiliza el coeficiente de extinción molar determinado a la longitud de onda de máxima absorción y en el mismo solvente en que se encuentra la solución incógnita.

La ecuación para el cálculo de la concentración es una adaptación de la Ley de Lambert Beer:

$$c = \frac{A \cdot Fc \cdot PM \cdot FD}{\epsilon \cdot l}$$

Fc = factor de corrección

FD = factor de dilución (si corresponde)

PM = peso molecular

El proceso de cuantificación por espectrofotometría es igual para todas las micotoxinas y resulta en un sencillo procedimiento de laboratorio. En primer lugar, se debe llevar la solución a temperatura ambiente y estabilizar el espectrofotómetro. En caso de que la concentración de la solución no sea adecuada para la medición tal cuál, es necesaria una dilución. Se deben preparar diluciones para el deoxinivalenol y la ocratoxina A, mientras que la aflatoxina M1 se mide directamente la Solución Stock y las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 se miden las Soluciones Intermedia (que fueron preparadas por única vez a partir de las Soluciones Stock). Una vez listas las soluciones y el equipo se procede a realizar la determinación del Factor de Corrección con soluciones de dicromato de potasio para estimar el error sistemático. Luego se realiza el cero con el solvente adecuado y se mide por triplicado la solución incógnita. Por último, se realizan los cálculos en una planilla de cálculo utilizando la fórmula anteriormente expuesta. A continuación, se presenta el diagrama de flujo del proceso para un mayor entendimiento.

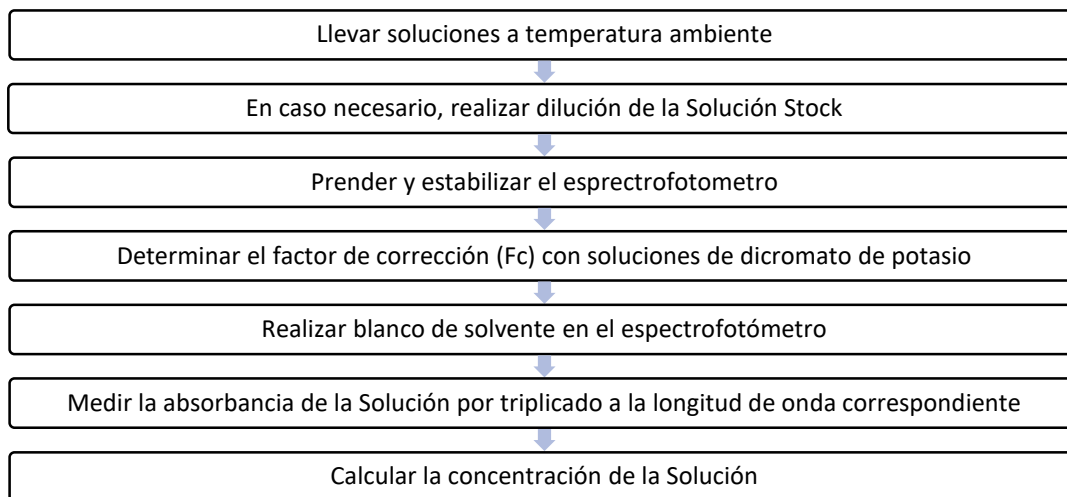


Figura 2. Diagrama de flujo de la cuantificación espectrofotométrica de micotoxinas.

ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

Un resultado de medición se encuentra incompleto si no presenta una incertidumbre asociada y se informa el factor de cobertura utilizado. Dado que un estudio intensivo de las incertidumbres de cada uno de los valores de concentración determinados espectrofotométricamente escapa a la complejidad de este trabajo y es imposible de efectuar en el marco del actual Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio, se realizará un análisis genérico para identificar las principales fuentes de incertidumbre y determinar tentativamente los valores finales de incertidumbre.

En una medición espectrofotométrica existen fuentes de error que son propias del instrumento, que denominaremos intrínsecas, y fuentes que son propias del objeto bajo estudio, que llamaremos químicas. Este tipo de mediciones puede ser considerada de alta exactitud dados los avances en tecnología y la incertidumbre combinada debido a fuentes intrínsecas puede llegar a ser menor al 1% [57].

Otra de las fuentes principales de incertidumbre del método radica en la dilución que se debe realizar al deoxinivalenol y a la ocratoxina A para obtener concentraciones dentro del rango de trabajo. A continuación, se sintetiza en un esquema de espina de pescado todas las fuentes de incertidumbre que han sido identificadas.

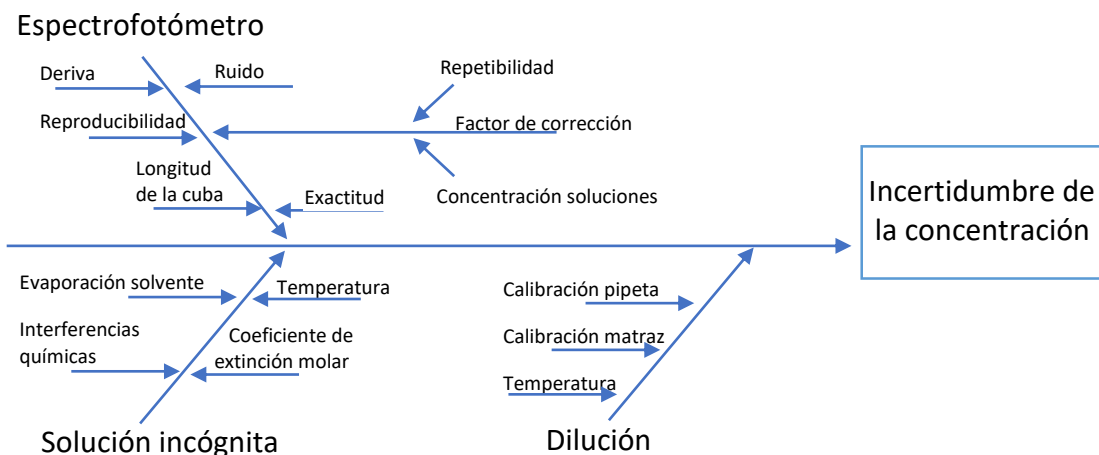


Figura 3. Espina de pescado con las principales fuentes de incertidumbre del método

Se han identificado tres fuentes principales de las llamadas químicas, ya que otras como la adsorción del analito a la caba o la degradación del analito se consideran despreciables. En ese sentido, se rescatan la evaporación del solvente de disolución que trae aparejado un aumento de la concentración del analito durante de la medición, la variación de temperatura que influye en el volumen de solvente y las interferencias químicas que por la baja especificidad de la técnica no pueden ser identificadas. Las principales interferencias presentes son los productos de degradación de las micotoxinas, por ejemplo, los isómeros de degradación.

