

Trabajo completo

Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de aflatoxina y ocratoxina, utilizando matrices de excitación-emisión de fluorescencia y calibración multivariada

RECIBIDO: 24/07/2014

REVISIÓN: 06/08/2014

ACEPTADO: 06/10/2014

Semeniuk, M.¹ • Schenone, A.¹ • Sobrero M. S.² • Marsili, N. R.^{1,*}

¹Cátedra de Química Analítica II. ²Cátedra de Química General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo S/N. S3000ZAA, CC 242, Santa Fe, Argentina.

*Nilda Raquel Marsili

Teléfono: 54-342-4559947 / 54-342-156108952.

E-mail: nmarsili@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Se desarrolló un nuevo método para la cuantificación de aflatoxina y ocratoxina que utiliza como datos matrices de excitación-emisión de fluorescencia y para el análisis de los mismos calibración multivariada. Debido a que la relación señal analítica-concentración no es lineal, se decidió trabajar con el método MCR-ALS, el cual es capaz de separar la señal de cada analito en cada muestra. Los resultados obtenidos al predecir muestras artificiales son muy satisfactorios, con porcentajes de recuperación de 94 a 103 % para aflatoxina y de 98 a 104 % para ocratoxina. Además los límites de detección obtenidos son bajos (3,9 y 4,2 μgL^{-1} para aflatoxina y ocratoxina respectivamente) comparables con los valores máximos aceptados por los organismos internacionales de control de alimentos. Este nuevo método no requiere reactivos, solo una mezcla de metanol:agua (75:25) como solvente, es rápido,

sencillo y de muy bajo costo.

PALABRAS CLAVE: micotoxinas, matrices de excitación-emisión de fluorescencia, MCR-ALS.

SUMMARY: *Analytical method development for the quantification of aflatoxin and ochratoxin, using excitation-emission fluorescence matrices and multivariate calibration.*

A new method for the quantification of aflatoxin and ochratoxin was developed, which uses excitation-emission fluorescence matrices as data and multivariate calibration. Because the relationship between the analytical signal and the concentration is not linear, we decided to work with the MCR-ALS method, since this method is able to separate the signal of each analyte in each sample. The prediction results for the artificial samples are very satisfactory, with recoveries from 94 to 103% for aflatoxin, and from 98 to 104 % for ochratoxin. Furthermore, the

obtained detection limits are low (3.9 and 4.2 mgL⁻¹ for aflatoxin and ochratoxin, respectively) comparable to the maximum values accepted by international food control agencies. The new method does not require reagents, only a mixture

of methanol:water (75:25) as solvent, it's fast, simple and inexpensive.

KEYWORDS: mycotoxins, excitation–emission fluorescence matrices, MCR–ALS.

1. Introducción

Los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* producen una serie de compuestos tóxicos durante su metabolismo secundario. Estos metabolitos se conocen como micotoxinas y su presencia en los alimentos produce daños a la salud humana (1, 2). Las micotoxinas se encuentran frecuentemente en productos como maíz, arroz y otros cereales, maní, vino, leche, entre otros (3, 4, 5), que pueden contaminarse tanto en el campo y antes de la cosecha, como durante el almacenaje previo al procesamiento del material.

Las aflatoxinas (entre ellas: aflatoxina B₁ y B₂, G₁ y G₂) tienen propiedades oncogénicas debido a su capacidad de unirse al ADN (1). También se las asocia al incremento en la mortalidad de animales de granja (2,3). La ingestión involuntaria de aflatoxina puede llegar a provocar la muerte en caso de intoxicación aguda, o resultar cancerígena en caso de ingesta crónica (2). Las ocratoxinas (entre ellas: ocratoxina A, B

y C), además de ser nefrotóxicas, muestran un comportamiento hepatotóxico, inmunosupresor, teratogénico y carcinogénico (1).

Las micotoxinas son compuestos muy estables que no se descomponen con irradiaciones de luz UV, ni el calor. Además, son inodoras, incoloras e insípidas, lo que facilita su consumo involuntario. Incluso, persisten en alimentos procesados ya que resisten severos procesos industriales (6).

Organizaciones como la FAO (*Food Agricultural Organization*), la Comisión del Codex Alimentarius, la FDA (*Food and Drug Administration*) y la UE (Unión Europea), han dictado reglamentaciones nacionales e internacionales que establecen los niveles máximos de tolerancia para las micotoxinas presentes en alimentos y materias primas (7, 8).

En la Tabla 1 se muestran algunos valores máximos aceptables establecidos en el *Reglamento (EU) N° 165/2010 para algunos alimentos*.

