



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

**CARRERA INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA  
OCRATOXINA A EN QUINUA USANDO HPLC-  
FLUORESCENCIA”**

**Trabajo de Titulación**

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar el grado académico de:

**INGENIERO EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**AUTOR:** Byron Eduardo Moreno Flores

**DIRECTOR:** Ing. Paola Fernanda Arguello Hernández M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2022

**©2022. Byron Eduardo Moreno Flores**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Yo, BYRON EDUARDO MORENO FLORES, declaro que el presente trabajo de investigación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 4 de marzo de 2022.



**Byron Eduardo Moreno Flores**

**060380582-1**

Ing. Luis Fernando Rodríguez Páez M.S.  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Pablo Fernando Aguayo Hernández M.S.  
DIRECTOR DEL TRABAJO  
DE TITULACIÓN

Ing. Juan Manuel Ramos Flores M.S.  
MIEMBRO DE TRIBUNAL

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Trabajo Experimental, "VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA OCRATOXINA A EN QUINUA USANDO HPLC-FLUORESCENCIA", realizado por el señor. **BYRON EDUARDO MORENO FLORES**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Luis Fernando Arboleda Álvarez PhD. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>	 _____	2022-03-04
Ing. Paola Fernanda Arguello Hernández M.Sc. <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	 _____	2022-03-04
Dr. Juan Marcelo Ramos Flores M.Sc. <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	 _____	2022-03-04

## **DEDICATORIA**

A Dios y a la Virgen Santísima por brindarme las fuerzas, salud y especialmente por brindarme el privilegio de la vida. A mis padres Eduardo Moreno y Ana Flores que día a día se han esforzado por sacar a sus hijos adelante y guiarnos con su ejemplo, a mis hermanos Marco y Diana por ser un apoyo incondicional, a mi abuelito Antonio Flores que desde el cielo me guía en el diario caminar, a mi futura esposa Soledad Duicela y a toda su familia por aceptarme como parte de ésta brindándome todo su cariño, amor y apoyo en todo momento.

**Byron**

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua, director del Departamento de Nutrición y Calidad del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias “INIAP” estación Experimental Santa Catalina, COTUTOR, del presente Trabajo de Titulación

A la Ing. Paola Arguello por su valiosa colaboración en la dirección y asesoramiento de este proyecto de investigación.

Al Comité Europeo para la Formación y Agricultura (CEFA) quienes otorgaron el financiamiento de la presente investigación a través del proyecto de investigación interinstitucional denominado “Evaluación de la ocurrencia de Ocratoxina A en quinua, procedente de las principales zonas productoras de la provincia de Chimborazo” convenio que se ejecutó con CEFA, ESPOCH, INIAP y las principales exportadoras de quinua en Chimborazo.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por todas las enseñanzas y por la experiencia que en este hermoso Templo del Saber pude adquirir.

A todas las personas que colaboraron en la ejecución de este proyecto tanto en las instalaciones de la ESPOCH así como en el laboratorio de Nutrición y Calidad del INIAP Santa Catalina.

Por ser todos ustedes ese apoyo incondicional en mi vida les doy un Dios les pague de todo corazón.

**Byron**

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xiii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

## CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....	3
1.1. La Quinoa - Generalidades .....	3
1.1.1. <i>Planta de Quinoa</i> .....	3
1.1.2. <i>Granos de Quinoa</i> .....	4
1.1.3. <i>Clasificación Taxonómica</i> .....	5
1.1.4. <i>Descripción Botánica</i> .....	5
1.1.4.1. Planta .....	5
1.1.4.2. Raíz .....	6
1.1.4.3. Tallo .....	6
1.1.4.4. Hojas .....	7
1.1.4.5. Panículas o panojas .....	8
1.1.4.6. Flores .....	8
1.1.4.7. Fruto.....	9
1.1.4.8. Semilla .....	9
1.1.5. <i>La Quinoa en el Ecuador</i> .....	10
1.1.6. <i>Varietades de quinoa en el Ecuador</i> .....	12
1.1.7. <i>Producción y Comercialización</i> .....	14
1.1.8. <i>Beneficios de la Quinoa</i> .....	14
1.1.9. <i>Plagas y Enfermedades</i> .....	16
1.2. Principales micotoxinas que afectan a los cereales .....	17
1.2.1. <i>Aflatoxinas (AF)</i> .....	18
1.2.2. <i>Tricotecenos</i> .....	19
1.2.3. <i>Zearalenona (ZAE)</i> .....	20

1.2.4.	<i>Fumonisin</i> (FN) .....	20
1.2.5.	<i>Patulina</i> (PN).....	21
1.2.6.	<i>Ocratoxina A</i> (OTA) .....	22
1.2.6.1.	Características Generales.....	22
1.2.6.2.	Toxicocinética de la OTA.....	23
1.2.6.3.	Toxicidad .....	23
1.2.6.4.	Micotoxinas en productos ancestrales del Ecuador .....	24
1.3.	<b>Validación de Métodos Analíticos</b> .....	25
1.3.1.	<i>Parámetros de Validación de un Método</i> .....	26
1.3.1.1.	Selectividad .....	26
1.3.1.2.	Linealidad y rango lineal .....	27
1.3.1.3.	Precisión .....	28
1.3.1.4.	Exactitud.....	29
1.3.1.5.	Sensibilidad .....	29
1.3.1.6.	Robustez (Confiabilidad del método).....	30
1.3.1.7.	Incertidumbre.....	30

## CAPÍTULO II

2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	38
2.1.	<b>Localización</b> .....	38
2.2.	<b>Unidades Experimentales</b> .....	38
2.3.	<b>Materiales, Equipos y Reactivos</b> .....	38
2.3.1.	<i>Estándares</i> .....	38
2.3.2.	<i>Material vegetal</i> .....	38
2.3.3.	<i>Materiales de Laboratorio</i> .....	39
2.3.4.	<i>Equipos</i> .....	39
2.3.5.	<i>Reactivos</i> .....	40
2.4.	<b>Tratamiento y Diseño Experimental</b> .....	40
2.5.	<b>Mediciones Experimentales</b> .....	42
2.5.1.	<i>Condiciones Cromatográficas</i> .....	42
2.5.2.	<i>Linealidad y rango lineal</i> .....	43
2.5.3.	<i>Parámetros de validación</i> .....	43
2.5.4.	<i>Incertidumbre</i> .....	43
2.6.	<b>Análisis Estadístico y Pruebas de Significancia</b> .....	43
2.7.	<b>Procedimiento Experimental</b> .....	44
2.7.1.	<i>Etapa 1: Curva de calibración</i> .....	44

2.7.1.1.	Preparación de reactivos .....	45
2.7.1.2.	Preparación de la curva de calibración .....	45
2.7.2.	<i>Etapa 2: Contaminación de quinua con OTA A y su recuperación</i> .....	46
2.7.2.1.	Preparación de Reactivos .....	46
2.7.2.2.	Molienda y Pesaje de la quinua .....	47
2.7.2.3.	Extracción de la OTA de quinua contaminada .....	47
2.7.2.4.	Purificación de OTA extraída de quinua contaminada .....	47
2.8.	<b>Metodología de Evaluación</b> .....	48
2.8.1.	<i>Condiciones Cromatográficas</i> .....	48
2.8.2.	<i>Linealidad y rango lineal</i> .....	48
2.8.3.	<i>Parámetros de validación</i> .....	49
2.8.4.	<i>Incertidumbre</i> .....	50

### CAPÍTULO III

3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	51
3.1.	<b>Condiciones óptimas del sistema cromatográfico para la cuantificación e identificación de OTA A.</b> .....	51
3.2.	<b>Linealidad y rango de linealidad del método relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de OTA A.</b> .....	51
3.3.	<b>Parámetros de validación relativos a la metodología propuesta.</b> .....	63
3.3.1.	<i>Límite de detección y cuantificación</i> .....	63
3.3.2.	<i>Precisión</i> .....	64
3.3.3.	<i>Exactitud</i> .....	66
3.3.4.	<i>Selectividad</i> .....	68
3.4.	<b>Estimación de la Incertidumbre relacionados a todos los elementos que intervienen en la metodología.</b> .....	68
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	71
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	72
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b>	Rendimiento de Quinua en el Ecuador .....	13
<b>Tabla 2-1:</b>	Aporte Nutricional por cada 100 gramos de Quinua No-Cocida .....	15
<b>Tabla 1-2:</b>	Esquema para la variable independiente y dependiente del método. ....	40
<b>Tabla 2-2:</b>	Esquema para el estudio de regresión lineal del método.....	41
<b>Tabla 3-2:</b>	Esquema para el Estudio de la Repetibilidad y Reproducibilidad del Método. ...	42
<b>Tabla 4-2:</b>	Parámetros para el estudio de regresión lineal .....	48
<b>Tabla 1-3:</b>	Preparación de Estándares para Curva de Calibración de OTA. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	52
<b>Tabla 2-3:</b>	Datos promedios para las cinco curvas de calibración. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	52
<b>Tabla 3-3:</b>	Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 1. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	52
<b>Tabla 4-3:</b>	Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 1. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	53
<b>Tabla 5-3:</b>	Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 2. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	54
<b>Tabla 6-3:</b>	Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 2. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	55
<b>Tabla 7-3:</b>	Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 3. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	56
<b>Tabla 8-3:</b>	Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 3. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	57
<b>Tabla 9-3:</b>	Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 4. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021. ....	58
<b>Tabla 10-3:</b>	Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 4. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	59
<b>Tabla 11-3:</b>	Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 5. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	60
<b>Tabla 12-3:</b>	Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 5. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	60
<b>Tabla 13-3:</b>	Promedios de la Curva de Calibración Global de OTA. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	61

<b>Tabla 14-3:</b>	Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración Global de OTA. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	62
<b>Tabla 15-3:</b>	Resultados del Cálculo de Límite de Detección y Cuantificación usando una Curva de Calibración. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	64
<b>Tabla 16-3:</b>	Resultados del Análisis de Precisión del Método. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	65
<b>Tabla 17-3:</b>	Resultados de la Suma de Diferencias Cuadráticas y Diferencias Cuadráticas Medias entre y dentro de niveles. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	65
<b>Tabla 18-3:</b>	Resultado de la Desviación Estándar, Desviación Estándar Relativa de RSD y de Reproducibilidad. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	66
<b>Tabla 19-3:</b>	Resultados del Porcentaje de Recuperación por día y Porcentaje Promedio. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	66
<b>Tabla 20-3:</b>	Resultados del estadístico de G de Cochran. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	67
<b>Tabla 21-3:</b>	Resultados del Coeficiente de Sensibilidad para la Incertidumbre. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	69
<b>Tabla 22-3:</b>	Resultados de las Contribuciones e Incertidumbres Asociadas a la Determinación de OTA en Quinoa. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina" .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b>	Plantación de quinua INIAP "Santa Catalina" .....	4
<b>Figura 2-1:</b>	Granos de quinua .....	5
<b>Figura 3-1:</b>	Planta de quinua .....	6
<b>Figura 4-1:</b>	Raíz de quinua.....	6
<b>Figura 5-1:</b>	Tallo de quinua .....	7
<b>Figura 6-1:</b>	Hojas de quinua.....	7
<b>Figura 7-1:</b>	Panojas de quinua .....	8
<b>Figura 8-1:</b>	Flor de quinua .....	9
<b>Figura 9-1:</b>	Fruto de quinua .....	9
<b>Figura 10-1:</b>	Semilla de quinua.....	10
<b>Figura 11-1:</b>	Quinua en el Ecuador.....	12
<b>Figura 12-1:</b>	Tunkahua .....	12
<b>Figura 13-1:</b>	Pata de venado .....	13
<b>Figura 14-1:</b>	Moho verde .....	16
<b>Figura 15-1:</b>	Mildiu.....	16
<b>Figura 16-1:</b>	Hongos productores de micotoxina.....	17
<b>Figura 17-1:</b>	Estructura química de las Aflatoxinas .....	19
<b>Figura 18-1:</b>	Estructura de Tricotecenos de tipo B .....	19
<b>Figura 19-1:</b>	Estructura química de la Zearalenona.....	20
<b>Figura 20-1:</b>	Estructura química de las Fumonisinias.....	21
<b>Figura 21-1:</b>	Estructura química de las Patulinas .....	21
<b>Figura 22-1:</b>	Estructura química de la Ocratoxina A.....	23
<b>Figura 1-3:</b>	Cromatograma de una Muestra de Quinua Contaminada Artificialmente con Ocratoxina A .....	68

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Curva de Calibración de OTA del día 1. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021. ....	53
<b>Gráfico 2-3:</b> Curva de Calibración de OTA del día 2. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021. ....	55
<b>Gráfico 3-3:</b> Curva de Calibración de OTA del día 3. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021. ....	56
<b>Gráfico 4-3:</b> Curva de Calibración de OTA del día 4. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021. ....	58
<b>Gráfico 5-3:</b> Curva de Calibración de OTA del día 5. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021. ....	60
<b>Gráfico 6-3:</b> Curva de Calibración Global de OTA. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021. ....	62

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** ANÁLISIS DE ESTÁNDARES PARA ELABORAR LA CURVA DE CALIBRACIÓN
- ANEXO B:** PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE OCRATOXINA A POR HPLC-FLUORESCENCIA.
- ANEXO C:** ELABORACIÓN DE LA SOLUCIÓN PARA OPERAR EL HPLC.

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue validar un método analítico para OTA A (Ocratoxina A) en quinua, usando HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) por medio del detector de fluorescencia. La metodología que se aplicó constó de 2 etapas, en la primera se elaboraron cinco curvas de calibración con un estándar de OTA A de pureza mayor al 98%, las diluciones del estándar fueron: 0,94; 1,89; 5; 7,5 y 12,5ug/Kg. Se inyectó cada estándar por triplicado en 5 días diferentes. A los datos obtenidos de la primera etapa se aplicó un análisis de regresión lineal para la determinación de los parámetros de linealidad, rango lineal, límite de detección y límite de cuantificación. En la segunda etapa se contaminaron 45 muestras de quinua adicionando 2, 5 y 12.5ug/Kg de OTA A. Se prepararon los reactivos requeridos para la extracción de OTA A, posteriormente se realizó la extracción en las 45 muestras utilizando las columnas de inmunoafinidad. Se procedió con la purificación, secado y colocación en viales. Finalmente se realizó la lectura en el equipo HPLC por medio del detector de fluorescencia. Con los datos de la segunda etapa se calculó la precisión, exactitud (se aplicó el estadístico de Cochran), selectividad e incertidumbre. Los resultados demostraron que el método es lineal en un rango de 0,83 a 30ug/Kg; preciso con base en la repetibilidad y reproducibilidad. El nivel de recuperación fue de 97,22%, límite de detección de 0,52ug/Kg y límite de cuantificación de 1,72ug/Kg. La incertidumbre fue de 0,86ug/kg. Se concluye que el método fue validado para la matriz quinua, se recomienda su uso para el control de este contaminante en la cadena productiva de la quinua.

**Palabras claves:** <QUINUA (*Chenopodium quinua willd*)>, <OCRATOXINA A>, <VALIDACIÓN>, <INMUNOAFINIDAD>, <CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN>

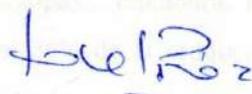
  
D.B.R.A.I.  
Cristian Castillo



## ABSTRACT

The objective of this research was to validate an analytical method for OTA A (Ochratoxin A) in quinoa, using HPLC (High Performance Liquid Chromatography) by means of a fluorescence detector. The methodology applied consisted of 2 stages, in the first one, five calibration curves were elaborated with an OTA A standard of purity greater than 98%, the dilutions of the standard were: 0.94; 1.89; 5; 7.5 and 12.5ug/Kg. Each standard was injected in triplicate on 5 different days. A linear regression analysis was applied to the data obtained from the first stage to determine the parameters of linearity, linear range, limit of detection and limit of quantification. In the second stage, 45 quinoa samples were contaminated by adding 2, 5 and 12.5ug/Kg of OTA A. The reagents required for the extraction of OTA A were prepared, then the extraction was carried out in the 45 samples using the immunoaffinity columns. Purification, drying and placing in vials was carried out. Finally, the reading was performed in the HPLC equipment by means of the fluorescence detector. With the data from the second stage, the precision, accuracy (Cochran's statistic was applied), selectivity and uncertainty were calculated. The results showed that the method is linear in a range of 0.83 to 30ug/Kg; precise based on repeatability and reproducibility. The recovery level was 97.22%, limit of detection was 0.52ug/kg and limit of quantification was 1.72ug/kg. The uncertainty was 0.86ug/kg. It is concluded that the method was validated for the quinoa matrix. Its use is recommended for the control of this contaminant in the quinoa production chain.

**Keywords:** <QUINOA (Chenopodium quinoa willd) >, <OCRATOXIN A>, <VALIDATION>, <INMUNOAFINITY>, <HIGH RESOLUTION LIQUID CHROMATOGRAPHY>.



**Dra. Gloria Isabel Escudero Orozco**

**C.I. No: 060269890-4**

## INTRODUCCIÓN

La quinua es un cultivo milenario, descrita por primera vez por Willdenow en el año de 1778, fue uno de los principales cultivos de las culturas precolombinas de América Latina y en la actualidad se lo sigue considerando como un alimento infaltable por su alto poder nutritivo (Jamieson, 2016 p. 169).

Para la FAO (2011 p. 5), “En la actualidad la quinua se encuentra en franco proceso de expansión porque representa un gran potencial para mejorar las condiciones de vida de la población de los Andes y del mundo moderno”. Según esta Organización, “La quinua es una planta andina que se originó en los alrededores del lago Titicaca ubicado entre Perú y Bolivia, fue cultivada y utilizada por las civilizaciones prehispánicas antes de la llegada de los españoles”.

En Ecuador se registran cultivos desde épocas de los Cañaris, pero no es hasta el año de 1980 que el INIAP mediante el “Programa de Cultivos Andinos”, introdujeron al mercado cuatro variedades y tecnología sobre el manejo de cosecha y postcosecha de la quinua, incluyendo por primera vez a la quinua en el Censo Agrícola; como resultado, la producción de quinua aumentó de 27 hectáreas en el año 1982 a 1098 hectáreas para el año de 1997 (Cuadrado, 2012 p. 44).

En 1999 la Organización Escuelas Radiofónicas de Chimborazo (ERPE) inició el cultivo de quinua orgánica para exportación a Estados Unidos (Bazile , et al., 2014 p. 40). Para la FAO (2011), los principales productores para el año 2011, fueron Bolivia, Perú, Estados Unidos, Ecuador y Canadá, lo que ubica a Ecuador en la cuarta posición a nivel mundial.

Desde el 2011 hasta la actualidad la quinua ha generado un importante desarrollo económico para las provincias de: Azuay, Cotopaxi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Chimborazo, representando esta última cerca del 26% de la producción total del país, con un rendimiento promedio de 1.29 TM/Ha, concentrada en tres organizaciones que agrupan a los pequeños agricultores como son: Sumak Tarpuey, Maquita, y COPROBICH (Dávalos, et al., 2019 p. 1).

La quinua puede ser cultivada desde el nivel del mar hasta los 4.200 m, se adapta a rangos de humedad relativa entre 40-88% y soporta temperaturas entre -4 y 38°C (Bongianino, et al., 2018 p. 61); pero al tratarse de un cultivo orgánico con líneas principalmente de exportación, está propensa a ser afectada por hongos especialmente del género *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales en condiciones favorables generan metabolitos secundarios conocidos como micotoxinas.

De acuerdo con la AFHSE (2015 p. 15), nos indica que las micotoxinas constituyen uno de los principales peligros sanitarios que afectan a los cereales y sus derivados. Dentro de las micotoxinas, la Ocratoxina A (OTA) ha sido estudiada por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIRC) y clasificada dentro del grupo 2B, como posible cancerígeno humano (Abreu, et al., 2011 p. 1217).