Dentro de las fuentes de incertidumbre intrínsecas se encuentran la exactitud, la deriva, el ruido y la reproducibilidad que aportan casi despreciablemente (excepto la exactitud) a la incertidumbre final de la medición. La incertidumbre de la longitud de la cuba toma relevancia porque la absorbancia es función del trayecto recorrido por el haz de luz, sin embargo, este dato se desconoce. Por último, dentro de las fuentes asociadas al equipo encontramos la incertidumbre del factor de corrección. El mismo es calculado para disminuir el error sistemático de la medición y poder eliminar ciertas fuentes de incertidumbre, pero al ser un valor experimental tiene asociado su propia incertidumbre. A grandes rasgos sus principales fuentes son la repetibilidad y la concentración de las soluciones. A continuación, se calculan las incertidumbres de los factores intrínsecos según los datos del fabricante asignándole distribuciones rectangulares ya que no se cuenta con información sobre sus procedimientos de cálculo [58]:

$$u(exac) = \frac{0,05}{\sqrt{3}} = 0,02887$$

$$u(reprod) = \frac{0,001}{\sqrt{3}} = 0,000577$$

$$u(deriva) = \frac{0,001}{\sqrt{3}} = 0,000577$$

$$u(ruido) = \frac{0,0001}{\sqrt{3}} = 0,0000577$$

El coeficiente de extinción molar de la ocratoxina A publicado en bibliografía no tiene una incertidumbre asociada, como sí está presente para varias otras micotoxinas. A partir de los valores de incertidumbre relativa de los coeficientes de extinción molar de 7 micotoxinas encontrados en distintos trabajos [59] [60] [61] se ha obtenido un promedio de incertidumbre porcentual de 2,5 %, por lo tanto, con este valor se estima la incertidumbre del coeficiente de extinción molar de $(5440 \pm 136) \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Cabe destacar que dicho valor es una estimación no muy exacta, sin embargo, es mejor que ignorar la incertidumbre que presenta el coeficiente. La incertidumbre estándar absoluta se obtiene de dividir por raíz de 3 ya que el dato posee una distribución rectangular.

$$u \text{ abs(coef ext)} = \frac{136}{\sqrt{3}} = 78,52$$

Para poder combinarla con el resto de las incertidumbres estándar, se debe obtener la incertidumbre estándar relativa:

$$u(coef \text{ ext}) = \frac{78,52}{5440} = 0,01443$$

La dilución de las micotoxinas para obtener una concentración dentro del rango de trabajo del método es una fuente importante de incertidumbre. A modo de ejemplo se utilizarán valores genéricos para estimar un valor de la incertidumbre de dilución. En este caso se debe considerar la temperatura ambiente que tendrá influencia en el volumen de solvente medido y las calibraciones de los materiales volumétricos utilizados. Para el caso de la ocratoxina A 0,0885 ml (v2) de solución se llevan a 5 ml (v1) de acetonitrilo utilizando una pipeta automática de 0,250 ml y un matraz de 5 ml. Se considera que el laboratorio se mantuvo a una temperatura de $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ por lo que la densidad del acetonitrilo es de $0,7857 \text{ g/cm}^3$ ($T = 20 ^\circ\text{C}$) y tiene un coeficiente de expansión de $1370 \times 10^{-6} ^\circ\text{C}^{-1}$. Se considera que la expansión volumétrica tiene una distribución rectangular por lo que corresponde dividirla por raíz de 3. Por otro lado, de los certificados de calibración de una pipeta automática de 0,250 ml y un matraz de 5 ml se obtienen los datos de repetibilidad, calculada como el desvío estándar de 10 mediciones en los volúmenes nominales de 0,075 ml y 5 ml respectivamente.

La ecuación para el cálculo de la incertidumbre estándar combinada relativa de dilución es:

$$u(dil) = \sqrt{\left(\frac{u(v1)}{v1}\right)^2 + \left(\frac{u(v2)}{v2}\right)^2 + \left(\frac{u(cal1)}{cal1}\right)^2 + \left(\frac{u(cal2)}{cal2}\right)^2}$$

Donde $u(v1)$ corresponde a la incertidumbre de la expansión volumétrica de 5 ml de acetonitrilo:

$$u(v1) = 5ml \times \left(\frac{2 ^\circ\text{C} \times 1370 \times 10^{-6} ^\circ\text{C}^{-1}}{\sqrt{3}} \right)$$

$$u(v1) = 0,00791 \text{ ml}$$

De igual manera se calcula $u(v2) = 1,34 \times 10^{-4} \text{ ml}$.

Por otro lado, las incertidumbres de asociadas a las calibraciones del material volumétrico son:

$$u(cal1) = \frac{0,009424 \text{ ml}}{\sqrt{10}}$$

$$u(cal1) = 0,00289 \text{ ml}$$

De igual manera se calcula $u(cal2) = 2,08 \times 10^{-4} \text{ ml}$.

Por último, para calcular la incertidumbre estándar combinada absoluta se usa:

$$u(dil) = \sqrt{\left(\frac{u(v1)}{v1}\right)^2 + \left(\frac{u(v2)}{v2}\right)^2 + \left(\frac{u(cal1)}{cal1}\right)^2 + \left(\frac{u(cal2)}{cal2}\right)^2}$$

$$u(dil) = \sqrt{\left(\frac{0,00791 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{1,34 \times 10^{-4} \text{ ml}}{0,085 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0,00289 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{2,08 \times 10^{-4} \text{ ml}}{0,075 \text{ ml}}\right)^2}$$

$$u(dil) = 0,003639$$

Finalmente es necesario combinar las incertidumbres estándar relativas analizadas hasta el momento para obtener la incertidumbre estándar relativa combinada del método.

$$u = \sqrt{u(exact)^2 + u(reprod)^2 + u(deriva)^2 + u(ruido)^2 + u(coef\ ext)^2 + u(dil)^2}$$

$$u = \sqrt{0,02887^2 + 0,000577^2 + 0,000577^2 + 0,0000577^2 + 0,01443^2 + 0,003639^2}$$

$$u = 0,03249$$

Para calcular la incertidumbre relativa expandida se toma un factor de cobertura $k = 2$ para obtener un intervalo de confianza del 95%.

$$U = u \cdot k$$

$$U = 0,03249 \cdot 2$$

$$U = 0,06498 = 6,5 \%$$

Las principales fuentes de incertidumbre son la exactitud propia del equipo y el coeficiente de extinción molar, y un orden menor la incertidumbre de dilución. A continuación, se analiza el caso de las micotoxinas que no son diluidas, todo el resto de las fuentes se mantienen constantes. Se toma de ejemplo la aflatoxina B1 que tiene un coeficiente de extinción molar de $(20721 \pm 819,35) \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ determinado a partir de 12 datos de un estudio interlaboratorio.

$$u\ abs(coef\ ext) = \frac{819,35}{\sqrt{12}} = 236,5$$

$$u(coef\ ext) = \frac{236,5}{20721} = 0,01141$$

La ecuación de incertidumbre estándar relativa combinada es:

$$u = \sqrt{u(exact)^2 + u(reprod)^2 + u(deriva)^2 + u(ruido)^2 + u(coef\ ext)^2}$$

$$u = \sqrt{0,02887^2 + 0,000577^2 + 0,000577^2 + 0,0000577^2 + 0,01141^2}$$

$$u = 0,03105$$

Con un factor de cobertura de $k = 2$ para un intervalo de confianza del 95 % se obtiene la incertidumbre expandida $U = 0,06210$, o 6,2 %. Este valor es levemente menor que el calculado para los métodos que incluyen dilución (6,5 %), esto es debido a que esta fuente es un orden menor que la exactitud y el coeficiente por lo que su eliminación no tiene un impacto significativo en la incertidumbre relativa expandida.