Tabla 1. Valores máximos tolerables para aflatoxina y ocratoxina establecidos en el *Reglamento (EU) N° 165/2010, del 26 de febrero de 2010.*

Ocratoxinas	($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Cereales y productos a base de cereales	5
Leche cruda	5
Productos lácteos	0,05
Pasas de uva	10
Vino	2
Alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0,5
Maní, nueces, almendras	4
Maíz y arroz	10

Aflatoxinas	
Leche cruda	0,05
Leche en polvo	5
Pasas de uva	4
Maíz	5
Harina de soja	30
Maní sin procesar	20
Maní terminado, nueces, almendras	4
Raciones para ganado lechero	30

Los principales cultivos agrícolas de América Latina (maíz, trigo, café, algodón, soja, cebada, girasol, maníes y nueces de árbol, cacao) y lácteos son muy susceptibles a la contaminación, lo que produce cuantiosas pérdidas económicas al momento de exportar la producción. Los países integrantes del Mercosur tienen reglamentos armonizados para las concentraciones aceptables de micotoxinas (9,10).

Dentro de los métodos de cuantificación publicados hasta el momento, se pueden mencionar métodos separativos como: cromatografía en capa delgada (TLC) (11), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (12, 13), cromatografía líquida ultra resolución acoplada a espectrómetros de masa en tándem (UPLC-MS/MS) (14, 15, 16) y cro-

matografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tándem (LC-MS/MS) (17). Estos métodos se caracterizan por requerir prolongados tiempos de procesamiento, equipos de elevado costo y personal capacitado. También se utilizan técnicas de inmunofluorescencia y métodos espectrofotométricos o luminiscentes (18,19). Uno de los métodos más utilizados actualmente es el ensayo inmunoenzimático (ELISA), considerada una técnica de cuantificación rápida, simple y sensible. Sin embargo, presenta las desventajas de su elevado costo y de no resolver el denominado efecto matriz (20, 21).

Actualmente, se utilizan métodos quimiométricos para la cuantificación simultánea de analitos que combinan datos obtenidos mediante técnicas analíticas y métodos

estadísticos de cálculo. Dentro de los métodos que utilizan datos de segundo orden, como matrices de fluorescencia de excitación-emisión (EEM), se encuentran PARAFAC (Análisis Paralelo de Factores) (22) y MCR-ALS (Resolución Multivariada de Curvas – Cuadrados Mínimos Alternantes) (23, 24). Estos métodos permiten el análisis simultáneo de varios analitos, sin recurrir a técnicas analíticas separativas y, asimismo, pueden discriminar la presencia de compuestos desconocidos presentes en la matriz de la muestra, lo que se conoce como “ventaja de segundo orden”.

El método MCR-ALS opera extrayendo los perfiles espectrales de cada analito presente en la mezcla y calcula el área bajo cada perfil de concentración. Con estos valores y las concentraciones del juego de calibración se construye una curva de calibrado de la misma manera que para calibración univariada. Este algoritmo es una poderosa herramienta capaz de resolver los espectros de diferentes compuestos presentes en muestras complejas, a pesar de desconocer los demás componentes de la matriz.

En el presente trabajo se describe un nuevo método, sencillo, rápido y de bajo costo para la cuantificación de aflatoxina y ocratoxina, utilizando matrices de excitación-emisión de fluorescencia y MCR-ALS. Además, la técnica desarrollada no utiliza reactivos contaminantes, por lo que puede considerarse amigable con el medio ambiente.

2. Teoría

El algoritmo MCR-ALS se ha convertido en una herramienta quimiométrica ampliamente utilizada para la resolución de múltiples componentes en muestras desconocidas debido a la variedad de tipo de datos

que se pueden analizar; esencialmente, cualquier sistema con multicomponentes que den como resultado tablas o matrices de datos (datos de segundo orden) que puedan describirse por un modelo bilineal (26). MCR-ALS tiene la capacidad de analizar múltiples matrices de datos simultáneamente y permite la aplicación flexible y diversa de restricciones que ayudan a la resolución, mejorando los resultados (26). Generalmente, las matrices se apilan en filas o columnas, generando una matriz aumentada \mathbf{D} . La descomposición bilinear de la matriz aumentada \mathbf{D} se lleva a cabo según la expresión:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \times \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