El Reglamento que actualmente regula los niveles de Ocratoxina A en los alimentos, es el Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión, en el cual se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, con una ingesta semanal tolerable de 120ng/Kg de peso corporal, mientras que la cantidad máxima permitida para cereales no procesados debe ser  $\leq 5\mu\text{g/Kg}$  (Abreu, et al., 2011 p. 1218).

Por lo anteriormente expuesto, en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Determinar las condiciones óptimas del sistema cromatográfico para la cuantificación e identificación de OTA A.
- ✓ Establecer la linealidad y rango de linealidad del método relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de OTA A.
- ✓ Verificar los parámetros de validación relativos a la metodología propuesta.
- ✓ Calcular la estimación de la incertidumbre relacionados a todos los elementos que intervienen en la metodología.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1 La Quinua - Generalidades

##### 1.1.1 Planta de Quinua

La quinua es una planta herbácea, de hojas anchas, dicotiledónea y usualmente alcanza una altura de 1 a 2 m, es reconocida como el alimento sagrado de las antiguas culturas andinas y tiene un desarrollo generalmente anual, aunque depende mucho de las condiciones climáticas (Pando, et al., 2016 p. 42).

De acuerdo con Gewehr, et al. (2012 p. 281), la quinua es una planta con propiedades funcionales y de excelente valor nutritivo, debido a su alto contenido en proteína, aminoácidos, vitaminas y minerales, también es considerado como un cultivo nutraceútico ya que es un alimento que, a más de proporcionar nutrientes, genera efectos benéficos para la salud y sirve como tratamientos para ciertas enfermedades, incluyendo su ventaja de adaptabilidad.

Para la (FAO) Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, define a la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) como un grano que posee las siguientes características:

- a) Variabilidad genética que le permite el desarrollo de múltiples variedades.
- b) Adaptabilidad a condiciones climáticas y de suelo diversas y adversas (altiplano, salares, puna, valles interandinos, nivel del mar).
- c) Calidad nutritiva, compuesta por aminoácidos esenciales, que son ideales y funcionales para el organismo humano.
- d) Diversidad de formas de organización que permite incluso la incorporación de innovaciones en su tratamiento.
- e) Bajo costo de producción, ya que su cultivo no es muy exigente ni se requiere de amplia mano de obra (FAO, 2011 p. 3).

En la Figura 1-1 se muestra una plantación de quinua sembrada en la Estación Experimental "Santa Catalina".



**Figura 1-1.** Plantación de quinua INIAP "Santa Catalina"

Realizado por: Moreno, B. 2022

### ***1.1.2 Granos de Quinua***

Los granos de quinua son también considerados como "granos integrales" ya que contienen todas las partes originales del grano o semilla, convirtiéndolo en un alimento más saludable y completo que los granos refinados o procesados.

Los granos de quinua presentan tres partes bien definidas que son: epispermo, embrión y perispermo.

- ✓ **El epispermo**, capa que cubre la semilla y está unida al pericarpio.
- ✓ **El embrión**, está formado por dos cotiledones y la radícula, constituye el 30% del volumen total de la semilla aproximadamente y cubre al perispermo como un anillo, con una curvatura de 320 grados.
- ✓ **El perispermo**, principal tejido de almacenamiento; sustituye al endospermo y está constituido por granos de almidón de manera predominante, es de color blanquecino y representa prácticamente el 60% de la semilla (Pando, et al., 2016 p. 10).

Para aclarar la determinación en el tono de colores de los granos de quinua, revisaremos como el propio Pando lo definía:

*El color de los granos depende de la capa en observación. Si las variedades mantienen el perigonio sepaloide los colores son verdes, rojos y púrpura. Si se observa el pericarpio los colores pueden ser blanco, crema, amarillo, naranja, rojo, rosado, gris y negro. Por otro lado, si el pericarpio se desprende durante el proceso de eliminación de la saponina, la capa observada es el epispermo y puede ser blanca, crema, roja, marrón, gris o negra (Pando, et al., 2016 p. 10).*

En la Figura 2-1 se muestra la forma de los granos de quinua.



**Figura 2-1.** Granos de quinua

Fuente: STANDPERU, 2018

### ***1.1.3 Clasificación Taxonómica***

Según la FAO (2011 p. 22), determinó la clasificación taxonómica de la quinua de la siguiente manera.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Amaranthaceae
Subfamilia:	Chenopodioideae
Género:	Chenopodium
Especie:	C. quinoa

### ***1.1.4 Descripción Botánica***

#### ***1.1.4.1 Planta***

La quinua es una planta que posee gran adaptabilidad, resistente a heladas y sequías. Posee hojas anchas, es dicotiledónea y usualmente alcanza una altura de 1 a 2 m, es reconocida como el alimento sagrado de las antiguas culturas andinas y tiene un desarrollo generalmente anual, aunque depende mucho de las condiciones climáticas, las plantas del valle tienen mayor altura que aquellas que son cultivadas por encima de los 4000 msnm (Pando, et al., 2016 p. 28).

En la Figura 3-1 se muestra la forma y las diferentes especies de una planta de quinua.



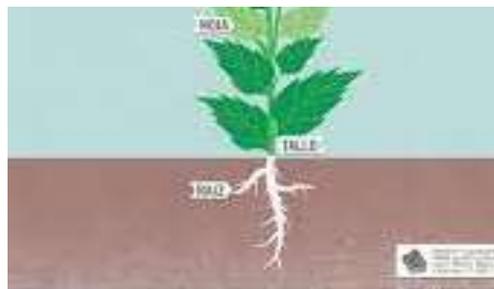
**Figura 3-1.** Planta de quinua

**Fuente:** TVAgro, 2016

#### *1.1.4.2 Raíz*

La raíz es pivotante, bastante ramificada y vigorosa, capaz de resistir a vientos fuertes y dándole una buena estabilidad a la planta, normalmente mide de 20 a 25 cm de longitud, formando una densa trama de radículas, las cuales penetran en la tierra tan profundamente como la altura de la planta; según el genotipo de las mismas, existen variedades que son profundamente ramificadas y fuertemente sostenidas al suelo (Pando, et al., 2016 p. 7).

En la Figura 4-1 se muestra la raíz de una planta de quinua.



**Figura 4-1.** Raíz de quinua

**Fuente:** FAO, 2013

#### *1.1.4.3 Tallo*

El tallo es robusto de corteza escamosa, tiene forma cilíndrica y puede tener o no ramas, dependiendo de la variedad y/o densidad del sembrado, el interior del tallo es esponjoso y hueco, rico en pectina y celulosa que puede emplearse para la fabricación de papel y cartón (Pando, et al., 2016 p. 7).

Según las variedades manifiestan 11 coloraciones mudables como el verde, amarillo, rosado y púrpura, de la misma manera manifiesta axilas de color rosado, rojo y púrpura. Cuando el tallo alcanza su madurez fisiológica el color se convierte en crema o rosado con distintas intensidades.

La altura de la planta, desde la base al ápice de la inflorescencia puede medir entre 0,5 a más de 3 m, dependiendo de la variedad, nutrientes y clima (Pando, et al., 2016 p. 7).

En la Figura 5-1 se muestra la forma de los tallos de quinua.



**Figura 5-1.** Tallo de quinua

**Fuente:** Andina, 2013

#### *1.1.4.4 Hojas*

Las hojas son muy variadas en la quinua, teniendo hojas gruesas y carnosas, en una misma planta se puede encontrar hojas romboides que normalmente se presentan en la parte superior y hojas lanceoladas que se encuentran alrededor de la inflorescencia, sus tonos varían desde un verde tenue hasta un rojo intenso dependiendo del genotipo, los bordes de las hojas pueden ser dentados, aserrados o lisos (Calla, 2012 p. 7).

En la Figura 6-1 se muestra las hojas de quinua.



**Figura 6-1.** Hojas de quinua

**Fuente:** Nexciencia, 2015

#### *1.1.4.5 Panículas o panojas*

Las panículas o panojas tienen una longitud variable de 15 a 70cm, en una panoja se pueden encontrar de 100 a 3000 granos de quinua y crecen generalmente en la punta de la planta, cada panoja tiene un eje central además de ramificaciones secundarias y terciarias que sostienen a los glomérulos y ayudan a la disposición de las flores; considerando su forma se clasifican en: amarantiformes, glomerulatas e intermedias (Pando, et al., 2016 p. 9).

En la Figura 7-1 se muestra las diversas variedades de panojas de quinua.



**Figura 7-1.** Panojas de quinua

**Fuente:** Flor de planta, 2016

#### *1.1.4.6 Flores*

Las flores son pequeñas, sésiles y carecen de pétalos. Generalmente pueden alcanzar hasta 3mm y presentan hasta 3 tipos de flores; hermafroditas (perfectas), femeninas (pistiladas) y androestériles (imperfectas) (Calla, 2012 p. 8).

En cuanto a su tamaño, las flores hermafroditas son más grandes que las femeninas con un diámetro de 3 a 5 mm; las flores femeninas están formadas de 5 tépalos y tienen un diámetro de 2 a 3mm y las flores androestériles son aún más pequeñas por lo que dificulta su manejo para realizar cruzamientos (Pando, et al., 2016 p. 9).

En la Figura 8-1 se muestra la flor de quinua.



**Figura 8-1.** Flor de quinua

**Fuente:** Food news latam, 2019

#### *1.1.4.7 Fruto*

El fruto es seco y puede medir aproximadamente entre 1,5 a 3mm de diámetro, circundando al cáliz, el cual es del mismo color que el de la planta. Está cubierto por un delgado pericarpio que se desprende con facilidad al frotarlo, sin embargo; en algunos casos puede permanecer adherido al grano incluso después de la trilla dificultando la cosecha y el procesamiento industrial de los granos (Pando, et al., 2016 p. 9).

En la Figura 9-1 se muestra el fruto de la quinua.



**Figura 9-1.** Fruto de quinua

**Fuente:** Exportaecuador.com.ec, 2018

#### *1.1.4.8 Semilla*

La semilla es usualmente lisa y de color (blanco, rosado, naranja como también rojo, marrón y negro), la intensidad del color en ocasiones puede disminuir o inclusive desaparecer en el proceso de secado de los granos, en la maduración en campo y por la luminosidad del ambiente de almacenamiento. El peso de la semilla constituye el 60%, formando una especie de anillo alrededor del endospermo que se desprende cuando la semilla es cocida (Pando, et al., 2016 p. 10).

En la Figura 10-1 se muestra la semilla de la quinua.



**Figura 10-1.** Semilla de quinua

**Fuente:** Cocina-ecuatoriana.com, 2017

### ***1.1.5 La Quinua en el Ecuador***

De acuerdo con Bazile (2014 p. 462), "Ecuador es el tercer país en realizar actividades de investigación y desarrollo para el rescate, promoción y uso de la quinua en la zona andina, de manera sistemática y dinámica"; varios años después de que lo hiciera Bolivia y Perú. Para este objeto se contó con el apoyo del INIAP, de la FAO, IBPGR y el Gobierno de Canadá (CIID).

En Ecuador, el rescate de la quinua andina junto al amaranto y al chocho se inició en el año 1983, con la recolección de la variable nacional y la formación del banco de germoplasma del INIAP.

El ex Programa de Cultivos Andinos de la Estación Experimental Santa Catalina, inició las primeras investigaciones y después de algunos años de trabajo en fitomejoramiento, manejo agronómico y calidad nutricional (INIAP, 2010 p. 24).

En 1992, liberó las primeras variedades de bajo contenido de saponina "dulces", de las cuales la variedad INIAP Tunkahuan continúa vigente, las otras ya no se mantienen ni se cultivan por su alta concentración en saponinas (INIAP, 2010 p. 24).

Las estadísticas del III Censo Agropecuario llevadas a cabo en Ecuador desde el 1 de octubre de 1999 hasta el 30 de septiembre de 2000, se registraron 2659 Unidades Productivas Agropecuarias (UPAS), cerca de 900 ha sembradas de quinua, con una producción cercana a las 226 toneladas, y las ventas registradas de este cultivo fueron de 180 toneladas aproximadamente (SICA, 2000 p. 3).

Posteriormente, para el año 2013 las superficies cultivadas alcanzaron las 2000 ha en sistemas de producción diversificados (MAGAP, 2015). Por otro lado, los centros de producción de quinua se ubicaron en determinadas áreas de la sierra, de las cuales las de mayor importancia de este cultivo fueron: Chimborazo, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Pichincha, Carchi; mientras que, en Cañar y Azuay, el cultivo casi ha desaparecido (INIAP, et al., 2009 p. 2).

Por este sentido es importante generar apoyo para este cultivo en el sur del Ecuador; no obstante, en los últimos años se está impulsando fuertemente la producción de quinua, sobre todo en el norte y sur del país, es así como un nuevo centro de acopio de quinua se creó en Carchi, mientras que, para el sur existe un centro de acopio en Cañar que podría receptor la producción del austro ecuatoriano (MAGAP, 2017 p. 11).

Para el año 2014, el MAGAP informó que el programa de fortalecimiento del cultivo de quinua se consolidó con el centro de acopio; a través de ese programa, en Carchi se sembraron 1500 ha de quinua, lo que significó una cosecha aproximada de 16 mil quintales (MAGAP, 2017 p. 11).

De la misma forma, según la Agencia Pública de Noticias del Ecuador y Suramérica (ANDESINFO), para el año 2015, se pretende superar las 2 mil ha de siembra del cereal, con una inversión de 1400 000 dólares. Para el año 2017, Ecuador se proyectó a producir quinua en 16 mil hectáreas, ubicadas en las provincias de Carchi, Chimborazo, Imbabura y Pichincha (MAGAP, 2017 p. 12).

El aumento de la producción de quinua se produjo como resultado de la aplicación del Plan de Mejora Competitiva (PMC), integrado por representantes del MAGAP, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y Ministerio de Comercio Exterior, y en representación del sector privado la Corporación de Promoción de Exportaciones del Ecuador (CORPEI) (MAGAP, 2017 p. 12).

En la Figura 11-1 se muestra la cosecha de una plantación de quinua.



**Figura 11-1.** Quinoa en el Ecuador

Fuente: Eldiario.ec, 2015

### ***1.1.6 Variedades de quinoa en el Ecuador***

De acuerdo con INIAP (2009 pp. 4-6), menciona que en nuestro país existen dos variedades mejoradas de quinoa que están vigentes, INIAP Tunkahuan e INIAP Pata de venado:

**INIAP Tunkahuan**, es una variedad de quinoa con bajo contenido de saponina, considerado dulce; se adapta bien en todas las provincias de la sierra en alturas comprendidas entre 2400 a 3400 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).

Posee un rendimiento promedio de 2000 kg por hectárea y es semi-precoz ya que se cosecha entre 5 a 7 meses dependiendo la altitud, y contiene 16,14% de proteína. Esta variedad se originó de una población recolectada en la provincia de Carchi en 1985 y para el año de 1992 ya fue liberada como variedad nacional (INIAP, et al., 2009 p. 4).

En la Figura 12-1 se muestra la variedad de quinoa "Tunkahuan".



**Figura 12-1.** Tunkahua

Fuente: INIAP, 2013

**INIAP Pata de Venado o Taruka Chaski**, es una variedad de quinoa con bajo contenido de saponina, que se adapta en localidades con alturas entre 3000 a 3600 metros sobre el nivel del

mar (m.s.n.m.), es precoz ya que se cosecha entre 5 a 6 meses y tiene un rendimiento promedio de 1200 kg por hectárea, con un contenido de proteína del 17,45%.

Se originó de la colección obtenida por el intercambio de germoplasma con la estación Experimental Patacamaya del ex Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria en el año 1983 y desde entonces trabajan en mejoras genéticas (INIAP, et al., 2009 p. 6).

En la Figura 13-1 se muestra la variedad de quinua "Pata de venado".



**Figura 13-1.** Pata de venado

Fuente: INIAP, 2013

Para (Monteros, 2016 p. 14), reportó que en el Ecuador se obtienen rendimientos de 1,19 a 1,79 t/ha, distribuidos en cada provincia como se describe en la Tabla 1-1.

**Tabla 1-1:** Rendimiento de Quinua en el Ecuador

Provincia/cantón	Rendimiento promedio t/ha	Provincia/cantón	Rendimiento promedio t/ha
		<b>Cotopaxi</b>	<b>1,3</b>
<b>Azuay</b>	<b>1,23</b>	Latacunga	0,71
Gualaceo	1,04	Pujilí	1,25
Paute	1,41	Salcedo	1,65
		Saquisilí	1,62
		Sigchos	0,97
<b>Cañar</b>	<b>1,42</b>		
Azogues	1,31	<b>Imbabura</b>	<b>1,57</b>
Déleg	1,65	Antonio Ante	1,62
		Cotacachi	1,59
		Ibarra	1,62
<b>Carchi</b>	<b>1,56</b>	Otavalo	1,53
Bolívar	1,41	Pimampiro	1,58
Espejo	1,89		
Mira	1,27	<b>Pichincha</b>	<b>1,19</b>
Montufar	1,43	Cayambe	2,23

		Mejía	1,69
		Pedro Moncayo	1,67
<b>Chimborazo</b>	<b>1,27</b>		
Colta	1,27	<b>Tungurahua</b>	<b>1,19</b>
Guamote	1,27	Ambato	1,13
Guano	1,08	Quero	0,51
Riobamba	1,29	Santiago de Píllaro	1,62

Fuente: (Guerrero, 2016)

Realizado por: Moreno, B. 2022

### ***1.1.7 Producción y Comercialización***

La comercialización depende de la aceptación por el consumidor y de la demanda, en la actualidad se observa un desequilibrio entre la oferta y la demanda, lo que provoca un precio variable, del cual el único beneficiario es el intermediario.

Según datos de la revista Líderes, después del auge en el año 2013, para 2018 los agricultores esperaban vender el quintal de quinua orgánica al granel en \$120,00 en el mercado internacional, y terminaron vendiendo hasta por \$25,00 en ferias y centros de abasto locales (Enríquez, 2018 p. 1).

En la actualidad se está realizando el proceso de desaponificación por vía combinada, para alcanzar los estándares requeridos para la comercialización del grano de quinua, vinculados de manera especial con: integridad del grano, valor nutricional y contenido final de saponinas; mediante este proceso alcanzamos valores requeridos para exportación que van de 0,01 y 0,06% de saponinas (Bazile , et al., 2014 p. 45).

### ***1.1.8 Beneficios de la Quinua***

La quinua es un cereal de grano entero, llamado también pseudocereal, que provee la mayor parte de sus calorías en forma de hidratos complejos, pero a su vez aporta entre 13,5 a 15,5 gramos de proteínas por cada 100 gramos y ofrece alrededor de 6 gramos de grasas en igual cantidad de alimento. Al ser comparada con la mayor parte de los cereales, ésta contiene muchas más proteínas y grasas insaturadas, destacándose la presencia de ácidos esenciales.

En cuanto a la parte calórica, la quinua es semejante o levemente superior a un cereal, pues contiene menor cantidad de hidratos, así mismo, debemos destacar su alto aporte de fibra, ya

que puede alcanzar los entre 7 a 10 gramos por cada 100 gramos, siendo en su mayoría fibra de tipo insoluble, como poseen característicamente las semillas.

Si nos referimos a los nutrientes, la quinua destaca por su contenido de potasio, fósforo, calcio, magnesio, zinc, sodio y hierro, además; ofrece vitaminas A, B y E, generando un aporte completo y adecuado para el correcto funcionamiento del individuo (Gottau, 2013 p. 3).

En la Tabla 2-1 se muestra el aporte nutricional de la quinua no cocida por cada 100g.