COMPARACIÓN DE RESULTADOS

El principal interrogante respecto al control espectrofotométrico de las Soluciones Stock radica en las conclusiones que pueden ser inferidas a partir de los datos. De modo general se busca chequear si la estabilidad de las soluciones se ha mantenido en el tiempo, es decir, si ha

cambiado la concentración. En tal sentido, una vez obtenido el dato nuevo se debe comparar con alguna otra concentración anterior a fin de determinar si hubo variación y su magnitud.

Distintos autores han utilizado las directivas del Manual de la Garantía de la Calidad Analítica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Abastecimiento de Brasil donde se establece que una variación del 3% de la concentración de micotoxina en solución respecto a la última medición en un valor aceptable [62]. Mientras que en un estudio el tiempo de almacenamiento prolongado ha sido establecido en 14 meses [63], en otros no se especifica cuál es el período de análisis [64]. En principio, este valor es considerado como muy permisivo, ya que una variación interanual del 3 % en la concentración de las Soluciones Stock no es viable para sostener un método analítico acreditado donde dichas soluciones han sido utilizadas durante años obteniéndose resultados satisfactorios en estudios interlaboratorios. De todas formas, es una referencia válida sobre la que pueden ser analizados los resultados de este trabajo.

El valor de referencia óptimo para comparar las mediciones espectrofotométricas es la concentración inicial con su incertidumbre asociada, es decir, la concentración obtenida de disolver una masa dada con un volumen de solvente. Sin embargo, no es posible conocer este valor ya que no se tienen los datos para poder calcularlo. Para conocer la concentración lo más exactamente posible se necesita la masa real de micotoxina que fue disuelta, no solo el valor nominal con el que es comercializado. Por otro lado, las principales fuentes de error para calcular la incertidumbre de dicha concentración son la incertidumbre de la balanza con que fue pesada la masa, la incertidumbre del material volumétrico con el que se midió el volumen de solvente y la pureza de la micotoxina [65].

En conclusión, se analizan los datos históricos obtenidos de las mediciones espectrofotométricas con las incertidumbres calculadas para evaluar la presencia de tendencias y comparando la variación porcentual entre el primer y el último dato obtenido.

ANÁLISIS DE RESULTADOS HISTÓRICOS

La práctica de cuantificar las Soluciones Stock mediante espectrofotometría en el Departamento de Análisis Instrumental es un proceso que se encuentra en distintas etapas de desarrollo para cada micotoxina. Las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 han sido analizadas desde el 2007 y la aflatoxina M1 desde el 2014, todas aproximadamente una vez al año. Esta cuantificación ha sido utilizada para establecer un nuevo valor de concentración de la solución y se ha utilizado este valor para recalcular los volúmenes necesarios para la preparación de las Soluciones Intermedias y Soluciones Calibrantes.

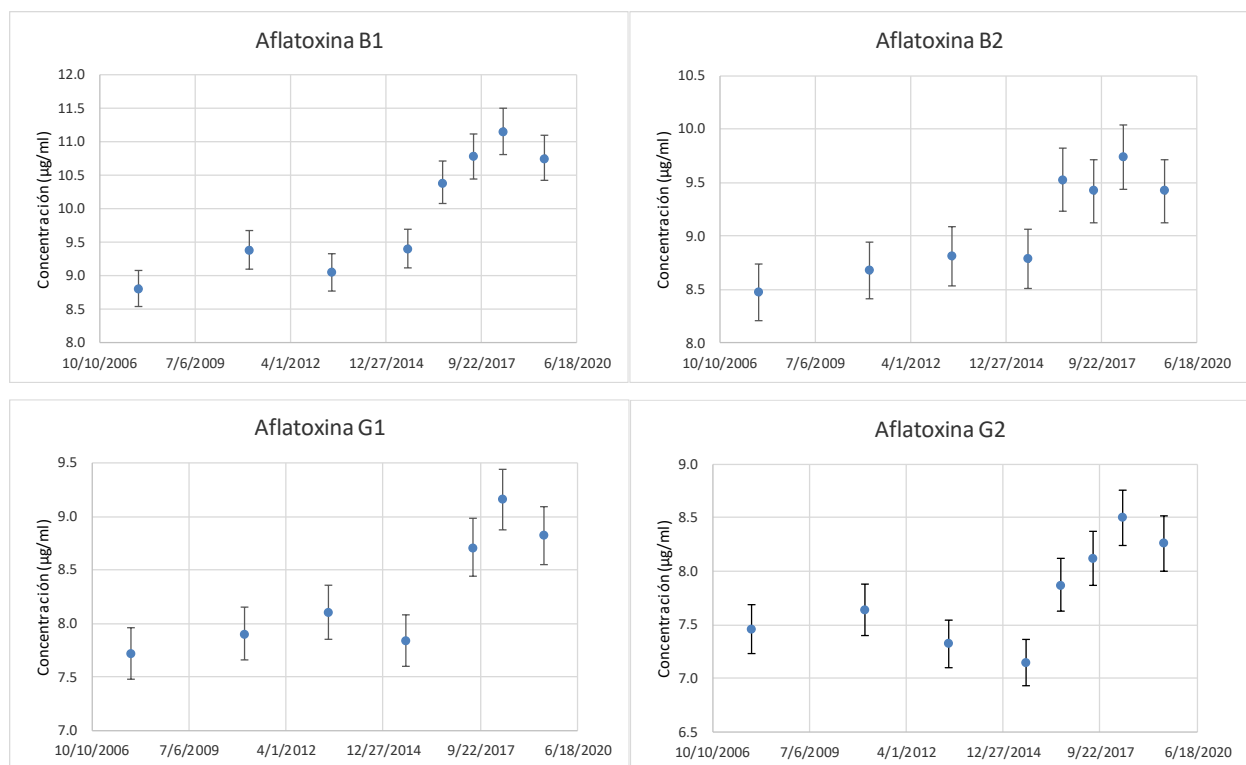


Figura 4. Concentraciones de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 cuantificadas espectrofotométricamente a través de los años. Incertidumbre de 6,2 % en todos los casos ($k = 2$).