donde las filas de \mathbf{D} contienen los espectros de excitación medidos a distintas longitudes de emisión, las columnas de \mathbf{C} contienen los perfiles de concentración (en nuestro caso los espectros de excitación) de los componentes involucrados en el proceso, las columnas de \mathbf{S} los perfiles espectrales (espectros de emisión), y \mathbf{E} es la matriz de los residuos no ajustados por el modelo. Las dimensiones apropiadas de \mathbf{D} , \mathbf{C} , \mathbf{S} y \mathbf{E} son $K \times (1+I) \times J$, $K \times (1+I) \times N$, $J \times N$ y $K \times (1+I) \times J$, respectivamente (I es el número de muestras de calibración, J es el número de longitudes de emisión, N es el número de componentes que dan respuesta, K el número de longitudes de onda de excitación y se asume una sola muestra incógnita). La descomposición de \mathbf{D} se logra a través de la minimización por cuadrados mínimos alternantes (ALS) de la norma de \mathbf{E} .

Entre las restricciones más aplicadas se encuentran (26, 27, 28): no negatividad, unimodalidad, rango local/selectividad, trilinealidad, entre otras.

Es importante mencionar que MCR-ALS requiere ser inicializado con parámetros del sistema lo más cercanos posible al resultado final. Se pueden proveer, por ejemplo, espectros de las especies obtenidos a partir de sus estándares puros o del análisis de los llamados espectros “más puros” a través de la metodología SIMPLISMA (del inglés, *simple Interactiveself-modelling mixture analysis*), un algoritmo de resolución multivariada de curvas que extrae los espectros puros de los componentes a partir de una mezcla de espectros de composición variada (25).

Luego de la descomposición de **D**, la información contenida en **C** puede ser utilizada para realizar predicciones cuantitativas. Esto se realiza construyendo un gráfico de calibración univariada con las concentraciones relativas de las muestras de calibración contenidas en la matriz optimizada **C**. Dado un componente de interés particular, se seleccionan los elementos de **C** correspondientes a las *l* mezclas de calibración desde $C_{1,l}$ hasta $C_{lK,l}$. En nuestro caso, cada serie de valores *K* corresponde al perfil de excitación para una muestra en particular. Si el área bajo el perfil es proporcional a la concentración del componente, se construye un modelo según:

$$\left\{ \sum_{k=1}^K C_{kn} \mid \sum_{k=1}^K C_{(k+K)n} \mid \dots \mid \sum_{k=1}^K C_{[k+K(L-1)]n} \right\} = k_{MCR} \mathbf{y} \quad (2)$$

donde la sumatoria de cada grupo de *K* elementos de **C** corresponden a un componente en particular, en una muestra de calibración dada, e **y** es el vector de las concentraciones de calibración.

Mediante la interpolación de los valores provistos por la muestra desconocida

puede obtenerse la concentración del analito de interés.

3. Materiales y métodos

Reactivos y soluciones: soluciones estándar de aflatoxina y ocratoxina A de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania). Se utilizaron los solventes metanol grado HPLC (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina) y etanol (Cicarelli, Santa Fe, Argentina). Todos los experimentos se realizaron con agua MilliQ (sistema purificador Millipore, Bedford, MA, USA).

Equipo: se empleó un espectrómetro Perkin-Elmer LS-55 y cubetas de cuarzo de caras planas de 700 μL de capacidad.

Las matrices de excitación-emisión de fluorescencia se registraron variando las longitudes de onda de excitación entre 250 y 400 nm cada 5 nm, y recogiendo los espectros de emisión entre 400 y 500 nm cada 0,5nm. Por lo tanto, el tamaño de cada matriz es de 201 \times 30. La velocidad de barrido fue 200 nm min^{-1} , las aberturas de ambos monocromadores se fijaron en 15 nm y voltaje del detector en 775 V.

Software: MCR-ALS se implementó a través de la interfaz gráfica provista por R. Tauler en su página <http://www.ub.edu/mcr/welcome.html> y se ejecutó utilizando MATLAB 7.0 (MATLAB 7.0, 2005). Además, se emplearon Origin Pro 8 (Originlab Corporation, USA) y SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc, USA).

3.1. Método fluorimétrico

Muestras de calibración: se prepararon 8 muestras de calibración para aflatoxina en un rango de concentración de 0 a 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por otro lado, se hicieron 10 muestras de calibración para ocratoxina en un rango de concentración de 0 a 70,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todas

las soluciones se prepararon por duplicado, agregando cantidad necesaria de solución patrón de la micotoxina correspondiente y llevando a volumen final con una mezcla de metanol:agua (75:25).

Muestras de validación: se prepararon 3 muestras de validación, por duplicado, conteniendo distintas cantidades de ambas micotoxinas y llevando a volumen final con una mezcla de metanol:agua (75:25).

