



---

---

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS**

**“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TESIS**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA  
DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE TRES MICOTOXINAS  
POR ELECTROFORESIS CAPILAR.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. Xiomara Zavala Sánchez.**

**ASESOR DE TESIS:**

**D en C. Virginia A. Robinson Fuentes.**



**Morelia, Michoacán. Julio 2019**



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**TESIS**

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN  
SIMULTÁNEA DE TRES MICOTOXINAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Presenta:**

Q.F.B. Xiomara Zavala Sánchez.

**Asesor de tesis:**

D en C. Virginia A. Robinson Fuentes.

Morelia, Michoacán. Julio ,2019.

El Comité Tutorial designado por la  
División de Estudios de Posgrado de la  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
“Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Aprobó la tesis presentada por:

**Química Farmacobióloga Xiomara Zavala Sánchez**

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado  
Maestría en Ciencias de la Salud de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Acreditado en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad  
CONACYT como programa consolidado.



La autora de esta tesis, es estudiante de la Facultad de Ciencias  
Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” Universidad Michoacana de  
San Nicolás de Hidalgo.

Agradece al CONACYT la beca que le fue otorgada para la realización  
de la Maestría en Ciencias de la Salud (Registro de becario: 618535) y  
la Beca Mixta de Movilidad en el Extranjero del programa CONACYT de  
Becas de Inversión en el Conocimiento 2018 -marzo 2019, otorgada  
para la realización de la estancia en el Instituto de Química Orgánica y  
Bioquímica de la universidad de la ciudad de Praga, Republica Checa,  
(01 de septiembre a 31 de noviembre 2018).

## DEDICATORIAS

Dedico mi trabajo a Dios por ser mi fortaleza e inspiración, por permitirme cumplir con una de mis metas más anheladas.

A mis padres y mi hermano, quienes siempre estuvieron para escucharme, animarme y aconsejarme. Mi pequeña gran familia que cuando me estuve de estancia fuera del país tuvieron temor de mi seguridad, pero aun así estuvieron apoyándome de todas las formas que podían y me decían día con día lo fuerte que era. Mi mamá y sus oraciones que fueron ángeles que me envolvieron y me cuidaron siempre, mi papá y su carácter fuerte que dejó a un lado para apoyarme en este proceso y demostrarme su amor. Mi hermano, mi confidente, mi guía y mi ejemplo a seguir que desde niña lo he admirado y sé que siempre puedo contar con él, sabe decirme las palabras que necesito escuchar en todo momento. Ellos, quienes me repiten siempre que puedo lograr todo lo que me proponga y desee.

A mi familia, mis tíos de Lázaro Vijen, Jave y Reyna, que siempre se han preocupado por mí y me cuidan como una hija, mis tíos de México quienes me cuidaron y se preocuparon por mí, me hospedaron y me trataron como una más de sus hijas antes de partir y al regresar de mi estancia, así como siempre me desean lo mejor.

Mis primos Diana, Pati, Kerry, Pello, Memo, Checo, Pao, Lau y Paty; quienes han estado durante este proceso conmigo, mandándome buenas vibras, creen en mí y me apoyan, siempre hay un mensaje o una buena plática para animarme, reírnos o porque no, bulliarme, por esas aventuras o fiestitas que son inolvidables, todos a su manera me demuestran su sentir que están ahí para mí y todo eso fue importante para cumplir esta meta.

Mis pequeñas sobrilatasos Any y Ale porque sus sonrisas, locuras y travesuras siempre me levantan el ánimo.

Mi tío Checo quien está pendiente de mí siempre, me demuestra su admiración y la fe que me tiene, siempre tiene un buen consejo, una buena conversación y muchos ánimos para no darme por vencida jamás. Mi tío quien también es mi amigo y como un padre al preocuparse por mí.

Mis amigos que estuvieron junto a mi durante este proceso, que han visto en mi la gran capacidad que tengo y fortaleza aún más de lo que yo misma veo en mí; esos amigos que me dieron una palabra de aliento, estuvieron para escucharme en mi frustración o cuando me perdí en algún momento de este proceso, o me deprimí por alguna razón externa, pero estuvieron para recordarme lo fuerte que soy. Se las dedico a ustedes: Zay, Viry, China, Eder, Arenita, Yuli, Gabo, Ivonne, Rubi, Ebric, Wendy, Lili, Kari, Eli, Pomo. Cada uno a su manera apporto algo en este camino.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco mi asesora la **D.C. Virginia A. Robinson Fuentes** por compartir conmigo su conocimiento y atenciones dadas, por ser paciente y exigirme tanto ya que sabía que podía dar más de lo que yo misma me exigía. Gracias por sus consejos, sugerencias, correcciones, regaños; gracias por cuidarme y preocuparse siempre por mí. Porque el tiempo que estuve en este posgrado y en su laboratorio, me hizo crecer como persona y profesionalmente, así como también obtuve más confianza en mí misma y eso fue algo en lo que usted colaboró mucho. Gracias por la confianza y por creer en mí, en que si podía lograr terminar este proyecto, aunque hiciera mis dramas y berrinches. Gracias por ser mi guía, doctora.

Agradezco a la **D.C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas** por formar parte de mi comité tutorial, por siempre tener un comentario o sugerencia que mejorara el trabajo, así como por estar pendiente de mi avance y por su apoyo en todo momento. También por su paciencia, sus observaciones y correcciones que ayudaron a culminar este trabajo de tesis.

Agradezco a la **D.C. Ana Edith Higareda Mendoza** por formar parte de mi comité tutorial, por su apoyo y consejos durante mi trabajo de tesis, gracias por tomarse el tiempo para revisar y aclarar mis dudas, y de esta manera, poder culminar este trabajo.

Agradezco al **D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos** por formar parte de mi comité tutorial, por siempre tener una observación o sugerencia positiva que me ayudara a mejorar y explicar mejor mi proyecto.

Agradezco a mis compañeros de generación Lau, Ale, Soco, Alo y Luis, ya que de ellos aprendí mucho y compartimos muchos momentos de alegría, tristezas, frustración, dolor, viajes, fiestas y aventuras inolvidables; me enseñaron tanto y me ayudaron a crecer durante este proceso.

A mis compañeros de laboratorio Will, Pablo, Lily, Karen, Dani con quienes compartí tantos momentos que siempre llevaré en mi corazón y mente, con ellos compartí toda

clase de momentos. Lili y Dani muchas gracias porque ustedes han sido más que compañeras, amigas; con quienes puedo compartir lágrimas y risas, siempre estuvieron para darme un buen consejo. Pablín gracias porque eres una gran persona. A cada uno de ustedes los llevare en mi corazón y extrañare esos convivios tan geniales y ¡hasta el bullying!

Agradezco al Químico Paul, Jorge, Zbysek, Cristian, así como a Luis Felipe, Isa, Mike y Ruzi, quienes durante mi estancia en Praga, me hicieron compañía, me enseñaron muchas cosas y se preocuparon por mí y me acogieron. Espero pronto volver a visitarlos.

I also would like to thank Dr. V. Kašička, Dr. V. Šolínová, Dr. P. Sázelová and all the team of the Electromigration Methods Laboratory of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, for their support, attention and for helping me in all aspects during my stay.



# INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
1. MARCO TEÓRICO .....	3
1.1. ¿QUÉ SON LAS MICOTOXINAS? .....	3
1.1.1.- CLASIFICACIÓN DE LA IARC. ....	5
1.2.- MICOTOXINAS DE INTERÉS. ....	6
1.2.1.- Aflatoxinas (AF). ....	6
1.2.2.- Ocratoxina (OT).....	7
1.2.3.- Zearalenona (Zea).....	8
1.3.- VÍAS DE CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR MICOTOXINAS.	9
1.4.- EFECTOS SINÉRGICOS DE LAS MICOTOXINAS. ....	11
1.5.- DETERMINACION DE MICOTOXINAS. ....	12
1.5.1.- Técnicas cromatográficas. ....	12
1.5.2.- Métodos Inmunoquímicos. ....	13
1.5.3.- Métodos rápidos.....	14
1.5.4.- Otras técnicas:.....	14
1.6. La EC y las micotoxinas. ....	22
1.7. VALIDACIÓN.....	24
2.- JUSTIFICACIÓN.....	26
3.- HIPÓTESIS .....	27
4.- OBJETIVO GENERAL.....	27
5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	28
6.1. Desarrollo del Método .....	28
6.2. Validación .....	28
7. METODOLOGÍA .....	29
7.1. MATERIALES.....	29
7.2. INSTRUMENTACIÓN. ....	29
7.3. DESARROLLO DEL MÉTODO. ....	30
7.3.1 Condiciones Electroforéticas tabla 8:.....	30

7.3.2 <i>Buffers y soluciones:</i> .....	30
7.3.3. <i>Tratamiento de los estándares y muestras:</i> .....	30
7.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO .....	30
7.4.1 <i>Linealidad</i> .....	30
7.4.2. <i>Precisión y Exactitud</i> .....	31
7.4.3. <i>Límite de cuantificación y detección</i> .....	31
7.5. Muestras reales.....	32
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
8.1 DESARROLLO DEL MÉTODO .....	33
8.1.1 <i>Longitudes de onda máxima para cada micotoxina.</i> .....	33
8.1.2 <i>Condiciones electroforéticas finales.</i> .....	35
8.2.- VALIDACIÓN.....	40
8.2.1. <i>Selectividad</i> .....	40
8.2.2. <i>Linealidad.</i> .....	41
8.2.3. <i>Precisión y Exactitud:</i> .....	43
8.2.4. <i>Límites:</i> .....	45
8.3.- ANÁLISIS DE MUESTRAS .....	46
8.3.1. <i>Aflatoxina por Tiras Reactivas</i> .....	46
8.3.2 <i>Ocratoxina por ELISA</i> .....	48
9. CONCLUSIÓN .....	52
10. RECOMENDACIONES .....	53
11. BIBLIOGRAFÍA .....	54

## RESUMEN

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por los hongos filamentosos que contaminan alimentos, durante o después de la cosecha. Durante el almacenamiento, las micotoxinas se producen en los alimentos si se encuentra en lugares cálidos y húmedos. La mayoría de las micotoxinas son químicamente estables y persisten al procesamiento de los alimentos. El ser humano se encuentra expuesto a las micotoxinas al consumir alimentos contaminados. Las micotoxinas pueden ocasionar diferentes padecimientos incluyendo cáncer, tanto en humanos como en animales. Además, se producen grandes pérdidas económicas cuando estas sustancias contaminan alimentos, en especial, los cereales. Se ha observado que los alimentos llegan a encontrarse contaminados por más de una micotoxina a la vez y que la combinación de éstas tiene un efecto sinérgico. Por esta razón, es importante contar con métodos adecuados para la determinación de micotoxinas. La Electroforesis capilar es una técnica cuantitativa que usa un mínimo de reactivos y solventes, además de ser una técnica rápida que requiere una cantidad pequeña de muestra. El objetivo de este proyecto es desarrollar y validar un método por electroforesis capilar para la determinación simultánea de tres micotoxinas. En este trabajo se utilizaron estándares de las Aflatoxina B1, Ocratoxina A y Zearalenona. Se usó un equipo BECKMAN COULTER P/ACETM MDQ Capillary Electrophoresis System. Se variaron las condiciones electroforéticas (buffer, concentración, pH, así como aditivos, tipo y concentración) para obtener las condiciones de análisis. Se validó el método evaluando la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y límite de detección. Las condiciones de análisis incluyen buffer de boratos 25 mM, pH: 9.1 con 50mM de SDS. Las señales se obtuvieron a 214 nm, 201 nm en detector arreglo de diodos. Longitud del capilar 40.1 cm, d.i. 50  $\mu$ m, T=23°C, inyección por presión por 10 s a 13 mBar para muestra y de 5 seg para el plug de buffer; un tiempo de corrimiento de 15 min. Polaridad normal a 17KV. Los tiempos de migración para Aflatoxina B1, Ocratoxina A y Zearalenona fueron 4.5, 8.5 y 10 min, respectivamente. Este método es específico, lineal, reproducible, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones trabajadas para las tres micotoxinas. El método se aplicó al análisis de muestras de maíz y se encontró contaminación por más de una micotoxina.

**Palabras clave:** Micotoxinas, Aflatoxina B1, Ocratoxina A, Zearalenona, Electroforesis capilar.

## ABSTRACT

Mycotoxins are toxic substances produced by filamentous fungi that contaminate food, during or after harvesting. During storage, mycotoxins are produced in food in hot, humid places. Most mycotoxins are chemically stable and can persist after food processing. People are exposed to mycotoxins when they consume contaminated food. Mycotoxins can cause different conditions including cancer, both in humans and animals. In addition, great economic losses occur when these substances contaminate food, especially cereals. It has been observed that food can be contaminated with more than one mycotoxin at a time and that the combination of these has a synergistic effect. For this reason, it is important to have adequate methods for the determination of mycotoxins. Capillary electrophoresis is a quantitative technique which uses a minimum of reagents and solvent; it is also fast and that requires a small amount of sample. The objective of this work is to develop and validate a method by capillary electrophoresis for the simultaneous determination of three mycotoxins. Standards of Aflatoxin B1, Ochratoxin A and Zearalenone were used; a Beckman Coulter P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System was used. Electrophoretic conditions (buffer, concentration, pH, as well as additives, type and concentration) were varied to obtain the method. The method was validated for selectivity, linearity, precision and accuracy, limit of quantification and limit of detection. The analysis conditions include borate buffer 25 mM, pH: 9.1 with 50 mM SDS. Signals were obtained at 214 nm, 201 nm using a diode array detector. Capillary: 40.1 cm, total length with 50 µm i.d. T = 23°C, injection by pressure for 10 sec at 13 mBar for sample and 5 sec for buffer plug; running time was 15 min. Normal polarity at 17KV. The migration times for Aflatoxin B1, Ochratoxin A and Zearalenone were 4.5, 8.5 and 10 min, respectively. This method is specific, linear, reproducible, precise and exact in the range of concentrations here assayed for the three mycotoxins. The method was applied to the analysis of real corn samples and they were found contaminated by more than one.

**Key words:** Mycotoxins, Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Zearalenone, capillary electrophoresis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFS	Aflatoxinas
AF	Aflatoxina
AFB	Aflatoxina B
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
CEN	Comité Europeo de Normalización
DON	Desoxinivalenol
EC	Electroforesis capilar
F	Fumonisina
FEO	Flujo Electroosmótico
HPLC	High performance liquid chromatography
IACR	International Agency for Research on Cancer
IR	Infrarrojo
JECFA	Expertos en Aditivos Alimentarios
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
OT	Ocratoxina
OTA	Ocratoxina A
OTO	Ocratoxina O
PMTDI	Ingesta Diaria Máxima Tolerable Provisional
R	coeficiente de correlación
R <sup>2</sup>	coeficiente de determinación
RASFF	Sistema de Alerta Rápido para Alimentos y Piensos
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
ZEA	Zearalonona

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Núm.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Estructuras de las aflatoxinas	7
2	Estructuras de Ocratoxina A y B	8
3	Estructura de grupo de Zeralanona	9
4	Vía de contaminación de los alimentos por micotoxinas	10
5	Representación del sistema de electroforesis capilar.	16
6	FEO representación de la formación de la doble capa	19
7	Separación CZE	20
8	Micelas y separación de moléculas neutras mediante MEKC	21
9	Espectrofotometro de Aflaoxina B1	33
10	Espectrofotometro de Ocratoxina A	33
11	Espectro fotómetro de zearalenona	34
12	Electroferograma basado en las condiciones de Arroyo et al, 2010.	36
13	Electroferograma con las 3 señales de las micotoxinas sobrepuestas.	36
14	Electroferograma de Ocratoxina A.	37
15	Electroferograma de Zearalenona.	38
16	Electroferograma de Aflatoxina B1.	38
17	Electroferograma de una mezcla de OTA, ZEA Y AFB1 a 201 nm.	39
18	Muestra M37 a 201 nm.	40
19	Muestra M37 + estándar de aflatoxina a 201nm.	40
20	M37 mas estándar de ZEA y estándar de AFB1.	41
21	Curva de calibración de Ocratoxina A.	42
22	Curva de calibración de Zearalenona.	42
23	Curva de calibración de Aflatoxina B1.	42
24	Electroferograma de la muestra M34	49
25	Electroferograma de la muestra M37	50
26	Electroferograma de la muestra M58	50
27	Electroferograma de la muestra M59	51
28	Electroferograma de la muestra In5	51

## INDICE DE TABLAS

<b>Núm.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Micotoxinas de interés, especies productoras y alimentos contaminados.	5
2	Clasificación de carcinógenos por la IARC..	5
3	Distintos sistemas Buffers para Electroforesis Capilar	17
4	Buffer utilizados en ECZ	17
5	Clases de surfactantes y sus propiedades.	21
6	Aditivos	22
7	Propiedades fisicoquímicas de las micotoxinas	29
8	Condiciones Electroforéticas	30
9	Concentraciones de las soluciones de los estándares de las micotoxinas usadas para probar la linealidad	31
10	Longitudes de onda encontradas vs reportadas.	34
11	Longitudes de onda reportadas en los diferentes artículos y solventes en las que se obtuvieron.	34
12	Condiciones electroforéticas finales.	35
13	Resolución de las micotoxinas en diferentes electroferogramas.	41
14	Calibración Ocratoxina A	41
15	Calibración Aflatoxina B1	41
16	Calibración Zearalenona	41
17	Intervalos, coeficientes de correlación y determinación de AFB1, OTA Y ZEA	43
18	Variabilidad intradía para las 3 micotoxinas	44
19	Variabilidad interdía para las 3 micotoxinas.	44
20	Parámetro para ser aceptados por la norma CCAYAC-058 de COFEPRIS.	44
21	Datos de repetibilidad	44
22	Datos de reproducibilidad	44
23	Límites de cuantificación y detección de las micotoxinas por electroforesis capilar.	45
24	Concentraciones obtenidas por Tiras Reactivas vs Conc. En MECK de AFB1.	47
25	Concentraciones obtenidas por ELISA vs Concentración en MECK de OTA.	48
26	Concentración Reportadas por MECK.	48

# INTRODUCCIÓN

En el marco de los Objetivos del Desarrollo Sostenible, la FAO, OMS y otros organismos, se han propuesto eliminar la desnutrición y mal nutrición a través de mejorar la salud alimentaria de los diferentes países. Sin embargo, los métodos masivos de producción de alimentos, sobre todo cereales, ocasionan que haya contaminación de ellos. Es así que la población mundial está expuesta al consumo de alimentos contaminados por varios compuestos, entre ellos las micotoxinas. Aun cuando se han establecido controles para prevenir el consumo de alimentos altamente contaminados, son pocos los que se establecen en países subdesarrollados en los que los casos de desnutrición y falta de alimentos son más pronunciados.