Se observa que las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 mantuvieron concentraciones constantes hasta el 2015 y a partir del 2016 hay un aumento en la concentración de todas las soluciones. Dado que las 4 soluciones son independientes pero son utilizadas en conjunto para la preparación de Soluciones Stock atraviesan los mismos procesos de descongelación y congelación y manipulación en general. Por lo tanto, es esperable que sus concentraciones se comporten de maneras similares. La diferencia entre los primeros valores medidos y los últimos se encuentran en un rango entre 11 % y 22 %. Estos valores superan ampliamente el 3 % establecido en bibliografía como un máximo de variación permitido. Cabe destacar que el método de cuantificación de aflatoxinas por HPLC para el que se usan estas soluciones se encuentra acreditado bajo la norma ISO/IEC 17025, siendo el resultado satisfactorio en un ensayo interlaboratorio de un proveedor calificado uno de los requisitos a cumplir. Evidentemente la práctica de ajustar la preparación de las Soluciones Calibrantes a los resultados espectrofotométricos obtenidos haya sido efectiva y haya compensado los desvíos aquí presentados.

La Solución Stock de aflatoxina M1 también cuenta con varias mediciones en su historia. Se pueden observar variaciones significativas en la concentración pero sin una tendencia clara, siendo la diferencia entre el primer y el último valor de 7,6 %.

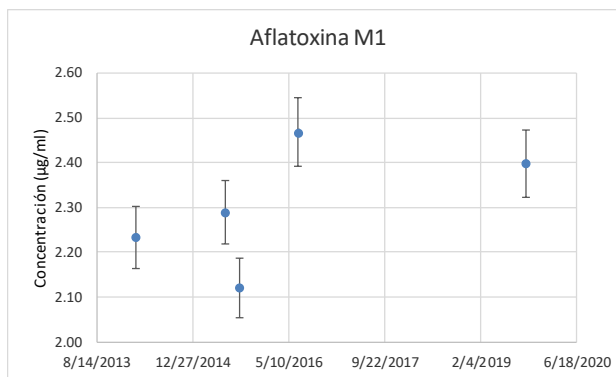


Figura 5. Concentraciones de aflatoxinas M1 cuantificada espectrofotométricamente a través de los años. Incertidumbre de 6,2 % ($k = 2$).

Por otro lado, la Solución Stock de deoxinivalenol comenzó a ser medida a partir del año 2019 cuando se encontró el valor de coeficiente de extinción molar en el solvente de dilución y una dilución adecuada para hacer la determinación. La medición se ha hecho en cuatro oportunidades para probar el método y corroborar la concentración de la Solución Stock, pero no se ha corregido el valor de concentración.

Con respecto a la ocratoxina A, la Solución Stock fue analizada en cinco oportunidades en los meses de diciembre de 2018 y enero de 2019 dentro del marco de un estudio interlaboratorio. Estos valores tampoco han sido utilizados para tomar medidas correctivas.

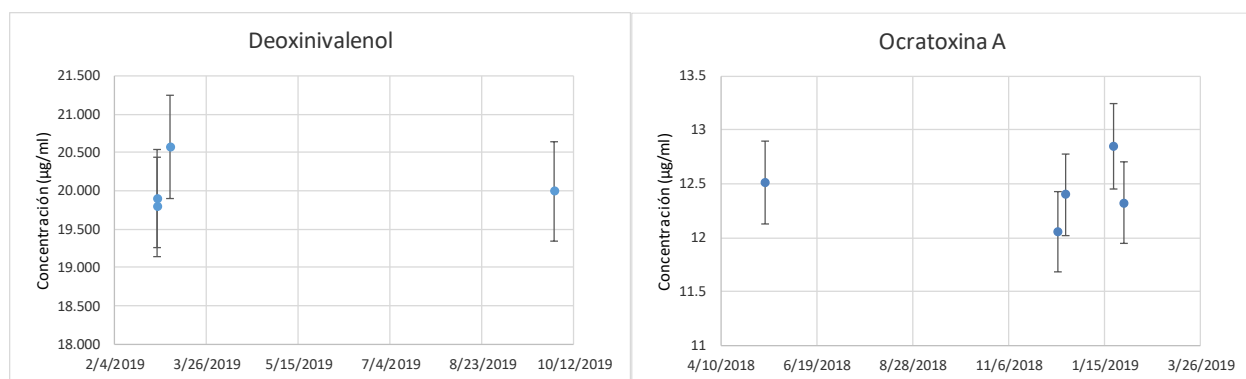


Figura 6. Concentraciones de deoxinivalenol y ocratoxina A cuantificadas espectrofotométricamente a través de los años. Incertidumbre de 6,5 % ($k = 2$).

Para estas dos micotoxinas las concentraciones no presentan variaciones significativas al contemplar las incertidumbres. Estas mediciones se han realizado en un período de tiempo mucho menor que las aflatoxinas, por lo tanto, las condiciones de análisis han sido muy similares entre las distintas mediciones. Las diferencias entre la primer y la última medición son de 1,5 % para la ocratoxina A y de 1,0 % para el deoxinivalenol.

Finalmente, no es posible realizar el análisis de las fumonisinas por espectrofotometría ya que estos compuestos carecen de cromóforos que son los sitios de las moléculas que absorben la luz y permiten este tipo de determinaciones.

PDCA: IMPLEMENTACIÓN DE MEJORAS

Para desarrollar la presente sección “Análisis de Estabilidad” se han estudiado en profundidad el método espectrofotométrico, su incertidumbre y los resultados históricos obtenidos para todas las micotoxinas en el que se aplica. Más allá de las deducciones a las se ha llegado hasta el momento, la principal conclusión a la que se arriba es la necesidad de implementar mejoras en todo el proceso de cuantificación de las Soluciones Stock a fin de poder asegurar su estabilidad.

En el Departamento de Análisis Instrumental hasta el momento se han tratado los métodos espectrofotométricos independientemente para cada micotoxina, ignorando la similitud de estos y sin profundizar demasiado ya que son considerados métodos relativamente sencillos. Sin embargo, se han encontrado oportunidades de mejora en distintos aspectos, tanto en lo relativo a lo experimental, estadístico, documental, registros y recursos humanos. Se propone un esquema de trabajo para la mejora continua basado en el ciclo PDCA con sus etapas características a fin de llevar adelante un proceso ordenado. En primer lugar, se deben planificar los objetivos y las tareas que se llevarán a cabo para alcanzarlos. Luego se realiza la ejecución de dichos planes, seguido por evaluar y monitorear si los objetivos han sido alcanzados y en qué medida para por último confirmar y mantener los resultados positivos o evaluar la posibilidad de realizar nuevos planes para corregir desvíos que se hayan presentado. A continuación, se resume la primera etapa del plan de trabajo, plasmando los objetivos y tareas para las principales oportunidades de mejora:

- Objetivo: estandarizar los procedimientos de medición.
Tarea: redactar Instructivos de Trabajo e incorporarla al Sistema de Gestión de Calidad.
- Objetivo: homogenizar y estandarizar los procesos de cálculo y registro de resultados.
Tarea: preparar hoja de cálculo funcional para todas las micotoxinas e incorporarla al Sistema de Gestión de Calidad.
- Objetivo: obtener pruebas objetivas y experimentales de que los métodos cumplen con los requisitos para cumplir con el uso propuesto.
Tarea: validar los métodos.
- Objetivo: establecer la incertidumbre de los resultados para poder realizar comparaciones.
Tarea: calcular las incertidumbres de los métodos.
- Objetivo: aplicar control estadístico de procesos para detectar desvíos y tomar acciones correctivas.
Tarea: preparar gráficos de control y árbol de decisiones.
- Objetivo: contar con recursos humanos idóneos para realizar los métodos.
Tarea: capacitar al personal y registrar la habilitación para realizar los métodos.