**Tabla 2-1:** Aporte Nutricional por cada 100 gramos de Quinua No-Cocida

<b>APORTE POR 100g QUINUA, NO COCIDA</b>	
Energía (Kcal)	368
Proteína (g)	14,2
Hidratos de carbono (g)	64
Fibra grasa total (g)	7
Grasa total (g)	6,07
Agua (g)	13,28
<b>Minerales</b>	
Potasio (mg)	563
Fósforo (mg)	457
Calcio (mg)	47
Magnesio (mg)	197
Zinc (ug)	3,1
Sodio (mg)	5
Hierro (mg)	4,57
<b>Vitaminas</b>	
B1 Tiamina (mg)	0,36
B2 Rivo flavina (mg)	0,31
B3 Niacina (mg)	1,52
B6 Piridoxina (mg)	0,48
Folatos (ug)	184
Vitamina A (UL)	14
Vitamina E (ug)	2,44

**Fuente:** (USDA, 2009)

**Realizado por:** Moreno, B. 2022

### **1.1.9 Plagas y Enfermedades**

La mayor parte de las enfermedades que afectan al cultivo de quinua son provocadas por hongos, en menor número por bacterias, nematodos y virus. Las plagas afectan este tipo de cultivo especialmente durante las primeras etapas de desarrollo, realizando cortes a la altura del cuello de la raíz ocasionando la muerte instantánea de la planta (Quiroz, 2018 p. 12).

La enfermedad más importante y conocida a nivel global es el mildiu, enfermedad que inicia atacando las hojas inferiores por medio de una pelusilla de color gris violáceo, luego ataca a las hojas superiores hasta llegar al tallo, otra enfermedad que podemos ver que ataca los cultivos de quinua es el moho verde que es una enfermedad que con mayor frecuencia encontramos en los cultivos de quinua de las zonas frías (More, 2016 p. 6).

En la Figura 14-1 y 15-1 se muestra 2 ejemplos de plagas que pueden afectar el cultivo de quinua.



**Figura 14-1.** Moho verde

Fuente: INIA.ci, 2014



**Figura 15-1.** Mildiu

Fuente: FAO.org, 2012

## 1.2 Principales micotoxinas que afectan a los cereales

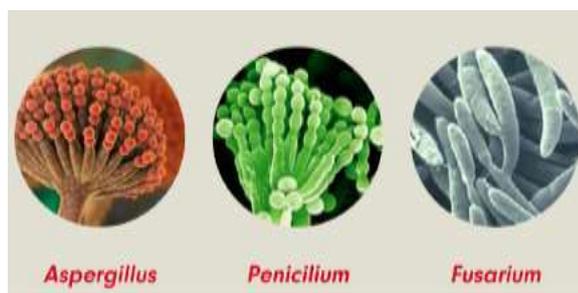
Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos, que pueden ejercer un efecto tóxico tanto en el hombre como en los animales, debido principalmente, a su exposición a través de los alimentos y productos contaminados (Ramos, et al., 2020 p. 1).

El término micotoxina, deriva de las palabras griegas *mykes* y *toxicum* que significan hongo y veneno, respectivamente. Son sustancias tóxicas que se pueden generar en cualquier punto de la cadena alimentaria desde la siembra, producción, cosecha hasta llegar al almacenamiento e inclusive hasta en el mismo transporte, originando un grupo de enfermedades y trastornos denominados micotoxicosis (Vela , 2016 p. 5).

La micotoxicosis es el nombre que se da al grupo de enfermedades y trastornos originados en el hombre y en los animales, por unos metabolitos secundarios tóxicos llamados micotoxinas y que son producidos por cepas toxicogénicas de especies de algunos géneros de mohos, las cuales afectan tanto al hombre como a los animales de manera leve en algunas ocasiones y otras de manera mortal (Vela , 2016 p. 5).

La mayoría de las micotoxinas de importancia agrícola son producidas principalmente por cuatro géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estima que entre 10 y 30% de los granos cosechados se pierden debido a la infección por hongos y que aproximadamente un 25% de los cultivos de cereales del mundo están contaminados por micotoxinas (Gómez, 2008 p. 33).

En la Figura 16-1 se muestra los principales hongos productores de micotoxinas.



**Figura 16-1.** Hongos productores de micotoxina

Fuente: nutriNews, 2019

La producción de micotoxinas depende en gran medida del estrés fúngico, factores ambientales desfavorables, así como la competencia entre especies que concurren en el mismo sustrato

(Leggieri, et al., 2019 p. 35). De acuerdo con Pacheco (2020 p. 11), existen varios factores que afectan tanto el crecimiento del hongo, como la producción de micotoxinas:

- La temperatura, mínima de 6-8 °C, óptima de 36-38 °C y 44-46 °C, como máxima.
- La humedad, en granos del 10 al 18%
- Tiempo, a mayor tiempo de almacenamiento se tienen condiciones más favorables para su desarrollo.
- El pH, la acidez es un elemento negativo para el desarrollo micótico y formación de esporas, puesto que las mismas requieren de un pH alcalino.
- La actividad de agua ( $a_w$ ), la cual indica la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos, una vez que se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema alimento/medio ambiente.
- Los nutrientes (presencia de hidratos de carbono).
- El nivel de inoculación, bajo, medio o alto.
- La naturaleza del sustrato, natural o artificial.
- Estado fisiológico, por lo general favorecen cuando la planta es muy joven.
- Las interacciones microbianas, en una misma especie existen estirpes productoras de micotoxinas y otras que son incapaces de producirlas; es decir, hay variaciones intra e interespecíficas.

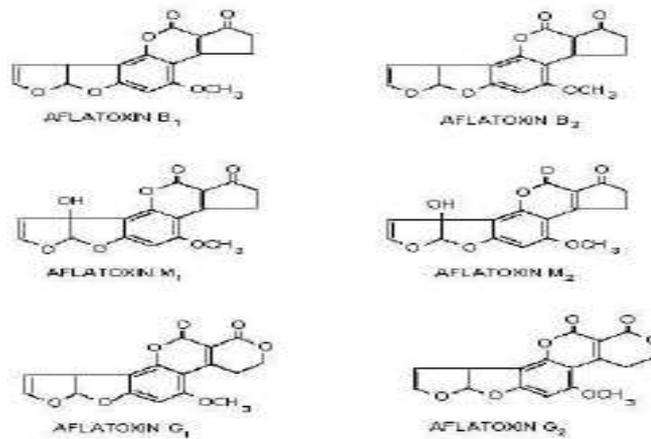
### 1.2.1 Aflatoxinas (AF)

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por muchas especies del género de hongos *Aspergillus* siendo los más notables, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus paraciticus*, especies que son bastantes definidas; el *A. flavus* produce solo aflatoxina B, mientras que el *A. paraciticus* produce aflatoxina B y G. Pero en estudios realizados se ha identificado algunas cepas de *A. flavus* que producen AFG1 y AFG2 (Semilanelue, 2019 p. 20).

Las aflatoxinas son las micotoxinas con mayor atención debido a su alto poder carcinógeno demostrado, fueron descubiertas en 1960 cuando más de 100.000 pavos jóvenes murieron en granjas de Inglaterra, denominándola a esta enfermedad como "enfermedad X"; esta enfermedad se caracterizaba por la pérdida de apetito, letardo y debilidad en las alas (Semilanelue, 2019 p. 23).

Las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1 son potentes agentes mutagénicos, genotóxicos y carcinogénicos en animales y humanos, clasificadas en el Grupo 1 (carcinógeno para seres humanos). Por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2012).

En la Figura 17-1 se muestra la estructura química de las Aflatoxinas.



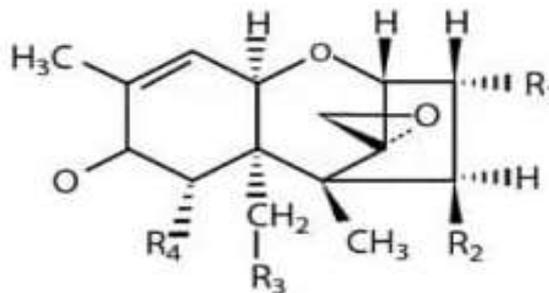
**Figura 17-1.** Estructura química de las Aflatoxinas

Fuente: Guzmán, 1993

### 1.2.2 Tricotecenos

Los tricotecenos son micotoxinas generadas por varias especies de *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* y *Stachybotrys*. Se han detectado cuatro tricotecenos: Toxina T-2, Nivalenol, Deoxinivalenol (DON) y Diacetoxiscirpenol que son contaminantes para la alimentación humana y animal. Los tricotecenos son inhibidores potentes de la síntesis de proteínas en las células de los mamíferos (Ramírez, 2014 p. 33).

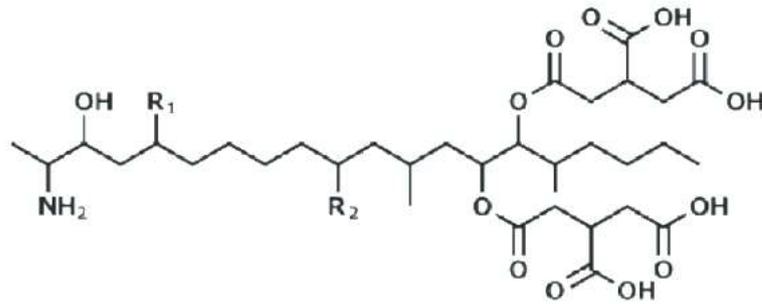
En la Figura 18-1 se muestra la estructura química de los Tricotecenos tipo B



**Figura 18-1.** Estructura de Tricotecenos de tipo B

Fuente: Olmix, 2016





	R1	R2
Fumonisina B1	OH	OH
Fumonisina B2	OH	H
Fumonisina B3	H	OH

**Figura 20-1.** Estructura química de las Fumonisinias

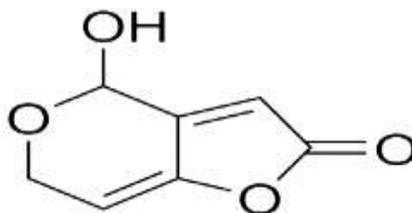
Fuente: Researchgate, 2013

### 1.2.5 Patulina (PN)

Es una micotoxina producida por varias especies de *Penicillium* principalmente el *P. expansum*, así como también algunas especies de *Aspergillus* y *Byssochyilams* que también pueden producir Patulina. Se puede encontrar como contaminante natural en manzanas, peras, albaricoques, melocotones, uvas y otras frutas con zonas empodrecidas, zumos y compotas de fruta y quesos.

El mayor síntoma que provoca es el neurotóxico afectando el sistema nervioso, puede haber también hepatocicosis y nefrotocicosis así como carcinomas. Sus síntomas son náuseas acompañados con vómitos (AFHSE, 2015 p. 133).

En la Figura 21-1 se muestra la estructura química de las Patulinas.



**Figura 21-1.** Estructura química de las Patulinas

Fuente: Wikipedia.es, 2010

## 1.2.6 Ocratoxina A (OTA)

### 1.2.6.1 Características Generales

La Ocratoxina A (OTA) de fórmula ( $C_{20}H_{18}O_6NCl$ ), es una molécula muy estable, incolora, soluble en disolventes orgánicos polares y poco soluble en agua; es considerada la micotoxina más frecuente en la contaminación de granos y cereales de climas fríos y templados (Castro, 2018 p. 30). "La OTA fue aislada por primera vez en el año 1965 en Sudáfrica a partir de un cultivo de *Aspergillus Ochraceus*" (González, 2010 p. 112).

La OTA es un metabolito secundario tóxico, producida por especies de hongos filamentosos superiores de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, se pueden reproducir en una gran diversidad de sustratos orgánicos como: cereales, piensos, café verde, la carne y sus derivados, las uvas, el vino, las pasas e higos secos, el chocolate, las legumbres, la cerveza, especias, el té, las infusiones, etc, son de las comunes con presencia de OTA (Castro, 2018 p. 30).

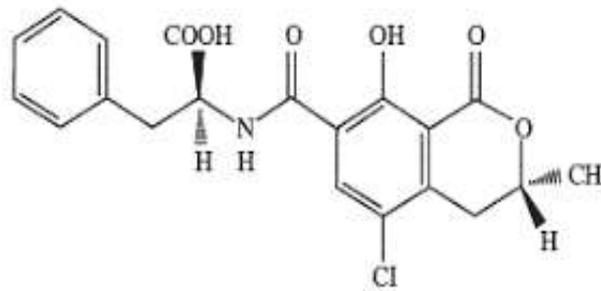
La Ocratoxina A puede aparecer durante todo el desarrollo de la planta, las condiciones medioambientales (humedad y temperatura) durante el almacenamiento y transporte afectan de manera directa a los niveles de OTA en los alimentos, la disponibilidad de agua (aw) también se considera como un factor clave que incide en la producción de OTA.

La ocratoxina es una molécula muy estable que no se la puede eliminar por métodos tradicionales de secado, tostado y fermentado; para que su concentración menor en los alimentos es necesario someterla a temperaturas superiores a los 250 °C y emplear un tiempo de varios minutos de cocinado (Malir, et al., 2013 p. 3).

La temperatura de producción óptima de OTA por *A.Ochraceus* se ha establecido entre 20 y 30°C, mientras que para *P. Verrucosum* requiere de temperaturas inferiores, entre 10 y 20°C para producir OTA; es por esto que frecuentemente al *P. Verrucosum* lo responsabilizaban de la producción de OTA en zonas frías y *A. Ochraceus* era el responsable en las zonas calientes.

Sin embargo, desde que identificaron la capacidad ocratoxicogénica de las especies *Niger*, se ha descrito que éstas son importantes en la contaminación por OTA de climas cálidos, ya que *A. Carbonarius* presenta su máximo desarrollo en temperaturas de 25 a 30°C, con una producción de OTA óptima a temperaturas de 15 a 20°C, mientras que las especies del agregado *A. Niger* presentan tanto el crecimiento como la producción de OTA de 20 a 25°C (González, 2010 p. 113).

En la Figura 22-1 se muestra la estructura química de Ocratoxina A.



**Figura 22-1.** Estructura química de la Ocratoxina A

Fuente: Scielo, 2011

#### 1.2.6.2 Toxicocinética de la OTA

La OTA se absorbe en el tracto gastrointestinal y pasa a la circulación sistémica, detectándose en sangre y tejidos. Estas concentraciones se detectan de mayor manera en órganos que generan una gran actividad metabólica dentro del organismo humano como el riñón, hígado, músculo y grasa (Abreu, et al., 2011 p. 1216).

Durante su distribución, la OTA tiene una muy buena capacidad de fijación a las proteínas plasmáticas, y larga etapa de eliminación, con valores en el cerdo de 72-120 horas y en el hombre de 840 horas (35 días), siendo la fracción libre de toxina < 0,2% (Abreu, et al., 2011 p. 1216).

Se observa que la OTA ataca con mayor frecuencia a animales monogástricos jóvenes, de manera especial a cerdos y aves; en caso de los rumiantes, parecen ser más resistentes a la intoxicación por OTA, debido a su degradación previa por acción de la microflora del rumen (Pachecho, 2020 p. 20).

#### 1.2.6.3 Toxicidad

La OTA es nefrotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena, teratogénica y neurotóxica. Respecto a la actividad carcinogénica, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC), ha clasificado a esta micotoxina en la categoría 2B, es decir; como posible carcinógeno humano.

La exposición a alimentos contaminados con OTA, se ha relacionado con evidencias epidemiológicas de cáncer testicular, debido a la formación de aductos con el ADN inducido por la acción de este genotóxico. Los biomarcadores urinarios de OTA, ofrecen mejor resultados frente a la exposición de OTA que los niveles detectados en plasma (Abreu, et al., 2011 p. 1217).

Se identifican 2 tipos de toxicidad:

**a. Toxicidad Aguda**

De acuerdo Abreu (2011 p. 1217), la toxicidad aguda de la OTA genera variaciones por vía oral en un intervalo entre 20-50 mg/kg en ratas y ratones, y entre 0,2-1 mg/Kg en perros, cerdos y pollos, siendo éstas las especies con mayor sensibilidad.

Los síntomas que se presentan en una intoxicación aguda son: pérdida de peso, poliuria, polidipsia y hemorragias multifocales en los órganos más importantes y trombos de fibrina en los órganos que ejercen mayor actividad metabólica como son: bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón, así como; nefrosis y necrosis hepáticas (Abreu, et al., 2011 p. 1217).

**b. Toxicidad Crónica**

En cuanto a la toxicidad crónica de la OTA se identifica como una nefropatía intersticial en los animales de granja (pollos y cerdos) conocidas como nefropatías porcinas y aviarias, que genera grandes pérdidas para este sector (Abreu, et al., 2011 p. 1217).

De la misma forma, la OTA constituye uno de los principales factores para el desarrollo de tumores en el tracto urinario en el hombre y de la "Nefropatía endémica de los Balcanes, presentando mayor relevancia en el sudeste de Europa y caracterizada por ser una fuerte afección histopatológica que cursa con una neuropatía tubulointersticial progresiva, que deriva en atrofia tubular y fibrosis periglomerular (Abreu, et al., 2011 p. 1217).

*1.2.6.4 Micotoxinas en productos ancestrales del Ecuador*

En Ecuador, existe un reciente interés en promover los cultivos ancestrales por el legado cultural y nutricional que se ha ido perdiendo, así como también en promover el consumo de ciertos alimentos con poseen un procesamiento mínimo para conservar su alto valor nutritivo.

Sin embargo, este tipo de alimentos por ser tratados de manera natural y sin la ayuda de fungicidas y pesticidas pueden presentar una contaminación con micotoxinas, lo que comprometería su calidad y utilización a nivel nutricional e industrial (Castro, 2018 p. 3).

La necesidad de conocer la calidad de estos alimentos impulsó a la Red de Inocuidad Alimentaria del Ecuador a evaluar la contaminación con micotoxinas. Para este ensayo se recolectaron 15 muestras de cada uno de estos alimentos expendidos al granel en dos ciudades andinas (Cuenca y Quito) y una ciudad de la región costa (Guayaquil).

En arroz integral y quinua se evaluaron ocratoxina A, fumonisina B1 y aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. En harina de trigo integral se evaluaron ocratoxina A, fumonisina B1 y deoxinivalenol; mientras que, en el chocho, crudo y desamargado, se evaluaron ocratoxina A, fumonisina B1 y aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Ortiz, et al., 2018 p. 4).

Para su análisis, las micotoxinas fueron extraídas de los alimentos utilizando mezclas acuosas de solventes orgánicos para tener una muestra líquida fácil de evaluar, luego purificadas con columnas de inmunoafinidad específicas para OTA, eliminando posibles interferencias y por último los extractos fueron analizados mediante técnicas cromatográficas (HPLC) (Ortiz, et al., 2018 p. 4).

Los resultados de contaminación obtenidos de esta investigación fueron diferentes en las tres ciudades estudiadas. En Cuenca, la mayor contaminación fue en la harina de trigo integral que el 47% de las muestras estuvo contaminada con fumonisina B1 a niveles altos, superando el límite máximo permisible - LMP y 60% de las muestras con deoxinivalenol sobre el LMP.

En Quito, la mayor contaminación se identificó en las muestras de chocho crudo, harina de trigo integral y quinua. En chocho, el 13% de las muestras estuvieron contaminadas con ocratoxina A sobre LMP; mientras que el 20% de las muestras de harina de trigo integral estuvo contaminada con deoxinivalenol, estuvo sobre LMP y el 38% de las muestras de quinua estuvo contaminada con ocratoxina A sobre LMP (Ortiz, et al., 2018 p. 8).

### **1.3 Validación de Métodos Analíticos**

La validación de métodos analíticos es un proceso de evaluación estadística y aporte de evidencias objetivas, en el cual se demuestra que un método analítico cumple con los requisitos particulares para un fin específico, con sus características de funcionamiento, limitaciones del

método, así como la identificación de influencias que pueden cambiar estas características y la comprobación técnica del personal y del laboratorio (ASECAL, 2008 p. 21).

Una de las actividades previa a la validación es la "puesta a punto", la misma que debe realizar el laboratorio para llegar a tener un conocimiento total del método. Con esta actividad se logra que el método "funcione", dando unas respuestas razonables, aceptables y consistentes.