Las micotoxinas se pueden encontrar en productos como los cultivos agrícolas y en productos de nuestra dieta diaria como son: leche, queso, algunas frutas, cereales, café, plantas medicinales y en bebidas alcohólicas (cerveza, vino), jugos de frutas, así como en trigo, maíz, cebada, entre otros [Goud et al, 2018]. Según estimaciones, 500 millones de personas de las regiones más pobres en África Subsahariana, América Latina y Asia están expuestas a niveles de micotoxinas que aumentan sustancialmente la mortalidad y la morbilidad [Wild y Gong, 2015].

El consumo no intencional de micotoxinas puede llegar a causar daños perjudiciales a la salud en humanos, debido a que la exposición a pequeñas y moderadas dosis de estas micotoxinas se acumulan a través del tiempo causando efectos perjudiciales al organismo. En estudios llevados a cabo en animales, se ha evidenciado la presencia de daño hepático, alteraciones en el crecimiento y desnutrición [OMS, 2018]. La importancia de las micotoxinas es porque en su mayoría son carcinogénicas, mutagénicas, neurotóxicas, así como supresores inmunológicos, además de conducir a un déficit de crecimiento en los niños [Adetunji et al, 2017]. Por esta razón, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció la Ingesta Diaria Máxima Tolerable Provisional (PMTDI, por su siglas en inglés) para algunas micotoxinas, con el objetivo de proteger la salud de los consumidores [Adetunji et al, 2017].



México cuenta con una gran diversidad de climas y extensa geografía lo que favorece el cultivo de una gran variedad de productos; sin embargo, también se tienen las condiciones favorables para que crezca una gran variedad de hongos en los alimentos y estos, pueden ser micotoxicogénicos. Los hongos micotoxigénicos son principalmente de los géneros *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Fusarium spp.* y las micotoxinas que producen tienen diversos mecanismos de acción para producir efectos tóxicos. Es por ello que su consumo representa un riesgo para la población, por lo que se debe contar con políticas sanitarias para esta hacerle frente a esta problemática. En México, sólo se cuenta con tres normas que regulan el contenido de aflatoxinas más no para el resto de las micotoxinas, que también son peligrosas [NOM-247-SSA1-2008, NOM-188-SSA1-2002].

Existen alrededor de 300 micotoxinas y sólo unas cuantas han sido estudiadas por ser las que ocasionan un mayor daño a humanos y animales de granja. De las diversas micotoxinas que existen, las que tienen importancia en la salud humana son: las Aflatoxinas, la Ocratoxina A y la Zeralenona, que son las que se encuentran contaminando los cereales de mayor consumo. Es preciso señalar que más de una micotoxina puede contaminar un solo alimento de manera simultánea, dependiendo de las condiciones en las que se encuentra el alimento y/o el cultivo. Entonces, tanto humanos como animales de granja están no solamente expuestos al efecto tóxico de alguna de las micotoxinas, sino de su efecto sinérgico. Es por ello que la industria agroalimentaria debe buscar métodos de detección de micotoxinas en combinación para ayudar a asegurar la buena calidad de los alimentos que se encuentran disponibles [Adetunji et al, 2017, Greco,2018].

Los métodos analíticos que se requieren para la determinación de las micotoxinas en alimentos y/o en fluidos biológicos, deben ser específicos y sensibles. Actualmente se utilizan métodos por HPLC acoplado a Espectrometría de Masas o ensayos inmunoenzimáticos, como en el caso de ELISA. Los métodos por HPLC/MS son los aceptados por la AOAC, organismo que certifica la idoneidad y validez de las metodologías analíticas empleadas; sin embargo, un equipo de HPLC/MS es muy costoso. Por otro lado, los métodos por ELISA han demostrado ser lo suficientemente sensibles y específicos, pero sólo se puede analizar un tipo de micotoxina a la vez.

Entonces, se propone el uso de la electroforesis capilar para determinar las diferentes micotoxinas de interés en este estudio. Aun cuando el equipo es costoso, cuando ya se cuenta con él, su utilización es económica debido a la mínima cantidad de reactivos que consume; por otro lado, es amigable con el medio ambiente ya que el uso de solventes orgánicos es mínimo o nulo [Alshannaq et al, 2017; Arroyo-Manzanares et al, 2014].

Además de tener como atributos la sensibilidad y la especificidad, las metodologías analíticas utilizadas en electroforesis capilar deben ser reproducibles, repetibles, exactas y tener un intervalo de linealidad aceptable. Estos parámetros son parte de la validación de un método, características que debe reunir para poder ser aceptado por organismos como la AOAC [Arroyo-Manzanares et al, 2014].

Contar con un método analítico por electroforesis capilar, que pueda usarse para la determinación simultánea de Aflatoxina B1, Ocratoxina A y Zearalenona, que cumpla con todos los parámetros de validación será de gran utilidad para conocer la calidad de los productos agrícolas que se consumen habitualmente.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. ¿QUÉ SON LAS MICOTOXINAS?

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por diferentes hongos filamentosos pertenecientes al *filo Ascomycota*. Los principales géneros fúngicos causantes de contaminación en los alimentos son: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* crecen frecuentemente en alimentos y piensos en condiciones de almacenamiento, las especies de *Fusarium* a menudo infectan cultivos como el trigo, la cebada y el maíz en el campo y se propagan en la planta. En la actualidad, se han identificado y documentado más de 300 micotoxinas; sin embargo, sólo unas cuantas contaminan regularmente alimentos y piensos. Se trata de *aflatoxinas (AF)*, *Ocratoxinas (OT)*, *Fumonisinás*, *Patulina*, *Zearalonona (ZEA)* y *tricotecenos* incluyendo *desoxinivalenol (DON)* y *toxina T-2*; todas ellas ocasionan intoxicaciones llamadas micotoxicosis [Alshannaq, et al, 2017].

Es posible que las micotoxinas siempre hayan existido, pero hace apenas unas cuantas décadas que se les consideró un problema de salud pública y animal [Moreno, 1988]. También representan un problema económico ya que los piensos y alimentos contaminados son desechados, lo que ocasiona pérdidas económicas y alimenticias. Los recursos destinados hacia la investigación, la reglamentación y las aplicaciones para resolver los problemas que ocasionan las micotoxinas, no son suficientes. Representan una preocupación a nivel mundial ya que ocasionan la pérdida de alrededor del 25% de los cultivos cosechados en el mundo cada año. Esto se traduce en pérdidas económicas de miles de millones de dólares [Alshannaq, et al, 2017]. De acuerdo con el Sistema de Alerta Rápida de la Comunidad Europea para alimentos y piensos (RASFF, por sus siglas en inglés), los problemas de contaminación de micotoxinas representan más del 30% de las diversas categorías de riesgo. Se considera la contaminación por micotoxinas un factor importante para la calidad de los alimentos y un factor de riesgo a la salud, debido a que tienen fuertes efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos y por esta razón, puede poner en peligro la vida de humanos y animales [Li et al, 2012].

De todas las micotoxinas, las aflatoxinas (AFs) son consideradas las más tóxicas y las más frecuentes en los productos agrícolas, con una derrama económica significativa para la agricultura. En los Estados Unidos y los países de la Unión Europea, las AF representan una preocupación económica; mientras que, en los países en desarrollo de Asia y África, las AF contribuyen a cientos de casos de carcinoma hepatocelular cada año. Muchas micotoxinas son difíciles de eliminar durante el procesamiento de alimentos debido a su estabilidad frente al calor, tratamientos físicos y químicos. Un ejemplo de esto, lo representa la Ocratoxina que se encuentra contaminando los granos de café que al tostarlo se disminuye en un 80% la concentración de toxina; esto pudiera ser favorable dependiendo de la contaminación de Ocratoxina que se tenga en los granos; la nixtamalización puede eliminar de un 75 a un 90% de aflatoxina en el maíz [Castellanos-Onorio et al., 2011; Learda, 2013; Martínez, 2013]. La contaminación por micotoxinas ocasiona pérdidas económicas, como la reportada en el 2017 en la industria agronómica estadounidense del maíz debido a la contaminación por aflatoxinas que oscilo entre US \$ 52,1 millones y \$ 1,68 mil millones. Además, las micotoxinas son la principal causa de rechazo para la importación de cereales en la frontera de la Unión Europea de acuerdo con el Sistema de Alerta Rápido para Alimentos y Piensos (RASFF), siendo las AF las micotoxinas más comúnmente asociadas con las notificaciones [Alshannaq, et al, 2017].

Hay muchos tipos de micotoxinas, pero las más peligrosas para animales y humanos, son aproximadamente 10. En la Tabla 1, se muestran las micotoxinas que entran en esta categoría y que son interés para este trabajo. También se muestran los hongos que las producen, algunos alimentos que contaminan y los daños más comunes que producen [Bellver, 2013].

**Tabla 1.** Micotoxinas de interés, especies productoras y alimentos contaminados.

Micotoxinas	Clasificación	Hongo productor	Alimentos	Fisiopatogenicidad (castillo, 2007)
Aflatoxinas	B1,B2,G1,G2	<i>Aspergillus Flavus,</i> <i>Aspergillus Parasiticus</i>	Maíz, arroz, frutos secos	Daño hepático agudo, inducción de tumores, disminución de la eficacia del sistema inmunitario, teratogénesis, excreción por leche, acumulación en tejidos
	M1	<i>Metabolito de aflatoxinas, B1 en mamíferos</i>	Leche, productos lácteos	
Ocratoxina	A	<i>Aspergillus ochraceus,</i> <i>Penicilium verrucosum</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Cereales, pasas, vino y café	Nefropatía endémica de los Balcanes, acumulación en riñón, tubo nefritis, hígado y musculo, vómitos, teratogénesis, mutagénesis, embriotóxicas
Zearalenona		<i>Fusarium graminearum,</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Cereales, productos a base cereales	Síndrome estrogénico, problemas reproductivos, excreción por leche junto con sus derivados $\alpha$ y $\beta$ – zearalenol.

Tomado de [Bellver Soto, 2013]

### 1.1.1.- CLASIFICACIÓN DE LA IARC.

La agencia internacional de investigación sobre el cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasifica a las sustancias por su potencial carcinogénico para humanos y animales; algunas micotoxinas se encuentran en esta clasificación (Ver tabla 2).

**Tabla 2. Clasificación de carcinógenos por la IARC.**

<b>Grupo 1</b>	Cancerígeno para humanos
<b>Grupo 2A</b>	Probablemente cancerígeno para humanos
<b>Grupo 2B</b>	Posiblemente carcinogénico para humanos
<b>Grupo 3</b>	No clasificable en cuanto a su carcinogenicidad para los humanos.
<b>Grupo 4</b>	probablemente no carcinogénico para humanos

## 1.2.- MICOTOXINAS DE INTERÉS.

### 1.2.1.- Aflatoxinas (AF).

Son producidas principalmente por *A. flavus* y *A. parasiticus* que están presentes normalmente en el suelo y diversos materiales orgánicos. Las cepas de *A. flavus* producen sólo aflatoxinas B1 (AFB1) y B2 (AFB2), y la M1 (AFM1) que es el principal metabolito hidroxilado de la AFB1; mientras que las cepas de *A. parasiticus* pueden producir AFB1, AFB2, G1 (AFG1) y G2 (AFG2). Se descubrió que la AF fue el agente causal de la enfermedad X de los pavos que mató a 100.000 ejemplares jóvenes en Gran Bretaña en 1960. Más tarde se presentó el primer brote de aflatoxicosis que afectó a seres humanos en la India y que llevó a la muerte de 100 personas. En consecuencia, las AFs se convirtieron en objeto de investigación y actualmente son las micotoxinas de las que se tiene mayores registros e investigaciones [Alshannaq et al, 2017].

Los hongos productores de aflatoxinas crecen en una amplia variedad de alimentos como: cereales (maíz, arroz, cebada, avena y sorgo), cacahuates, almendras, nueces y semillas de algodón. La leche puede ser fuente de contaminación de aflatoxina M1, debido que cuando una vaca come pienso contaminado con AFB1, esta se biotransforma por el citocromo P450 hepático y se obtiene el hidroxilo-AFB1 que es la AFM1. La AFM1 es detectable en algunos productos lácteos como el queso, que tiene concentración más alta de AFM1 que la de la leche cruda, ya que AFM1 es estable al calor, se une bien a la caseína y no es afectado por el proceso de elaboración del queso [Alshannaq et al, 2017].

Las AFs tienen efectos cancerígenos, teratogénicos, hepatotóxicos, mutagénicos e inmunosupresores [Alshannaq et al, 2017]. También exhiben baja solubilidad en agua, pero son solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metanol, acetonitrilo o acetona. Además, son relativamente inestables a la luz y al aire en estado puro y susceptibles a la hidrólisis alcalina; son afectadas por amoníaco o hipoclorito de sodio (pH>10.5); termo-resistentes y estables en un intervalo de pH entre 3 y 10; son inodoras, incoloras e insípidas [Martínez et al, 2013].

La estructura de la AFB está formada por la fusión de un anillo de ciclopentanona a un anillo lactona de la estructura cumarina, las AFG tienen un anillo lactona fusionado [Bellver, 2013] Ver Figura 1.

La AFB1 es metabolizada por la enzima citocromo P450 y la transforma en 8,9- epóxido (AFBO) que es una estructura muy carcinogénica y que puede unirse con mucha facilidad a las macromoléculas, principalmente proteínas y al ADN, y esto ocasiona la formación de aductos que crean mutaciones genéticas y cáncer [Murphy, 2006].

Hay que mencionar que la AFB1 es la más tóxica, y el orden de toxicidad respecto a las demás aflatoxinas es: AFB1>AFG1>AFB2>AFG2.

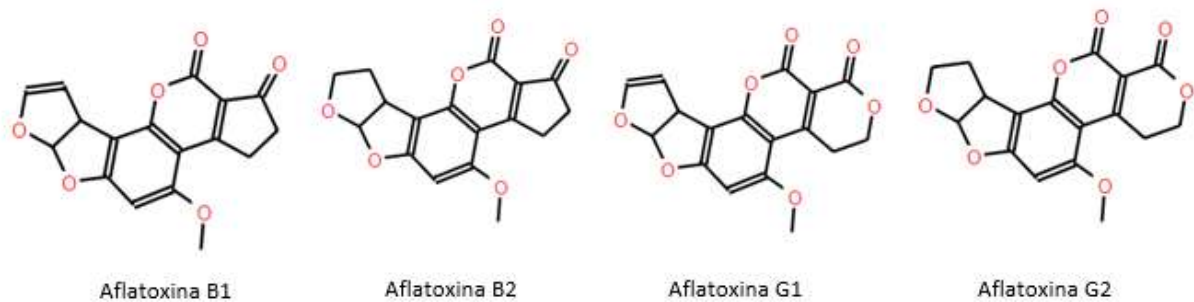


Figura 1. Estructuras de las Aflatoxinas [Arroyo,2010].

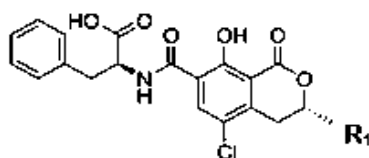
### 1.2.2.- Ocratoxina (OT).

Esta micotoxina fue descubierta en 1965 en Sudáfrica y es producida por varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, entre ellas encontramos el *Aspergillus ochraceus*, el *Penicillium verrucosum*. La Ocratoxina más frecuente y que ha demostrado ser la más agresiva es la Ocratoxina A [Alshannaq, 2017].

El *P. verrucosum* puede producir OTA en condiciones frías y templadas, mientras que *A. ochraceus* prefiere producirla en regiones tropicales calientes. La OTA se puede encontrar en una gran variedad de productos agrícolas como maíz, trigo, cebada, harina, café, arroz, avena, centeno, frijoles, chícharos y piensos mixtos, se puede encontrar en el vino y el jugo de uva [Amezqueta et al, 2009]. Esta micotoxina también puede contaminar los productos de origen animal, como la carne y la leche, y puede encontrarse en la leche humana [Murphy, 2006]. La OTA puede resistir altas temperaturas y es muy

estable a los ambientes ácidos, esto significa que es muy difícil de eliminar en condiciones de cocción [Alshannaq et al, 2017].

La OTA está clasificada por la IARC en el Grupo 2B (posible carcinógeno humano) y es nefrotóxica y hepatotóxica, también puede causar inmunotoxicidad, genotoxicidad, neurotoxicidad y teratogenicidad tanto en humanos como en animales. La OTA es soluble en grasa por lo que puede acumularse en el tejido de los animales y humanos. La OTA presenta una vida media de eliminación larga, con valores en el cerdo de 72-120 horas y en el hombre de 840 horas, siendo la fracción libre la de toxina < 0,2%. Tanto la OTA como sus metabolitos se excretan por vía renal y hepatobiliar; se ha observado la presencia de OTA en las secreciones lácteas, lo cual constituye un riesgo para el recién nacido, afectándolo de manera directa en su crecimiento y desarrollo futuro [Stojkovic et al, 1984; Breitholtz-Emanuelsson, 1993,]. La OTA tiene una estructura similar a la fenilalanina, esto ocasiona que interfiera con el proceso de síntesis de proteínas debido a que produce la inhibición competitiva de la Phe-ARNt sintetasa. Al actuar como sustrato de la enzima fenilalanina hidroxilasa, da lugar a un producto final, Tyr-OTA, que es metabolizada y transformada en los metabolitos hepáticos que parecen ser los epímeros (4R y 4S)-OH-OTA, en cuya formación está implicado el sistema citocromo. Se ha demostrado que, en la formación de estos metabolitos, principalmente el epímero R y en menor medida el S, participan las isoformas de P450 1A1/1A2, 2B1 y 3A1/3A2. [Alshannaq et al, 2017; Kuiper-Goodman et al, 1989; Omar et al, 1996].