CONCLUSIONES

La presencia de micotoxinas en materias primas y productos terminados es un problema a nivel mundial que afecta tanto en lo sanitario como en lo económico. Los países deben realizar grandes inversiones para legislar y controlar los alimentos que comercializa y que consume su población. El INTI, como organismo del Estado, brinda servicios de determinación de micotoxinas desde hace décadas y en los últimos años ha incrementado su participación en proyectos para desarrollar la metrología en micotoxinas.

Los Materiales de Referencia Certificados son herramientas fundamentales para establecer trazabilidad en cualquier determinación físico-química. Sin embargo, no se encuentran disponibles para todas las micotoxinas y los existentes tienen un costo prohibitivo para su uso en análisis de rutina. El uso de Materiales de Referencia no certificados en combinación de otras herramientas de calidad, como estudios interlaboratorios y MRC en matriz, permiten alcanzar niveles de calidad de los resultados suficientes para los usos cotidianos previstos. La verificación diaria de parámetros como la temperatura de almacenamiento y el uso de cartas de control para detectar desvíos en las Soluciones Calibrantes preparadas a partir de las Soluciones Stock resultan en un efectivo control.

Por más que es ampliamente reconocido que las micotoxinas son moléculas muy estables es necesario asegurar que la concentración de Soluciones Stock no varíe en el tiempo. Para ello se pueden realizar mediciones espectrofotométricas y establecer un valor de concentración con una incertidumbre asociada. El proceso para estimar la incertidumbre para cada micotoxina es complejo e intervienen fuentes de error propias del instrumento, del objeto en estudio y del procedimiento analítico, entre otras. Del análisis realizado se desprende que las fuentes más significativas son la exactitud del equipo, el proceso de dilución de las soluciones y el coeficiente de extinción molar. Se obtuvieron incertidumbres porcentuales expandidas ($k = 2$) de 6,5 % y 6,2 % para los métodos que incluyen dilución y los que no incluyen dilución respectivamente. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio de incertidumbres para realizar una caracterización individual para cada analito, identificar otras fuentes no analizadas hasta el momento y finalmente, optimizar el método para minimizar la incertidumbre.

Una vez obtenidas las concentraciones con sus incertidumbres fue posible realizar una evaluación de estabilidad de las Soluciones Stock a partir de los datos históricos. Las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y la aflatoxina M1 presentaron variaciones significativas, las primeras con un aumento de la concentración en el tiempo, mientras que las segundas no presentaron una tendencia clara. El deoxinivalenol y la ocratoxina A poseen pocas mediciones y fueron realizadas todas en el último tiempo, estas no presentan variaciones significativas. Sin embargo, incertidumbres de la magnitud de las asignadas no permiten percibir variaciones sutiles, como por ejemplo, el 3 % que la bibliografía indica que no deberían superar.

Finalmente, se planteó la necesidad de implementar mejoras en distintos aspectos del método bajo un formato de ciclo PDCA. Con el objetivo de optimizar los recursos disponibles y estandarizar los procesos se definieron seis objetivos y las tareas para alcanzarlos y sólo cumpliéndolos será posible evaluar eficientemente la estabilidad de las soluciones.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Poder Ejecutivo Nacional., DECRETO-LEY 17138/1957, Buenos Aires, Argentina, 27/12/57.
- [2] «INTI,» [En línea]. Available: <https://www.inti.gob.ar/conoces-al-inti>. [Último acceso: 31 5 2020].
- [3] «INTI,» [En línea]. Available: <http://www2.inti.gob.ar/web/noticiero.jsp?idNoticia=1134>. [Último acceso: 31 5 2020].
- [4] M. Cirio, M. Villarreal, T. Lopez Seal, M. Simón, C. Smersu y E. Kneeteman, «Incidence of Deoxynivalenol in Wheat Flour in Argentina and GC-ECD Method Validation,» J AOAC Int, vol. 102 (6), pp. 1721-1724, 2019.
- [5] M. Phillips, T. López Seal, J. Ness y K. Zhang, «Development and Characterization of a Multimycotoxin Reference Material,» Journal of AOAC INTERNATIONAL, vol. 102(6), pp. 1642-1650, 2019.
- [6] E. Rego, M. Simon, X. Li, X. Li, A. Daireaux, T. Choteau, S. Westwood, R. Josephs, R. Wielgosz y V. Cunha, «Mycotoxin metrology: Gravimetric production of zearalenone calibration solution,» Journal of Physics: Conference Series, vol. 975, pp. 26-29, 2018.
- [7] M. Mom, S. Romero, A. Larumbe, L. Iannone, R. Comerio, C. Santana Smersu, M. Simón y G. Vaamonde, «Microbiological quality, fungal diversity and aflatoxins contamination in carob flour (*Prosopis flexuosa*),» Inter J Food Micro, vol. 326, 2020.
- [8] W. Bryden, «Mycotoxins in the food chain: Human health implications,» Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, vol. 16, nº 1, pp. 95-101, 2007.
- [9] J. Miller, «Miller, J.D., 1998. Global significance of mycotoxins. In: Miraglia, M., van Mycotoxins and Phycotoxins: Developments in Chemistry,» Tox & Food Saf, 1998, pp. 3-15.
- [10] F. Wu, «Mycotoxin Risk Assessment for the Purpose of Setting International Regulatory Standards,» Environ. Sci. Technol., vol. 38, nº 15, pp. 4049-4055, 2004.
- [11] W. Bryden, «Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security,» Animal Feed Sc and Tech, vol. 173, pp. 134-158, 2012.
- [12] F. Cheli, L. Pinotti, L. Rossi y V. Dell'Orto, «Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review,» LWT - Food Science and Technology, vol. 54, nº 2, pp. 307-314, 2013.
- [13] J. Buzby, «International Trade and Food Safety: Economic Theory and Case Studies,» Agricultural Economic Report, vol. 828, 2003.
- [14] C. A. Argentino, «http://www.conal.gob.ar/ultimas_modificaciones/Capitulo_III.pdf,» [En línea]. [Último acceso: 2020 5 15].
- [15] Secretaría de Regulación y Gestión Sanitaria y la Secretaría de Alimentos y Bioeconomía de la República Argentina, Resolución Conjunta 22/2019, Buenos Aires, 2019.
- [16] FAO, «Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003,» FOOD AND NUTRITION PAPER, vol. 81, 2004.