4. Resultados y discusión

Aflatoxina y ocratoxina son solubles en metanol:agua (75:25) y fluorescen cuando son excitadas con energía radiante, sin necesidad de ser derivatizadas. Bajo estas condiciones, se estudiaron las longitudes de onda donde ambos analitos presentan picos de fluorescencia. En las Figs. 1A y 1B se muestran los gráficos las matrices de excitación-emisión de fluorescencia de una solución patrón de aflatoxina de $42,0\mu\text{g L}^{-1}$ y otra

de ocratoxina de $53,0\mu\text{g L}^{-1}$ en metanol:agua, respectivamente, en un rango de longitudes de onda de excitación de 330 a 390 nm y de 400 a 475 nm para emisión.

A partir del análisis de los gráficos, se extrajeron las longitudes de onda de excitación y de emisión donde cada analito presenta un pico de fluorescencia, siendo éstas de 380/442nm y 343/450nm para aflatoxina y ocratoxina, respectivamente.

Se decidió trabajar en el rango de longitudes de onda de 330 a 390 nm para excitación y de 400 a 475 nm para emisión ya que a estas longitudes de onda se encuentra la mayor información analítica. De esta manera las matrices de datos quedaron con una dimensión de 150×13 .

Esta restricción se realizó con la intención de lograr que el método de calibración multivariado MCR-ALS diferenciara con mayor eficacia la señal de los analitos presentes en las matrices de validación.

Figura 1A. Matriz de excitación-emisión de una solución de aflatoxina pura de $42,0\mu\text{g L}^{-1}$ en metanol:agua, en un rango de longitudes de onda de excitación de 330 a 390 nm y de 400 a 475 nm para emisión.

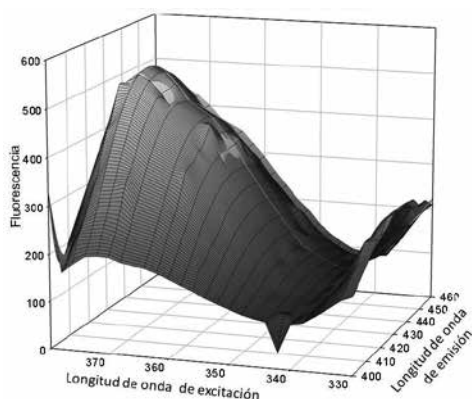
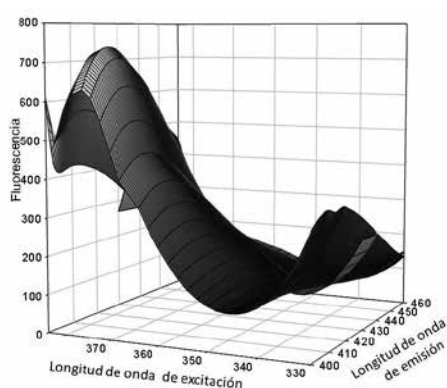


Figura 1B. Matriz de excitación-emisión de una solución de ocratoxina pura de $53,0\mu\text{g L}^{-1}$ en metanol:agua, en un rango de longitudes de onda de excitación de 330 a 390 nm y de 400 a 475 nm para emisión.



Además, se analizaron los espectros de emisión y de excitación de ambos analitos y se determinó que la mayor diferencia entre ellos se presenta en los espectros de emisión. Por este motivo, se utilizaron los espectros de emisión para la identificación de cada analito, y los espectros de excitación para la cuantificación de los mismos. En la Figura 2 A y B se observan los espectros de excitación y de emisión de ambos analitos, en el rango de longitudes de onda de trabajo.

4.1. Estudio de la linealidad

Aflatoxina: para el estudio de la relación entre señal analítica y concentración, se construyó una curva de calibrado, graficando las áreas bajo los perfiles de concentración (espectros de excitación), obtenidas al aplicar MCR-ALS, *versus* concentración (ver Fig. 3). Para ello, se generó una matriz

aumentada apilando en columnas las matrices transpuestas correspondientes a las muestras de calibración de aflatoxina, ordenadas de menor a mayor concentración. Antes de comenzar la resolución por MCR-ALS, la determinación del número de componentes se llevó a cabo mediante la descomposición en valores singulares (SVD) (resultando igual a uno debido a la contribución del analito solamente), mientras que las estimaciones iniciales se crearon a través de SIMPLISMA (25). En el presente estudio, se aplicaron las restricciones de no negatividad de los perfiles de concentraciones y espectrales, y unimodalidad sólo en los perfiles de concentración.