Es por esto que, es necesario pulir el método en todos sus apartados, prestando una especial consideración a parámetros instrumentales de aplicación, como son: longitud de onda, flujo de bomba, temperatura de horno, presión, limpieza de columna, fase móvil, etc (ASECAL, 2008 p. 21).

### ***1.3.1 Parámetros de Validación de un Método***

Para validar métodos analíticos cuantitativos se considera la evaluación de los parámetros siguientes: (Cendejas, 2018).

- Selectividad
- Linealidad
- Exactitud
- Precisión
- Sensibilidad
- Robustez
- Incertidumbre

#### ***1.3.1.1 Selectividad***

La selectividad es la capacidad del método para diferenciar y cuantificar únicamente al analito y no a la presencia de algo similar. La selectividad y la especificidad evalúan la confiabilidad de las mediciones ante la presencia de interferencias; la segunda se considera por lo general como un 100% de selectividad. La selectividad debe ser evaluada con un mínimo de 6 fuentes de la matriz biológica adecuada (Cendejas, 2018 p. 53).

Este parámetro viene establecido bibliográficamente, pues el método seleccionado cuenta con información sobre su selectividad y las interferencias que se conocen, además para este método se están usando columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para OTA.

De acuerdo con Quezada (2009 p. 29), para evaluar la selectividad, la documentación necesaria puede incluir:

- Una lista de sustancias que pueden ser encontradas en la solución de ensayo, especialmente sustancias que pueden ser causas de problemas en la determinación cuantitativa.
- Tiempos de retención para el analito en cuestión y productos secundarios.
- Diagrama de cromatograma típico de una solución de ensayo y si es necesario el diagrama de cromatogramas de soluciones de ensayo piloto.

#### *1.3.1.2 Linealidad y rango lineal*

La linealidad es la relación funcional (concentración) de analito (**X**) y la respuesta del método (**Y**), esta relación es denominada normalmente como recta de calibración, aunque no siempre debe que ser lineal para que el método sea eficaz (ASECAL, 2008 p. 22).

Rango Lineal: "es el rango de concentraciones que va desde la menor concentración detectable y cuantificable con total exactitud y precisión (LOQ), hasta la concentración en donde la curva de calibración se desvía de la linealidad (LOL)" (FAO, 2011).

Para su determinación se prepara una serie de al menos 5 diluciones de un estándar, comprendiendo los ámbitos estudiados de trabajo con un exceso de al menos 50% sobre el límite superior y un defecto del 50% debajo del límite inferior del valor referencial de medida.

Las medidas de los puntos deben ser distribuidas lo más equidistante posible sobre el rango de trabajo, evitando ser concentrada tanto en la parte superior como inferior del rango, las cantidades del analito y el valor de la información acompañante son usadas para calcular los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado (Quezada, 2009 p. 29).

Los documentos para evaluar la linealidad en la validación pueden contener la siguiente información:

- Una tabla con las concentraciones de estándares utilizados y su respuesta en cada punto de la curva de calibración elaborada.
- Una representación gráfica de los valores medidos con la respuesta del equipo y los valores de pendiente, ordenada al origen, desviaciones estándar y límites de confianza.

- Rango de trabajo (Quezada, 2009 p. 30).

### 1.3.1.3 Precisión

Se define como el grado de concordancia entre réplicas de mediciones de la misma cantidad, mide también el error aleatorio de un análisis, los parámetros que normalmente usamos para medir la precisión son: repetibilidad y reproducibilidad (ASECAL, 2008 p. 22).

**La Repetibilidad**, expresa la precisión obtenida por un conjunto de resultados llevado a cabo bajo iguales condiciones de operación dentro del mismo laboratorio, mismo equipamiento, mismo operador, en un intervalo de tiempo pequeño; llamado también "Precisión Intra ensayo" (Quezada, 2009 p. 30).

La repetibilidad se expresa en función de la desviación estándar de las mediciones que se realicen y pueden llevarse a cabo de dos maneras.

- Con un mínimo de 9 determinaciones que se encuentren dentro del rango de concentraciones empleado durante el procedimiento, tres concentraciones/tres réplicas para cada una, ó
- Un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración del ensayo (Quezada, 2009 p. 31).

**La Reproducibilidad**, es la precisión bajo condiciones reproducibles, es decir son obtenidos con el mismo método, en diferentes laboratorios, con diferentes equipos y diferentes operarios; denominada también "Precisión Inter laboratorios" que tienen relación con trabajos o estudios colaborativos entre laboratorios (Quezada, 2009 p. 31).

La repetibilidad y reproducibilidad dependen generalmente de la concentración del analito, estableciendo cuando sea relevante la relación entre la concentración y el coeficiente de variación (Sánchez, 2009). El documento para evaluar en la validación de la repetibilidad y reproducibilidad puede contener la siguiente información.

- Resultados en forma de una tabla de todas las repeticiones.
- Valor medio de las repeticiones obtenidas.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación.

#### *1.3.1.4 Exactitud*

Se puede definir a la exactitud, como la concordancia entre el valor medido y el valor real aceptado. La exactitud se mide como el porcentaje de recuperación del analito, aplicando el método de ensayo, mediante el uso de muestras spike o a su vez con Materiales de Referencia Certificados (MCR) (Quezada, 2009 p. 31).

**La recuperación**, se evalúa mediante la capacidad de un método de determinar todo el analito presente en las muestras, según el alcance del método. La mejor manera de identificar la eficacia de extracción del método es combinarla con diferentes concentraciones del analito a las muestras contaminadas y procesarlas por el método completo (Sánchez, 2009).

El documento para evaluar en la validación la exactitud puede contener la siguiente información:

- Una tabla mostrando la cantidad de sustancia a ser determinada, la misma que fue añadida, pesada o adicionado volumen de solución estándar con sus respectivas concentraciones. El correspondiente valor informativo, el "verdadero" y los valores medios como recuperación.
- Valor medio para el porcentaje de recuperación (Quezada, 2009 p. 32).

#### *1.3.1.5 Sensibilidad*

Es la gradiente de la curva de respuesta, o, dicho de otra forma, es el cambio de señal correspondiente a un cambio de concentración del analito. Para el intervalo lineal de un método, la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración rutinaria.

Los parámetros por evaluar en la sensibilidad son:

El **límite de detección (LOD)**, llamada también "cantidad mínima detectable", es la concentración más baja del analito en estudio posible de detectar (no cuantificar) con eficacia. Se expresa en unidades de concentración. Para determinarla se efectúa comparaciones con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 ó 3 (Quezada, 2009 p. 33).

El **límite de cuantificación (LOQ)**, es la concentración más baja de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptable, bajo condiciones operacionales establecidas para el método. Esta concentración es directamente proporcional a una respuesta, que después de haber aplicado el método completo, es igual a la media de las respuestas del blanco (ruido) más diez desviaciones estándar (Quezada, 2009 p. 33).

#### *1.3.1.6 Robustez (Confiabilidad del método)*

Corresponde a los estudios que indican el grado de confianza del ensayo ante cambios de variables comunes, estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas de equipos, análisis, laboratorios, fuente de columnas, etc. Este estudio puede ser retrospectivo, a partir de los resultados históricos obtenidos en diferentes condiciones, pero en el caso de métodos nuevos el estudio es efectuado por el laboratorio emisor de la técnica (Sánchez, 2009).

“Es evidente que un método debe ser “sólido” (reproducibile) frente a un cambio de analistas o instrumentos, pero no necesariamente debe serlo frente a todos los cambios que se estudien” (Quezada, 2009 p. 33).

#### *1.3.1.7 Incertidumbre*

La incertidumbre no es más que la duda que se tiene sobre la validez del resultado al realizar una medición, reflejando la falta de conocimiento exacto del valor esperado, heredados por defectos sistemáticos, errores aleatorios y correcciones imperfectas (Torres, 2013 p. 15).

Para estimar el cálculo de la incertidumbre se toma como referencia el Curso de Validación de Métodos Analíticos dirigida por la Asesoría de Calidad y Medio Ambiente, en la que se describe una serie de pasos referenciales para realizar este cálculo (ASECAL, 2008).

### **PASO 1**

Colocar la expresión de la magnitud de salida **Y** en función de todas las magnitudes de entrada **X<sub>i</sub>**, (a, y menos serán aquellas que se miden directamente a partir de las que se calcula el resultado final; por ejemplo, si se mide el espacio, **s**, y el tiempo, **t**, para calcular la velocidad, poner la expresión **v=s/t**) (ASECAL, 2008).

$$\text{Ec. 1.1} \quad Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$$

## PASO 2

Aplicar la ley de propagación de las varianzas a la expresión determinada anteriormente:

$$\text{Ec. 1.2} \quad u^2(y) = \sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)$$

Donde:

$$\text{Ec. 1.2.1} \quad c_i = \left[ \frac{\partial Y}{\partial x_i} \right] x_i \quad \text{Coeficiente de sensibilidad}$$

$$\text{Ec. 1.2.2} \quad u(x_i, x_j) = u(x_i)u(x_j)r(x_i, x_j)$$

Y  $u(x_i)$  y  $u(x_j)$  son las incertidumbres típicas asociadas a las estimaciones de entrada  $x_i$  y  $x_j$ , siendo  $r$  el coeficiente de correlación entre ambas magnitudes de entrada, que siempre se encuentra entre -1 y +1 (ASECAL, 2008).

El coeficiente de correlación,  $r$ , se puede calcular a partir de  $m$  pares de valores  $(p_i, q_i)$  de las magnitudes de entrada  $X_i$  y  $X_j$ , definidas como  $P$  y  $Q$  en el caso correcto, tomados simultáneamente: (ASECAL, 2008).

$$\text{Ec. 1.3} \quad r = s(\bar{p}, \bar{q}) = \frac{\sum_{k=1}^m (p_k - \bar{p})(q_k - \bar{q})}{m(m-1)}$$

- a) En el caso de que todas las magnitudes de entrada  $X_1, \dots, X_n$  sean independientes entre sí, y por tanto las  $r(x_i, x_j) = 0$ , la expresión anterior se reduce a:

$$\text{Ec. 1.4} \quad u^2(y) = \sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i)$$

Ó

$$\text{Ec. 1.5} \quad u^2(y) = \sum_{i=1}^N u_{x_i}^2(y)$$

Debido a que la contribución a la incertidumbre típica de la estimación de salida asociada a cada magnitud de entrada,  $u_{x_i}^2(y)$ , es el producto de la incertidumbre de la estimación de entrada  $u^2(x_i)$ , por su correspondiente coeficiente de sensibilidad,  $c_i$  (ASECAL, 2008).

- b) Si además la expresión de  $Y$  es aditiva ( $Y = \pm X_1, \pm X_2, \dots, \pm X_n$ ), con todos los  $c_i$  iguales a 1, como es el caso habitual de medidas directas (las realizadas con un

instrumento que nos da la indicación en las unidades en que queremos expresar el resultado.

Por ejemplo, medir voltios con un voltímetro, metros con una regla o una cinta métrica, masas con una balanza, etc.), en las que las correcciones en el caso de que se hagan se podrían poner como cantidades a añadir ( $\pm$ ) a la indicación, (por ejemplo, correcciones expresadas como diferencia entre valor patrón e indicación en un certificado de calibración).

También se podría considerar aditiva, una corrección estimada como un límite máximo directamente en las unidades de la indicación o como una corrección por temperatura que no se realiza en una regla metálica estimada a partir de un coeficiente de dilatación lineal máximo y una máxima diferencia de temperatura respecto a la de calibración). La expresión se reduce a lo siguiente: (ASECAL, 2008).

$$\text{Ec. 1.6} \quad u^2(y) = \sum_{i=1}^N u^2(x_i) = \sum_{i=1}^N u_{x_i}^2(y)$$

### PASO 3

Calcular la incertidumbre típica asociada a cada  $x_i$ ,  $u(x_i)$ , considerando todas las contribuciones asociadas. Para ello, si cada  $x_i$  puede ser considerada como variable de medida directa con todas las correcciones aditivas se seguirá la siguiente secuencia y estableciendo tan detalladamente como sea posible las causas de incertidumbre que afectan a la medida realizada, asociadas a cada factor que la determina: (ASECAL, 2008).

**De tipo A** (si ha habido repetición de medidas de  $x_i$  y no se considera la contribución de tipo A sobre la función  $Y$ ) y **de Tipo B** (posibles causas de incertidumbre a considerar para distintos tipos de medida y que conviene considerar su posible influencia, además de aquellas otras que específicamente sean significativas) (ASECAL, 2008).

Evaluar la contribución de cada componente de la incertidumbre:

- a) Los componentes de tipo A serán estimados aplicando métodos estadísticos. Para ello se seguirán los siguientes pasos:

- Se realizará una serie de n medidas de la magnitud  $X_1$  correspondiente [ identificada como  $Q(q_1, q_2, \dots, q_n)$  ], según se defina en el procedimiento de calibración o medida correspondiente.
- Se calculará la media aritmética, como mejor estimador del valor verdadero de la estimación de salida: (ASECAL, 2008).

$$\text{Ec. 1.7} \quad \bar{q} = \frac{\sum_{i=1}^n q_k}{n}$$

- Se calculará la varianza experimental de la serie de n medidas realizadas mediante:

$$\text{Ec. 1.8} \quad s^2(q) = \frac{\sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2}{n-1}$$

- Y la varianza de la media

$$\text{Ec. 1.9} \quad s^2(\bar{q}) = \frac{s^2(q)}{n} = \frac{\sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2}{n(n-1)}$$

- Y la incertidumbre asociada a esta estimación es:

$$\text{Ec. 1.10} \quad u(q) = s(\bar{q})$$

Si el número de mediciones  $n$  es pequeño ( $n < 10$ ), la evaluación de tipo A expresada por la ecuación anterior puede no ser fiable. Si no se puede aumentar el número de observaciones deberían calcularse los grados efectivos de libertad (ASECAL, 2008).

**Ensayos** – En general, es razonable suponer una distribución normal que propicie un intervalo de cobertura con el nivel de confianza del 95% cuando el modelo es lineal en las magnitudes de entrada y se cumple alguna de las siguientes posibilidades: (ASECAL, 2008).

- Existe una contribución única y dominante a la incertidumbre, que se origina de una distribución normal, y los correspondientes grados de libertad son mayores de 30.
- Las tres principales contribuciones son de tamaño similar y los grados efectivos de libertad son mayores de 30 (ASECAL, 2008).

En ocasiones, cuando la medición está correctamente caracterizada y bajo control estadístico, es posible que se disponga de una estimación combinada de la varianza (por ejemplo, de repetibilidad  $s_r^2$ ) que caracterice mejor la dispersión que la desviación típica estimada a partir de un número limitado de observaciones.

En este caso, si la magnitud de entrada  $Q$  se calcula como la medida aritmética  $\bar{q}$  de un número pequeño  $m$  de observaciones independientes, la varianza de esta medida aritmética podrá estimarse como: (ASECAL, 2008).

$$\text{Ec. 1.11} \quad s^2(\bar{q}) = \frac{s_r^2}{m}$$

- b) Los componentes de tipo B serán estimados basándose en el certificado de calibración, la experiencia, recomendaciones de fabricante, etc. Se estimarán a partir de la información disponible o, cuando no se dispone de otra información, se estimará la incertidumbre máxima de las componentes; en este caso  $u(x_i)$  puede ser dada por la regla práctica siguiente: (ASECAL, 2008).

$$\text{Ec. 1.12} \quad u(x_i) = \frac{\text{límite máximo de la componente}}{\sqrt{3}}$$

Para el caso que se estime una distribución de los posibles valores de tipo rectangular, o, en caso de distribución triangular: (ASECAL, 2008).

$$\text{Ec. 1.13} \quad u(x_i) = \frac{\text{límite máximo de la componente}}{\sqrt{6}}$$

Componer todas las contribuciones, tanto de Tipo A como de Tipo B, cuadráticamente:

$$\text{Ec. 1.14} \quad u^2(y) = \sum u^2(x_i) = \sum u_{x_i}^2(y)$$

En el caso de que cada  $x_i$  no pueda ser considerada como variable de medida directa con todas las correcciones aditivas, se aplicará, para dicha variable, lo establecido en el paso 1 y paso 2 hasta llegar a variables que cumplan con lo anterior. (ASECAL, 2008).

#### PASO 4

La incertidumbre típica,  $u(y)$ , así calculada puede no haber tenido en cuenta otro tipo de contribuciones que habría que añadir en este momento (por ejemplo, la contribución de tipo A, si habiendo habido repeticiones de medidas no se ha considerado ya en las  $u_{x_i}(y)$ , no considerarlo en los dos sitios pues sería considerar dos veces la misma contribución.

Así mismo, se debería analizar si hay contribuciones que no se han considerado en las  $u_{x_i}(y)$  ya sea porque no se puede estimar su contribución a las mismas y así al resultado final o porque esta última estimación es mejor o semejante y más cómoda de considerar en función de los datos disponibles: repetibilidad, reproducibilidad de la determinación a analizar, en su caso (ASECAL, 2008).

$$\text{Ec. 1.15} \quad U^2(y)_{\text{TOTAL}} = u^2(y) + \sum(\text{otras contribuciones})^2$$

#### PASO 5

Cálculo de la incertidumbre expandida de medida:

A partir de la incertidumbre típica total se expresará la incertidumbre de medida como un intervalo de incertidumbre simétrico alrededor de la estimación de salida ( $y$ ) dentro del cual se estima que se encontrará el valor verdadero de la medida realizada, con un factor de cobertura ( $k$ ) (FAO., 2006 p. 14).

Este intervalo se determina multiplicando la incertidumbre típica total,  $u(y)_{\text{TOTAL}}$ , por un factor  $k$  (factor de cobertura). Este factor será, usualmente,  $k = 2$ , si podemos atribuir al mensurando una distribución normal y la estimación de salida tiene la suficiente fiabilidad. La incertidumbre expandida así calculada corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente un 95% (FAO, 2011 p. 35).

Si no se cumple alguna de las dos condiciones (normalidad y fiabilidad suficiente), el factor usual de  $k = 2$  puede producir una probabilidad de cobertura inferior al 95%. En estos casos, para garantizar que la incertidumbre expandida se corresponde con la misma probabilidad del 95%, tiene que utilizarse el procedimiento siguiente:

Cuando se cumplen condiciones del Teorema Central del Límite, la distribución resultante de varios componentes derivados de distribuciones bien definidas (por ejemplo, normales,

rectangulares, triangulares, ... es normal), el factor de cobertura se estima en la tabla de factores multiplicadores para el cálculo de la incertidumbre, en función de los grados efectivos de libertad,  $v_{ef}$ , de la  $u(y)_{TOTAL}$ , que se calcula según la siguiente fórmula: (FAO., 2006 p. 15).

$$\text{Ec. 1.16} \quad v_{ef} = \frac{u^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_{x_i}^4(y)}{v_i}}$$

Por tanto, la incertidumbre expandida se expresará: (FAO., 2006 p. 15).

$$\text{Ec. 1.17} \quad U = \pm k * u(y)_{TOTAL}$$

## PASO 6

Cálculo de la estimación de salida.

Es la media de la serie de determinaciones del resultado realizadas a partir de las estimaciones de entrada corregidas  $x_{ic} = \bar{x}_i$  es la media de la serie de medidas de  $x_i$  realizadas para determinar cada resultado y  $corr_i$  es la correlación para realizar para la indicación  $\bar{x}_i$  del equipo (ASECAL, 2008).

Se entiende por corrección, **corr<sub>i</sub>**, la cantidad que hay que sumar al valor obtenido,  $x_i$ , para obtener el valor convencionalmente verdadero. La determinación de **corr<sub>i</sub>**, se puede deber a una corrección simple o al resultado de un conjunto de correcciones.

Son posibles fuentes de corrección, el certificado de calibración (**corr<sub>calibración</sub> =  $x_{ipatrón} - x_{ilectura\ equipo}$** ), la dilatación de un material, la variación con la temperatura de la resistencia eléctrica de un elemento, etc (FAO., 2006 p. 15).