- [17] M. E. Zain, «Impact of mycotoxins on humans and animals,» *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 15, pp. 129-144, 2011.
- [18] M. Klich, «*Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin.,» *Mol. Plant Pathol.*, vol. 8, p. 713–722, 2007.
- [19] G. Shephard, «Risk assessment of aflatoxins in food in Africa.,» *Food Addit. Contam.*, vol. 25, p. 1246–1256, 2008.
- [20] J. Cullen y P. Newberne, «The Toxicity of Aflatoxins.,» *Human Health, Veterinary and Agricultural Significance.*, pp. 3-26, 1994.
- [21] World Health Organization y International Agency for Research of Cancer, «Aflatoxins,» de *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon, France, IARC Press, 1993, p. 245–395.
- [22] J. Zhang, N. Zheng, J. Liu, F. Li, S. Li y J. Wang, «Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells,» *Food Chem. Toxicol.*, vol. 83, pp. 54-60, 2015.
- [23] JECFA, «Aflatoxin M1. JECFA Monographs 2001, 47,» 21 5 2020. [En línea]. Available: www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm.
- [24] A. Veldman, J. Meijs, G. Borggreve y J. Heeres-van der Tol, «Carry-over of aflatoxin from cows food to milk,» *Anim. Sci.*, vol. 55, pp. 163-168, 1992.
- [25] JECFA, «Safety evaluation of certain mycotoxins in Food. Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives,» de *WHO Food Additives Series 47 – FAO Food and Nutrition Paper – IPCS- International Programme on Chemical Safety*, Ginebra, Suiza, 2001.
- [26] B. Belluco, A. Costa de Camargo, E. Micotti da Gloria, C. T. dos Santos Dias, D. C. Button y M. Calori-Domingues, «Deoxynivalenol in wheat milling fractions: A critical evaluation regarding ongoing and new legislation limits,» *Journal of Cereal Science*, vol. 77, pp. 284-290, 2017.
- [27] J. Bennett y M. Klich, «Mycotoxins,» *Clin Microbiol Rev.*, vol. 16, nº 3, p. 497–516, 2003.
- [28] J. Pestka y A. Smolinski, «Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans,» *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, vol. 8, nº 1, pp. 39-69, 2005.
- [29] P. Scott, «Recent research on fumonisins: A review.,» *Food Addit. Conta.*, pp. 242-248, 2012.
- [30] A. Waskiewicz, M. Beszterda y P. Golinski, «Occurrence of fumonisins in food - An interdisciplinary approach to the problem.,» *Food Control*, vol. 26, pp. 491-499, 2012.
- [31] A. Blacutt, S. Gold, K. Voss, M. Gao y A. Glenn, «*Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize.,» *Phytopathology*, vol. 108, pp. 312-326, 2018.
- [32] W. Marasas, T. Kellerman, W. Gelderblom, J. Coetzer, P. Thiel y J. van der Lugt, «Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort,» *J. Vet. Res.*, vol. 55, pp. 197-203, 1988.
- [33] W. Haschek, L. Gumprecht, G. Smith, M. Tumbleson y P. Constable, «Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives,» *Environ. Health Perspect.*, vol. 109 (Suppl. 2), pp. 251-257, 2001.

- [34] C. Wild, J. Miller y J. Groopman, «Mycotoxin Control in Low and Middle Income Countries,» de IARC Working Group Report #9, Lyon, France, 2015.
- [35] IARC, «Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins,» de IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 56, Lyon, France, 1993, pp. 445-466.
- [36] World Health Organization, «EVALUATION OF CERTAIN,» de Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Ginebra, Suiza.
- [37] IARC, «IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human,» Lyon, France, 1993.
- [38] JECFA, «Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives,» de WHO Technical Report Series No. 859, 1995.
- [39] E. O'Brien y D. R. Dietrich, «Ochratoxin A: The continuing enigma,» Crit. Rev. Toxicol., vol. 35, pp. 33-60, 2005.
- [40] T. B. WHITAKER, «Sampling Foods for Mycotoxins,» Food Additives and Contaminants, vol. 23(1), pp. 50-61, 2006.
- [41] B. Gilbert-Lopez, J. Garcia-Reyes y A. Molina-Diaz, «Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review,» Talanta, vol. 79, pp. 109-128, 2009.
- [42] H. Yao, Z. Hruska y J. Di Mavungu, «Developments in detection and determination of aflatoxins,» World Mycotoxin Journal, vol. 8 (2), pp. 181-191, 2017.
- [43] M. Holcomb, D. Wilson, M. Trucksess y H. Thompson, «Determination of Aflatoxins in Food Products by Chromatography,» J Chromatogr, Vols. %1 de %2624 (1-2), pp. 341-352, 1992.
- [44] H. Valenta, «Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids,» J. Chromatogr. A, vol. 815, p. 75, 1998.
- [45] N. W. Turnera, S. Subrahmanyamb y S. A. Piletskyb, «Analytical methods for determination of mycotoxins: A review,» Analytica Chimica Acta, vol. 632, pp. 168-180, 2009.
- [46] P. M. Scott, «Mycotoxin methodology,» Food Addit & Contam., vol. 12:3, pp. 395-403, 1995.
- [47] ISO/IEC, «ISO/IEC 17025:2017,» de Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, Ginebra, Suiza, 2018-03, p. 32.
- [48] Centro Español de Metrología, «Conceptos fundamentales y generales,» de Vocabulario Internacional de Metrología, VIM, 3ª edición 2012, p. 88.
- [49] P. Masson, «Quality control techniques for routine analysis with liquid chromatography in laboratories,» Journal of Chromatography A, vol. 1158, pp. 168-173, 2007.
- [50] T. Engelhard, E. Feller y Z. Nizri, «A comparison of the complimentary and different issues in ISO/IEC 17025 and OECD GLP,» Accred. Qual. Assur., vol. 8, pp. 208-211, 2002.
- [51] J. Ermer y H. Ploss, «Validation in Pharmaceutical Analysis. Part II: Central Importance of Precision to Establish Acceptance Criteria and for Verifying and Improving the Quality of Analytical Data,» J. Pharm. Biomed., vol. 37, p. 859, 2005.
- [52] H. Albazzaz y X. Z. Wang, «Statistical Process Control Charts for Batch Operations Based on Independent Component Analysis,» Ind. Eng. Chem. Res., vol. 43, nº 21, p. 6731-6741, 2004.