A simple vista, la relación no es lineal, por lo que se estudiaron dos tipos de ajustes: sigmoideo y lineal. En la Tabla 2 se muestran los parámetros obtenidos para cada tipo ajuste.

Figura 2. 2A. Espectros de excitación de fluorescencia en un rango de longitudes de onda de 330 a 390 nm, y **2B.** Espectros de emisión de fluorescencia en un rango de longitudes de onda de 400 a 475 nm. Aflatoxina (línea de puntos) y ocratoxina (línea llena).

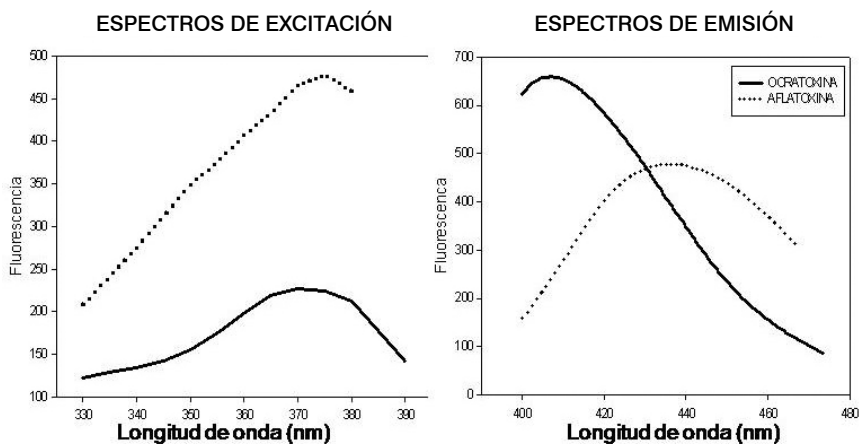
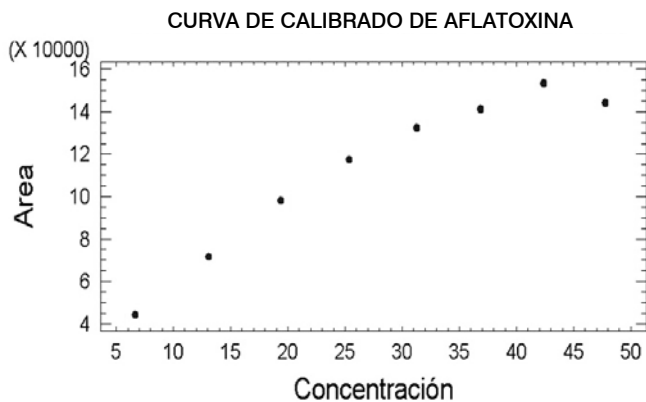


Figura 3. Curva de calibrado de aflatoxina, en un rango de concentraciones entre 7,0 y 49,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.**Tabla 2.** Ecuaciones, parámetros estadísticos y rango de trabajo, obtenidos para los modelos sigmoideo y lineal para la curva de calibrado de aflatoxina.

Ajuste	Sigmoideo	Lineal
Ecuaciones	$y = \frac{A_2 + (A_1 - A_2)}{(1 + \exp ((x-x_0)/dx))}$	$y = a + b x$
R^2	0,99728	0,98329
Error estándar de la estimación	2019,05	3222,49
Rango de concentraciones de trabajo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7,0 a 49,0	13,0 a 42,0
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,9	8,7
Límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	11,8	26,3

Ocratoxina: de la misma manera que para aflatoxina, se procedió a estudiar la relación entre señal analítica (área obtenida por MCR-ALS) y concentración de ocratoxina (ver Fig. 4). La aplicación del algoritmo fue de la misma manera que el caso anterior, siendo el número de componentes igual a uno.

Esta relación tampoco es lineal, por lo que nuevamente se realizaron dos tipos de ajustes: sigmoideo y lineal. En la Tabla 3 se muestran los parámetros obtenidos para cada tipo ajuste.

Figura 4. Curva de calibrado de ocratoxina, en un rango de concentraciones entre 12,0 y 64,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

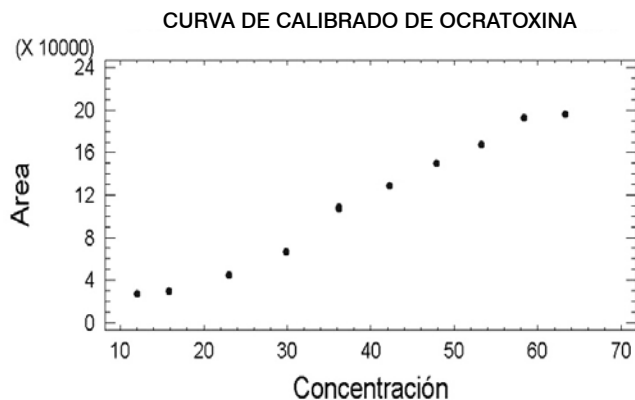


Tabla 3. Ecuaciones, parámetros estadísticos y rango de trabajo, obtenidos para los modelos sigmoideo y lineal, para la curva de calibrado de ocratoxina.