En caso de que no se realicen correcciones, dichas correcciones no realizadas se tendrán en cuenta (en su máxima estimación) para aumentar la incertidumbre expandida en sus cálculos posteriores (FAO., 2006 p. 16).

## PASO 7

El resultado final de una medida se expresa por la estimación de la salida  $y$ , con el intervalo de incertidumbre para un factor de cobertura  $k$ , dado (usualmente=2 para una probabilidad de cobertura del 95%); mediante la expresión: (FAO., 2006 p. 16).

**Ec. 1.18**  $y \pm U$ (indicando siempre el valor  $k$ )

En los procedimientos específicos de calibración y/o medida en que sea aplicable, se incluirá, o se hará referencia concreta, un análisis de las incertidumbres asociadas a los resultados cuantitativos de la calibración o medida considerando los equipos, variaciones máximas de las magnitudes de influencia que admite el procedimiento, método, etc.

Se indicarán las contribuciones a considerar (fuentes de incertidumbre y los métodos para valorarlas incertidumbres típicas asociadas, número de observaciones en caso de repetición, etc.) y la expresión para su composición (ASECAL, 2008).

El cálculo de las incertidumbres se podrá realizar en registros específicos en los que se cuantifiquen los límites de las contribuciones y se compongan determinando, en su caso, una tabla o expresión a aplicar para cada resultado concreto que se obtenga en una calibración o medida siguiendo dicho método (FAO., 2006 p. 17).

Para mayor claridad, es recomendable presentar los datos referentes a este análisis de forma tabulada. En la tabla, las magnitudes deben expresarse mediante un símbolo físico,  $X_i$ , o un breve identificador, indicando para cada una de ellas, como mínimo, el valor de la estimación de entrada,  $x_i$ , la incertidumbre típica asociada a esta,  $u(x_i)$ , el coeficiente de sensibilidad,  $c_i$ , y las diferentes contribuciones,  $u_{xi}(y)$ , a la incertidumbre típica,  $u(y)$ .

También debe indicarse la dimensión de cada magnitud, junto con los valores que se facilitan en la tabla (FAO., 2006 p. 18). En el procedimiento, los valores se indicarán por su expresión, criterio o referencia a ellos, salvo cuando el valor sea constante para todo el alcance del procedimiento (se indicará). En los registros del cálculo completo se expresarán los valores numéricos en lo posible (FAO., 2006 p. 18).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Laboratorio de Servicios de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Departamento de Nutrición y Calidad (DNC) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC).

Así como también en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

#### 2.2 Unidades Experimentales

Las unidades experimentales se utilizaron para el objetivo tres: Verificar los parámetros de validación relativos a la metodología propuesta.

Se utilizó 45 unidades experimentales que corresponden a la cantidad de quinua (25 g) en las cuales se aplicaron diferentes niveles de contaminación con OTA A (2; 5 y 12.5ug/Kg). Esta cantidad está en función de lo que el método de referencia indica.

#### 2.3 Materiales, Equipos y Reactivos

##### 2.3.1 Estándares

- Estándar Ocratoxina A pureza > 98% (Sigma 01877)

##### 2.3.2 Material vegetal

En este estudio se utilizó quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) perlada, procedente de la provincia de Chimborazo, para ser contaminada con OTA A y luego determinar el nivel de recuperación de OTA A mediante el HPLC-fluorescencia.

### 2.3.3 *Materiales de Laboratorio*

- Probetas de borosilicato de 10mL a 1000mL
- Balones volumétricos de 5mL a 2000mL
- Vasos de precipitación de borosilicato de 10mL a 1000mL
- Embudos de filtración de vidrio
- Pipetas volumétricas de 4mL
- Vasos de vidrio para licuadora de 500mL
- Tubos de ensayo de vidrio con punta cónica de 15mL
- Sistema de extracción al vacío
- Gradillas porta tubos de ensayo
- Espátula de metal
- Micropipeta automática de 100 a 1000 $\mu$ L y de 10 a 100 $\mu$ L
- Puntas para micropipeta automática
- Papel filtro de 12,5cm de diámetro Whatman 4 o equivalente
- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 045 $\mu$ m de poro, 47mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 022 $\mu$ m de poro, 25mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana de fibra de vidrio tipo APFB
- Jeringuillas de polipropileno de 10mL y 60mL desechables
- Columna de inmunoafinidad para purificación de OTA (recuperación  $\geq$  90%)

### 2.3.4 *Equipos*

- Molino (Thomas Wiley)
- Balanza de dos dígitos de capacidad para 4200g y precisión  $\pm$ 0.01g (Shimadzu UW4200H)
- Balanza analítica de capacidad de 220g y precisión de 0.1mg (Shimadzu AUX220)
- Evaporador de muestras
- Baño María (Mettler)
- Equipo de Extracción en fase solida al vacío (Waters)
- Agitador de Tubos (Maxi Mix II)
- Baño Ultrasonido (Cole Parmer)
- Equipo HPLC (Agilent 1200 series)
- Licuadoras (Osterizer)
- Bomba de vacío (GE-MOT-012)

- Plancha Agitadora/calentadora (Cole Parmer)
- Cronómetro digital (thomas Scientific)
- Espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu 2201)

### 2.3.5 *Reactivos*

- Agua tipo I
- Bicarbonato de sodio grado p.a. pureza al 99.9%
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Metano grado p.a. 99.8%
- Cloruro de potasio grado p.a. pureza > 99.5%
- Cloruro de sodio grado p.a. pureza > 99.5%
- Dihidrógeno fosfato de potasio anhidro
- Hidrógeno fosfato disódico anhidro
- Ácido Acético grado p.a. pureza del 99.8%
- Tolueno > 99.9%
- Gas Nitrógeno 99.9% de pureza

## 2.4 **Tratamiento y Diseño Experimental**

En el presente trabajo de titulación, el tratamiento y diseño experimental aplica únicamente para el objetivo 3 que son los parámetros de validación del método, cuya variable independiente y dependiente se observa en la tabla 1-2.

**Tabla 1-2:** Esquema para la variable independiente y dependiente del método.

Variable independiente	Niveles de contaminación con OTA A en las unidades experimentales (25 g de quinua perlada)
Variable dependiente (respuesta)	Porcentaje de recuperación de OTA A mediante el método que se está validando

Realizado por: Moreno, B. 2022

La validación del método en quinua se realizó en dos etapas, en la primera se realizó la curva de calibración con concentraciones de (0,94; 1,89; 5; 7,5 y 12,5 ng/ml) bajo el esquema que se muestra en la tabla 2-2.

**Tabla 2-2:** Esquema para el estudio de regresión lineal del método.

NIVEL ug/Kg	Repeticiones	Respuesta (Área LU)				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
0,94	1	X	X	X	X	X
	2	X	X	X	X	X
	3	X	X	X	X	X
	PROMEDIO					
1,89	1	X	X	X	X	X
	2	X	X	X	X	X
	3	X	X	X	X	X
	PROMEDIO					
5	1	X	X	X	X	X
	2	X	X	X	X	X
	3	X	X	X	X	X
	PROMEDIO					
7,5	1	X	X	X	X	X
	2	X	X	X	X	X
	3	X	X	X	X	X
	PROMEDIO					
12,5	1	X	X	X	X	X
	2	X	X	X	X	X
	3	X	X	X	X	X
	PROMEDIO					

Realizado por: Moreno, B. 2022

En la segunda etapa, se contaminó con OTA (variable independiente en 2; 5 y 12,5ug/kg) 45 muestras de quinua y se cuantificó el nivel de recuperación de esta toxina (variable dependiente es el porcentaje de recuperación de la toxina). Para esto se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), donde los niveles de concentración de OTA correspondieron a los tratamientos (3) y las muestras de quinua a las unidades experimentales (45).

Esto bajo la siguiente ecuación lineal:  $Y = \mu + T + \epsilon$ . Los tratamientos fueron asignados al azar a cada unidad experimental, en la tabla 3-2 se muestra esta asignación.

Prueba de hipótesis en DCA:

$$Y_{kn} = \mu + T_k + \epsilon_{kn}$$

$Y_{kn}$  = variable de respuesta

$\mu$  = media global

$T_k$  = efecto del tratamiento

$\epsilon_{kn}$  = error aleatorio

**Tabla 3-2:** Esquema para el Estudio de la Repetibilidad y Reproducibilidad del Método.

Tratamientos: Nivel de contaminación en ug/kg	Repeticiones	DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
2	1	31	2	15	12	1
	2	4	7	20	40	45
	3	32	9	14	33	23
5	1	43	18	8	35	41
	2	36	22	10	16	6
	3	19	44	34	38	5
12,5	1	13	39	27	24	28
	2	42	17	37	3	30
	3	29	21	11	26	25

Realizado por: Moreno, B. 2022

Con los valores obtenidos de recuperación de OTA se determinó el límite de detección, la precisión, exactitud incluyendo una prueba de homogeneidad de varianzas, el estadístico de Cochran, para determinar si el factor de concentración tiene efecto sobre la variabilidad de la concentración en los tres niveles, selectividad, la incertidumbre típica combinada y la incertidumbre expandida.

## 2.5 Mediciones Experimentales

### 2.5.1 Condiciones Cromatográficas

- ✓ Longitud de onda
- ✓ Flujo
- ✓ Presión
- ✓ Temperatura de columna

- ✓ Volumen de inyección
- ✓ Fase móvil

### **2.5.2 *Linealidad y rango lineal***

- ✓ Área del estándar a diferentes niveles de concentración en el HPLC

### **2.5.3 *Parámetros de validación***

- ✓ Porcentaje de recuperación de OTA en las muestras artificialmente contaminadas.

### **2.5.4 *Incertidumbre***

- ✓ No aplica

## **2.6 *Análisis Estadístico y Pruebas de Significancia***

Los resultados obtenidos en la investigación realizada fueron tabulados en una hoja electrónica Excel de Office 2020, posteriormente se realizó el procesamiento estadístico para lo cual se utilizó el paquete estadístico de Excel Office 2020. Los resultados obtenidos fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

- T-student: Al resultado de las curvas de calibración se aplicó una regresión lineal y se midió el coeficiente de correlación para verificar la correlación lineal significativa entre los valores de "concentración" y "área" bajo los siguientes parámetros: pendiente, intercepto, desviación estándar de la pendiente, desviación estándar de intercepto, límite de confianza de la pendiente, error típico y el límite de confianza del intercepto.
- G de Cochran: Para comprobar la validación del método se utilizó los parámetros de selectividad, precisión, sensibilidad y exactitud. En este último parámetro se aplicó el estadístico G de Cochran, que usa las diferencias de las varianzas elevadas al cuadrado; esto permite determinar si el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados, como se muestra en la tabla 4-2.

## 2.7 Procedimiento Experimental

Para validar el método en la matriz de quinua se utilizó como referencia el método oficial de la AOAC 2004.10 (2005) Determinación de Ocratoxina A en café verde utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (AOAC, 2005).

**Tabla 4-2:** Prueba de Cochran para el análisis de varianza.

nivel	Varianzas S2					Promedio	G-experimental	G-teórico(K,n)
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5			
2	X	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X		
12,5	X	X	X	X	X	X		
							∞	X
							<b>K</b>	X
							<b>n</b>	X

Realizado por: Moreno, B. 2022

El método seleccionado está basado en la utilización de columnas de inmunoafinidad que poseen anticuerpos monoclonales específicos para OTA, tecnología que es altamente específica, sensible y rápida en relación con las tecnologías tradicionales de purificación (Destilación simple, cristalización, punto de fusión, sublimación, etc).

La OTA es extraída de la muestra con soluciones de metanol y bicarbonato de sodio, la misma que es aplicada sobre la columna de inmunoafinidad que atrapa a la toxina, la columna es lavada para eliminar todas las interferencias, y la OTA es recuperada de la columna con una solución de metanol, la toxina recuperada es cuantificada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna de fase reversa C18 y detector de fluorescencia (Quezada, 2009).

### 2.7.1 Etapa 1: Curva de calibración

Para la ejecución de la curva de calibración se preparó los reactivos y las diluciones del estándar en (0,94; 1,89; 5; 7,5 y 12,5ug/Kg), se realizó las mediciones correspondientes como se presentó en la tabla 1-2 para posteriormente realizar los cálculos estadísticos pertinentes para la validación de un método de ensayo.

### 2.7.1.1 Preparación de reactivos

- **Solución Ácido Sulfúrico 0.009M:** En un balón aforado de 1000mL se transfirió cuantitativa e individualmente 500mL de agua bidestilada y 494uL de ácido sulfúrico concentrado con pureza del 97,1%, se completó el volumen con agua bidestilada y se homogenizó.
- **Solución Dicromato de Potasio 0,25mM en Ácido Sulfúrico 0.009M:** En una caja Petri se transfirió 5g de dicromato de potasio pureza del 99,5-100% y se secó a 105 °C por una hora, se sacó a un desecador y se esperó a que se enfríe. En un vaso de precipitación de 100mL se pesó 0,074g de dicromato de potasio, se añadió 75mL de ácido sulfúrico 0,009M y agitó hasta que se disuelva, se transfirió cuantitativamente a un balón aforado de un litro y se llevó a volumen con el ácido sulfúrico 0,009M.
- **Solución Dicromato de Potasio 0,125mM en Ácido Sulfúrico 0.009M:** Se transfirió cuantitativamente 5mL de la solución de dicromato de potasio 0,25mM en ácido sulfúrico 0,009M a un balón de 10mL y se llevó a volumen con el ácido sulfúrico 0,009M.
- **Solución Dicromato de Potasio 0,625mM en Ácido Sulfúrico 0.009M:** Se transfirió cuantitativamente 5mL de la solución de dicromato de potasio 0,125mM en ácido sulfúrico 0,009M a un balón de 10mL y se llevó a volumen con el ácido sulfúrico 0,009M.

### 2.7.1.2 Preparación de la curva de calibración

- **Solución estándar Madre.** Se removió con cuidado el seguro de la parte superior del vial de estándar de OTA de 5mg y se introdujo con cuidado la aguja de una jeringuilla de vidrio de 10mL en el vial, se inyectó 4mL de solución de Tolueno – Ácido acético (99:1), se agitó por dos minutos, a continuación, se tomó 100uL de esta solución y se diluyó a 100mL con Tolueno – Ácido acético (99:1).
- **Preparación de las diluciones a partir de la solución madre (50ng/mL).** Para la preparación de las diluciones se realizó el siguiente procedimiento:
  - Se calculó el volumen de estándar madre requerida para las cinco diluciones (0,94. 1,89. 5, 7.5, 12.5 ng/mL), mediante la siguiente fórmula.

$$V1 = \frac{C2V2}{C1}$$

C1= Concentración de la solución madre de OTA  
V1= ?  
C2= 50ng/mL.  
V2= 100mL

- Se tomó el volumen calculando en un balón de 100mL y se secó con corriente de Nitrógeno en un baño maría a 50°C.
- Se añadió 50mL de metanol, se redisolvió con agitación y se colocó el balón en un ultrasonido por 5 minutos, se aforó a 100mL con metanol grado HPLC.
- **Lectura en el HPLC.** Una vez preparadas las diluciones se procedió a la medición del área por triplicado en el equipo HPLC (Agilent 1200 series) bajo los parámetros que se muestran en el apartado 3.1 Condiciones óptimas del sistema cromatográfico en la sección de resultados de esta tesis.

## **2.7.2 Etapa 2: Contaminación de quinua con OTA A y su recuperación**

En esta etapa se realizó la preparación de reactivos requeridos para la extracción de OTA de las 45 muestras de quinua, la preparación de estas unidades experimentales, la extracción utilizando las columnas de inmunoafinidad y la detección y cuantificación de OTA usando el equipo HPLC y el detector de fluorescencia. Con los datos obtenidos de esta etapa, siguiendo el esquema presentado en la tabla 2-2 se aplicaron los estadísticos correspondientes.

### **2.7.2.1 Preparación de Reactivos**

- **Solución Buffer Fosfato Salino PBS 0.1%:** Se transfirió cuantitativa e individualmente 0.2g de dihidrógeno fosfato de potasio, 1,5g de hidrógeno fosfato disódico dihidratado, 8.0g de cloruro de sodio, 0.2g de cloruro de potasio, en un balón volumétrico de 1000mL, se completó el volumen con agua purificada y se homogenizó.
- **Solución Bicarbonato de Sodio al 3%:** Se pesó 30g de bicarbonato de sodio, se transfirió a un balón de 1000mL, se completó el volumen con agua purificada y se homogenizó.
- **Solución de Extracción:** Solución de metanol: bicarbonato de sodio al 3% (v/v).
- **Solución fase móvil:** Acetonitrilo (400mL); Metanol (300mL); Ácido Acético 0.2% (600uL) y aforar a 1000mL con agua bidestilada.

#### 2.7.2.2 *Molienda y Pesaje de la quinua*

- a) Se trituró 1Kg de quinua en el molino hasta obtener un tamaño de partícula de 1mm.
- b) Se colocó un frasco pequeño de licuadora de 500mL, con número de identificación de la muestra sobre la balanza y se encendió la balanza.
- c) Se pesó 25 gramos de muestra previamente homogenizada en el frasco de vidrio con la ayuda de una espátula.
- d) Se trasladó el frasco de vidrio con la muestra hacia el lugar de extracción.

#### 2.7.2.3 *Extracción de la OTA de quinua contaminada*

- a) Se adicionó a la muestra 200mL de solución de Metanol: bicarbonato de sodio al 3% (1:1, v/v).
- b) Se colocó el frasco en la licuadora, se aseguró el mismo y se homogenizó a alta velocidad durante 5 minutos.
- c) Se filtró la muestra por gravedad usando papel filtro y membrana de fibra de vidrio.
- d) Se tomó 4mL de filtrado y se transfirió a un balón volumétrico de 100mL, se aforó con la solución PBS y se homogenizó.

#### 2.7.2.4 *Purificación de OTA extraída de quinua contaminada*

- a) Se adaptó una jeringa de polipropileno de 60mL a una columna de inmunoafinidad y se conectó al sistema de filtración al vacío.
- b) Se pasó cuantitativamente el contenido del balón de 100mL por la columna y se dejó pasar a través de la columna controlando el flujo con el émbolo.
- c) Se lavó la columna con 10mL de agua y se dejó secar la columna.
- d) Se desconectó la columna del sistema de vacío y se aplicó presión positiva.
- e) Se sustituyó la jeringa de plástico de 60mL por una jeringa de plástico de 10mL.
- f) Se transfirió 4mL de metanol grado HPLC por la jeringa, se eluyó la Ocratoxina A utilizando presión positiva y se controló el flujo por medio del émbolo de la jeringa.
- g) Se evaporó el eluido a sequedad utilizando nitrógeno en baño de agua con agitación y control de temperatura a 50°C.
- h) Se redisolvió los residuos obtenidos en la etapa de purificación con 300µL de metanol grado HPLC, se agitó utilizando un agitador de tubos y en baño ultrasonido por 5 min.

## 2.8 Metodología de Evaluación

### 2.8.1 Condiciones Cromatográficas

Para establecer las condiciones del sistema cromatográfico, se tomó como referencia la técnica de análisis para Ocratoxina A en café verde (método AOAC. 2004.10), método que presenta valores preestablecidos para los parámetros de: tipo de columna, temperatura de columna, longitud de onda, presión, composición de la fase móvil, velocidad de flujo y volumen de la muestra.

### 2.8.2 Linealidad y rango lineal

El estudio de linealidad y rango lineal se evaluó relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de Ocratoxina A, utilizando el esquema que se presentó en la tabla 2-2. Con los resultados obtenidos se realizó el estudio de regresión lineal como se muestra en la tabla 4-2.