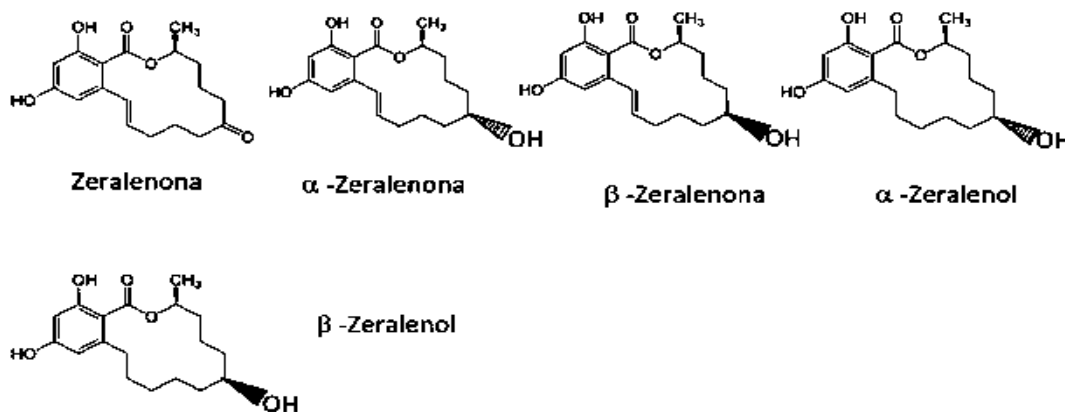
**Figura 2.** Estructuras de Ocratoxina A y B, Ocratoxina A: R<sub>1</sub>= Cl y Ocratoxina B: R<sub>1</sub>= H.

### 1.2.3.- Zearalenona (Zea).

La Zearalenona (Fig. 3) es producida por especies de *Fusarium*, principalmente *F. graminearum* y *F. moniliforme*; es una micotoxina estrogénica, que puede inducir efectos



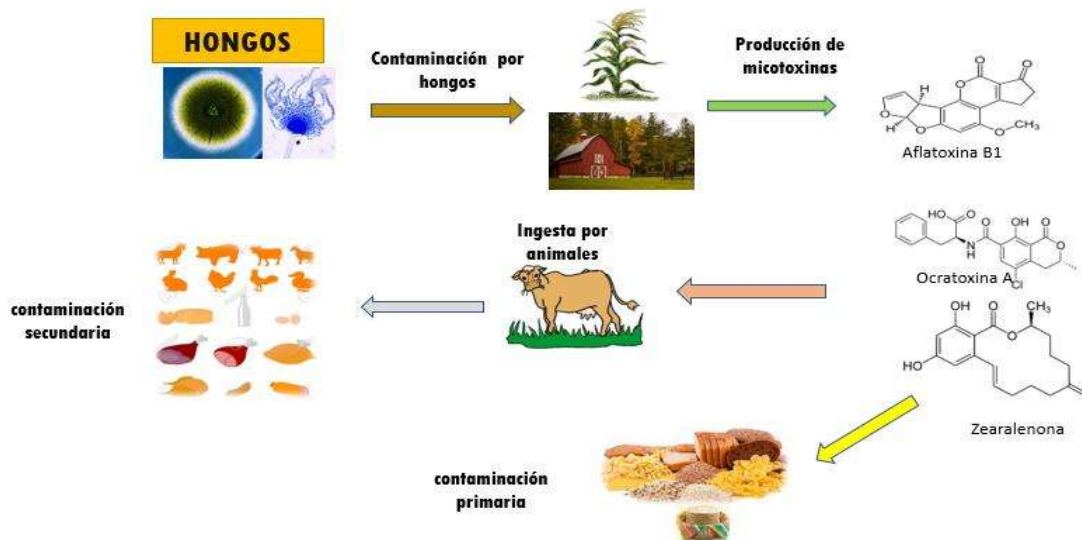
estrogénicos en humanos y animales . ZEA se encuentra frecuentemente en maíz, trigo, cebada, sorgo y centeno. La producción de ZEA es favorecida por altas condiciones de humedad y baja temperatura. ZEA es estable bajo temperaturas normales de cocción y se elimina bajo altas temperaturas [Alshannaq et al, 2017]. ZEA está clasificada como un carcinógeno del Grupo 3 por el IARC. Esta micotoxina compite con la unión a los receptores de estrógenos (ER  $\alpha$  y ER  $\beta$ ) en varias especies animales, lo que resulta en cambios y lesiones en el sistema reproductivo femenino; actúa desplazando al estradiol de su proteína de unión uterina, provocando una respuesta estrogénica lo que ocasiona infertilidad, hinchazón del útero y vulva, aumento de la reabsorción embriológica y atrofia de los ovarios [Alshannaq et al, 2017; Murphy et al, 2006].



**Figura 3.** Estructuras del grupo de zeralonona [Tamura, 2015].

### 1.3.- VÍAS DE CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR MICOTOXINAS.

Las micotoxinas pueden llegar a los humanos a través del consumo directo de alimentos contaminados o de manera indirecta, por el consumo de carne de animales que fueron alimentados por piensos contaminados (Fig. 4).



**Figura 4.** Vía de contaminación de los alimentos por micotoxinas.

La producción de micotoxinas es difícil de controlar completamente por métodos de prevención y control; primero, porque son termoestables, por lo que no pueden destruirse con las temperaturas normales de cocción de los alimentos. En segundo lugar, porque los cultivos y/o alimentos se encuentran contaminados por más de una micotoxina por lo que se observa un efecto sinérgico sobre la acción en el organismo aumentando su toxicidad [FAO, 2018].

La tortilla se produce a través de un proceso tradicional llamado nixtamalización, cuya alcalinidad parece destruir en gran parte las aflatoxinas presentes en el maíz. Se ha demostrado que la nixtamalización tradicional es capaz de destruir 85% de la aflatoxina presente en el maíz y que 15% de aflatoxina remanente en masa no conserva sus propiedades de fluorescencia [Peña et al, 1995]. Otros autores reportan que del 75 al 95% del contenido de aflatoxinas en grano es destruido por la nixtamalización [Anguiano et al, 2005]. Sin embargo, en otros estudios se ha reportado que la destrucción de aflatoxina por nixtamalización parece no ser muy efectiva como se pensaba; debido a que un alto porcentaje del contenido original de aflatoxinas se revierte a su forma original fluorescente en el medio ácido; a un pH similar al de los ácidos que se encuentran durante el proceso de la digestión, lo que lleva a la reconstitución de las moléculas de

aflatoxinas; con el consecuente riesgo que esto implica para la salud humana [Martínez et al, 2013].

Se realizó un estudio para confirmar si durante el tostado de café se reducía la cantidad de contaminación de Ocratoxina en granos de café verde. Los granos de café verde fueron contaminados artificialmente con una cantidad de Ocratoxina A (OTA) y mediante la inoculación con *Aspergillus westerdijkiae*; además, se compararon dos técnicas de tostado diferentes, cilindro giratorio y lecho fluidizado. Los resultados indicaron que la reducción de OTA fue similar para los dos niveles de contaminación: 95.1% y 97.2% con el cilindro giratorio, y 81.3% y 79.2% con el lecho fluidizado. El tostado de cilindro giratorio fue el proceso técnico más eficiente para la reducción de OTA en un café tostado oscuro comercial (88%) [Castellanos et al, 2010].

#### **1.4.- EFECTOS SINÉRGICOS DE LAS MICOTOXINAS.**

Diversos estudios han comprobado el efecto sinérgico de las micotoxinas:

En el estudio realizado por Huff (1980) en pollos de engorda, se observó que la combinación de AFB1 y OTA aumentaba la mortalidad de estas aves, y que había un aumento en la hepatotoxicidad.

Dabrowski et al (2016) estudiaron los cambios en las subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica porcina inducidos por la exposición a bajas dosis de Zearalenona (ZEA) y Deoxinivalenol (DON). Se observó que la combinación de ambas micotoxinas disminuyó el porcentaje de CD4 Y CD8, también la exposición a la combinación de las micotoxinas redujo el tamaño de las subpoblaciones CD3 e inhibieron la actividad fagocítica de los glóbulos blancos. Este estudio demostró que aun cantidades bajas de estas micotoxinas combinadas ejerce mayor inmunosupresión que el alimento que contiene solo una micotoxina.

Zheng et al (2018) evaluaron de manera individual y combinada la Zearalenona, la Ocratoxina A y el  $\alpha$ -Zearalenol. La exposición de las células Hep G2 condujo a la reducción de la viabilidad celular, el contenido de MDA, la actividad de GSH-Px y el contenido de GSH. La exposición a ZEA individual o  $\alpha$ -ZOL condujo a reducciones significativas,

dependientes de la dosis, en la viabilidad celular y la actividad de GSH-Px y el contenido de GSH. Entre las micotoxinas individuales, la OTA tuvo el mayor efecto citotóxico en las células Hep G2, seguida de  $\alpha$ -ZOL. También observaron que la mezcla de ZEA + OTA causó efectos negativos graves en las células Hep G2 y se mostró una disminución significativa en la viabilidad de las células Hep G2 y en los contenidos intracelulares de GSH. De manera similar, la combinación de ZEA +  $\alpha$ -ZOL redujo significativamente la viabilidad celular, la actividad de GSH-Px y el contenido de GSH en comparación con la ZEA individual. Se comprobó con este estudio que las combinaciones de micotoxinas causan mayor citotoxicidad y daño oxidativo que las toxinas individuales, lo que indica que las micotoxinas tienen un efecto sinérgico.

### **1.5.- DETERMINACION DE MICOTOXINAS.**

Actualmente se ha estudiado más sobre los daños y riesgos a la salud ocasionados en animales y humanos por la exposición a micotoxinas o el consumo de estas, ya sea de manera directa o indirecta. Por esta razón, se han buscado métodos de determinación de micotoxinas, para conocer el contenido que puedan tener los alimentos. Se sabe que las micotoxinas pueden causar una multicontaminación en un mismo producto y esto ocasiona el aumento de sus efectos dañinos en seres vivos, es por eso que se debe contar con métodos de determinación específicos, sensibles y reproducibles. Algunos de estos métodos utilizan las siguientes técnicas:

#### ***1.5.1.- Técnicas cromatográficas.***

La cromatografía es una técnica ampliamente utilizada para analizar muestras de alimentos. Su principio es clave en el estudio de micotoxinas ya que es necesario la separación de los componentes de una muestra para su estudio. La cromatografía ha evolucionado gracias a los avances con detectores altamente sensibles [Turner et al, 2015].

Las técnicas cromatográficas para la determinación directa de micotoxinas se dividen en:

### **A. Cromatografía en Capa Fina (TLC, por sus siglas en inglés).**

La cromatografía en capa fina es una de las técnicas inicialmente utilizadas para la detección y determinación de micotoxinas, tiene la ventaja de analizar varias micotoxinas de manera simultánea [Seymour et al, 2009], pero cuenta con poca sensibilidad [Turner et al, 2015].

### **B. Cromatografía líquida (HPLC, por sus siglas en inglés).**

En la actualidad, la HPLC es la técnica de elección para muchas micotoxinas, especialmente en investigación, o para confirmación de resultados positivos por ELISA. Este tiene algunas ventajas como que es automático, rápido y sensible; los métodos HPLC-FLD / MS han sido aceptados y validados por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) y por el Comité Europeo de Normalización (CEN) para la cuantificación de las micotoxinas en los cereales [Alshannaq, 2017], pero también tiene desventajas como el alto costo del equipo y el mantenimiento, requiere de un tratamiento delicado de muestra [Ramos,2015]. Es muy sensible y exacto con aquellas micotoxinas que presentan fluorescencia natural, pero para las que no tienen como las del género *Fusarium* ya que carecen de cromóforo es necesario realizar una derivatización [Turner et al, 2009].

### **1.5.2.- Métodos Inmunoquímicos.**

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es uno de los más utilizados para la determinación de micotoxinas. Este método proporciona detección rápida y cuantificación de todas las micotoxinas principales, tales como AF, AFM1, OTA, ZEA, DON, fumonisinas y toxina T-2. ELISA puede realizarse de varias maneras, como ensayo directo, ensayo indirecto competitivo y ensayo indirecto no competitivo, que es el más utilizado. Sin embargo, cuenta con ciertas desventajas incluyendo la potencial reactividad cruzada y dependencia de una matriz específica. El kit solo puede identificar una sola micotoxina y se usa una sola vez; Por lo tanto, puede ser costoso en muestras con micotoxinas múltiples. Este método está validado por la AOAC, pero para uso con micotoxinas específicas, bajo niveles de contaminación específicos y el resultado debe confirmarse por cromatografía. ELISA se

pueden obtener determinaciones cuantitativas, puede ser una buena prueba portátil [Turner et al, 2009].

### **1.5.3.- Métodos rápidos.**

Son métodos diseñados para poder realizarse fuera del laboratorio en los sitios de inspección y en menor tiempo, con una rápida obtención de resultados con ayuda de instrumentos portátiles y sencillos o sin utilizar ningún instrumento. Estos métodos pueden proporcionar resultados cualitativos y semicuantitativos. Una desventaja de estos métodos es que necesitan la confirmación por métodos cuantitativos [Zheng, et al, 2006].

Un método rápido es el dispositivo de flujo lateral (LFD); esta prueba puede proporcionar resultados semicuantitativos en menos de 10 minutos y no requiere equipo especializado; incluye una línea de control negativo junto con las líneas de muestra en la misma tira. Se puede encontrar de manera comercial para la detección de AFs, DON, T-2 toxina, OTA, y ZEA. Su aplicación solo es en campo para ver posible contaminación, su utilización es limitada por ser poco sensible y fiable, así como por su alto costo [Alshannaq et al, 2017].

### **1.5.4.- Otras técnicas:**

#### ***Espectroscopia infrarroja.***

Son técnicas rápidas y no destructivas para detección de micotoxinas. No requieren preparación de la muestra ni extracción y dan resultados rápidamente; sin embargo, estos métodos tienen problemas con la distribución no homogénea de las muestras de micotoxinas dentro de alimentos. Entre algunos ejemplos de espectroscopias IR se han usado tanto la espectroscopia de reflectancia al IR cercano y la espectroscopia de transmitancia al IR medio; ambas se han utilizado para la detección de la contaminación DON en trigo y maíz [Alshannaq et al, 2017].

#### ***Electroforesis capilar:***

Es una técnica instrumental que separa diferentes componentes debido al movimiento o desplazamiento diferencial de especies cargadas (iones), sustancias neutras o migración

pasiva, por atracción o repulsión en un campo eléctrico. El campo eléctrico es el que provoca el movimiento de los componentes por un capilar; se puede utilizar con moléculas con o sin carga [Desai et al, 2003]. Una ventaja distintiva de esta técnica son los pequeños volúmenes de solventes y tampones (buffers) requeridos, generando así pequeños volúmenes de residuos. Parte de la versatilidad y la eficacia que tiene esta técnica se debe a que combina elementos de distintas técnicas analíticas; por ejemplo, utiliza detectores de alta sensibilidad como en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y el uso de capilares de sílice fundida ( $\text{SiO}_2$ ), como en la cromatografía de gases (GC) [Chopin et al, 2012].

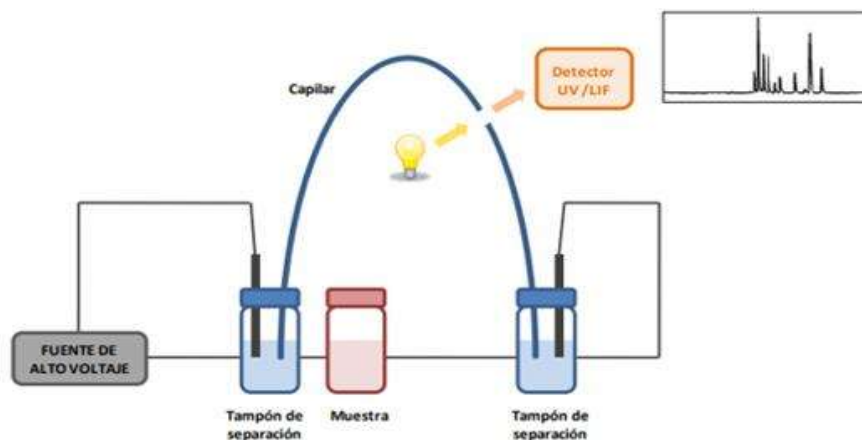
### ***A. Historia de la electroforesis capilar.***

En 1967 se empleó por primera vez la electroforesis capilar, desarrollada por Hjerten quien uso capilares milimétricos, los cuales eran rotados a través de su sección longitudinal para evita los efectos de la convección. En 1942, Martin realizó una separación de cloruro, aspartato y glutamato por isotacoforesis. Después, en 1979, Virtanen y Mikkers desarrollaron las separaciones empleando electroforesis en capilares de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro en vidrio y teflón. En 1980, Jorgenson y Lukacs emplearon técnicas avanzadas para la obtención de capilares de sílice fundida con diámetros de 75  $\mu\text{m}$ ; la separación de péptidos realizada en un capilar de sílice fundida a potenciales de 20 a 30 KV en un campo de 400 a 500 V/cm refrigerados por aire, fue con lo que comenzó la EC [Castagnino, 2000].

### ***B. Instrumento:***

El equipo utilizado en electroforesis capilar está compuesto de un tubo capilar, dos viales y una fuente de voltaje. Los viales contienen dos electrodos: es uno de entrada (electrodo positivo o ánodo), otro de salida (electrodo negativo o cátodo) y estos contienen el tampón de separación; en ellos se introducirán los extremos del capilar para ser rellenado con el buffer de separación por diferencia de presión. Cuando ya se encuentra el capilar lleno, el extremo de entrada del capilar se introduce en un vial de muestra, para introducirla por inyección electrocinética (campo eléctrico) por aplicación de voltaje o

inyección hidrodinámica (presión externa) mediante diferencia de presión y llevar a cabo la separación de su contenido. El capilar cuenta con una ventana que está acoplada a un detector, por dicha ventana se envía la señal de cada compuesto encontrado durante la separación de la muestra; estas señales se traducirán en el sistema del equipo mediante un software y se formarán los electroferogramas (Fig. 5) [Casado, 2014; Flores, 2015].



**Figura 5.** Representación del sistema de electroforesis capilar [Casado, 2014].

Los capilares usados en esta técnica son de 35 a 100 cm de largo y con diámetros internos de 50, 75 o 100  $\mu\text{m}$  y de 300 a 400  $\mu\text{m}$  de diámetro externo; El capilar de sílice fundida se cubre con una capa de poliamida para darle mayor resistencia, se le puede realizar una ventana para que a través de ella se permita el paso de la luz UV de tal manera que la visualización se realiza on-line con la corrida, obteniendo simultáneamente resultados cuantitativos en cuestión de minutos; con esta técnica es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea [Castagnino, 2000].

### **C. Los buffers**

En la EC hay una amplia variedad de soluciones buffer que pueden ser utilizados y generalmente se emplean a un valor de pH con una o dos unidades alrededor de su pKa



(Tabla 3), esto porque se obtiene una mejor selectividad en la separación [Salazar, 2015]. El buffer que se emplea en EC debe reunir una serie de propiedades [Castagnino, 2000]:

1. Buena capacidad amortiguadora en el intervalo de pH de trabajo.
2. Baja absorbancia en la longitud de onda empleada en la detección.
3. Baja movilidad (para lo cual se necesita baja concentración iónica).