Ajuste	Sigmoideo	Lineal
Ecuaciones	$y = \frac{A_2 + (A_1 - A_2)}{(1 + \exp((x - x_0)/dx))}$	$y = a + b x$
R ²	0,9993	0,9948
Error estándar de la estimación	7730,296	2683,24
Rango de concentraciones de trabajo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12,0 a 64,0	32,0 a 58,0
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4,2	9,0
Límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12,7	27,1

Predicciones de las mezclas de validación: como se mencionó, con las matrices de 150×13 del juego de calibración de aflatoxina, ordenadas en orden creciente de concentraciones, más las matrices del juego de validación, se construyó una hipermatriz **D**. Del mismo modo se procedió con las matrices de calibración de ocratoxina.

El número óptimo de componentes se calculó utilizando SVD, que sugirió la existencia de dos factores significativos, lo que

coincide con la cantidad de componentes en las mezclas de validación. Para el cálculo de las estimaciones iniciales se aplicó el método SIMPLISMA (25). Las restricciones aplicadas fueron no negatividad en los perfiles de concentración (espectros de excitación) y en los espectros de emisión, y unimodalidad de los perfiles de concentración.

Luego de treinta y siete ciclos iterativos se alcanzó el criterio de convergencia seleccionado (cambio relativo en el ajuste para itera-

ciones sucesivas = 0,1 %). El valor de la falta de ajuste fue de 5,78 y la variancia explicada 99,58 %. En la Fig. 5 se muestran los resultados obtenidos luego de aplicar MCR-ALS a la matriz aumentada que contiene las matrices de calibración de aflatoxina y las tres muestras de validación por duplicado. En la parte superior se observan los espectros de excitación cuyas áreas fueron utilizadas para

realizar las predicciones. En la parte inferior se observan los espectros de emisión normalizados de ambas micotoxinas.

En la Tabla 4 se detallan las concentraciones de aflatoxina predichas para las tres muestras de validación y sus correspondientes porcentajes de recuperación al aplicar los diferentes ajustes mencionados anteriormente.

Figura 5. Gráfico superior: perfiles de concentración obtenidos al aplicar MCR-ALS a la matriz aumentada que contiene las matrices de calibración de aflatoxina (eje x: 0 a 1200) y las matrices de las tres muestras de validación por duplicado (eje x: 1200 a 1800). Gráfico inferior: perfiles de emisión normalizados de ambas micotoxinas. La línea de puntos corresponde a la ocratoxina y la línea discontinua a la aflatoxina.

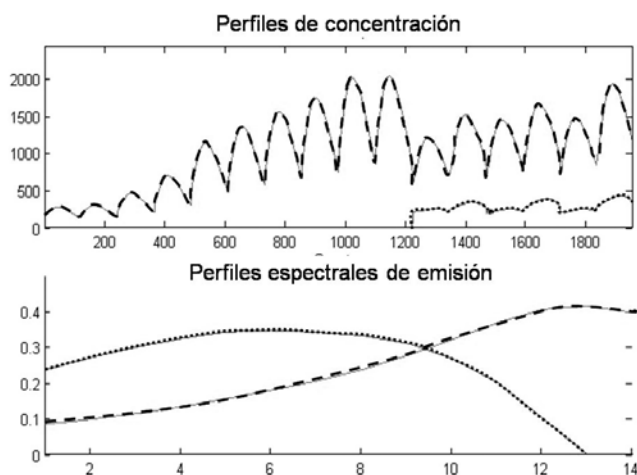


Tabla 4. Concentraciones de aflatoxina predichas para las tres muestras de validación al aplicar los dos modelos de ajustes y sus correspondientes porcentajes de recuperación

Muestras		Ajuste Sigmoideo		Ajuste Lineal	
Concentración Nominal		Concentración Predicha*		Concentración Predicha*	
(μgL^{-1})		(μgL^{-1})		(μgL^{-1})	
		% Recup.*		% Recup.*	
1	24,0	23,9 ± 0,3	99,6 ± 1,1	25,1 ± 0,2	104,7 ± 0,6
2	28,0	28,8 ± 0,5	103,0 ± 1,7	29,5 ± 0,6	105,0 ± 1,7
3	32,0	30,0 ± 0,6	94,0 ± 1,7	32,9 ± 0,9	102,6 ± 2,6

* promedio de tres valores, con su correspondiente desviación estándar.