**Tabla 4-2:** Parámetros para el estudio de regresión lineal

PARÁMETRO	FÓRMULA
<b>Coefficiente de correlación (r):</b>	<b>Ec. 2.1</b> $r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\left[ \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]^{\frac{1}{2}} \left[ \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]^{\frac{1}{2}}}$
<b>Pendiente (m):</b>	<b>Ec. 2.2</b> $m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = \frac{S_{yx}}{S_{xx}}$
<b>Intercepto (L):</b>	<b>Ec. 2.3</b> $L = \frac{\sum y - m \sum x}{n} = \bar{y} - m \bar{x}$
<b>Desviación estándar de la pendiente (Sm):</b>	<b>Ec. 2.4</b> $S_m = \sqrt{\frac{S^2_{yx}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} = \frac{S_{yx}}{\sqrt{S_{xx}}}$
<b>Desviación estándar del intercepto (SL):</b>	<b>Ec. 2.5</b> $S_L = \sqrt{S_m^2 \frac{\sum x^2}{n}} = S_m \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$
<b>Límite de confianza de la pendiente:</b>	<b>Ec. 2.6</b> $S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-2}}$
<b>Error Típico (Sy,x):</b>	<b>Ec. 2.7</b> $m: m \pm t \cdot S_m$ t= valor de t de la distribución t-student con n-2 grados de libertad (t tabla)
<b>Límite de confianza del intercepto:</b>	<b>Ec. 2.8</b> $L: L \pm t \cdot S_L$
<b>Prueba t-student para el coeficiente de correlación:</b>	

<p><b>Hipótesis nula (H<sub>0</sub>):</b> No correlación entre X (concentración) e Y (área) (r=0)</p> <p><b>Hipótesis alterna (H<sub>1</sub>):</b> "r" NO debe ser significativamente diferente de uno (r≠0)</p>	<p><b>Ec. 2.9</b> <math display="block">tr = \frac{ r *\sqrt{n-2}}{\sqrt{(1-r^2)}}</math></p> <p><b>Criterio de aceptación:</b> El valor de t-calculado (tr) debe ser mayor a t-tabla. La hipótesis nula se rechaza, existiendo una correlación lineal significativa. Por lo tanto, r ≈ 1.</p>
--	--

Realizado por: Moreno, B. 2022

### 2.8.3 Parámetros de validación

Para determinar los parámetros de validación se empleó las siguientes fórmulas:

- ✓ **Límite de detección.** Se evaluó utilizando la siguiente relación.

$$\text{Ec. 2.10} \quad LD = \frac{3L}{m}$$

L= intercepto

m= pendiente

- ✓ **Límite de cuantificación.** Se determinó utilizando la siguiente relación.

$$\text{Ec. 2.11} \quad LC = \frac{10L}{m}$$

L= intercepto

m= pendiente

- ✓ **Precisión.** El estudio de repetibilidad y reproducibilidad se realizó utilizando muestras de quinua artificialmente contaminadas con OTA (muestras spike) mediante el esquema de la tabla 3-2.
- ✓ **Exactitud.** Se calculó el porcentaje de recuperación en cada uno de los niveles expuestos en la tabla para el análisis de la repetibilidad y reproducibilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ec. 2.12} \quad \% \text{Recuperación} = \frac{C_{\text{obtenido}}}{C_{\text{esperado}}} \times 100$$

$C_{\text{obtenido}}$  es el resultado obtenido.  
 $C_{\text{esperado}}$  es el valor teórico del mismo.

Luego se utilizó el estadístico de Cochran para el análisis de varianza mediante el esquema que se presenta en la tabla 4-2.

- ✓ **Selectividad.** Se utilizó columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para OTA, que permiten separar el analito de cualquier otra interferencia producidas por la matriz de quinua.

#### 2.8.4 Incertidumbre

Este parámetro de la validación se estableció siguiendo los pasos señalados en la parte teórica del presente trabajo: la expresión final de la incertidumbre se estableció con las siguientes fórmulas:

- ✓ **Incertidumbre típica combinada (u):**

$$\text{Ec. 2.13} \quad u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)}$$

$$\text{Ec. 2.13.1} \quad c_i = \left[ \frac{\partial Y}{\partial X_i} \right]_{\bar{x}_i} \text{ (Coeficiente de sensibilidad)}$$

- ✓ **Incertidumbre expandida (U):**

$$\text{Ec. 2.14} \quad U = k \cdot u(y)_{\text{TOTAL}}$$

Siendo el factor de cobertura  $k=2$

## CAPÍTULO III

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados organizados en función de los objetivos específicos del trabajo experimental.

#### 3.1 Condiciones óptimas del sistema cromatográfico para la cuantificación e identificación de OTA A.

Para determinar las condiciones del sistema cromatográfico, se tomó como referencia la técnica de análisis para Ocratoxina A en café verde (método AOAC 2004.10), obteniendo los siguientes parámetros de trabajo:

- **Longitud de Onda:** Excitación 330nm, Emisión 475nm.
- **Flujo:** 1mL/minuto
- **Presión:** 73 Bares
- **Temperatura de Columna:** 30°C
- **Volumen de inyección:** 20µL
- **Fase móvil:** Acetonitrilo (400mL); Metanol (300mL); Ácido Acético 0.2% (600uL) y aforar a 1000mL con agua bidestilada.
- **Tipo de columna:** C-18

#### 3.2 Linealidad y rango de linealidad del método relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de OTA A.

A partir de la solución madre de OTA (50ng/mL), se preparó cinco diluciones usando metanol como diluyente como se muestra en la tabla 1-3.

Una vez con los estándares listos se realizó 5 curvas de calibración, para lo cual se inyectó cada estándar por triplicado en 5 días diferentes, usando el esquema indicado en el capítulo 2 de marco metodológico. (tabla 2-2).

**Tabla 1-3:** Preparación de Estándares para Curva de Calibración de OTA. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina".

Concentración de OTA (ng/mL)	Volumen de solución madre OTA ( $\mu$ L)	Volumen de Metanol ( $\mu$ L)
1,56	62,4	1937,6
3,15	126	1874
8,33	333,2	1666,8
12,5	500	1500
20,83	833,2	1166,8

Realizado por: Moreno, B. 2022

En la tabla 2-3 se observa los datos compilados de los promedios de las cinco curvas de calibración.

**Tabla 2-3:** Datos promedios para las cinco curvas de calibración. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR ng/ml	RESPUESTA DEL EQUIPO HPLC (AREA LU)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
0.94	10,571	10,659	10,761	10,620	10,490
1.89	22,055	21,998	22,031	21,980	22,097
5	59,371	59,391	57,358	58,742	59,540
7.5	88,091	88,636	88,100	87,668	89,993
12.5	150,199	147,032	146,302	147,496	149,858

Realizado por: Moreno, B. 2022

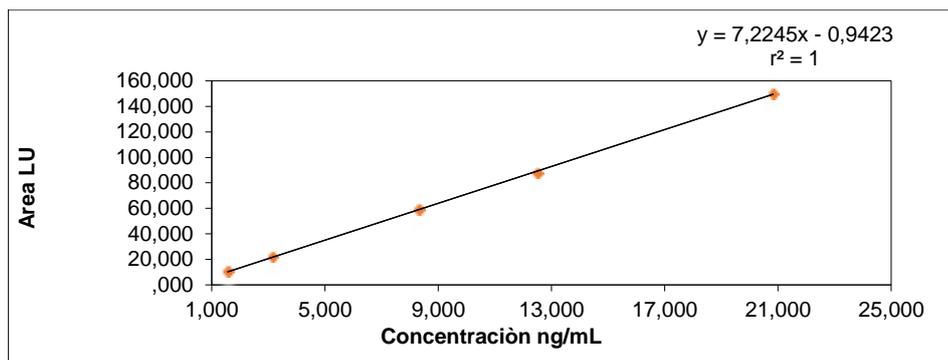
A continuación, en la tabla 3-3 se presenta los resultados obtenidos para la curva de calibración promedio correspondiente al día uno del proceso de validación.

**Tabla 3-3:** Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 1. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina".

Concentración (ng/mL)	1,56	3,15	8,33	12,50	20,83
Área (LU*s)	10,571	22,055	59,371	88,091	150,199

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 1-3 se muestra la curva de calibración para el día 1 en referencia a los resultados obtenidos en la tabla 3-3, representando la concentración de OTA (ng/mL) por el área (LU).



**Gráfico 1-3.** Curva promedio de Calibración de OTA del día 1. (LSAIA). (DNC).  
INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 1-3, se observa la ecuación resultante para la primera curva de calibración, teniendo un valor de la pendiente de 7,22 y de la ordena al origen de -0,94, el coeficiente de correlación lineal  $r^2$  fue de 1, el cual nos indica una alta correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA.

Con estos datos se realizó un análisis de regresión lineal. Los resultados del análisis de regresión para la curva de calibración correspondiente al día 1 se observan en la tabla 4-3.

**Tabla 4-3:** Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 1. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina".

Estadístico	Descripción	Valor
m=	Pendiente de la recta	7,2245
Lo=	Ordenada al origen	-0,9423
S <sub>y,x</sub> =	error típico	0,8534
S <sub>m</sub> =	Desv st pendiente	0,0549
S <sub>Lo</sub> =	Desv st ordenada	0,6361
t=	Valor t de las tablas	3,1824
*tr=	Valor t calculado	131,66
m min=	Pendiente mínima aceptable	7,0498
m max=	Pendiente máxima aceptable	7,3991
Lo min=	Intercepto mínimo	-2,9666
Lo max=	Intercepto máximo	1,0821

Realizado por: Moreno, B. 2022

Del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 1, se presentó los valores de desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ ) 0,05 y de la desviación estándar de la ordenada al origen ( $SL_o$ ) de 0,64.

De igual forma se presentó los valores para el error típico  $S_{y,x}$  en la curva de calibración del día 1 con un valor de 0,85, esto representa la incertidumbre por curva de calibración, o lo que es lo mismo el grado de dispersión de los datos con respecto al valor esperado.

Se mostró también el resultado de la prueba t-student ( $t_r$ ) para el coeficiente de correlación  $r$ , el cual permite verificar la correlación lineal significativa entre los valores de "concentración" y "área", con los resultados obtenidos se estableció que el valor de  $t_r$  calculado es 131,66 y el  $t$  de las tablas al 95% es 3,18; determinando que el valor de  $t_r > t$  tabla, indicando así que existe una alta correlación lineal entre X y Y.

Con los valores de la pendiente, intercepto y desviación de cada parámetro, se estableció los límites de confianza utilizando la inversa de la distribución t-student de dos colas al 95% de confianza y 3 grados de libertad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 7,05 a 7,40 y el intercepto entre -2,97 a 1,08.

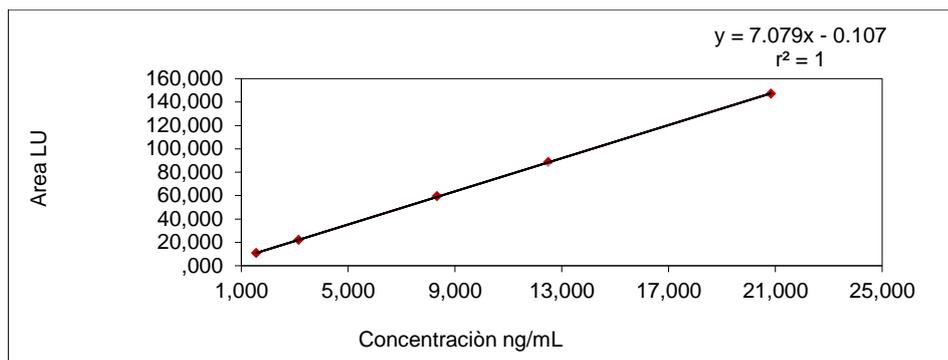
En la tabla 5-3, se presenta los resultados obtenidos para la curva de calibración promedio correspondiente al día dos del proceso de validación.

**Tabla 5-3:** Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 2. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina".

Concentración (ng/mL)	1,56	3,15	8,33	12,50	20,83
Curva 2	10,659	21,998	59,391	88,636	147,032

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 2-3, se observa la ecuación resultante para la segunda curva de calibración, en referencia a los resultados obtenidos en la tabla 5-3, teniendo un valor de la pendiente de 7,08 y de la ordena al origen de -0,11, el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  fue de 1, el cual nos indica una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA.



**Gráfico 2-3.** Curva de Calibración de OTA del día 2. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

**Realizado por:** Moreno, B. 2022

Con estos resultados se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 2, los resultados se observan en la tabla 6-3:

**Tabla 6-3:** Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 2. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina".

Estadístico	Descripción	Valor
m=	Pendiente de la recta	7,0790
Lo=	Ordenada al origen	-0,1070
S <sub>y,x</sub> =	error típico	0,4321
S <sub>m</sub> =	Desv st pendiente	0,0278
S <sub>Lo</sub> =	Desv st ordenada	0,3221
t=	Valor t de las tablas	3,1824
*tr=	Valor t calculado	254,80
m min=	Pendiente mínima aceptable	6,9905
m max=	Pendiente máxima aceptable	7,1674
Lo min=	Intercepto mínimo	-1,1321
Lo max=	Intercepto máximo	0,9180

**Realizado por:** Moreno, B. 2022

Del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 2, se presentó los valores de desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ ) 0,03 y de la desviación estándar de la ordenada al origen ( $S_{L_0}$ ) de 0,32.

De igual forma se presentó los valores para el error típico  $S_{y,x}$  en la curva de calibración del día 2 con un valor de 0,43, esto representa la incertidumbre por curva de calibración, o lo que es lo mismo el grado de dispersión de los datos con respecto al valor esperado.

Se mostró también el resultado de la prueba t-student ( $t_r$ ) para el coeficiente de correlación  $r$ , el cual permite verificar la correlación lineal significativa entre los valores de "concentración" y "área", con los resultados obtenidos se estableció que el valor de  $t_r$  calculado es 254,80 y el  $t$  de las tablas al 95% es 3,18; determinando que el valor de  $t_r > t$  tabla, indicando así que existe una alta correlación lineal entre X y Y.

Con los valores de la pendiente, intercepto y desviación de cada parámetro, se estableció los límites de confianza utilizando la inversa de la distribución t-student de dos colas al 95% de confianza y 3 grados de libertad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 6,99 a 7,17 y el intercepto entre -1,13 a 0,92.

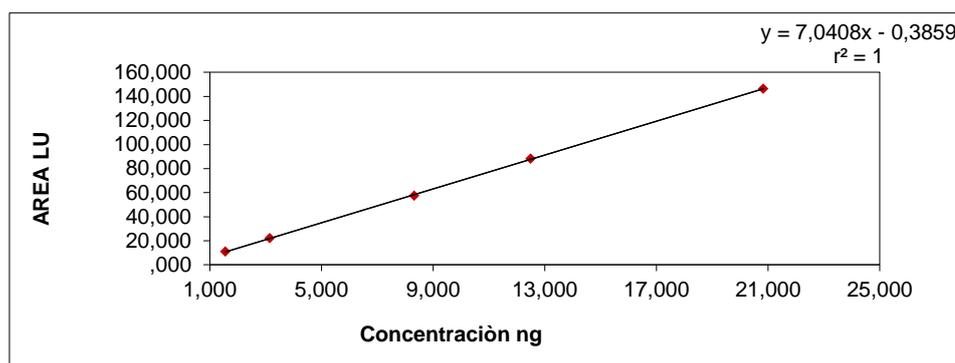
En la tabla 7-3, se presenta los resultados obtenidos para la curva de calibración promedio correspondiente al día tres del proceso de validación.

**Tabla 7-3:** Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 3. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

<b>Concentración (ng/mL)</b>	1,56	3,15	8,33	12,50	20,83
<b>Curva 3</b>	10,761	22,031	57,358	88,100	146,302

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 3-3 se muestra la curva de calibración para el día 3 en referencia a los resultados obtenidos en la tabla 7-3, representando la concentración de OTA (ng/mL) por el área (LU).



**Gráfico 3-3.** Curva de Calibración de OTA del día 3. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 3-3, se observó la ecuación resultante para la tercera curva de calibración, teniendo un valor de la pendiente de 7,04 y de la ordenada al origen de -0,39, el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  fue de 1, el cual nos indica una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA.

Con estos resultados se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 3, los resultados se observan en la tabla 8-3:

**Tabla 8-3:** Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 3. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Estadístico	Descripción	Valor
m=	Pendiente de la recta	7,0408
Lo=	Ordenada al origen	-0,3859
$S_{y,x}$ =	error típico	0,6140
Sm=	Desv st pendiente	0,0395
SLo=	Desv st ordenada	0,4576
t=	Valor t de las tablas	3,1824
*tr=	Valor t calculado	178,34
m min=	Pendiente mínima aceptable	6,9151
m max=	Pendiente máxima aceptable	7,1664
Lo min=	Intercepto mínimo	-1,8423
Lo max=	Intercepto máximo	1,0705

Realizado por: Moreno, B. 2022

Del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 3, se presentó los valores de desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ ) 0,04 y de la desviación estándar de la ordenada al origen ( $S_{L_o}$ ) de 0,46.

De igual forma se presentó los valores para el error típico  $S_{y,x}$  en la curva de calibración del día 3 con un valor de 0,61, esto representa la incertidumbre por curva de calibración, o lo que es lo que es lo mismo el grado de dispersión de los datos con respecto al valor esperado.

Se mostró también el resultado de la prueba t-student ( $t_r$ ) para el coeficiente de correlación r, el cual permite verificar la correlación lineal significativa entre los valores de "concentración" y "área", con los resultados obtenidos se estableció que el valor de  $t_r$  calculado es 178,34 y el t de las tablas al 95% es 3,18; determinando que el valor de  $t_r > t$  tabla, indicando así que existe una alta correlación lineal entre X y Y.

Con los valores de la pendiente, intercepto y desviación de cada parámetro, se estableció los límites de confianza utilizando la inversa de la distribución t-student de dos colas al 95% de confianza y 3 grados de libertad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 6,91 a 7,17 y el intercepto entre -1,84 a 1,07.

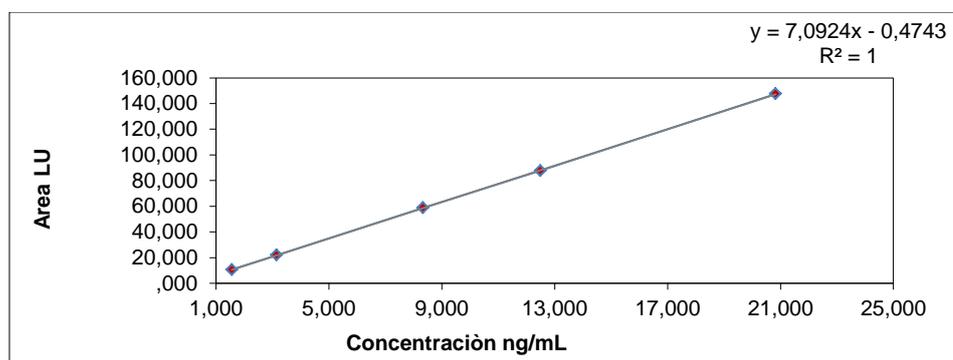
En la tabla 9-3, se presenta los resultados obtenidos para la curva de calibración promedio correspondiente al día cuatro del proceso de validación.

**Tabla 9-3:** Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 4. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

<b>Concentración (ng/mL)</b>	1,56	3,15	8,33	12,50	20,83
<b>Curva 4</b>	10,620	21,980	58,742	87,668	147,496

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 4-3 se muestra la curva de calibración para el día 4 en referencia a los resultados obtenidos en la tabla 9-3, representando la concentración de OTA (ng/mL) por el área (LU).



**Gráfico 4-3.** Curva de Calibración de OTA del día 4. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 4-3, se observó la ecuación resultante para la cuarta curva de calibración, teniendo un valor de la pendiente de 7,09 y de la ordena al origen de -0,47, el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  fue de 1, el cual nos indica una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA.