En la separación de proteínas y péptidos se utilizan los buffers zwitterionicos, tales como tricina, CAPS, MES y Tris (ver tabla 4) [Schwartz y Guttman, 1994]. La ventaja de estos, es su conductividad que reduce la corriente y el efecto Joule. También hay buffers que cuentan con una preparación especial en el medio, se les agrega sales de cloruros, fosfatos y sulfatos, principalmente a los que van dirigidos a la separación de proteínas [Flores, 2015].

**Tabla 3. Distintos sistemas Buffers para Electroforesis Capilar**

Nombre	pKa	Nombre	pKa
Fosfato	2,12 (pKa <sub>1</sub> )	TES	7,50
Citrato	3,06 (pKa <sub>1</sub> )	Hepes	7,55
Formato	3,75	Hepps	8,00
Succinato 4	4,19 (pKa <sub>1</sub> )	Tricina	8,15
Citrato	4,74 (pKa <sub>2</sub> )	Glicina amida	8,20
Succinato	5,57 (pKa <sub>2</sub> )	Hidroclorhídrico	
MES	6,15	glicilglicina	8,25
ADA	6,60	TRIS	8,30
BIS-TRIS	6,80	Bicine	8,35
propano			
Pipes	Pipes	Morfolino	8,49
ACES	6,90	Borato	9,24
MOPSO	6,90	CHES	9,50
Imidazol	7,00	Chapso	9,60
MOPS	7,20	CAPS	10,40
Fosfato	7,21(pKa <sub>2</sub> )	Fosfato)	12,32 (pKa <sub>3</sub> )

Tomada de Castagnino,2000

**Tabla 4. Buffers utilizados en ECZ**

Buffer	Intervalo de pH
Fosfato	1.14 – 3.14
Acetato	3.76 – 5.76
Fosfato	6.20 – 8.20
Borato	8.14 – 10.14
Buffer zwitterionicos	
MES	5.15 – 7.15
<b>PIPES</b>	5.80 – 7.80
<b>HEPES</b>	6.55 – 8.55
<b>Tricina</b>	7.15 – 9.15
<b>Tris</b>	7.30 – 9.30

Tomada de Salazar, 2015.

#### **D. Movilidad Electroforética.**

Es el movimiento provocado por la aplicación de un campo eléctrico, lo que produce la migración del analito por su relación masa/carga.

La velocidad a la que migran los analitos se le llama velocidad de migración, y esta está determinada por [Cruces,1998]:

$$\mu_{ep} = \frac{V_{ep}}{E} = \frac{L_d/t_m}{V/L_t}$$

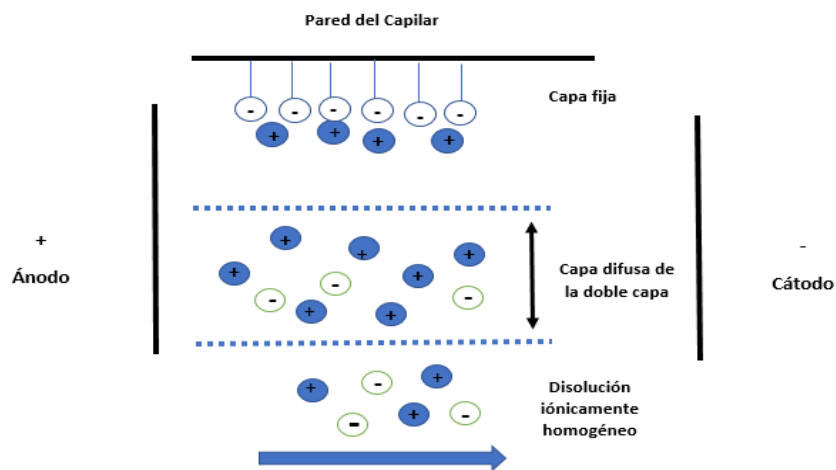
- Viscosidad: la velocidad es inversamente proporcional a la viscosidad.
- Campo eléctrico: a mayor campo eléctrico mayor velocidad.
- Carga eléctrica neta de la molécula: mayor carga neta mayor velocidad.
- Tamaño de la molécula: la velocidad es inversamente proporcional al tamaño de la molécula.
- Las velocidades son términos medibles: se calculan al dividir el tiempo de migración por la longitud del capilar al detector,  $L_d$  [Cruces,1998].

#### **E. Flujo Electroosmótico.**

La electroósmosis es un fenómeno consecuencia de la carga superficial de la pared del capilar. Los capilares de sílice fundida usados en EC tienen grupos silanol ionizables en contacto con el buffer contenido en el capilar y el grado de ionización se controla principalmente por el pH del buffer [Robinson, 2006]. Los grupos silanol se cargan ya sea positiva o negativamente, como anteriormente se mencionó, dependiendo del pH del buffer usado; serán positivos ( $\text{Si-OH}^+$ ) a pH menor a 4 o negativos a pH superior a 4 [Casado,2014].

El flujo electroosmótico (FEO) se crea al aplicar el campo eléctrico en un pH alcalino, éste generará una doble capa eléctrica entre la solución y la pared del capilar [Salazar, 2015]; debido a que la pared cargada negativamente atrae a los iones cargados positivamente del buffer, éstos se unirán a la pared y se creará la doble capa [Robinson, 2006]. De manera más extensa se explica que debido a que la pared suele estar cargada

negativamente, atrae a los cationes presentes en el buffer, formándose una capa inerte de cationes en la pared del capilar unida a los grupos  $\text{SiO}^-$ , denominada capa fina. Como éstos cationes no son suficientes para compensar las cargas negativas de la pared, se forma otra capa de cationes sobre la anterior, que al estar a mayor distancia se ve atraída más débilmente por la pared del capilar, esto ocasiona que esté menos unida, a esta segunda capa de cationes se le denomina capa móvil [Casado,2014]. Cuando se aplica el voltaje a través del capilar, los cationes de la fase difusa o capa móvil migran en dirección al cátodo, acarreando agua con ellos. El resultado es un flujo neto de buffer en la dirección del electrodo negativo [Robinson, 2006] (Fig. 6). Con el FEO es posible analizar aniones, cationes y especies neutras en un solo análisis. Sin la presencia del FEO la migración se realizaría de solo aniones, o solo cationes sin pasar todos los analitos por el detector. Con el FEO todas las especies pasan por el detector con el orden de migración de cationes, especies neutras y aniones [Salazar, 2015].



**Figura 6.** FEO representación de la formación de la doble capa [Flores, 2015]

### **F. Detectores utilizados.**

Se han desarrollado una amplia variedad de detectores para la EC como: detectores de fluorescencia, electroquímica y conductividad, pero los detectores más usados comercialmente son los que emplean luz ultravioleta y visible. Los detectores usan fuentes de deuterio con filtros o detección con longitudes de onda seleccionadas. Las fuentes de luz generalmente provienen de un haz de luz entre un fotodiodo de referencia

y un microenfocado óptico en el estuche del capilar. El escaneo se realiza por un detector que ilumina el capilar con luz blanca dispersada y analizada a través de un policromador por arreglo de fotodiodos. El sistema óptico convencional puede ser empleado por una banda espectral aislada por un monocromador colocado entre la fuente de luz y el capilar. El escaneo puede ser controlado rápidamente por un sistema computarizado que controla el movimiento del monocromador en el rango espectral en el tiempo de milisegundos. Este sistema de detección tiene como ventaja que produce menos ruido de fondo, y mucha más sensibilidad que otros detectores [Castagnino,2000].

Hay diferentes tipos de electroforesis dependiendo del tipo combinación de buffer, aditivos y pH, de las cuales se destacan dos tipos en este proyecto la electroforesis capilar de zona y la electroforesis capilar micelar electrocinética:

- **Electroforesis Capilar de Zona:** el mecanismo de diferenciación se basa en la relación masa/carga. Es muy importante la homogeneidad del buffer y el campo eléctrico constante a lo largo de la longitud del capilar. Después de que es inyectada la muestra y aplicado el voltaje los componentes se separan en zonas [Robinson, 2006].

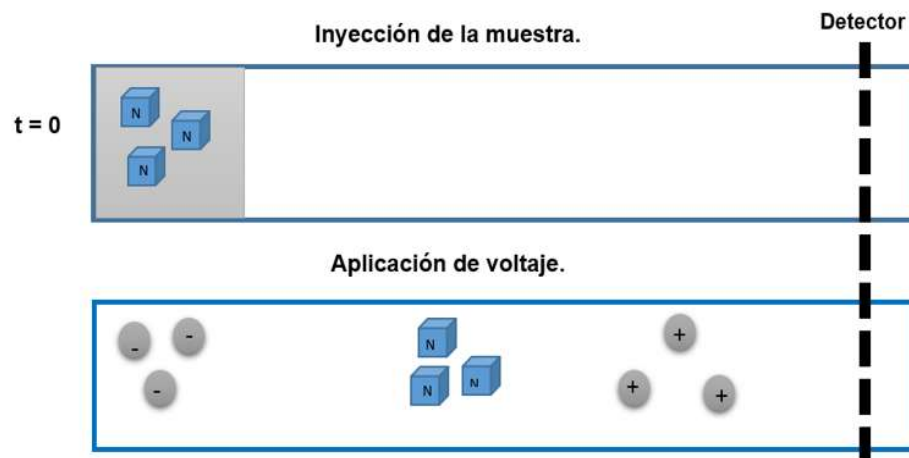


Figura 7. Separación CZE (Higuera,2012).

- **Electroforesis Capilar Micelar Electrocinética:** en esta electroforesis se utilizan soluciones surfactantes formadoras de micelas que permiten las separaciones. Este tipo de electroforesis cuenta con un EOF muy regulado. Una parte importante

de esta modalidad de EC es la formación de micelas, por lo que se hablará de este concepto.

**Micelas:** Agregados anfifílicos de moléculas conocidas como **surfactantes** (Tabla 5), los cuales son moléculas largas de (10 a 50 unidades de carbono) se caracterizan por tener una cola muy larga e hidrofóbica y una cabeza que corresponde a un grupo hidrofílico. Las micelas se forman por el efecto hidrofóbico, esta es la forma para reducir la energía libre del sistema. La cola hidrofóbica no puede solvatare en solución acuosa por encima de una concentración micelar crítica porque los agregados están completamente formados. Los cambios físicos tales como la tensión superficial, la viscosidad y la habilidad de dispersar la luz acompaña la formación de las micelas [Robinson, 2006].

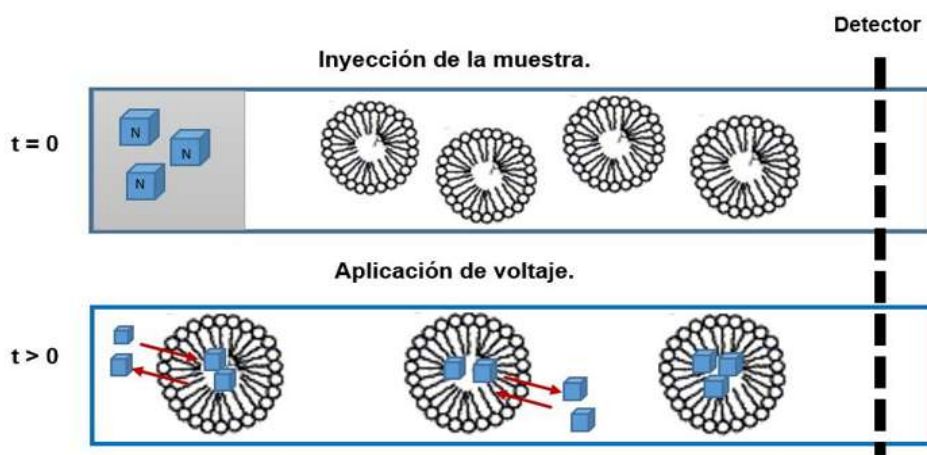


Figura 8. Micelas y separación de moléculas neutras mediante MEKC (Higuera,2012).

Tabla 5. Clases de surfactantes y sus propiedades.

Surfactante	Tipo	CMC	Agregación	Nombre completo
SDS	Aniónico	$8,1 \times 10^{-3}$	62	SDS: dodecil sulfato de sodio
CTAB	Catiónico	$9,2 \times 10^{-4}$	170	CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio
BRIJ – 35	No iónico	$1,0 \times 10^{-4}$	40	BRIJ 35: polioxitileno – 23- lauril éter
Sulfobetaína	Zwitteriónico	$3,3 \times 10^{-3}$	55	Sulfobetaína: N – dodecil - N–N dimetil amonio 3-propano 1-sulfónico ácido

**G. Diferentes Aditivos:**

Además de las soluciones buffer, existen varios aditivos que ayudan a cambiar la selectividad de la separación. Los aditivos pueden alterar las movilidades electroforéticas

de los analitos permitiendo diferenciarlos, aunque originalmente hayan tenido una movilidad electroforética idéntica.

**Tabla 6.** Aditivos, Tomada de Salazar, 2015.

Aditivo	Función del aditivo
Sales inorgánicas	Cambios en la conformación de proteínas.
Solventes orgánicos	Disolver, modificar el FEO.
Urea	Solubilizar proteínas y desnaturalizar oligonucleótidos.
Ácidos sulfónicos, reactivos formadores de pares de iones	Agentes de interacción hidrofóbica.
Surfactantes catiónicos	Inversión de carga en la pared del capilar.
Derivados de celulosa	Reducción del FEO. Proveen un medio de tamizaje.
Aminas	Cubren grupos silanoles libres.

### 1.6. La EC y las micotoxinas.

En la electroforesis capilar, las micotoxinas se separan entre sí y de los compuestos de la matriz alimentaria debido a sus cargas; después, pueden ser detectadas por fluorescencia o absorbancia de luz UV [Piette,2005]. La EC ha sido reconocida como una técnica de separación adecuada que ofrece las ventajas de un desarrollo de método más rápido, mayor eficiencia y menor consumo de solventes y reactivos. Esta técnica es muy prometedora para el análisis rápido de micotoxinas en los alimentos.

Se han utilizado métodos por EC para el análisis de micotoxinas: fumonisina B1 en maíz, aflatoxinas en maíz y arroz, patulina en jugo de manzana y OTA en café, maíz y sorgo. [Gómez et al, 2012] Algunos estudios con EC para análisis de micotoxinas son los siguientes:

- ❖ **Maragos y Michael (2007)**, realizaron un estudio donde evaluaron 22 ciclodextrinas por su capacidad para mejorar la fluorescencia de Zeralenona (ZEN) en una electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser. De las CD que se examinaron, el heptakis (2,6-di-O-metil)-CD fue la que mejoró mayormente la fluorescencia de ZEN. Este se usó en el desarrollo de un método CE-LIF para la detección de ZEN en maíz. El método desarrollado fue capaz de detectar ZEN con un límite de cuantificación de 5 ng/g de maíz. Las recuperaciones de ZEN a partir de maíz se dispararon en el intervalo de 5 ng/g a

500 ng/g como promedio  $103.1 \pm 8.5\%$  ( $n = 20$ ). Para este método se usó un buffer de borato de sodio 20 mM, pH 8.5 con la ciclodextrina indicada en concentración de 2 mg/mL. El voltaje aplicado fue de 10 kV, se utilizó un capilar de 100  $\mu\text{m}$  i.d., 50 cm, a una temperatura 30°C, con longitudes de onda de excitación y emisión de 325 nm y 427 nm, respectivamente. El tiempo de análisis fue de 8 minutos.

- ❖ **Arroyo et al (2010)** investigaron el acoplamiento de MEKC con detección LIF para la determinación de cuatro aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2). La determinación se realizó en un capilar de sílice fundida (70 cm x 75  $\mu\text{m}$ id, 55 cm de longitud efectiva), usando un buffer de borato 20 mM con 30 mM de SDS (pH 8,5) y 7% de ACN. Para aumentar la sensibilidad, se aplicó un procedimiento de preconcentración on-line, basado en el barrido, utilizando el mismo buffer de separación sin SDS como disolvente de la muestra. La precisión del método fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia y los resultados fueron aceptables en todos los casos ( $\text{DER} < 12\%$ ). Los LD de preconcentración on-line fueron más bajos que sin preconcentración y fueron 0.11, 0.52, 0.04 y 0.10  $\mu\text{g/L}$  para G2, G1, B2 y B1, respectivamente. Se desarrollaron estudios de recuperación con extractos de muestras de arroz contaminadas de aflatoxinas, que se encuentran en el intervalo entre 93.0 y 105.4%.
- ❖ **Güray et al (2013)**, describieron un método para la determinación de Zearalenona por electroforesis capilar de zona. Para realizar este estudio se utilizó un buffer de tetraborato sódico 20 mM a pH 9,0 con 15% de acetonitrilo, aplicando 15 kV, inyectando 10 s a 50 mbar. Se usó fenobarbital como un estándar interno; se registraron las señales a 254 nm. Zearalenona y el estándar interno aparecieron a 5:46 min (RSD% 0.20) y 6:35 min (RSD% 0.18), respectivamente. Los resultados de reproducibilidad están en el intervalo de 0.01-1.58 para inter-día. La linealidad se investigó en el intervalo de  $5.20 \times 10^{-7}$  M a  $7.86 \times 10^{-5}$  M ZEA. El LD y el LQ fueron  $2.70 \times 10^{-8}$  M (8,25  $\mu\text{g/L}$ ) y  $8,17 \times 10^{-8}$  M (25  $\mu\text{g/L}$ ), respectivamente. El método se aplicó con éxito al análisis de ZEA en alimentos para aves de corral, harina de maíz, granos y ciertas muestras de cereales como galletas fibrosas, palomitas de maíz y arroz crujiente. Se usó un sistema de electroforesis capilar (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con un detector UV de

matriz de diodos (modelo G1600 A), empleando un capilar de sílice fundida de 75  $\mu\text{m}$  i.d. y 50 cm de longitud efectiva (Agilent, Oregon, EEUU).

### 1.7. VALIDACIÓN.

Es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica. En México está regulado por la COFEPRIS 2011, en su norma CCAYAC – 058. También se considera a la Validation of Analytical Procedures - European Medicines Agency, AOAC ISO 17025.

- **Selectividad:** Capacidad del método para diferenciar al analito de entre los componentes de la muestra.
- **Linealidad:** Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.
- **Precisión:** es la cercanía o grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples porciones de una misma muestra homogénea.
- **Repetibilidad:** Grado de coincidencia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica varias ocasiones a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos, bajo las mismas condiciones en intervalos cortos de tiempo.
- **Reproducibilidad:** Grado de similitud entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de muestra o en instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días y puede ser en laboratorios diferente.
- **Exactitud:** Está determinada por el análisis replicado de las muestras, así como las cantidades del analito. debe medirse con un mínimo de 5 determinaciones.