Posteriormente, se aplicó un test estadístico de comparación de múltiples muestras (ANOVA) mediante el cual se analizaron los resultados obtenidos para cada tipo de ajuste, tomando como valor de referencia la concentración nominal. Se obtuvieron los siguientes resultados: $F=0,38$ y $p= 0,7689$. Dado que el valor de p es mayor de $0,05$, no existe diferencia estadísticamente significativa

entre las medias de los tres grupos de valores de concentración, con un nivel de confianza del 95 %.

Para predecir la concentración de ocratoxina en las muestras de validación se procedió de la misma manera que para aflatoxina; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones de ocratoxina predichas para las tres muestras de validación al aplicar los dos modelos de ajustes y sus correspondientes porcentajes de recuperación.

Muestras		Ajuste Sigmoideo		Ajuste Lineal	
Concentración Nominal		Concentración Predicha*		Concentración Predicha*	
(μgL^{-1})		(μgL^{-1})	% Recup.*	(μgL^{-1})	% Recup.*
1	40,0	41,8 \pm 1,6	104,4 \pm 4,3	42,5 \pm 1,2	106,3 \pm 3,2
2	46,0	47,5 \pm 3,5	103,3 \pm 7,5	48,4 \pm 2,0	104,6 \pm 4,1
3	52,0	52,2 \pm 2,6	98,3 \pm 16,2	51,2 \pm 3,1	98,3 \pm 11,1

* promedio de tres valores, con su correspondiente desviación estándar.

Nuevamente se aplicó un test estadístico de comparación de múltiples muestras. El análisis de la varianza en este caso arrojó valores de $F = 0,3631$ y $p = 0,9866$, los que indican que no existen diferencias entre los grupos de resultados, con un nivel de confianza del 95 %.

Las concentraciones de aflatoxina y ocratoxina en las muestras de validación obtenidas aplicando los dos modelos de ajustes arrojan resultados comparables, exactos y precisos. Pero para el ajuste sigmoideo las cifras de mérito son mejores, el rango de concentraciones de trabajo es mayor (7,0 – 49,0 frente a 13,0 – 42,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para aflatoxina y 12,0 – 64,0 frente a 32,0 – 58,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ocratoxina), el límite de detección es

mucho más bajo, siendo para aflatoxina 3,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ con ajuste sigmoideo y 8,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ con ajuste lineal y para ocratoxina 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 9,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, lo mismo ocurre con el límite de cuantificación, por lo que este ajuste es el más conveniente.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos para aflatoxina y ocratoxina en las muestras de validación, son exactos y precisos, independientemente del tipo de ajuste (sigmoideo o lineal) que se aplique. A pesar de esto, el ajuste sigmoideo que presenta límites de detección y cuantificación mucho menores, y el rango de concentraciones de trabajo es mayor tanto para aflatoxina como para

ocratoxina, por lo que este ajuste presenta mejores cifras de mérito, siendo el más conveniente al momento de predecir muestras incógnitas.

El límite de detección para aflatoxina es de $3,9 \mu\text{g L}^{-1}$ y $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para ocratoxina. Ambos son inferiores a los niveles de concentración tolerados por los organismos de control internacional que, según el Reglamento de la FDA y de la Unión Europea, se acepta de 30 a $50 \mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas totales en las raciones para ganado lechero y de $5 \mu\text{g/kg}$ en la leche, y para ocratoxina A de $5 \mu\text{g/kg}$ en cereales y productos a base de cereales.

Este nuevo método es muy sencillo y económico, y además las cifras de mérito y resultados obtenidos son óptimas. Este trabajo será continuado aplicando el método desarrollado a muestras reales como alimento para ganado lechero y leche.