- [53] E. T. S. Skibsted, H. F. M. Boelens, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, N. W. Broad, D. R. Rees y D. T. Witte, «Net Analyte Signal Based Statistical Quality Control,» *Anal. Chem.*, vol. 77, nº 22, pp. 7103-7114, 2004.
- [54] Departamento de Análisis Instrumental, «Determinación de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 por HPLC-Kobra Cell,» vol. Revisión 7.
- [55] L. Bullerman y A. Bianchini, «Stability of mycotoxins during food processing,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 119, pp. 140-146, 2007.
- [56] E. Diao, X. Li, Z. Zhang, W. Ma, N. Ji y H. Dong, «Ultraviolet irradiation detoxification of aflatoxins,» *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 42, pp. 64-69, 2015.
- [57] E. Meehan, «Treatise on analytical chemistry. Part 1, Vol 7,» de *Optical methods of analysis.*, New York, Elving, PJ; Meehan, EJ; Kolthoff, IM, 1981, pp. 53-157.
- [58] P. Elmer, «Specifications UV/visible spectroscopy LAMBDA 265, 365, 465,» [En línea]. Available: https://www.s4science.at/wordpress/wp-content/uploads/2018/10/Lambda-265_365_465-Specifications_English.pdf. [Último acceso: 9 7 2020].
- [59] S. Nesheim, M. W. Trucksess, S. W. Page, J. Greer, J. M. Hurley y F. S. Suggs, «Molar Absorptivities of Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Acetonitrile, Methanol, and Toluene-Acetonitrile (9 + 1),» *Journal of AOAC International*, vol. 82, nº 2, pp. 251-258, 1999.
- [60] R. Krska, P. Schubert-Ullrich, R. D. Josephs, H. Emteborg, G. Buttinger, H. Pettersson y D. Chan, «Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 388, nº 5-6, pp. 1215-1226, 2007.
- [61] R. Josephs, R. Krska, S. MacDonald, P. Wilson y H. Pettersson, «Preparation of a Calibrant as Certified Reference Material for Determination of the Fusarium Mycotoxin Zearalenone,» *J AOAC Int.*, vol. 86, nº 1, pp. 50-60, 2003.
- [62] Ministerio de Agricultura, Abastecimiento y Pesca de Brasil. «Manual de Garantía de la Calidad Analítica,» Brasilia, Brasil, 2011.
- [63] M. Kiseleva, Z. Chalyy, I. Sedova y I. Aksenov, «Stability of Mycotoxins in Individual Stock and Multi-Analyte Standard Solutions,» *Toxins*, vol. 12, nº 94, 2020.
- [64] P. D. Andrade, R. R. Dantas y C. E. D. Moura-Alves Tlds., «Determination of multi-mycotoxins in cereals and of total fumonisins in maize products using isotope labeled internal standard and liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive ionization,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1490, pp. 138-147, 2017.
- [65] R. D. Josephs, R. Krska, S. MacDonald, P. Wilson y H. Pettersson, «Production of a calibrant certified reference material for determination of the estrogenic mycotoxin zearalenone,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 378, nº 5, pp. 1182-1189, 2004.
- [66] M. Maresca, «From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol,» *Toxins (Basel)*, vol. 5, nº 4, pp. 784-820, 2013.

ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEOXINIVALENOL

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

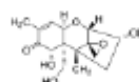
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Deoxynivalenol

Product Number: D0168
Batch Number: 037M4077V
Brand: SIGMA
CAS Number: 51481-10-8
Formula: C₁₅H₂₀O₆
Formula Weight: 296.32 g/mol
Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
Quality Release Date: 27 AUG 2014
Recommended Retest Date: AUG 2018



Test	Specification	Result
Appearance (Form)	Powder	Powder
Appearance (Colour)	White to White w/ Yellow Cast	White
Solubility (Solvent)	Ethanol	Ethanol
Solubility (Conc)	9.80 - 10.20 mg/ml	10.00 mg/ml
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Colorless
Water (by Karl Fischer)	≥ 0.00 %	0.41 %
Elemental Anal. (%C anhydrous)	60.30 - 61.30 %	61.27 %
NMR (Solvent)	CDCl ₃	CDCl ₃
Identity by NMR	Consistent	Consistent with Structure
Purity (TLC)	≥ 98.00 %	99.00 %
Initial Melting Point	≥ 151 °C	152 °C
Final Melting Point	≤ 159 °C	155 °C

Theo Ackermann

Theo Ackermann PhD MScEng QGM
Manager, Quality and Regulatory Affairs
Jerusalem, Israel IL

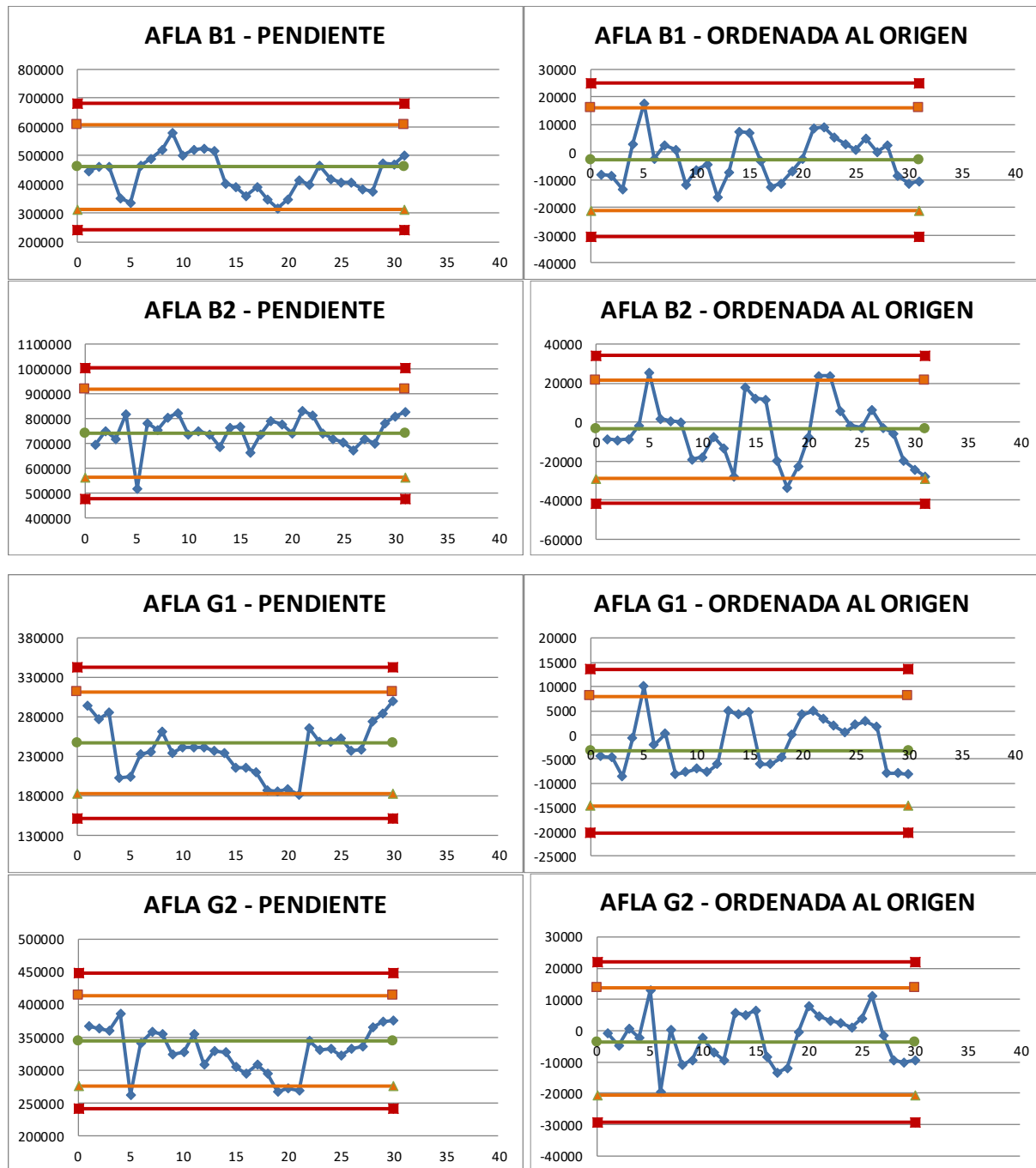
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