- **Límite de Cuantificación:** Es la mínima concentración a la cual el analito puede cuantificarse con precisión las condiciones experimentales establecidas.
- **Límite de Detección:** Cantidad más baja a la cual el analito puede ser detectado bajo las condiciones establecidas.

## 2.- JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se les ha dado mucha importancia a los métodos de determinación de micotoxinas. Esto es porque contaminan cultivos, piensos y alimentos, perjudicando la calidad de los alimentos, así como producen daños en la salud de los individuos y animales que consumen los alimentos contaminados. Además, se sabe que la contaminación se debe a más de una micotoxina en el mismo producto, lo que aumenta el riesgo a sufrir los efectos tóxicos de las mismas.

México es uno de los países que al tener una gran diversidad de climas y una extensa geografía tiene las condiciones favorables para que sus piensos y alimentos estén contaminados por diversas micotoxinas. Entre los estados con un gran riesgo debido a sus amplia geografía y diversidad se encuentra Michoacán, cuya variedad de cultivos y, en ocasiones, malas condiciones de almacenamiento, lo hace susceptible de tener disponibles al consumidor productos contaminados.

Actualmente para la determinación de micotoxinas, la AOAC acepta el uso de HPLC acoplado a Espectrometría de Masas y ensayos inmunoenzimáticos ELISA. Aunque estos métodos son los aceptados, tienen desventajas como su costo o su capacidad de análisis (solo pueden analizar una micotoxina a la vez). Para conocer el contenido de micotoxinas que se encuentra en alimentos y piensos es necesario contar con métodos analíticos lo suficientemente sensibles, específicos, versátiles y económicos, por esta razón se propone el desarrollo de un método utilizando electroforesis capilar para la determinación de Aflatoxina B1, Ocratoxina A y Zearalenona, micotoxinas que se encuentran más comúnmente contaminando alimentos.

### **3.- HIPÓTESIS**

Las micotoxinas AFB1, OTA y Zearalenona, de características químicas diferentes, se pueden determinar mediante electroforesis capilar de manera simultánea

### **4.- OBJETIVO GENERAL**

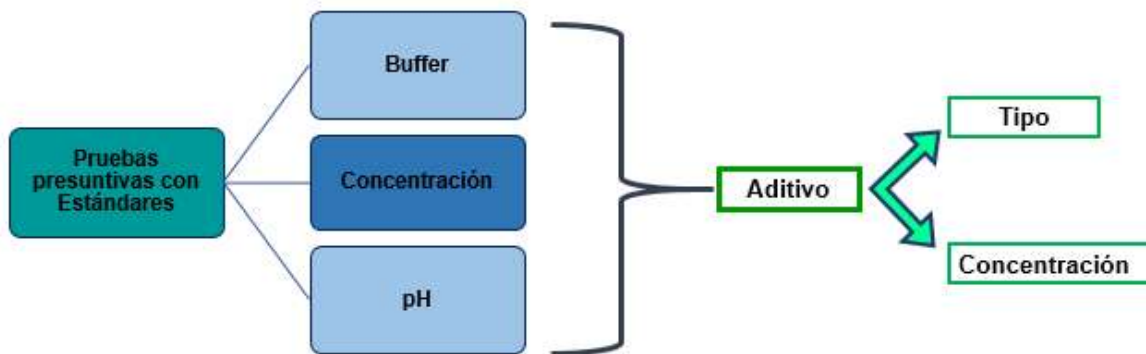
Desarrollar y validar un método por electroforesis capilar, para determinar simultáneamente Aflatoxina B1, Ocratoxina A y Zearalenona.

### **5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

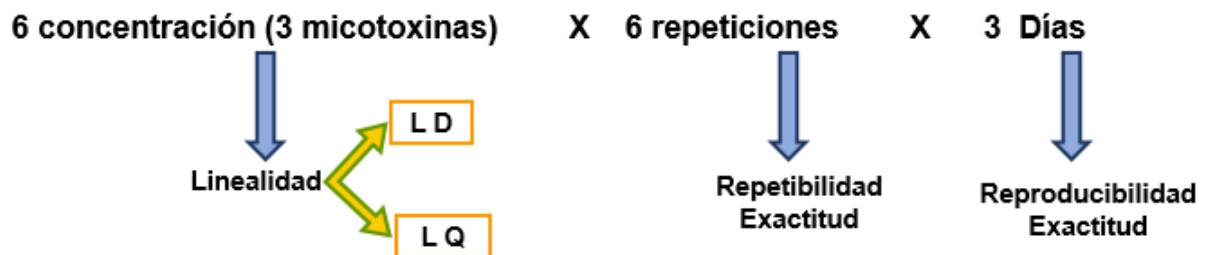
1. Encontrar las condiciones que permitan obtener señales electroforéticas de cada una de las micotoxinas estudiadas.
2. Obtener una buena resolución entre las señales electroforéticas de las micotoxinas estudiadas
3. Validar el método obtenido (selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y de cuantificación).

## 6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 6.1. Desarrollo del Método



### 6.2. Validación



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. MATERIALES.

Se usaron estándares de las micotoxinas de interés (Sigma-Aldrich®), cuyas propiedades se resumen en la tabla 7. Los reactivos usados fueron grado analítico: Benzoato de sodio (LACHEMA), Tetraborato de sodio (Sigma-Aldrich®), dodecil sulfato de sodio (Fluka AG), Hidróxido de sodio (PENTA). Los solventes fueron grado HPLC: Metanol y Dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich®), Acetonitrilo (Fluka).

**Tabla 7.** Propiedades fisicoquímicas de las micotoxinas.

Micotoxina	Solubilidad	Peso molecular (g/mol)	pka	Longitud de onda máxima (nm)
<b>Aflatoxina B1</b> C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Exhibe baja solubilidad en agua, Solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metanol, acetonitrilo, acetona	312.06	-----	Absorción UV 362
<b>Ocratoxina A</b> C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>	Soluble en disolventes orgánicos polares, soluciones acuosas de metanol, poco soluble en agua	404	3.29	Absorción en UV 215 y 334
<b>Zearalenona</b> C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	Ligeramente soluble en hexano; progresivamente más soluble en benceno, acetonitrilo, diclorometano, soluble en soluciones acuosas de metanol y acetona.	318.40	7.41	Absorción en UV 236, 274 y 316

### 7.2. INSTRUMENTACIÓN.

El equipo usado fue BECKMAN COULTER P/ACE™ MDQ Glycoprotein Capillary Electrophoresis System, acoplado a un detector de arreglo de diodos tanto en el Laboratorio de Desarrollo Analítico, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina, UMSNH, como en el Laboratorio de Electroforesis Capilar del Instituto de Química Orgánica y Bioquímica de la Ciudad de Praga, República Checa.

### 7.3. DESARROLLO DEL MÉTODO.

#### 7.3.1 Condiciones Electroforéticas tabla 8:

Condiciones	Valores / intervalos
Longitud del capilar	40 y 60 cm
Capilar i.d.	50 y 75 $\mu$ m
Presión de inyección	13 a 35 mbar
Voltaje	15 a 20 Kv
Temperatura	23 a 25
Longitud de onda*	200 a 400 nm
Buffer	Borato conc. 20 -25 mM, pH 8.5 - 9.1, con/sin SDS 30 a 50 Mm, con/sin ACN 7% Fosfato 40Mm, SDS 10 mM, pH 8, sin aditivos.

\*Las longitudes de onda máxima para cada micotoxina, se corroboraron usando una solución de cada una de ellas de 200  $\mu$ l, usando metanol como solvente y obteniendo los espectros en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies).

#### 7.3.2 Buffers y soluciones:

Se utilizaron soluciones buffer de boratos cuya concentración se varió de 20 a 40 mM con un intervalo de pH de 8-9.1. Se utilizó dodecil sulfato de sodio como aditivo (SDS) en concentraciones de 10 a 50 mM.

#### 7.3.3. Tratamiento de los estándares y muestras:

Los estándares y muestras se mezclaron con borato de sodio, acetonitrilo y/o metanol, para obtener las mejores señales.

### 7.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

La validación del método se llevó a cabo en base a los criterios de validación señalados en la norma de la COFEPRIS 2011 CCAYAC – 058, por la Validation of Analytical Procedures - European Medicines Agency, AOAC ISO 17025.

#### 7.4.1 Linealidad

Para evaluar la linealidad se inyectaron en el equipo seis disoluciones de OTA, ZEA y AFB1 (Tabla 9), en metanol más benzoato de sodio que se usó como estándar interno. La concentración del benzoato varía en el cálculo de linealidad para cada micotoxina: OTA, 0.5 mM de benzoato; AFB1, 0.3 mM de benzoato; ZEA, 0.2 mM de benzoato. Las disoluciones se prepararon por triplicado y se construyeron las curvas de calibración a partir de las que se obtuvieron los parámetros a probar: coeficiente de determinación

( $R^2$ ), coeficiente de correlación ( $r$ ), la pendiente de la recta ( $m$ ), y el valor del intercepto ( $b$ ). Los valores de  $r$  y  $R$ , se obtuvieron con las fórmulas siguientes:

$$r = \frac{\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2} \sqrt{\sum(Y - \bar{Y})^2}} \quad R^2 = r^2$$

Las áreas bajo la curva fueron calculadas por un software llamado CLARITY (Solihull, UK, software de estación de datos cromatográficos con varios módulos para la adquisición de datos, permite el procesamiento y el control de diferentes instrumentos).

**Tabla 9.** Concentraciones de las soluciones de los estándares de las micotoxinas usadas para probar la linealidad.

Aflatoxina B1 (mMoles/L)	Ocratoxina A (mMoles/L)	Zeralenona (mMoles/L)
0.0070	0.078	0.0981
0.0140	0.156	0.1962
0.0280	0.312	0.3925
0.0560	0.625	0.785
0.1121	1.25	1.57
0.2243	2.5	3.14

#### 7.4.2. Precisión y Exactitud.

Estos parámetros se calculan analizando 6 concentraciones de las soluciones de cada una de las micotoxinas por triplicado. Se calcula la DER% en un solo día para exactitud, intradía (repetibilidad); y en tres días diferentes (reproducibilidad) para precisión.

#### 7.4.3. Límite de cuantificación y detección

Para calcular ambos parámetros, se calculó el promedio de la relación señal/ruido. Se determina el límite de detección (LD) cuando la relación señal/ruido es 3:1, mientras que para el límite de cuantificación (LQ) la relación señal/ruido, debe ser 10:1, de acuerdo a USP31 <1225>. El cálculo de ambos parámetros se ilustra con las siguientes fórmulas:

$$LD = \frac{3 \times \sigma_a}{b} \quad LQ = \frac{10 \times \sigma_a}{b}$$

Donde:

$\sigma_a$ : desviación estándar del ruido

$b$ : pendiente de la recta en regresión

### **7.5. Muestras reales.**

Para el análisis de muestras, se contó con dos tipos de muestras una que fue de cuatro lotes de maíz (M34, M37, M58, y M59); estos provenían de una productora de Sinaloa y tienen reporte de contener una alta contaminación de Aflatoxina B1. El contenido de micotoxinas se midió por tiras reactivas.

La segunda muestra consiste en cinco lotes de maíz, recolectados en distintos puntos del estado de Michoacán por miembros del equipo de trabajo (M4, In5, UM, Q9, CH6). Estas muestras se analizaron por ELISA para determinar la cantidad de Ocratoxina A que contenían.

Todas las muestras se analizaron con el método aquí descrito y cuando había sospecha de una micotoxina en particular, se le añadía una cantidad conocida para corroborar la presencia de la misma



## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 DESARROLLO DEL MÉTODO

#### 8.1.1 Longitudes de onda máxima para cada micotoxina.

La Tabla 10 muestra una comparación de las longitudes de onda máximas reportadas, contra las aquí observadas en los espectros para AFB1 (Fig. 9), OTA (Fig. 10) y Zea (Fig. 11). Como se puede apreciar, los máximos difieren y es por eso que, en los primeros ensayos, no se obtuvieron señales de las micotoxinas a las longitudes de onda reportadas. Las longitudes de onda pueden variar de un estudio a otro debido a que existen cambios sutiles en las moléculas cuando se usan diferentes solventes, diferentes valores de pH, así como diferentes temperaturas (ver tabla 11). En este trabajo se optó por obtener los espectros en metanol, debido que es el solvente en que se extraen y en las que las tres micotoxinas son solubles.

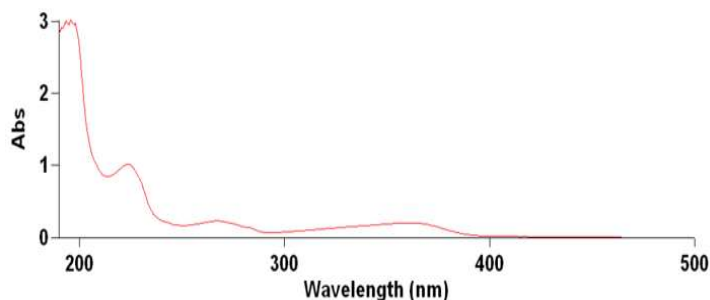


Figura 9. Espectro de absorción de Aflatoxina B1 en metanol.

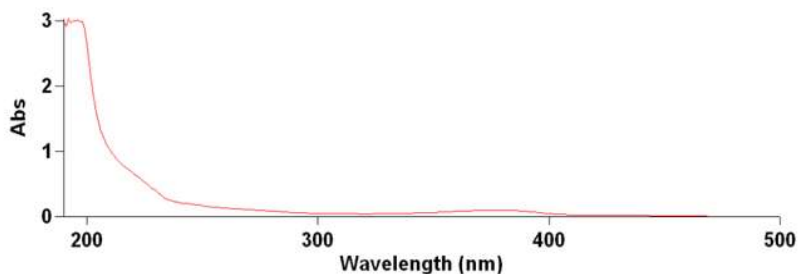


Figura 10. Espectro de absorción de Ocratoxina A en metanol.

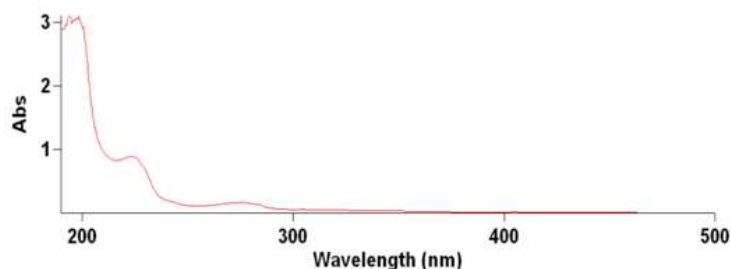


Figura 11. Espectro de absorción de Zearalenona en metanol.

Tabla 10. Longitudes de onda encontradas vs reportadas.

Micotoxina	Observadas (nm)	Reportadas (nm)
AFB1	200, 250 y 285	360
OTA	200, 210 y 230	214 y 333
ZEA	200, 245 y 280	236 y 254

Tabla 11. Longitudes de onda reportadas en los diferentes artículos y solventes en las que se obtuvieron.

Referencia	Micotoxina	Solvente	$\lambda$ (nm)
Arroyo et al, 2010	Aflatoxinas	Metanol evaporado y recuperado con tolueno: ACN (98:2)	Detección por fluorescencia (lex 360nm)
Almeda, 2008	Ocratoxina	Agua destilada	214 y 333
Guray, 2013	Zearalenona	Cloroformo	254

Los cambios en las longitudes de onda se explican de la siguiente manera:

La AFB1 tiene en su estructura química varios grupos carbonilo, que al interactuar con la luz UV van a experimentar transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  y en el estado excitado los electrones van a interactuar con los provenientes de las moléculas de metanol formando puentes de hidrogeno con enlaces poco estables, lo que favorece un desplazamiento hipsocrómico (a menores longitudes de onda). Esto es lo que se observa de acuerdo a lo que reporta Arroyo et al (2010). Aun cuando hicieron la detección por fluorescencia, la longitud de onda de excitación fue de 360 nm equivalente a la utilizaría en UV; entonces, al cambiar de un solvente no polar a uno polar disminuye la longitud de onda y por eso en este trabajo se encontraron máximos de 200, 250 Y 285 nm [Skoog et al, 1998].

En el caso de OTA y ZEA cuyas moléculas contienen grupos carbonilos y alcoholes, los puentes de hidrogeno que se forman con el solvente son más estables (transición de  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) por lo que aumenta la longitud de onda (desplazamiento batocrómico) y se observan las señales a mayores longitudes de onda. Las longitudes de onda máxima reportadas para OTA son mayores en agua que las obtenidas en este trabajo en metanol, lo cual coincide con la teoría porque el metanol es menos polar que el agua. La longitud de onda máxima reportada para ZEA es en cloroformo, solvente con una polaridad muy baja comparada con el metanol, por lo que la longitud de onda observada en metanol es mayor [Skoog et al, 1998].

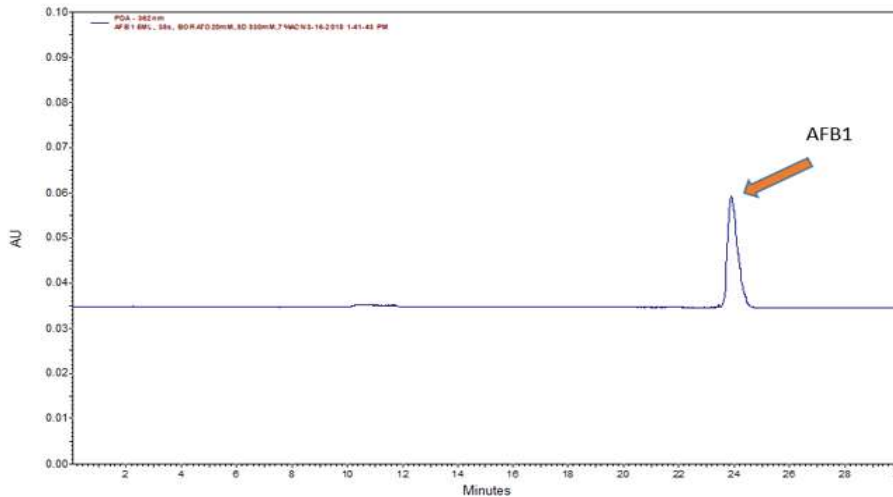
### 8.1.2 Condiciones electroforéticas finales.

La Tabla 12, contiene las condiciones electroforéticas finales con las que se obtuvieron picos simétricos, resueltos, en un tiempo de análisis menor a 15 minutos, para las tres micotoxinas.

Tabla 12. Condiciones electroforéticas finales.