Con estos resultados se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 4, los resultados se observan en la tabla 10-3:

**Tabla 10-3:** Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 4. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Estadístico	Descripción	Valor
m=	Pendiente de la recta	7,0924
Lo=	Ordenada al origen	-0,4743
S <sub>y,x</sub> =	error típico	0,3418
Sm=	Desv st pendiente	0,0220
SLo=	Desv st ordenada	0,2548
t=	Valor t de las tablas	3,1824
*tr=	Valor t calculado	322,70
m min=	Pendiente mínima aceptable	7,0225
m max=	Pendiente máxima aceptable	7,1624
Lo min=	Intercepto mínimo	-1,2851
Lo max=	Intercepto máximo	0,3365

Realizado por: Moreno, B. 2022

Del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 4, se presentó los valores de desviación estándar de la pendiente (Sm) 0,02 y de la desviación estándar de la ordenada al origen (SLo) de 0,26.

De igual forma se presentó los valores para el error típico  $S_{y,x}$  en la curva de calibración del día 4 con un valor de 0,34, esto representa la incertidumbre por curva de calibración, o lo que es lo mismo el grado de dispersión de los datos con respecto al valor esperado.

Se mostró también el resultado de la prueba t-student (tr) para el coeficiente de correlación r, el cual permite verificar la correlación lineal significativa entre los valores de "concentración" y "área", con los resultados obtenidos se estableció que el valor de  $t_r$  calculado es 322,70 y el t de las tablas al 95% es 3,18; determinando que el valor de  $t_r > t$  tabla, indicando así que existe una alta correlación lineal entre X y Y.

Con los valores de la pendiente, intercepto y desviación de cada parámetro, se estableció los límites de confianza utilizando la inversa de la distribución t-student de dos colas al 95% de confianza y 3 grados de libertad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 7,02 a 7,16 y el intercepto entre -1,28 a ,34.

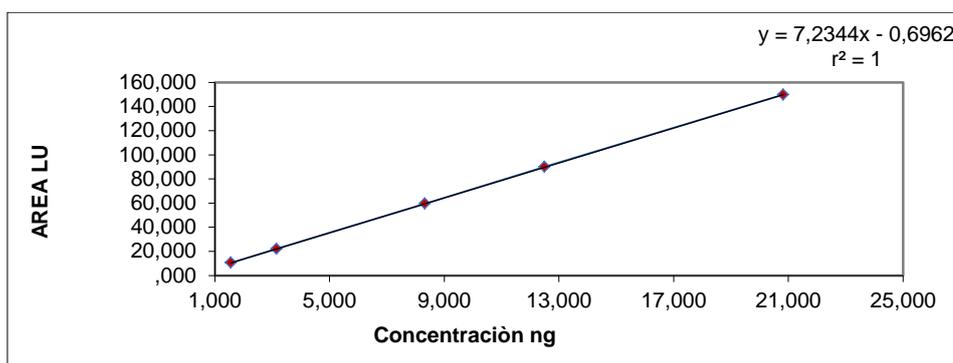
En la tabla 11-3, se presenta los resultados obtenidos para la curva de calibración promedio correspondiente al día cinco del proceso de validación.

**Tabla 11-3:** Promedios de la Curva de Calibración de OTA para el día 5. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

<b>Concentración (ng/mL)</b>	1,56	3,15	8,33	12,50	20,83
<b>Curva 5</b>	10,490	22,097	59,540	89,993	149,858

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 5-3 se muestra la curva de calibración para el día 5 en referencia a los resultados obtenidos en la tabla 11-3, representando la concentración de OTA (ng/mL) por el área (LU).



**Gráfico 5-3.** Curva de Calibración de OTA del día 5. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 5-3, se observó la ecuación resultante para la quinta curva de calibración, teniendo un valor de la pendiente de 7,23 y de la ordena al origen de -0,69, el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  fue de 1, el cual nos indica una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA.

Con estos resultados se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 5, los resultados se observan en la tabla 12-3:

Del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 5, se presentó los valores de desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ ) 0,01 y de la desviación estándar de la ordenada al origen ( $SL_o$ ) de 0,13.

De igual forma se presentó los valores para el error típico  $S_{y,x}$  en la curva de calibración del día 5 con un valor de 0,18, esto representa la incertidumbre por curva de calibración, o lo que es lo mismo el grado de dispersión de los datos con respecto al valor esperado.

**Tabla 12-3:** Resultados del Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración del día 5. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Estadístico	Descripción	Valor
m=	Pendiente de la recta	7,2344
Lo=	Ordenada al origen	-0,6962
S y,x=	error típico	0,1799
Sm=	Desv st pendiente	0,0116
SLo=	Desv st ordenada	0,1341
t=	Valor t de las tablas	3,1824
*tr=	Valor t calculado	625,25
m min=	Pendiente mínima aceptable	7,1976
m max=	Pendiente máxima aceptable	7,2712
Lo min=	Intercepto mínimo	-1,1230
Lo max=	Intercepto máximo	-0,2693

Realizado por: Moreno, B. 2022

Se mostró también el resultado de la prueba t-student ( $t_r$ ) para el coeficiente de correlación  $r$ , el cual permite verificar la correlación lineal significativa entre los valores de "concentración" y "área", se estableció que el valor de  $t_r$  calculado es 625,25 y el  $t$  de las tablas al 95% es 3,18; determinando que el valor de  $t_r > t$  tabla, indicando así una alta correlación lineal entre X y Y.

Con los valores de la pendiente, intercepto y desviación de cada parámetro, se estableció los límites de confianza utilizando la inversa de la distribución t-student. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 7,20 a 7,27 y el intercepto entre -1,12 a -0,27.

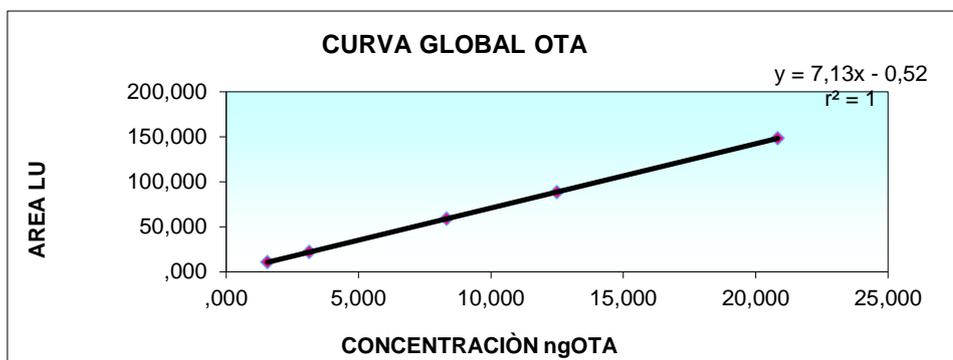
En la tabla 13-3, se presenta los resultados de la curva de calibración por día y su promedio.

**Tabla 13-3:** Promedios de la Curva de Calibración Global de OTA. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Concentración (ng/mL)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Promedio área (LU)
1,56	10,571	10,659	10,761	10,620	10,490	<b>10,620</b>
3,15	22,055	21,998	22,031	21,980	22,097	<b>22,032</b>
8,33	59,371	59,391	57,358	58,742	59,540	<b>58,880</b>
12,50	88,091	88,636	88,100	87,668	89,993	<b>88,498</b>
20,83	150,199	147,032	146,302	147,496	149,858	<b>148,177</b>

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 6-3 se muestra la curva de calibración promedio de los 5 días en referencia con los promedios de la tabla 13-3, representando la concentración de OTA (ng/mL) por el área (LU).



**Gráfico 6-3.** Curva de Calibración Global de OTA. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Realizado por: Moreno, B. 2022

En el gráfico 6-3, se observó la ecuación resultante para la curva de calibración promedio, teniendo un valor de la pendiente de 7,13 y de la ordenada al origen de -0,52, el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  fue de 1, el cual nos indica una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA.

Con estos resultados se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración global, los resultados se observan en la tabla 14-3:

**Tabla 14-3:** Análisis de Regresión Lineal para la Curva de Calibración Global de OTA. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", julio de 2021.

Estadístico	Descripción	Valor
m=	Pendiente de la recta	7,13
Lo=	Ordenada al origen	-0,52
S y,x=	error típico	0,85
Sm=	Desv st pendiente	0,03
SLo=	Desv st ordenada	0,36
t=	Valor t de las tablas	3,18
*tr=	Valor t calculado	302,55
m min=	Pendiente mínima aceptable	6,92
m max=	Pendiente máxima aceptable	7,40
Lo min=	Intercepto mínimo	-2,97
Lo max=	Intercepto máximo	1,08

Realizado por: Moreno, B. 2022

Del análisis de regresión lineal para la curva de calibración global, se presentó los valores de desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ ) 0,03 y de la desviación estándar de la ordenada al origen ( $SL_o$ ) de 0,36.

De igual forma se presentó los valores para el error típico  $S_{y,x}$  en la curva de calibración global con un valor de 0,85, esto representa la incertidumbre por curva de calibración, o lo que es lo mismo el grado de dispersión de los datos con respecto al valor esperado.

Se mostró también el resultado de la prueba t-student ( $t_r$ ) para el coeficiente de correlación  $r$ , el cual permite verificar la correlación lineal significativa entre los valores de "concentración" y "área", con los resultados obtenidos se estableció que el valor de  $t_r$  calculado es 302,55 y el  $t$  de las tablas al 95% es 3,18 determinando que el valor de  $t_r > t$  tabla, indicando así que existe una alta correlación lineal entre X y Y.

Con los valores de la pendiente, intercepto y desviación de cada parámetro, se estableció los límites de confianza utilizando la inversa de la distribución t-student de dos colas al 95% de confianza y 3 grados de libertad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 6,92 a 7,40 y el intercepto entre -2,97 a 1,08.

### **3.3 Parámetros de validación relativos a la metodología propuesta.**

#### ***3.3.1 Límite de detección y cuantificación***

Se estableció el límite de detección y el límite de cuantificación en base a los datos obtenidos en el estudio de linealidad del método, es decir; con valores del intercepto que para este caso es 0,98 y de la pendiente que su valor es de 7,11, utilizando la ecuación 2.10 y 2.11.

El método en la matriz de quinua presentó un límite de detección y de cuantificación de 0,52ug/Kg y 1,72ug/Kg respectivamente, los resultados se muestran a continuación en la tabla 15-3:

Con estos resultados se estableció que el método presentó un límite de detección inferior a 1μg/Kg y un límite de cuantificación inferior a 1,8μg/Kg, determinando así que el método presenta una alta sensibilidad para el análisis de OTA.

**Tabla 15-3:** Resultados del Cálculo de Límite de Detección y Cuantificación usando una Curva de Calibración. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", agosto de 2021.

	<b>µg/Kg</b>
<b>Límite de detección</b>	0,52
<b>Límite de cuantificación</b>	1,72

Realizado por: Moreno, B. 2022

En trabajos realizados en el Laboratorio de Servicios de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina, utilizando el mismo método de determinación y cuantificación de OTA por HPLC se reporta valores para el límite de detección y el límite cuantificación de 0,44µg/Kg y 1,47µg/Kg respectivamente en la matriz de café verde (Quezada, 2009 p. 76).

En la matriz de cacao se generaron valores de 0,90µg/Kg y de 1,35µg/Kg respectivamente (Cevallos, et al., 2012 pp. 3-4). En contraste con otros trabajos ejecutados fuera del laboratorio del INIAP, de acuerdo con Francia (2021 p. 79) obtuvo valores para el límite de detección de 0,039µg/Kg.

Díaz, et al., (2005) publicó que en café verde el límite de detección fue de 0,01µg/Kg y el límite de cuantificación fue de 0,3µg/Kg, mientras que para café soluble el límite de detección y cuantificación respectivamente fue de 0,03µg/Kg y 0,6µg/Kg; Milla, et al., (2020 p. 164) publicó que los valores obtenidos para el límite de detección y cuantificación respectivamente fueron de 0,22 µg/Kg y 0,44µg/Kg en la matriz de café arábico en la ciudad de Lima.

Comparado con estos valores con los anteriormente presentados, el límite de detección y cuantificación en la matriz quinua son altamente sensibles en respuesta al método planteado, generando datos confiables.

### **3.3.2 Precisión**

Para establecer la precisión del método, se realizó un estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando muestras de quinua artificialmente contaminadas con OTA en 3 niveles dentro del rango de trabajo. Esto se ejecutó por triplicado en 5 días diferentes, los resultados se presentan en la tabla 16-3:

**Tabla 16-3:** Resultados del Análisis de Precisión del Método. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", agosto de 2021.

Concentración de OTA ( $\mu\text{g/Kg}$ )					
Muestra spike	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
2	1,80340	1,88138	1,81480	1,98190	1,81510
2	1,80564	1,84899	1,85190	1,92310	1,86980
2	1,83627	1,84150	1,86480	1,86260	2,04660
5	4,92913	4,99587	4,99820	4,91230	4,97600
5	4,77629	4,94133	4,80870	4,91970	4,98930
5	4,75609	5,05681	4,93360	4,70660	4,96870
12,5	12,42295	12,48885	12,53450	12,48400	12,52910
12,5	12,54310	12,49379	12,53830	12,53190	12,47550
12,5	12,49198	12,50876	12,47370	12,41460	12,52800

Realizado por: Moreno, B. 2022

Con los datos que se muestran en la tabla 16-3, se realizó un análisis de varianza, calculando en primer lugar la suma de diferencias cuadráticas entre niveles (SDCb) y la suma de diferencias cuadráticas dentro de niveles (SDCw); así mismo se calculó la diferencia cuadrática media entre niveles (DCMb) y dentro de niveles (DCMw). Estos resultados se muestran en la tabla 17-3.

**Tabla 17-3:** Resultados de la Suma de Diferencias Cuadráticas y Diferencias Cuadráticas Medias entre y dentro de niveles. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", agosto de 2021.

Concentración OTA $\mu\text{g/Kg}$	SDCb	DCMb	SDCw	DCMw
2	0,02481	0,0062	0,0393	0,0039
5	0,07304	0,01826	0,0726	0,0073
12,5	0,0044	0,0011	0,0192	0,0019

Realizado por: Moreno, B. 2022

Con referencia a los datos que se muestran en la tabla 17-3 se determinó la desviación estándar de la repetibilidad ( $S_r$ ) y de la reproducibilidad ( $S_R$ ), la desviación estándar relativa de repetibilidad ( $RSD_r$ ) y de reproducibilidad ( $RSD_R$ ). Se muestran los resultados en la tabla 18-3.

**Tabla 18-3:** Resultado de la Desviación Estándar, Desviación Estándar Relativa de RSD y de Reproducibilidad. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", agosto de 2021.

$\mu\text{g/Kg}$	$S_r$	$RSD_r \%$	$SL^2$	$S_R$	$RSD_R \%$
2	0,06	3,14	-0,0008	0,06	2,82
5	0,09	1,70	0,0037	0,10	2,09
12,5	0,04	0,35	-0,0003	0,04	0,32

Realizado por: Moreno, B. 2022

Con los datos de  $RSD_r$  y  $RSD_R$  presentados en la tabla 18-3 se estableció que el método cumple con los criterios exigidos para métodos de análisis de micotoxinas por la CE (Comunidad Europea), que indican que valores de  $RSD_R \leq 30\%$  y  $RSD_r \leq 20\%$ , cuando el rango de concentración en el que se evalúa el analito es de 1 a  $10\mu\text{g/Kg}$ .

### 3.3.3 Exactitud

La exactitud del método se determinó como porcentaje de recuperación, mediante la fórmula 2.12, obteniendo el valor de la recuperación promedio de las 3 muestras spike, en las concentraciones de  $2\mu\text{g/Kg}$ ,  $5\mu\text{g/Kg}$  y  $12,5\mu\text{g/Kg}$ .

**Tabla 19-3:** Resultados del Porcentaje de Recuperación por día y Porcentaje Promedio. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", agosto de 2021.

NIVEL ( $\mu\text{g/Kg}$ )	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
2	90,73	92,83	92,15	96,1	95,5
5	96,47	99,95	98,26	96,91	99,55
12,5	99,87	99,97	100,12	99,81	100,09
%REC. PROMEDIO/DÍA	95,69	97,58	96,84	97,61	98,38
%REC. PROMEDIO TOTAL	97,22				

Realizado por: Moreno, B. 2022

Con los datos presentados en la tabla 19-3, se estableció que tanto el porcentaje de recuperación por día, así como el porcentaje de recuperación promedio, que fue de 97,22%, cumple con los requisitos exigidos para métodos de análisis de Micotoxinas por la CE (Comunidad Europea),

que establece que valores aceptables están en el rango de 70 a 110%, cuando el rango de concentración en el que se evalúa el analito es de 1 a 10µg/Kg.

**Tabla 20-3:** Resultados del estadístico de G de Cochran. (LSAIA). (DNC). INIAP “Santa Catalina”, agosto de 2021.

nivel	Varianzas S2					promedio	G-experimental	G-teórico(K,n)
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5			
2	0,00	0,00	0,00	0,004		0,00	0,15	0,75
5	0,01	0,00	0,01	0,01		0,01		
12,5	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00		
							∞	0,05
							K	3
							n	5

**Realizado por:** Moreno, B. 2022

Con los datos presentados en la tabla 20-3, al aplicar el estadístico de G de Cochran, se determinó que el G experimental 0,15 < G teórico 0,75, por tanto, el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados.

En trabajos realizados en el Laboratorio de Servicios de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina, utilizando el mismo método de determinación y cuantificación de OTA por HPLC en diferentes matrices de alimentos, reportaron valores de recuperación de 91,92% en café verde (Quezada, 2009 p. 78), y de 97,50% en la matriz de cacao (Cevallos, et al., 2012 p. 4).

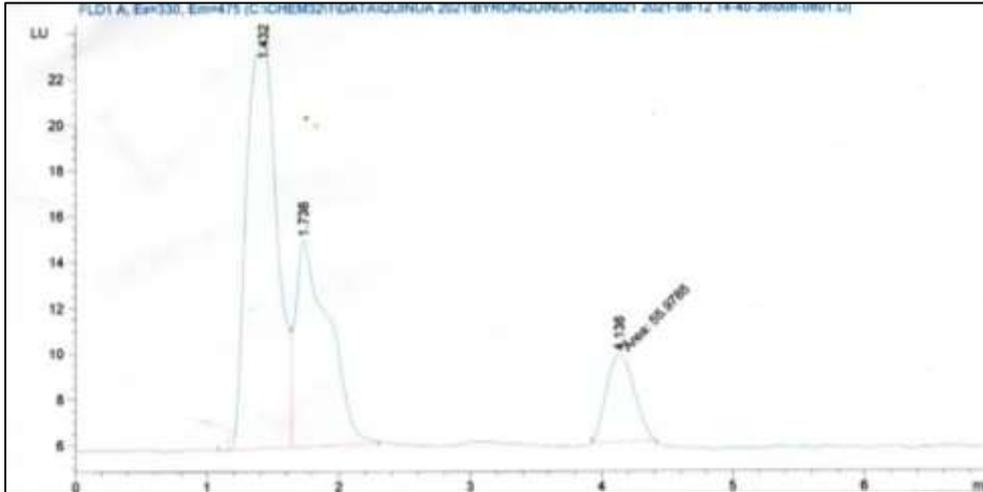
En contraste con otros trabajos ejecutados fuera del laboratorio de INIAP, en los que se obtuvieron valores menores, De acuerdo con Francia (2021 p. 82) analizó OTA en la matriz pprika con un valor de recuperaci3n de 85,8%; según Díaz, et al., (2005) public3 el porcentaje de recuperaci3n de OTA en café soluble en el rango de 73,5 a 91,92%, y en café verde de 68,7 a 84,5%.

Milla, et al., (2020 p. 164) public3 datos de recuperaci3n para café arábico en la ciudad de Lima, con un promedio de 76,23% de recuperaci3n. Comparado con estos valores, el porcentaje de recuperaci3n de OTA en la matriz de quinua es mucho mayor al obtenido en otras matrices alimentarias.