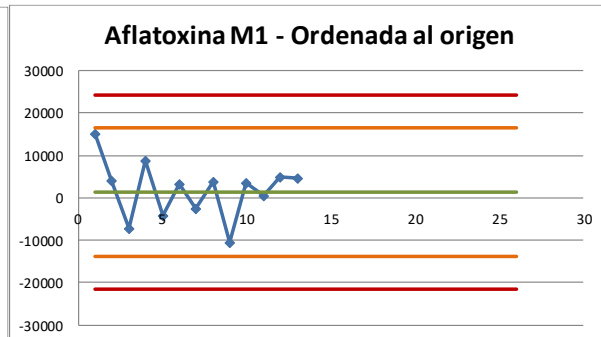
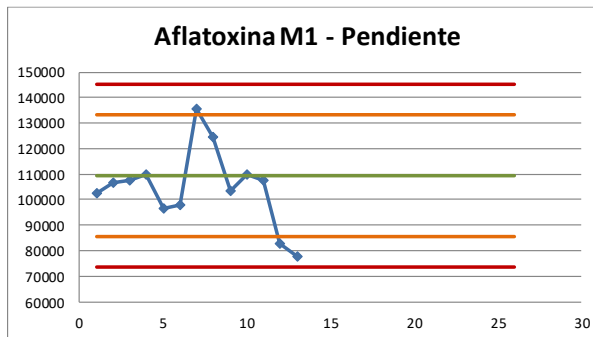
Page 1 of 1

ANEXO B – CARTAS DE CONTROL DE LOS PROCESOS DE CALIBRACIÓN

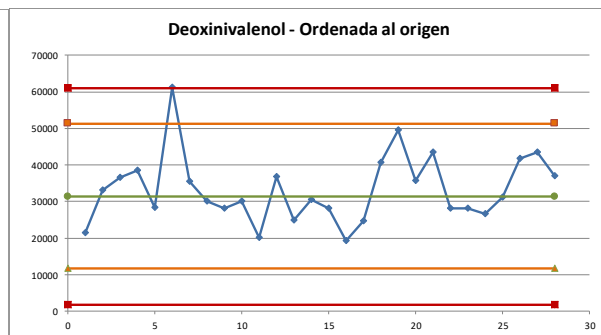
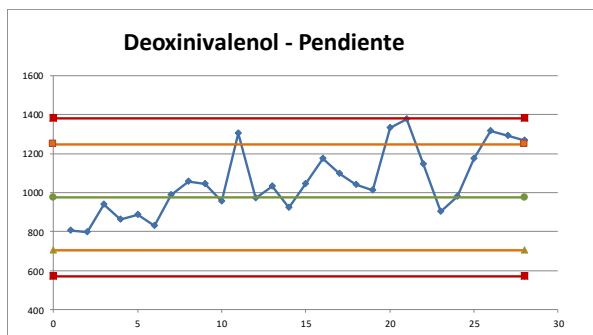
Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2



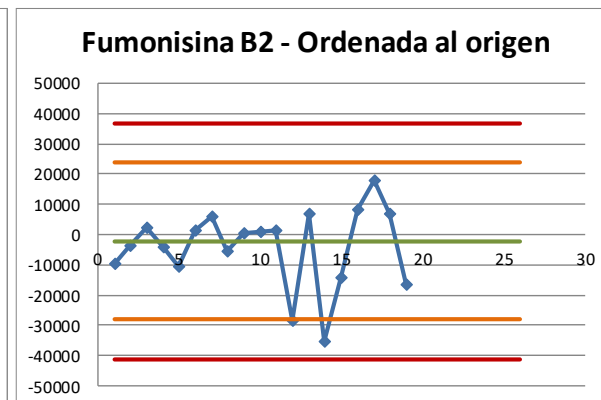
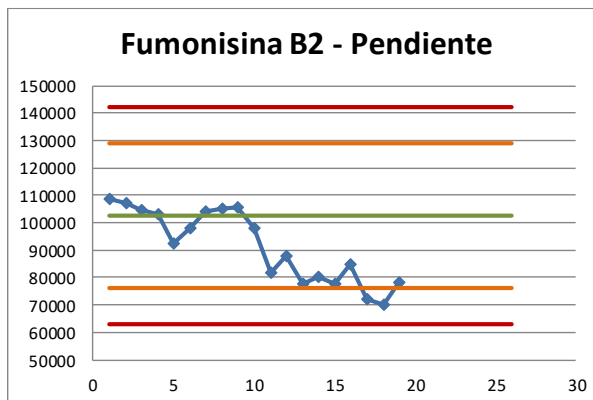
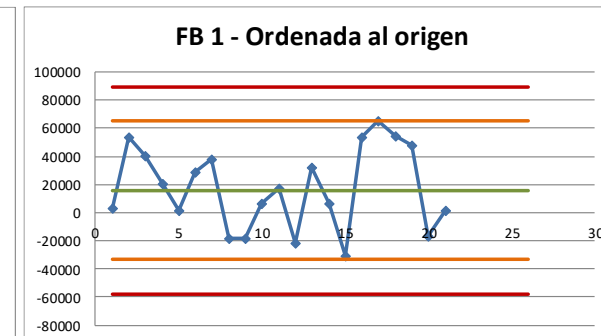
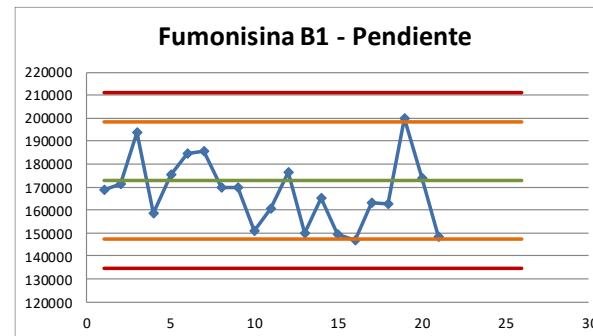
Aflatoxina M1



Deoxinivalenol



Fumonisin B1 y B2



Ocratoxina A