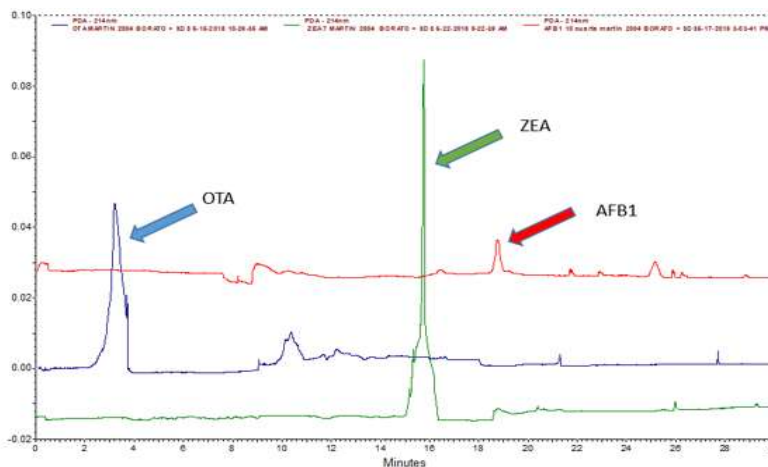
Condiciones	Valores
Presión de inyección (mbar)	13.8
Temperatura °C	23
$\lambda$ (nm)	280 -214 -201
Voltaje kV	17
Diámetro y tamaño del capilar	50mm d.i. X 40.1cm de $L_t$
Buffer conc.	Borato 25 mM
Buffer pH	9.1
Aditivo	SDS 50mM
Prep. de muestra	Metanol + agua

La figura 12 representa el electroferograma obtenido para AFB1 siguiendo las condiciones de Arroyo et al, (2010). Se aprecia un pico simétrico solo para AFB1, las otras dos micotoxinas no fueron detectadas a esa longitud de onda y se observa que el tiempo de análisis es muy prolongado. Estas condiciones si permiten el análisis de las cuatro aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) por sus características químicas similares.



**FIGURA 12.** Electroferograma basado en las condiciones de Arroyo et al, 2010. Donde se logró obtener señal de AFB1. Condiciones: Buffer de borato de sodio 20mM (pH 8.5) + SDS 30 mM, 7% ACN; 70 cm x75  $\mu$ m id,  $\lambda_{ex}$ = 360nm,  $\lambda_{em}$ = 420nm.

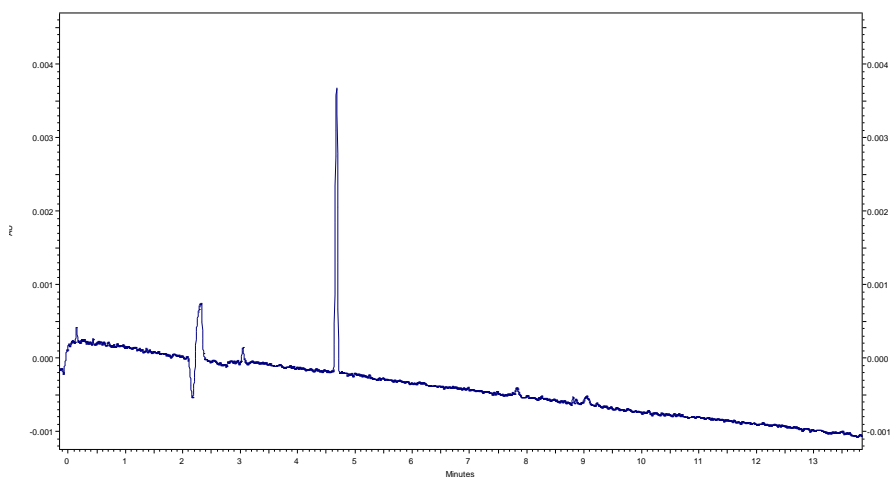
El electroferograma de la figura 13 representa el análisis por separado de cada una de las micotoxinas, siguiendo las condiciones de Martin et al (2004) (buffer de boratos 25 mM pH 9, con SDS 50mM y 7% ACN;  $\lambda$ = 200 y 280 nm, capilar de 75 $\mu$ m d.i. X 60 cm de  $L_t$ ). Ellos analizaron diez toxinas incluyendo las tres de interés en este trabajo. En este trabajo se decidió utilizar un capilar de 50  $\mu$ m d.i. X 40 cm de  $L_t$ , para reducir el tiempo de análisis. También se eliminó el uso de ACN, ya que ocasionaba mucho ruido de fondo. Entonces, con estas modificaciones se obtuvieron las señales electroforéticas deseadas, en un tiempo de análisis adecuado y con una línea base muy estable. Este último factor es importante cuando se quieren analizar muestras reales, ya que las señales de los componentes de la matriz de la muestra pueden interferir con las señales de las micotoxinas.



**FIGURA 13.** Electroferograma con las 3 señales de las micotoxinas sobrepuestas. Fueron obtenidas individualmente, siguiendo las condiciones de Martin et al (2004). Los tiempos de migración para las micotoxinas fueron 2.5, 18 y 20 min, para OTA, Zea y AFB1, respectivamente.

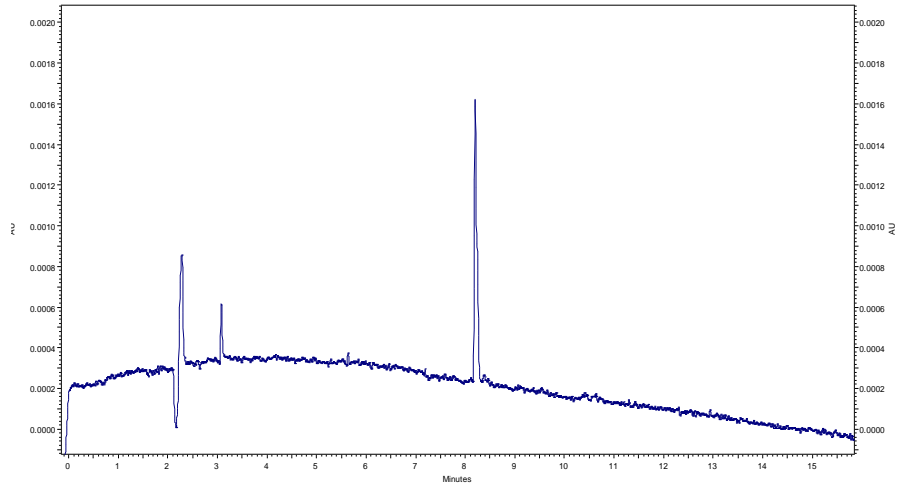
Otro factor que se modificó fue la presión de inyección, por tener un capilar con diámetro interno más reducido. De esta manera, se inyecta prácticamente la misma cantidad de muestra al capilar que cuando se usaba uno de 75  $\mu\text{m}$ ; además de evitar que el capilar se rompiera con una mayor presión. Entonces, el diámetro menor favoreció que las moléculas tuvieran un menor espacio para difundir y migraran a mayor velocidad.

En los electroferogramas de las figuras 14, 15 y 16 para OTA, Zea y AFB1, respectivamente, se observan señales bien definidas con un tiempo de migración menor. La señal de AFB1 es la que migra en un mayor tiempo, pero es evidente que el tiempo de análisis se redujo a la mitad, 15 min. El electroferograma de la figura 17, se muestra la mezcla de las tres micotoxinas. En este caso, la mezcla disminuye el tiempo de migración de las tres sin perder resolución. Entonces, se pone de manifiesto que las condiciones aquí presentadas favorecen la determinación de las tres micotoxinas en mezcla. Más adelante se mostrarán ejemplos de la aplicación del método a la determinación de muestras reales.



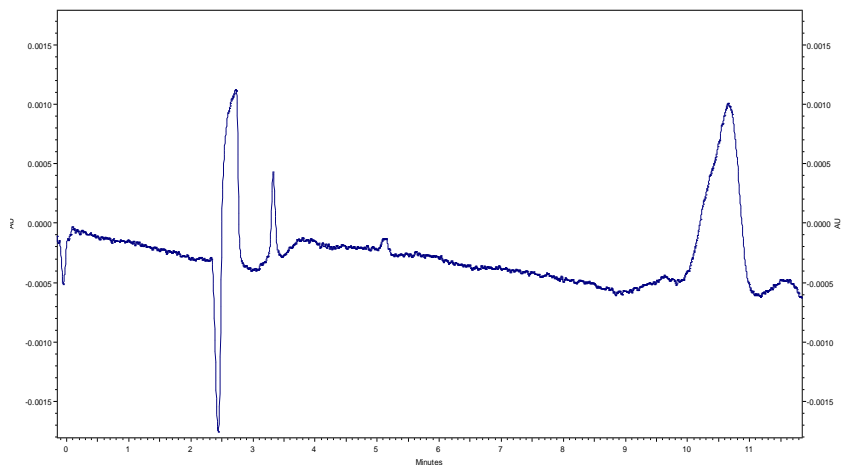
**Figura 14.** Electroferograma de Ocratoxina A.

Se detectó a 4.5 minutos. en tetra borato de sodio 25 Mm, pH 9.1, aditivo SDS 50mM voltaje de 17 kV, presión de inyección de 13mbar. Analito preparado en metanol.



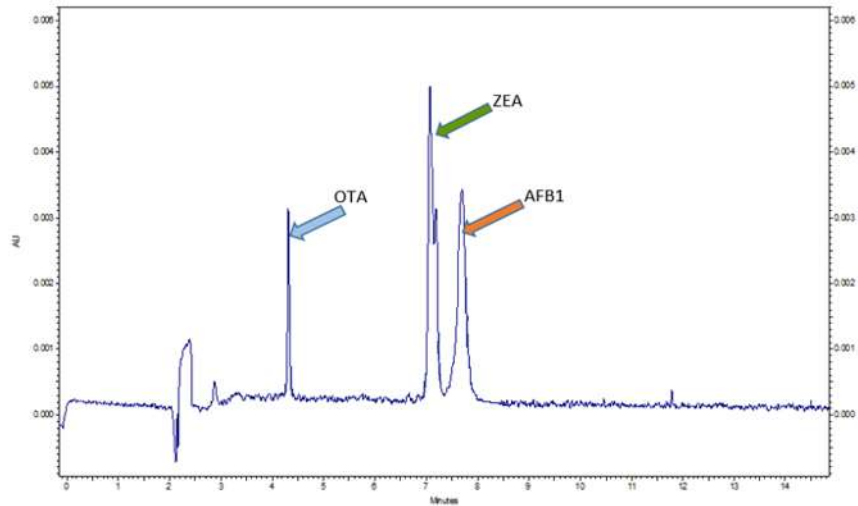
**Figura 15.** Electroferograma de Zearalenona.

Se detectó 8.4 min. en tetra borato de sodio 25 mM con pH 9.1, aditivo SDS 50mM voltaje de 17 kV, presión de inyección de 13mbar. Analito preparado en metanol.



**Figura 16.** Electroferograma de Aflatoxina B1.

Se detectó a los 10 minutos. en tetra borato de sodio 25 mM, pH 9.1, aditivo SDS 50mM voltaje de 17 kV, presión de inyección de 13 mbar. Analito preparado en metanol.



**Figura 17.** Electroferograma de una mezcla de OTA, ZEA Y AFB1 a 201 nm. Tiempo de detección fue menor de 15 min. Buffer de tetra borato de sodio 25 mM pH 9.1, aditivo SDS 50mM voltaje de 17 KV, presión de inyección de 13mbar. Analito preparado en metanol.

La resolución es un parámetro importante en cualquier técnica de separación. Es la medida del grado de separación de los componentes que constituyen una muestra. La resolución entre dos picos adyacentes se calcula a partir de la siguiente fórmula (ver la tabla 13):

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

Donde:

$R_s$  = Resolución

$t_1$  y  $t_2$  = tiempos de migración de los componentes 1 y 2, respectivamente.

$w_1$  y  $w_2$  = anchuras de dos picos adyacentes.

La resolución debe ser  $R_s \geq 1$  y  $R_s \leq 1.5$  para poder decir que el método tiene resolución.

## 8.2.- VALIDACIÓN.

### 8.2.1. Selectividad

La selectividad indica la idoneidad de un método para discriminar entre sustancias diferentes. En este caso, es posible distinguir las señales ocasionadas por las tres micotoxinas, en tiempos de migración diferentes y valores de resolución aceptables. Los electroferogramas de las figuras 18, 19 y 20, representan los análisis de extractos de muestras de maíz. En ellos se pueden observar las señales para cada micotoxina, señalada en cada electroferograma, perfectamente bien definidas.

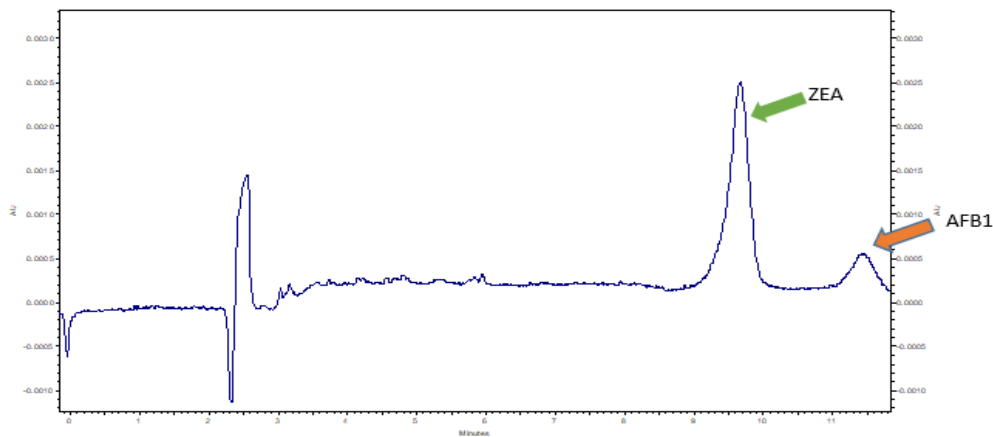


Figura 18. Muestra M37 a 201 nm.

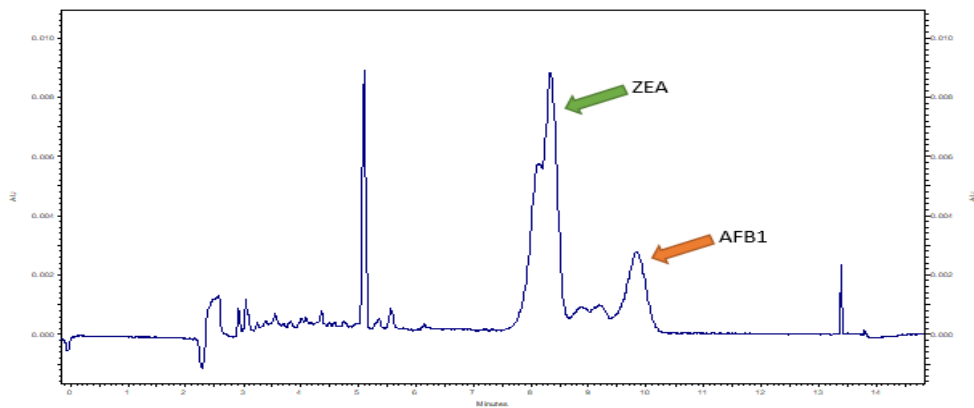
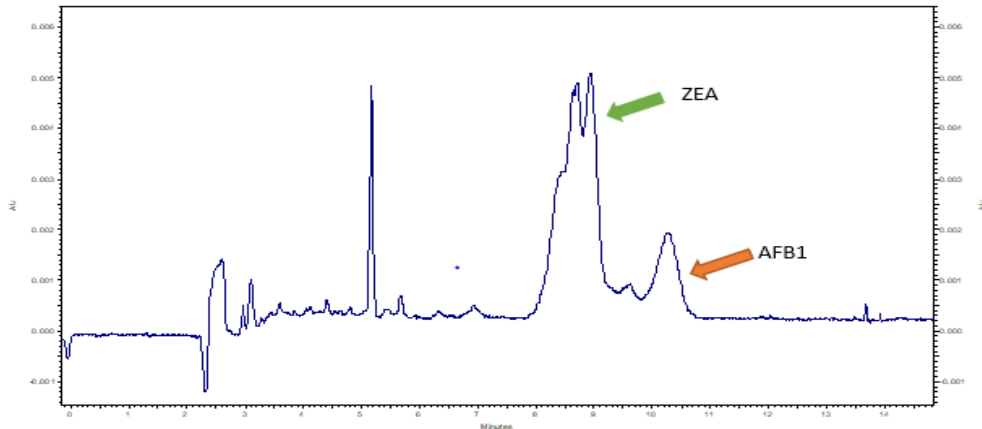


Figura 19. Muestra M37 + estándar de aflatoxina a 201nm.





**Figura 20.** M37 más estándar de ZEA y estándar de AFB1.

**Tabla 13.** Resolución de las micotoxinas en diferentes electroferogramas.

Electroferograma	Resolución
Figura 17. Electroferograma de una mezcla de OTA, ZEA Y AFB1 (Rs de Zea y AFB1)	1
Figura 19. Muestra M37 + estándar de aflatoxina a 201nm	1.49
Figura 20. M37 más estándar de ZEA y estándar de AFB1.	1.45

Así que las condiciones electroforéticas aquí obtenidas proporcionaron un método selectivo.

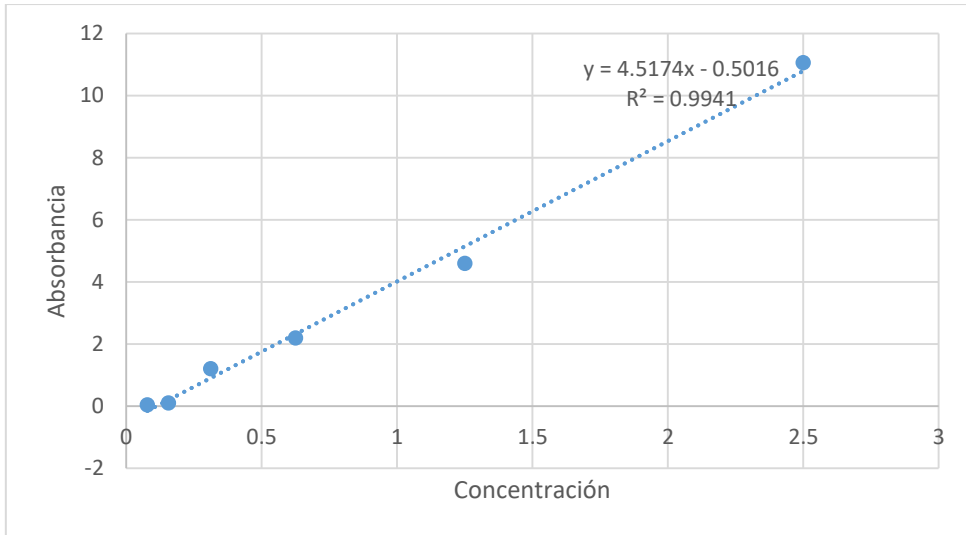
**8.2.2. Linealidad.** Se calculó y graficó la linealidad de las tres micotoxinas obteniendo los resultados de las tablas 14, 15, 16. Las gráficas para cada micotoxina son: OTA, figura 21; ZEA, figura 22 y AFB1, figura 23.