Referencias bibliográficas

1. Bezerra da Rocha, M.; da Chagas Oliveira, F.; Maia F.; Guedes, M.; Rondina, D., 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, **36**:159–165.
2. Zain, M., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, **15**:129–144.
3. Chelí, F.; Campagnoli, A.; Dell'Orto, V., 2013. Fungal populations and mycotoxins in silages: from occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, **183**:1–16.
4. Hernández-Martínez, R.; Navarro-Blasco, I., 2010. Aflatoxin levels and exposure assessment of Spanish infant cereals. *Food Additives and Contaminants*, **3**, 4:275–288.
5. Binder, Eva M., 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, **133**:149–166.
6. Marin, S.; Ramos, A.; Cano-Sancho, G.; Sanchez, V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, **60**:218–237.
7. Food Agricultural Organization (FAO), 2003. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudio FAO Alimentación y nutrición. Vol **81**. <http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s00.htm>
8. Unión Europea, 2010. Reglamento (UE) N o 212/2010 de la Comisión del 12 de marzo de 2010 que modifica el Reglamento (CE) N o 669/2009, por el que se aplica el Reglamento (CE) N o 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Pág. 15. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/;ELX_SESSIONID=Q6hTJnBZLBfyMnbxQ9SF7yVz92jJS4Fqr8TJLDjtZ24Lrv4mLXWn!2135095376?uri=CELEX:32010R0165
9. Otsuki, T.; Wilson, J.; Sewadeh, M., 2001. What Price Precaution? European Harmonization of Aflatoxin Regulations and African Food Exports. *European Review of Agricultural Economics*, **28** (3).
10. ANMAT, 2014. Capítulo III. De los productos alimenticios. Condiciones generales. Artículo 155. Artículo 156 bis (Res. 612, 10.05.88). www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_III.pdf
11. Leming, L.; Zhang, J.; Wang, P.; Wang, P.; Chen, J., 1998. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography*, **A**, 815:3–20.
12. Skarkova, J.; Ostry, V.; Malir, F.; Roubal, T., 2013. Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, **46**, 10:1495–1504.
13. Amelin, V.; Karaseva, N.; Tret'yakov, A., 2013. Chromatographic methods for the determination of mycotoxins in food products. *Journal of Analytical Chemistry*, **68**, 3:195–205.
14. Arroyo-Manzanares, N.; Huertas-Pérez, J.; García-Campaña, A.; Gámiz-Gracia, A., 2014. Simple methodology for the determination of

- mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. *Food Control*, **36**:94–101.
- 15.** Duarte da Costa Cunha Bandeira, R.; Uekane, T.; Passos, C.; Rodrigues, J. M.; Campino de la Cruz, M.; de Oliveira, R.; de Lima F., 2013. A. Comparison of high performance liquid chromatography with fluorescence detector and with tandem mass spectrometry methods for detection and quantification of ochratoxin A in green and roasted coffee beans. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56**, 6:911–920.
- 16.** Meng, H.; Wang, Z.; De Saeger, S.; Wang, Y.; Wen, K.; Zhang, S.; Shen J., 2014. Determination of ochratoxin A in cereals and feeds by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with immunoaffinity column clean-up. *Food Analytical Methods*, **7**, 4:854–864.
- 17.** Liao, C. D.; Lin, H.; Chiueh, L.; Shih, D., 2011. Simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in cereals by LC-MS/MS. *Journal of Food and Drug Analysis*, **19**, 3:259–268.
- 18.** Chan, D.; MacDonald, S.; Boughtflower, V.; Brereton, P., 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immune affinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, **A**, **1059**:13–16.
- 19.** Oswald, S., Karsunke, X., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Knopp, D., 2013. Automated regenerable microarray-based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, **405**, 20:6405–6415.
- 20.** Zheng, M. Z.; Richard, J. L.; Binder, J., 2006. Review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, **161**:261–273.
- 21.** bHyang Sook, C.; EunHye, C.; Hyun-Joo, C.; Sung-Wook, C.; Sergey A. E., 2009. A fluorescence polarization immunoassay for the detection of zearalenone in corn. *Analytica Chimica Acta*, **639**:83–89.
- 22.** Bro, Rasmus, 2006. Review on Multiway Analysis in Chemistry 2000–2005. *Analytical Chemistry*, **36**:279–293.
- 23.** De Juan, A.; Tauler, R., 2001. Comparison of three-way resolution methods for non-trilinear chemical data sets. *Journal of chemometrics*, **15**:749–772.
- 24.** Tauler, R., 1995. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chem. Intell. Lab. Syst.*, **30**:133–146.
- 25.** Windig, W.; Guilment, J., 1991. Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal. Chem.* **63**:1425–1432.
- 26.** Jaumot, J.; Gargallo, R.; de Juan, A.; Tauler, R., 2005. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **76**:101–110.
- 27.** Muñoz, G.; De Juan A., 2007. pH- and time-dependent hemoglobin transitions: A case study for process modelling. *Anal. Chim. Acta*, **595**:198–208.
- 28.** De Juan, A.; Tauler, R., 2003. Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Anal. Chim. Acta*, **500**:195–210.