### 3.3.4 Selectividad

La selectividad del método se estableció considerando que el método usa columnas de inmutioafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para OTA, que separa cualquier interferencia del pico del analito, así como se puede observar en el cromatograma siguiente:

En la figura 1-3 se puede observar el cromatograma de una muestra spike.



**Figura 1-3.** Cromatograma de una Muestra de Quinoa Contaminada Artificialmente con OTA A.

Realizado por: Moreno, B. 2022

### 3.4 Estimación de la Incertidumbre relacionados a todos los elementos que intervienen en la metodología.

Para el cálculo de la incertidumbre, en primer lugar, en base a la expresión final del análisis (ecuación 3.1), se calculó los coeficientes de sensibilidad mediante derivadas parciales de cada una de las variables con respecto al resultado final utilizando la ecuación 1.2.1, los resultados se exponen en la tabla 21-3.

$$\text{Ec. 3.1} \quad OTA \frac{\mu\text{g}}{\text{Kg}} = \frac{C}{M_s} * \frac{V_1}{V_2} * \frac{V_3}{V_4} * R$$

C = Lectura del equipo expresada en nanogramos

$V_1$  = Volumen de extracción

$V_2$  = Volumen de alícuota de extracto aplicado en la columna de inmutioafinidad

$V_3$  = Volumen final de extracto redissuelto en metanol

$V_4$  = Volumen de extracto inyectado al equipo

$M_s$  = Peso de muestra en gramos

R = Factor de Recuperación

**Tabla 21-3:** Resultados del Coeficiente de Sensibilidad para la Incertidumbre. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", agosto de 2021

Variable	Coeficiente de sensibilidad (c)
C	0,2108
$V_1$	0,0136
$V_2$	0,0466
$V_3$	0,3671
$V_4$	0,0466
$M_s$	0,0094
R	0,0310

Realizado por: Moreno, B. 2022

Posteriormente se calculó la contribución de la incertidumbre asociada a cada variable, además de la contribución asociada al factor de recuperación aplicando la ecuación 1.5. Se calculó la incertidumbre típica combinada aplicando la ecuación 2.13.

Por último, se calculó la incertidumbre expandida (ecuación 2.14), de esta manera se obtuvo una incertidumbre de 0,86, que va asociada al resultado final, de tal manera que el resultado obtenido en la determinación Ocratoxina A en quinua utilizando columnas de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta resolución tendrá un margen de error de +/- 0,86ng/g.

En trabajos realizados en el Laboratorio de Servicios de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina, utilizando el mismo método de determinación y cuantificación de OTA por HPLC se reporta valores de incertidumbre de +/- 0,69ng/g en la matriz de café verde (Quezada, 2009 p. 81).

Un valor de +/- 0,53ng/g en la matriz de cacao (Cevallos, et al., 2012 p. 4). Por lo que se puede decir que la incertidumbre en la matriz de quinua tiene un valor acorde al factor de recuperación encontrado.

Los resultados de las contribuciones de cada variable, la incertidumbre combinada e incertidumbre expandida para la determinación de OTA en quinua se pueden apreciar en la tabla 22-3.

**Tabla 22-3:** Resultados de las Contribuciones e Incertidumbres Asociadas a la Determinación de OTA en Quinoa. (LSAIA). (DNC). INIAP "Santa Catalina", agosto de 2021.

Fuente	Contribución incertidumbre (u*c)	$V_i$ Ou Veff	
Calibración (C)	0,2108	$\infty$	
Volumen de Extracción (V1)	0,0136	$\infty$	
Volumen de Alícuota de Extracto tomado (V2)	0,0466	$\infty$	
Volumen de Redisolución de extracto (V3)	0,3671	$\infty$	
Volumen de Extracto Inyectado al equipo (V4)	0,0466	$\infty$	
Peso de Muestra (Ms)	0,0094	$\infty$	
Factor de Recuperación (R)	0,0310	$\infty$	
Incertidumbre combianada total (u)	0,4297		
Incertidumbre expandida (U)	K	2	<b>0,86</b>

Realizado por: Moreno, B. 2022

## CONCLUSIONES

- Las condiciones para un perfecto funcionamiento en la lectura del HPLC-fluorescencia en términos de longitud de onda, flujo, presión, temperatura de columna, volumen de inyección, fase móvil y tipo de columna fueron idénticos en las utilizadas para la matriz de café verde según el método oficial de la AOAC 2004.10 (2005).
- El método es lineal puesto que la correlación existente entre la concentración de OTA (ng/ml) y el área (LU) es muy alta, lo cual se demostró gráficamente con un coeficiente de correlación igual a 1.
- Este método puede detectar desde 0,52ug/Kg de OTA y cuantificar desde 1,72ug/Kg de OTA en quinua, siendo apropiado para el control de este contaminante en quinua, considerando que la norma N° 1881/2006 de la Comunidad Europea indica que el máximo permitido es de 5ug/Kg.
- El método es preciso, cumple con los criterios exigidos para métodos de análisis de micotoxinas por la CE (Comunidad Europea), que indican que valores de  $RSD_R \leq 30\%$  y  $RSD_r \leq 20\%$ , cuando el rango de concentración en el que se evalúa el analito es de 1 a 10µg/Kg.
- El método analítico por medio de columnas de inmunoafinidad y lectura en el HPLC para la determinación y cuantificación de OTA es exacto, ya que el porcentaje de recuperación promedio total de OTA en dicha matriz fue de 97,22%, encontrándose dentro del rango exigido por la Comunidad Europea que va de 70 a 110%.
- El método es selectivo, por utilizar en el proceso columnas de inmunoafinidad que separan cualquier otra interferencia, permitiendo obtener un pico con el 100% de pureza.
- La incertidumbre Expandida (U) correspondiente al 95% de confianza presenta un margen de error de +/- 0,86ug/Kg para concentraciones en el rango de 0,83 a 30ug/Kg.

## **RECOMENDACIONES**

- Manejar información sobre el protocolo de buenas prácticas de laboratorio y tomar en cuenta las indicaciones emitidas por cada profesional encargado de laboratorio.
- Mantener las muestras de quinua, columnas y solución madre en refrigeración y selladas herméticamente.
- Se recomienda una lavada profunda de equipos, materiales y recipientes después de la utilización de cada matriz, ya que el equipo al ser muy sensible detecta pequeñas interferencias que ocasionan problemas a la hora de emitir los resultados.
- Controlar la reserva de gas nitrógeno para el secado de las muestras.

## BIBLIOGRAFÍA

**ABREU, Ravelo, et al.** *La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión.* [En línea]. 2011. [Consulta: 02 junio 2021]. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112011000600004.16995198](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600004.16995198).

**AFHSE, Asociación de fabricantes de harina-sémola España.** *Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas* [En línea]. 2015. [Consulta: 21 marzo 2021]. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/textomicotoxinas18122015\\_completoev\\_nipo\\_tcm30-57870.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/textomicotoxinas18122015_completoev_nipo_tcm30-57870.pdf). 280152407.

**AOAC, Association of Official Analytical Chemist.** *Official Methods Of Analysis.* United States of America : Chapter, 2005, pp. 61-63.

**ASECAL, Asesores de Calidad y Medio ambiente.** *Curso de Validación de Métodos Analíticos.* Quito : s.n., 2008. pp. 21-40.

**BAZILE , Didier, et al. 2014.** *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013.* Santiago de Chile : CIRAD, 2014. 9789253085583.

**BONGIANINO, Fabricio & ISASTI, Julián.** *Evaluación del rendimiento y características agronómicas de cuatro materiales de quinua en la región semiárida pampeana* [En línea]. 2018. [Consulta: 22 octubre 2021]. Disponible en: <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/semiarida/article/view/3504>. 24084077.

**CÁCERES, Miguel.** *Determinación de niveles de Zearalenona y sus factores de riesgo en leche cruda del cantón Mejía y Quito- Pichincha, en época lluviosa y época seca* [En línea] (Trabajo de titulación). (Tercer nivel) Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. 2019. p.16. [Consulta: 2021-08-13]. Disponible en: <http://dSPACE.espace.edu.ec/bitstream/123456789/14218/1/27T00446.pdf>

**CALLA, Jael.** *Manejo agronómico del cultivo de la quinua* [En línea]. 2012. [Consulta: 08 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/ctecnica/038-b-quinua.pdf>

**CASTRO, Evelyn.** Evaluación de la calidad e inocuidad por contaminación con Ocratoxina A de la cerveza artesanal expendida en bares de la ciudad de Cuenca [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. 2018. p.30. [Consulta: 2021-07-28]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29444/1/Trabajo%20de%20Titulaci%c3%b3n.pdf>

**CENDEJAS, Emilio.** Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antifúngicos en muestras preclínicas y clínicas [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2018. pp. 53-54. [Consulta: 2021-07-15]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/46126/1/T38025.pdf>

**CEVALLOS, Amanda & SAMANIEGO, Iván.** *Evaluación cuantitativa de Ocratoxina A como contaminante en el cacao ecuatoriano de exportación por cromatografía líquida de alta resolución* [En línea]. 2012. [Consulta: 08 noviembre 2021]. Disponible en: <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/QUIMICA/article/view/1198/1189>.

**CUADRADO, Silvia.** La quinua en el Ecuador situación actual y su industrialización [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. 2012. pp. 40. [Consulta: 2021-06-17]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5221/1/UPS-QT03869.pdf>

**DÁVALOS, Eduardo & ARGUELLO, Patricio.** *Clúster para generación de emprendimientos en la cadena agroproductiva de la quinua en Chimborazo – Ecuador* [En línea]. 2019. [Consulta: 23 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/oel/2019/03/cluster-emprendimientos-ecuador.html>. 16968352.

**DÍAZ, Gonzalo, ARIZA, Diana and PERILLA, Natalia.** *Method validation for the determination of ochratoxin A in green and soluble coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography* [En línea]. 2005. [Consulta: 17 noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF02946736>.

**FAO.** *La quinua: cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial* [En línea]. 2011. [Consulta: 14 junio 2021]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/2169/1/22T%28430%29Ali%20Edwin%20Francisco%20L%C3%B3pez%20Corado.pdf>

**FAO.** *Taller Subregional sobre Aseguramiento de Calidad y Validación de Metodología para Análisis Químicos* [En línea]. 2005. [Consulta: 13 junio 2021]. Disponible en: <https://www.coursehero.com/file/89712255/FAO-ac-en-labspdf/>.

**FAO.** *Taller Subregional sobre Metodología de Muestreo Analítico, Principios de Metrología Científica y Cálculos de Incertidumbre.* [En línea]. 2006. [Consulta: 03 julio 2021]. Disponible en: <http://www.montevideo.gub.uy/asl/sistemas/Gestar/resoluci.nsf/0bfcab2a0d22bf960325678d00746391/a9a01db6b54ede8a0325719b00617d67?OpenDocument>

**FRANCIA, Abel.** Evaluación Ocratoxina A (OTA) por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en *Capsicum annum* L. “Páprika” procedente del mercado mayorista de Lima-Perú [En línea] (Trabajo de titulación). (Tercer nivel) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 2021. pp. 82. [Consulta: 2021-08-19]. Disponible en: [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/17140/Francia\\_ra.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/17140/Francia_ra.pdf?sequence=3&isAllowed=y)

**GEWEHR, Márcia, et al.** Análises químicas em flocos de quinoa: caracterizacáo para a utilizacáo em produtos alimentfcios. Campinas : s.n., 2012, Vol. 15, pp. 281-282.

**GÓMEZ, Eyder.** Caracterización de cepas toxigénicas del género *fusarium* mediante técnicas de biología molecular [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. 2008. pp. 30-39. [Consulta: 2021-08-19]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/3346/tesisUPV2902.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**GONZÁLEZ, Amaia.** Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2010. p. 112. [Consulta: 2021-08-17]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/10545/1/T30977.pdf>

**GOTTAU, Gabriela.** *Todo sobre la quinua, propiedades, beneficios y usos en la cocina* [En línea]. 2013. [Consulta: 07 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.vitonica.com/alimentos/todo-sobre-la-quinua-propiedades-beneficios-y-usos-en-la-cocina>.

**IARC, International Agency for Research on Cancer.** *Aflatoxins. Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks on Humans.* 2012. pp. 225-248.

**INIAP.** *INIAP Tunkahuan variedad mejorada de quinua de bajo contenido de saponina.* [En línea] 2010. [Consulta: 10 octubre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2639/1/iniapsopl345.pdf>.

**INIAP, PERALTA, Eduardo and PRONOALEG-GA.** *LA QUINUA EN ECUADOR "Estado del Arte"* [En línea] 2009. [Consulta: 18 septiembre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/805/1/iniapsclgaq1.pdf>.

**JAMIESON, Ross.** *Barrio de Indios: Arqueología de una parroquia urbana periférica en la ciudad colonial de Riobamba, Ecuador* [En línea] 2016. [Consulta: 12 abril 2021]. Disponible en: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/boletindearqueologia/article/view/19343>

**LEGGIERI, Marco, et al.** *Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides Interaction: Modeling the Impact on Mycotoxin Production* [En línea] 2019. [Consulta: 17 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02653/full>.

**MAGAP.** *2017, año clave para Ecuador en exportación de quinua* [En línea] 2017. [Consulta: 28 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.agricultura.gob.ec/2017-año-clave-para-ecuador-en-exportación-de-quinua>.

**MAGAP.** *Estrategia Fomento a la Producción de la Quinua en la Sierra Ecuatoriana. Subsecretaría de Agricultura.* [En línea] 2015. [Consulta: 02 noviembre 2021]. Disponible en: [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/10/PROECAS2015\\_QUINUA.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/10/PROECAS2015_QUINUA.pdf).

**MALIR, Frantisek, et al.** *Ochratoxin A levels in blood serum of Czech women in the first trimester of pregnancy and its correspondence with dietary intake of the mycotoxin contamination* [En línea] 2013. [Consulta: 08 octubre 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24102088/>

**MILLA, Félix & CASTRO, Américo.** *Evaluación del nivel contaminante de ocratoxina a (ota) mediante columnas de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia en Coffea arabica l. "Café"* [En línea] 2020. [Consulta: 18 noviembre 2021]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2020000200164&script=sci\\_arttext.1810-634X](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2020000200164&script=sci_arttext.1810-634X).

**MONTEROS, Amparito.** *Rendimiento de quinua en el Ecuador 2016* [En línea] 2016. [Consulta: 10 septiembre 2021]. Disponible en: <https://fliphtml5.com/ijia/mzvg/basic>.

**MORE, Mercedes.** Detección del inóculo primario, sintomatología y control del mildiu (*peronospora variabilis* Gaum) en el cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en Piura [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Nacional de Piura, Piura, Perú. 2016. pp. 6-7. [Consulta: 2021-07-23]. Disponible en: <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/2096/AGR-MOR-YAR->

**ORTIZ, Johana, et al.** *Los alimentos nutritivos en el Ecuador contaminados con micotoxinas* [En línea] 2018. [Consulta: 17 septiembre 2021]. Disponible en: <http://www.vlirnetworkecuador.com/los-alimentos-nutritivos-en-el-ecuador-estan-contaminados-con-micotoxinas/.9789942363732>.

**PACHECHO, Gianella.** Micotoxina en alimentcion animal [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. 2020. p. 20. [Consulta: 2021-08-28]. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/107873/files/TAZ-TFM-2021-937.pdf>

**PANDO, Luz & CASTELLANOS, Enrique.** *Guía de cultivo de la quinua. 2.* Lima-Perú : Universidad Nacional Agraria La Molina, 2016. p. 121. 9789253090693.

**QUEZADA, Claudio.** Validación de una Método de Análisis para Ocratoxina A en café verde, utilizando Columnas de Inmunofinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución [En línea] (Trabajo de titulación). (Tercer nivel) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 2009. pp. 30-47. [Consulta: 2021-07-23]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/215/1/56T00189.pdf>

**QUIROZ, Jerry.** Dinámica poblacional de los insectos plagas del cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), en el centro productivo agrícola F.A UPN-2014-Valle medio Piura distrito de Castilla [En línea] (Trabajo de titulación). (Tercer nivel) Universidad Nacional de Piura, Piura, Perú. 2018. p. 12. [Consulta: 2021-06-28]. Disponible en: <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1294/AGR-QUI-BER-17.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**RAMÍREZ, Diana.** Estudio Comparativo de las Condiciones Ambientales que influncian la producción de tricotecenos en cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo cultivado en Argentina [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad de Buenos Aires. Buenos

Aires, Argentina. 2014. p. 33. [Consulta: 2021-06-20]. Disponible en: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5609\\_RamirezAlbuquerque.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5609_RamirezAlbuquerque.pdf)

**RAMOS, Antonio, et al.** *Las micotoxinas: el enemigo silencioso* [En línea] 2020. [Consulta: 08 noviembre 2021]. Disponible en: <https://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/2354>.

**SÁNCHEZ, Domingo.** *Que es la Validación de Métodos Analíticos* [En línea] 2009. [Consulta: 15 julio 2021]. Disponible en: [http://gemini.udistrital.edu.co/comunidad/estudiantes/dlilian/que\\_es\\_vali.htm](http://gemini.udistrital.edu.co/comunidad/estudiantes/dlilian/que_es_vali.htm).

**SEMILANELUE, Noemi.** Investigación de aflatoxinas en leche y en productos destinados a la alimentación animal [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. 2019. p. 23. [Consulta: 2021-06-04]. Disponible en: <https://zagan.unizar.es/record/83999/files/TESIS-2019-155.pdf>

**SICA. 2000.** *III Censo Agropecuario*. 2000.

**TORRES, Almicar.** *Validación de métodos de DQO en aguas residuales y naturales, en el desarrollo de la determinación de la incertidumbre en la medición* [En línea] 2013. [Consulta: 28 octubre 2021]. Disponible en: <http://repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx/xmlui/handle/123456789/908>.

**VELA, Edwin.** Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca distribuida en un centro de acopio ubicado en la región de la costa sur de Guatemala 2015 [En línea] (Trabajo de titulación). (Tercer nivel) Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, Guatemala. 2016. p. 5. [Consulta: 2021-07-12]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/5760/1/Tesis%20Med.%20Vet.%20Edwin%20Manolo%20Adolfo%20Vela%20Morales.pdf>



## ANEXOS

### ANEXO A: ANÁLISIS DE ESTÁNDARES PARA ELABORAR LA CURVA DE CALIBRACIÓN

			
Calibración del espectrofotómetro	Solución estándar madre con pureza mayor al 98%	Solución estándar de calibración de 50ng/mL	Inyección en el equipo HPLC

### ANEXO B: PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE OCRATOXINA A POR HPLC-FLUORESCENCIA

			
Muestra de quinua de la provincia de Chimborazo	Moler la quinua y pasar por un tamiz de 1mm	Pesar 25 g de muestra de quinua y fortificarla	Adicionar 200ml de la Sol. de extracción y licuar por 3 min.
			

Filtrar con papel filtro y membranas de fibra de vidrio	Aforar en balones de 100mL con la solución buffer	Extracción de la muestra	Purificación de la muestra
			
Secado de la muestra con nitrógeno gas	Colocar en viales de 2000uL	Inyecta en el equipo HPLC con datos predeterminados	Impresión y análisis de resultados

### ANEXO C: ELABORACIÓN DE LA SOLUCIÓN PARA OPERAR EL HPLC





esPOCH

Dirección de Bibliotecas y  
Recursos del Aprendizaje

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL**

**REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

**Fecha de entrega:** 13/ 06 / 2022

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Byron Eduardo Moreno Flores
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias Pecuarias
<b>Carrera:</b> Ingeniería en Industrias Pecuarias
<b>Título a optar:</b> Ingeniero en Industrias Pecuarias
<b>f. responsable:</b> Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz

  
D.B.R.A.I.  
Ing. Cristhian Castillo



1075-DBRA-UTP-2022