**Tabla 14.** Calibración Ocratoxina A. **Tabla 15.** Calibración Zearalenona. **Tabla 16.** Calibración Aflatoxina B1

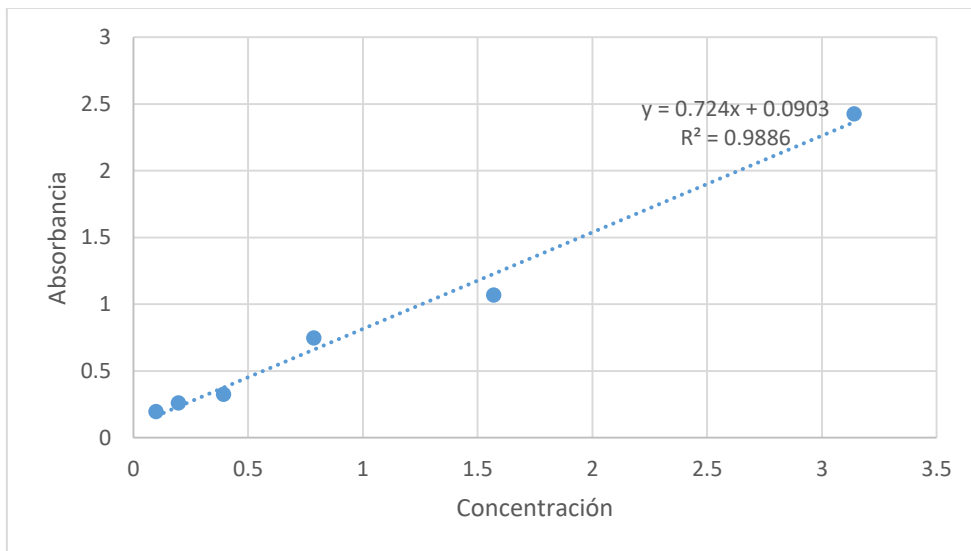
Conc. (mMoles/L)	Áreas bajo la curva
0.078	0.0449
0.156	0.1104
0.312	1.2096
0.625	2.198
1.25	4.6002
2.5	11.0573

Conc. (mMoles/L)	Áreas bajo la curva
0.098125	0.1952
0.19625	0.2592
0.3925	0.3241
0.785	0.746
1.57	1.06863
3.14	2.4247

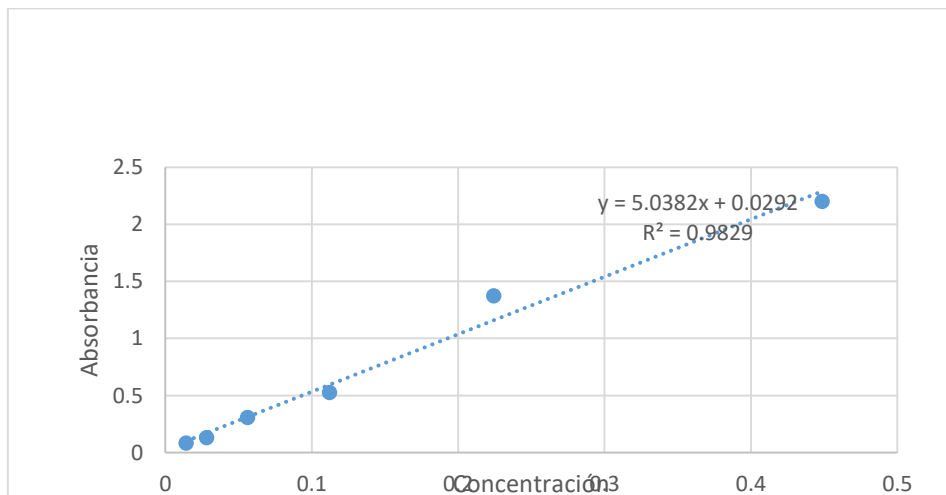
Conc. (mMoles/L)	Áreas bajo la curva
0.0140	0.0827
0.0280	0.1305
0.0560	0.3087
0.1121	0.5258
0.2243	1.3757
0.4487	2.2023



**Figura 21.** Curva de calibración de Ocratoxina A.



**Figura 22.** Curva de calibración de Zearalenona.



**Figura 23.** Curva de calibración de Aflatoxina B1.

El **coeficiente de correlación (r)** obtenido en la curva de calibración es cercano a la unidad, lo que significa que sirve para conocer las concentraciones e interpolar las absorbancias. El **coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>)** es 0.98 lo que nos afirma que hay una respuesta lineal de detector para la concentración, así como que el error de cálculo es del 1.1% por lo que es adecuado (Tabla 17).

**TABLA 17.** Intervalos, coeficientes de correlación y determinación de AFB1, OTA Y ZEA

Micotoxina	Intervalo (mMoles/L)	R <sup>2</sup>	r
AFB1	0.0140- 0.4487	0.9829	0.9914
OTA	0.078 – 2.5	0.9941	0.9970
ZEA	0.0981 – 3.14	0.9886	0.9942

La COFEPRIS en la norma CCAYAC 058 nos indica que el coeficiente de correlación es aceptable para validación si:

$r \geq 0.98$  para cuantificación de residuos e impurezas.

$r \geq 0.99$  para cuantificación de contenido e ingrediente activo.

En nuestro caso las micotoxinas son impurezas en los cereales al ser un contaminante, por lo tanto, los coeficientes de correlación son aceptables para validación.

La linealidad se validó de acuerdo a lo indicado en la COFEPRIS 2011 CCAYAC – 058, y en la guía Validation of Analytical Procedures - European Medicines Agency, AOAC ISO 17025; que nos indica un mínimo de 5 a 6 niveles de concentración repitiendo estos valores 3 veces mínimo para procesos analíticos. Para obtener la curva de calibración, se calculó la linealidad por el método de mínimos cuadrados y se promediaron los valores.

### **8.2.3. Precisión y Exactitud:**

La precisión (DER%) y la exactitud del método se evaluó en un solo día (intradía, repetibilidad), así como en diferentes días (interdía, reproducibilidad). Los valores obtenidos se muestran en las tablas 18 y 19.

**Tabla 18.** Variabilidad intradía para las 3 micotoxinas.

Micotoxina	Conc. Nominal (mg/L)	Conc. observada (mg/L)	% DER	% Desviación conc. real	Exactitud %
Aflatoxina B1	0.0728	0.0768	6.8446	-7.846	92.1540
Ocratoxina A	0.1120	0.1126	2.9684	0.5345	100.5345
Zearalenona	0.3323	0.3605	6.59016	8.4997	108.4997

**Tabla 19.** Variabilidad interdía para las 3 micotoxinas.

Micotoxina	Conc. Nominal (mg/L)	Conc. observada (mg/L)	% DER	% Desviación conc. Real	Exactitud %
Aflatoxina B1	0.04313	0.0441	5.4043	2.4596	102.4596
Ocratoxina A	0.1459	0.1438	4.2049	-1.3846	98.6154
Zearalenona	0.5244	0.5857	6.5968	11.6969	111.6969

En exactitud, cada uno de los valores de las micotoxinas fueron cercanos al 100%.

La norma CCAYAC-058 de COFEPRIS establece que para que la repetibilidad y la reproducibilidad sea aceptadas, la desviación estándar relativa debe estar dentro de los siguientes parámetros, tabla 20:

**Tabla 20.** Parámetro para ser aceptados por la norma CCAYAC-058 de COFEPRIS.

Concentración del analito	Repetibilidad	Reproducibilidad
<1 µg/kg ó µg/L	CV ≤ 35%	CV ≤ 53%
<b>1 a 10 µg/kg ó µg/L</b>	CV ≤ 30%	CV ≤ 45%
<b>10 a 100 µg/kg ó µg/L</b>	CV ≤ 20%	CV ≤ 32%
0.1 a 100 mg/kg ó mg/L	<b>CV ≤ 15%</b>	<b>CV ≤ 23%</b>
100 a 1000 mg/kg ó mg/L	<b>CV ≤ 10 %</b>	<b>CV ≤ 16%</b>

Se muestran los valores obtenidos para repetibilidad (Tabla 21) y de reproducibilidad (Tabla 22) dentro de los límites que marca la norma CCAYAC-058 COFEPRIS. Están dentro de lo aceptado para validación.

**Tabla 21.** Datos de repetibilidad.

	AFB1	OTA	ZEA
C (mg/L)	0.0768	0.1126	0.3605
DE (mg/L)	0.0052	0.0033	0.0237
DER%	6.84461	2.9684	6.5901

**Tabla 22.** Datos reproducibilidad.

	AFB1	OTA	ZEA
C (mg/L)	0.0820	0.1438	0.5857
DE (mg/L)	0.0048	0.0371	0.1438
DER%	4.01	4.2049	6.5968

La precisión es un parámetro establecido por la COFEPRIS y la guía de validación europea, que incluye repetibilidad y reproducibilidad. Estos se evalúan con el DER% que en, Norma Mexicana se tiene diferentes valores dependiendo de su concentración y las DER% de las tres micotoxinas para repetibilidad y reproducibilidad están dentro de los intervalos establecidos (tablas 17,18,19). Por lo tanto, el método es preciso, reproducible y presenta repetibilidad.

La exactitud es la capacidad que tiene el método analítico para obtener resultados próximos al verdadero valor y reflejar el error sistemático o la tendencia a él. Se hace una comparación de las concentraciones adicionadas (nominales) contra los determinados para observar si existe parecido entre ellas. Las normas USP y la norma mexicana, indican que los valores determinados deben ser estadísticamente iguales al 100%. Se realizó una prueba t para muestras pareadas, donde:

$H_0$ : cantidad observada  $\neq$  cantidad adicionada.

$H_1$ : cantidad observada = cantidad adicionada.

Se obtuvo que la p fue mayor de 0.05 tanto para intradía (0.3352) como para interdía (0.4336), por lo tanto, no hay diferencia significativa entre los valores. La t de tablas fue de -2.92 y la t calculada intradía -1.2583 y interdía -0.9717, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa porque  $t_c < t_t$ . Entonces, con estos dos parámetros se demuestra que hay exactitud con este método.

#### 8.2.4. Límites:

**Tabla 23.** Límites de cuantificación y detección de las micotoxinas por electroforesis capilar.

Micotoxina	Límite de cuantificación	Límite de detección
<b>AFLATOXINA B1</b>	1.3801X 10 <sup>-5</sup> mMol/L	4.1765 x 10 <sup>-6</sup> mMol/L
<b>OCRATOXINA A</b>	2.6722x10 <sup>-5</sup> mMol/L	8.9076 x10 <sup>-5</sup> mMol/L
<b>ZERALENONA</b>	4.2715x10 <sup>-5</sup> mMol/L	1.2814x10 <sup>-5</sup> mMol/L

Arroyo et al (2010) reportaron para aflatoxina LD 0.10  $\mu$ g/L y LQ 0.32  $\mu$ g/L, los valores obtenidos en este trabajo fueron (LD 1.3030  $\mu$ g/L, LQ 4.3059  $\mu$ g/L, que son superiores debido a que Arroyo y colaboradores, trabajaron con una longitud de onda de 254nm y la aflatoxina presenta mayor sensibilidad a 250 nm aproximadamente, en nuestro método se renuncia a la sensibilidad de aflatoxina para lograr la detección de las 3 micotoxinas a la misma longitud de onda.

Para Zea se obtuvo LQ  $4.2715 \times 10^{-8}$  M ( $13.6004 \mu\text{g/L}$ ) y LD  $1.2814 \times 10^{-8}$  M ( $4.0749 \mu\text{g/L}$ ), al realizar una comparación con los resultados reportados por Guray et al (2013), que fueron de LD  $2.70 \times 10^{-8}$  M ( $8.25 \mu\text{g/L}$ ) y LQ  $8.17 \times 10^{-8}$  M ( $25 \mu\text{g/L}$ ), se puede observar que los límites de detección y cuantificación obtenidos con EC utilizando un detector de arreglo de diodos a 201nm fueron más sensibles que los obtenidos por Guray y colaboradores utilizando un detector de fluorescencia a 254 nm, esto puede ser debido a que la Zearalenona presentó mayor longitud de onda en metanol a 200 nm.

### **8.3.- ANÁLISIS DE MUESTRAS.**

Se contó con dos tipos de muestras para hacer el análisis y comprobar la aplicabilidad del método la primera muestra consiste en cuatro lotes de maíz provenientes de una productora de Sinaloa. Las muestras tenían reporte de una alta contaminación de Aflatoxina B1 que fue determinada por tiras reactivas.

La segunda muestra consiste en diferentes lotes de maíz, recolectados en diferentes puntos del estado de Michoacán por miembros del equipo de trabajo. Los lotes de Queréndaro, Morelia, Umécuaro e Indaparapeo. Todas estas muestras fueron analizadas por ELISA para determinar la cantidad de Ocratoxina A presente.

Para determinar el contenido de las micotoxinas aquí estudiadas, se realizó el mismo proceso de extracción en todas las muestras.

#### **8.3.1. Aflatoxina por Tiras Reactivas**

En el estudio en campo para la determinación de micotoxinas se utilizan las tiras reactivas por ser más rápidas. Las tiras reactivas son un método semi cuantitativo. En el mercado existen diferentes marcas de tiras reactivas con distinta sensibilidad cada una, entre las que se encuentran las de ROMER LABS con un límite de detección de 3.31 ppb y de cuantificación de 0 - 500 ppb. También están las de Reveal Max con una sensibilidad de 20 ppb. Vicam con una sensibilidad de 10 a 20 ppb, entre otras.

Se analizaron 4 muestras de maíz que fueron proporcionadas por una productora del estado de Sinaloa, quienes reportaron contaminación por aflatoxinas por arriba de los niveles máximos recomendados.

Las concentraciones reportadas por las tiras reactivas vs las detectadas por el método desarrollado (Tabla 24).

**TABLA 24.** Concentraciones obtenidas por Tiras Reactivas vs Conc. En MECK de AFB1.

Muestra	Afb1 (ng/g) Tiras reactivas	AFB1 (ng/g) MECK
M34	0.00614	0.4077
M37	0.00603	0.4088
M58	0.0055	0.53991
M59	0.0097	0.5525

### **Comparación de dos métodos:**

Hipótesis nula: Los resultados con las tiras reactivas son diferentes a la Electroforesis Capilar.

Hipótesis alternativa: Los resultados con las tiras reactivas son iguales a la Electroforesis Capilar.

Se realizó la prueba t de student para comparar las 4 parejas de resultados, obteniendo: la t tablas fue de 3.18 y la t calculada de 11.9311, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula porque  $t_c > t_t$ . La p fue de 0.001 lo que quiere decir que si existe una diferencia significativa.

Las tiras reactivas son un método semi cuantitativo, por lo que son menos sensibles que la electroforesis capilar que es un método cuantitativo. Con las tiras reactivas se detecta una micotoxina a la vez, lo cual es un inconveniente pues, como se muestra en los resultados del análisis por EC, las muestras también estaban contaminadas por Zearalenona ver figs. 24, 25, 26, 27. Todas las concentraciones obtenidas por MECK se encuentran en la tabla 26.

### 8.3.2 Ocratoxina por ELISA

El ELISA es una técnica cuantitativa, como la electroforesis capilar, por lo que se realizó la comparación de estos dos métodos con una prueba de t con la comparación de las concentraciones (Tabla 25) y se obtuvo lo siguiente:

#### Comparación de los Métodos ELISA vs Electroforesis Capilar

Hipótesis nula ( $H_0$ ) = Los resultados obtenidos por ELISA son diferentes a los obtenidos por EC.

Hipótesis alternativa ( $H_1$ ): Los resultados obtenidos por ELISA son iguales a los obtenidos por EC.

Los resultados de la prueba t muestran lo siguiente: la t de tablas es de 2.78 y la t calculada de 0.3064; por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa porque  $t_c < t_t$ , los resultados obtenidos por ambos métodos pueden considerarse equivalentes, lo que permite tener opciones en la determinación de este tipo de compuestos. Por otro lado, el valor de p fue de 0.7745, lo que refuerza el hecho de que no hay diferencias significativas entre los resultados de ambos métodos.

**TABLA 25.** Concentraciones obtenidas por ELISA vs Concentración en MECK de OTA.

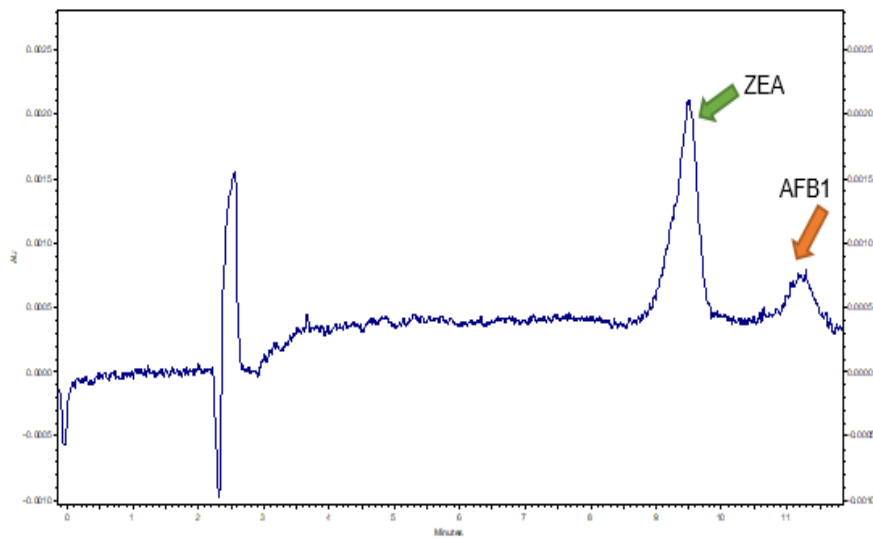
Muestra	Ota (ng/g) Elisa	OTA (ng/g) MECK
M4	0.16511	1.084
In5	0.05528	0.9991
UM	0.12	0.73
Q9	1.52719	0.0697
CH6	0.03851	0.3491

**TABLA 26.** Concentraciones reportadas por MECK.

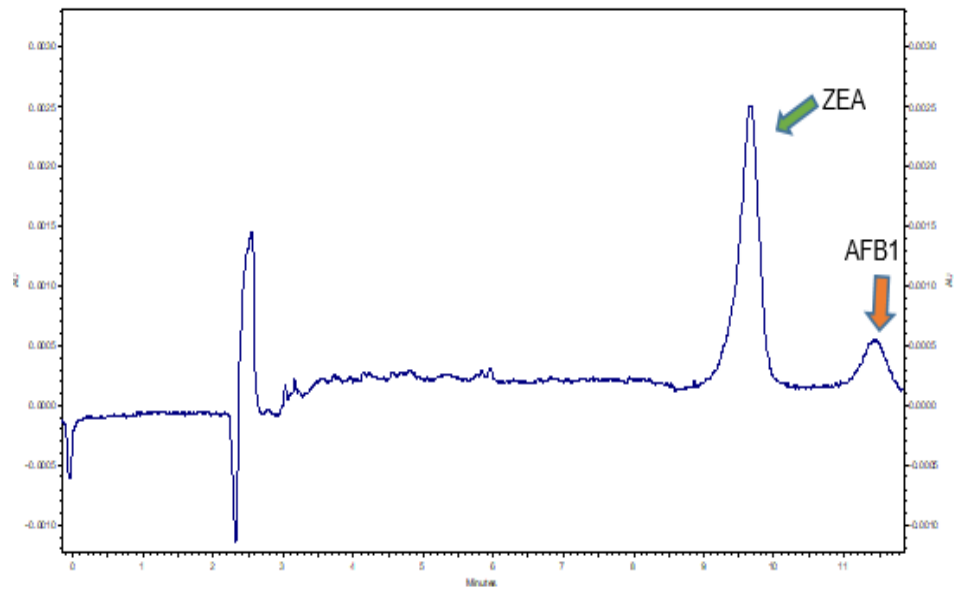
Muestra	AFB1. ng/g	ZEA. ng/g	OTA ng/g
M34	0.4077	129.7461	ND
M37	0.4088	156.5397	ND
M58	0.53991	93.05	ND
M59	0.5525	103.4099	ND
M4	NP	91.5853	1.084
In5	2.4171	34.1829	0.9991
UM	1.1539	NP	0.73
Q9	1.1428	NP	0.0697
CH6	NP	NP	0.3491



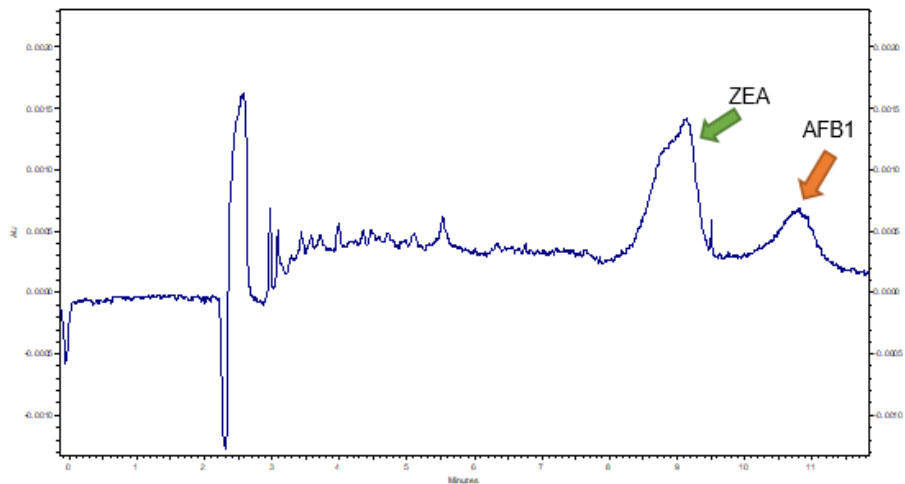
Existen diversos métodos para la determinación de micotoxinas, como el HPLC, ELISA, las tiras reactivas, entre otros. Todos los métodos tienen ventajas y desventajas; ejemplos de estas últimas son su elevado costo o que solo logran determinar una sola micotoxina a la vez. Usando el método desarrollado en este trabajo, se logró estandarizar la determinación de 3 micotoxinas de manera simultánea y se demostró su utilidad en el análisis de muestras de maíz con un reporte de alta contaminación por AFB1 solamente; sin embargo, también se demostró la presencia de Zea y en una alta concentración. Los resultados aquí mostrados, dan la posibilidad de usar cualquiera de las dos metodologías, ELISA y EC, para analizar una micotoxina en particular, como fue el caso de OTA. De cualquier manera, la ventaja del método por EC, es que fue posible detectar más de una micotoxina en las muestras de maíz y, como se observa en la tabla 26, se detectaron hasta las tres micotoxinas analizadas en este trabajo en una muestra (Fig. 28).



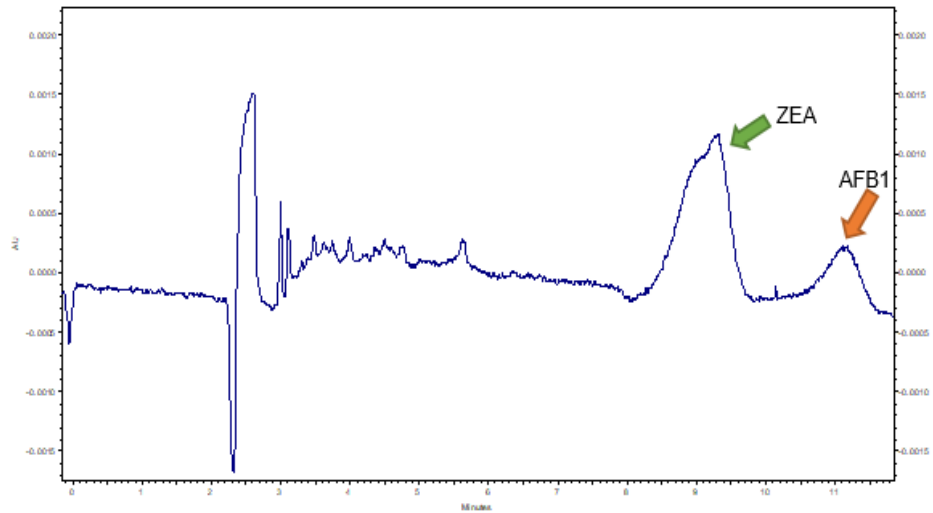
**Figura. 24.** Electroferograma de la muestra M34, en el cual aparece ZEA Y AFB1  
Condiciones en fig. 17



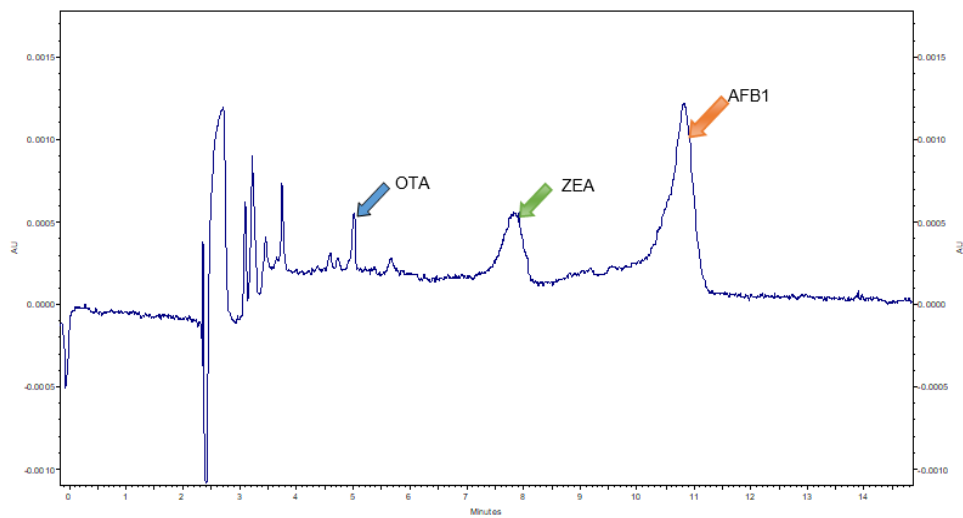
**Figura. 25.** Electroferograma de la muestra M37, en el cual aparece ZEA Y AFB1. Condiciones en fig. 17



**Figura. 26.** Electroferograma de la muestra M58, en el cual aparece ZEA Y AFB1. Condiciones en fig. 17.



**Figura 27.** Electroferograma de la muestra M59, en el cual aparece ZEA Y AFB1. Condiciones en fig. 17



**Figura 28.** Electroferograma de la muestra In5, donde se observa la presencia de las tres micotoxinas estudiadas.

## 9. CONCLUSIÓN

En este trabajo se desarrolló y validó un método MECK para la determinación de tres micotoxinas de manera simultánea en un corto tiempo. Este método cumple con los parámetros de COFEPRIS 2011 CCAYAC – 058 y de la guía Validation of Analytical Procedures - European Medicines Agency, AOAC ISO 17025.

Este método es sensible, eficaz, lineal, preciso y exacto, por lo que puede ser usado para la determinación de AFB1, OTA y ZEA, lo que se demostró realizando la determinación de las tres micotoxinas en extractos de maíz con resultados muy favorables.

## 10. RECOMENDACIONES

- ❖ El equipo debe de ser encendido una hora antes de comenzar el análisis para que el detector logre calentarse y muestre una línea base recta sin inclinación.
- ❖ Las muestras deben de tener un volumen constante para que el análisis no tenga variaciones.
- ❖ Las muestras con metanol como solvente se deben preparar con poco tiempo antes de comenzar su análisis esto para evitar la evaporación del solvente y no se altere el volumen y concentración de la muestra.
- ❖ El aditivo SDS cuando actúa en muestras preparadas con metanol debe de tener una concentración más elevada de 15 mM para que no se altere la formación de micelas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Adetunji, M, Atanda, O y Ezekiel, C. (2017). Risk Assessment of Mycotoxins in Stored Maize Grains Consumed by Infants and Young Children in Nigeria, *Children Basel*, 4(7): 58. doi:10.3390/children4070058

Alberts T (2017). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–119, recuperada de: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>

Almeda S, Arce L. y Valcárcel M. (2008). Combined use of supported liquid membrane and solid-phase extraction to enhance selectivity and sensitivity in capillary electrophoresis for the determination of ochratoxin A in wine. *Electrophoresis*, 29 (7):1573 – 81

Alshannaq A y Yu J-H (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal Environmental Researt Public Health*; 14(6): 632. DOI: 10.3390/ijerph14060632

Amezqueta, S, Schorr-Galindo S, Murillo-Arbizu M, González-Peñas E, López de Cerain, A y Guiraud JP (2012). OTA-producing fungi in food stuffs: A review. *Food Control*, 26(2), 259-268.

Anguiano-Ruvalcaba GL, Vargas-Cortina AV y Guzmán-De Peña, D (2005). Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Pública de México*, 47(5), 369-375. Recuperado en 07 de mayo de 2019, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342005000500007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000500007&lng=es&tlng=es).

Arroyo-Manzanares N, Huertas-Pérez JF, Gámiz-Gracia L y García-Campaña AM (2014) Control de Micotoxinas en Alimentos, Universidad de Granada, *Investigación GRASEQA: seguridad alimentaria Boletín GRASEQA*. 7, 16 – 31.

Arroyo-Manzanares N, Gamiz L, Garcia A, Soto JJ y Garcia L. (2010) On-line preconcentration for the determination of aflatoxins in rice samples by micellar electrokinetic

capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 31: 2180–2185. DOI 10.1002/elps.201000062

Bellver Soto MJ (2013). Evaluación del Riesgo de Exposición a Ocratoxina A. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. 20 -24.

Breitholtz-Emanuelsson A, Olsen M, Oskarsson A, Palminger I, Hult K. (1993) Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J Assoc Anal Chem*; 42: 172-6.

Casado, M. (2014). Aplicaciones de la Electroforesis Capilar en el Estudio de Errores Congénitos del Metabolismo. Tesis Doctoral. Universidad autónoma de Barcelona Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de medicina. Barcelona. 13 -17

Castagnino JM. (2000). Electroforesis capilar. *Bioquímica*. 25(1):13-32.

Castellanos-Onorio O, Gonzalez-Rios O, Guyot B, Fontana TA, Guiraud JP, Schorr-Galindo, S., Suárez-Quiroz M. (2011). Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*, 22(8), 1184–1188. doi:10.1016/j.foodcont.2011.01.014.

Chopin M. (2012). Principios Básicos de Electroforesis Capilar: Técnica Analítica de Separación de Analitos, Investigación en Discapacidad, 1 (2): 86-89.

Cruces Blanco Carmen (1998), Electroforesis Capilar, Monografías de Ciencia y Tecnología, Universidad de Almería, España, (4): 46-49.

Desai M y Armstrong D. (2003). Separation, Identification, and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1): 38–51. DOI: 10.1128/MMBR.67.1.38-51.2003

Dąbrowski, M, Obremski K, Gajęcka M, Gajęcki M y Zielonka Ł. (2016). Changes in the Subpopulations of Porcine Peripheral Blood Lymphocytes Induced by Exposure to Low

Doses of Zearalenone (ZEN) and Deoxynivalenol (DON). *Molecules*, 21(5), 557.

doi:10.3390/molecules21050557

Electroforesis Capilar, (2012), recuperado de:

<https://es.slideshare.net/VictorHiguera/electroforesis-capilar-15028426>

FAO Capitulo 13 Calidad de Métodos Analíticos, producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Recuperado de:

<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s15.htm>

FAO/ OIEA, (2003), Micotoxinas de importancia mundial, recuperada de:

<http://www.fao.org/docrep/005/y1390s/y1390s04.htm#TopOfPage>

Flores (2015) Identificación de especies fúngicas mediante electroforesis capilar, Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, pp: 30 -34.

Greco D, D'Ascanio V, Santovito E, Logrieco AF y Avantaggiato G. (2018). Comparative efficacy of agricultural byproducts in sequestering mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI:10.1002/jsfa.9343

Gomez F, Monasterio R, Vargas V y Silva M. (2012). Analytical characterization of wine and its precursors by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 33(2012): 2240–2252

Goud KY, Kalisa SK, Kumar V, Tsang YF, Lee S, Gobi KV y Kim K-H. (2018). Progress on nanostructured electrochemical sensors and their recognition elements for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. (2018): 1-57 DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.029

Güray T, Tuncel M, Dilek U y Oncu-Kaya E. (2013). Determination of zearalenone by the capillary zone electrophoresis-uv detection and its application to poultry feed and cereals. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(2013):1366–1378. DOI: 10.1080/10826076.2012.691437



Huff W. E. y Doerr J. A. (1981). Synergism Between Aflatoxin and Ochratoxin A in Broiler Chickens. *Poultry Science*, 60(3), 550–555. doi:10.3382/ps.0600550

IARC (2017) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer

Kuiper-Goodman T, Scott PM. (1989) Risk Assessment of the Mycotoxin Ochratoxin A. *Biomed Environ Sci*; 2:179-248.

Maragos CM, Appell M, Lippolis V, Visconti A, Catucci L. y Pascale M. (2008). Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25 (2): 164-171, DOI: 10.1080/02652030701564555

Maragos C y Appell, M. (2007). Capillary electrophoresis of the mycotoxin zearalenone using cyclodextrin-enhanced fluorescence. *Journal of Chromatography A*. 1143:252 -257

Maragos C, (2004) Emerging Technologies for Mycotoxin Detection. *Journal toxicology*. 23. 317-344. DOI: 10.1081/TXR-200027859

Martínez MM, Vargas del Río LM, Gómez VM.( 2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*;12(2): 89-109.

Martínez Y, Hernández S, Reyes C y Vazquez G. (2013). The Genus *Aspergillus* and their Mycotoxins in Maize in Mexico: Problems and Perspectives, *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31 (2): 126-146.

Moreno, E. (1988), Manual para la identificación de hongos y en granos y sus derivados. Primera edición. Mexico. Universidad nacional Autónoma de México. 17-23.

Murphy A. Patricia, Hendrich Suzanne, Landgren Cindy y M. Bryant Cory, (2006), Food Mycotoxins: An Update, *journal of food science*, vol.71, R51-R65 DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x

NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de planificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba, URL.: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009)

NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. URL.: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html>

Li AP, Uzgaré A, LaForge YS. Definition of metabolism-dependent xenobiotic toxicity with co-cultures of human hepatocytes and mouse 3T3 fibroblasts in the novel integrated discrete multiple organ co-culture (IdMOC) experimental system: Results with model toxicants aflatoxin B1, cyclo. *Chemico-Biological Interactions* 2012; 199:1-8.

Robinson Fuentes VA. (2006). Introducción a la Electroforesis capilar. Michoacán, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Pp. 8-9.

Salazar Alcantar LY. (2015). Influencia de Surfactantes en la Movilidad Electroforética de Conidias de *trichoderma spp.* Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 17-20.

Schwartz H, Guttman A. Separation of DNA by Capillary Electrophoresis. Beckman Instruments, Inc. Palomar Analytical Services Redwood City, CA. Pág.1-15.

Seymour G, (2008), Determination of mycotoxins in human food, *Chemical Society Reviews*, 37(2008), 2468 – 2477. DOI: 10.1039/b713084h

Skoog DA, Leary JJ, Holler FJ (1998). Principios de Análisis Instrumental. 5a. ed; Ed. McGraw – Hill.

Stojkovic R, Ganulin S, Plestina R. (1984) High affinity binding of Ochratoxin A to plasma constituents. *Biochem Int*; 19: 33-8.

Pittet A. (2005) Modern methods and trends in mycotoxin analysis, *Communications from food testing and hygiene A. (Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene A)*, 96 (6) 424 – 444

W. Turner N, Subrahmanyam S. y A. Piletsky S. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review *Analytica Chimica Acta Volume 632*, p 168-180.

W. Turner N, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, Poma A, Raymond, R. y A. Piletsky S. (2015). Analytical Methods for Determination of -Mycotoxins: an update (2009 - 2014) *Analytica Chimica acta*, DOI: 10.1016/j.aca.2015.10.013.

Wild CP, Miller DJ and Groopman JD. (2015). Control de las Micotoxinas en los Países de Ingresos Bajos y Medios, Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), OMS. P: IX-1.

Wild CP, Gong Y. (2009). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31(1), 71–82. doi:10.1093/carcin/bgp264

Zheng N, Gao YN, Liu J, Wang HW y Wang JQ. (2017). Individual and combined cytotoxicity assessment of Zearalenone with Ochratoxin A or  $\alpha$ -zearalenol by full factorial design. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 251–259. doi:10.1007/s10068-017-0197-9

Zheng M, Richard LJ y Binder J. (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161(2006): 261–273. DOI 10.1007/s11046-006-0215-6