

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

BIOQUÍMICA



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE
AFLATOXINAS EN YERBA MATE COMERCIAL
(*Ilex paraguariensis*) POR CROMATOGRFÍA
LIQUIDA DE ULTRA EFICACIA ACOPLADA A UN
ESPECTRÓMETRO DE MASAS EN TÁNDEM
(UPLC-MS/MS)**

POR

ALCI SALVADORA MEDINA BENITEZ

**San Lorenzo – Paraguay
Marzo 2020**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

BIOQUÍMICA



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE
AFLATOXINAS EN YERBA MATE COMERCIAL
(*Ilex paraguariensis*) POR CROMATOGRFÍA
LIQUIDA DE ULTRA EFICACIA ACOPLADA A UN
ESPECTRÓMETRO DE MASAS EN TÁNDEM
(UPLC-MS/MS)**

POR

ALCI SALVADORA MEDINA BENITEZ

**TUTOR/A
PROF.DRA. SILVIA
CABALLERO**

**CO-TUTOR/A
PROF.DR. NELSON
ALVARENGA**

**Trabajo de grado presentado por Alci Salvadora
Medina Benítez para optar al título de Bioquímico/a**

**San Lorenzo – Paraguay
Marzo 2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

ACORDARSE DE IMPRIMIR ATRÁS DE LA PAGINA ANTERIOR



LA PROF. DRA. SILVIA CABALLERO, DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN, Y **EL PROF.DR. NELSON ALVARENGA**, DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

CERTIFICAN: Que el presente documento, titulado “**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS EN YERBA MATE COMERCIAL (*Ilex paraguariensis*) POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ULTRA EFICACIA ACOPLADA A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS EN TÁNDEM (UPLC-MS/MS)**”, constituye la Memoria del Trabajo de Grado que presenta la estudiante **ALCI SALVADORA MEDINA BENITEZ** para optar al Título Universitario de Bioquímica, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que el trabajo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firman el presente informe en San Lorenzo, a los ____días del mes de marzo de 2020.

PROF.DRA. SILVIA CABALLERO

PROF.DR. NELSON ALVARENGA



LA COORDINACIÓN DE TRABAJO DE GRADO DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

CERTIFICA: Que el presente documento, titulado “**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS EN YERBA MATE COMERCIAL (*Ilex paraguariensis*) POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ULTRA EFICACIA ACOPLADA A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS EN TÁNDEM (UPLC-MS/MS)**”), constituye la Memoria del Trabajo de Grado que presenta la estudiante **ALCI SALVADORA MEDINA BENITEZ** para aspirar al Título Universitario de Bioquímica bajo la dirección de los profesores Prof. Dra. Silvia Caballero y Prof. Dr. Nelson Alvarenga.

Considerando que el trabajo reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentado ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los días del mes de marzo de 2020.

Prof. Dra. Ma. Eugenia Flores Giubi

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Pablo y Eufemia, ejemplos de superación, de perseverancia, compromiso y responsabilidad. Por los valores que me enseñaron y por el continuo aliento para llegar a esta meta, gracias mamá, gracias papá.

A mis queridos hermanos Mirta y Isaac, todo por el apoyo incondicional y por haberme acompañado en todo momento. Sin ustedes no hubiera sido posible llegar hasta aquí, gracias.

A los profesores; Silvia Caballero y Nelson Alvarenga por aceptar ser mis tutores.

Una especial gratitud a la Prof. Dra. Silvia Caballero, por haber dirigido el presente trabajo de tesis, por las oportunidades brindadas, los conocimientos compartidos y la confianza depositada. Por haberme alentado e impulsado en todo momento, por tu tiempo y dedicación, por haberme ayudado a crecer.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica de Alimentos. Especialmente a la Prof. Dra. Laura Méreles y a la Bioq. Eva Coronel, por ayudarme a realizar algunas determinaciones y resolver inconvenientes que se presentaron durante el desarrollo del trabajo.

A las profesoras Ma. Eugenia Flores y a los profesores de trabajo de grado por acompañarnos durante todo este proceso.

A mi amiga y hermana del corazón, Josefina Candia, por estar siempre atenta y dispuesta a colaborar en todo.

Por último, pero no menos importante, agradezco al creador Todopoderoso y la Virgen Santísima porque guiaron todos mis pasos desde mi existencia, y quiénes a pesar de mis tropiezos, siempre estuvieron ahí acompañándome.

INDICE

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aflatoxinas.....	1
1.1.1 Antecedentes	1
1.1.2 Estructura Química y propiedades	2
1.1.3 Síntesis	3
1.1.4 Aflatoxinas en alimentos	4
1.1.5 Efectos tóxicos y Mecanismo de acción de las aflatoxinas	4
1.1.6 Condiciones para la producción de aflatoxinas	6
1.1.7 Reglamentación	7
1.1.8 Métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas.....	8
1.2 Yerba Mate.....	9
1.3. Validación.....	11
1.3.1 Parámetros de Validación	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo General	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Diseño	15
3.2 Métodos y técnicas.....	15
3.2.1 Validación del método cromatografico	16
3.2.2 Extracción de aflatoxinas	16
3.3 Manipulación de aflatoxinas	16
3.4 Ensayos preliminares	17
3.4.1 Preparación de los estándares de aflatoxinas.....	17
3.5 Condiciones cromatograficas para el análisis de aflatoxinas	17
3.6 Preparación de la muestra	18
3.7 Procesamiento y extracción de aflatoxinas	18

3.7.1 Muestras	18
3.7.2 Extracción de las aflatoxinas.....	19
3.7.3 Purificación de las muestras	19
3.8 Validación de la metodología	21
3.8.1 Selectividad/ Especificidad.....	21
3.8.2 Linealidad.....	21
3.8.3 Límite de detección y Límite de cuantificación	21
3.8.4 Repetibilidad	22
3.8.5 Reproducibilidad	22
3.8.6 Efecto matriz	22
3.9 Análisis de datos	22
3.10 Consideraciones Éticas.....	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Selectividad/Especificidad	24
4.2 Linealidad	26
4.3 Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)	26
4.4 Repetibilidad y Reproducibilidad	27
4.5 Efecto matriz	27
5. DISCUSIÓN	30
6. CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	37

“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS EN YERBA MATE COMERCIAL (*Ilex paraguariensis*) POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ULTRA EFICACIA ACOPLADA A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS EN TÁNDEM (UPLC-MS/MS)”

Alci Medina*; Silvia Caballero**; Nelson Alvarenga***

*Estudiante de la Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Bioquímica de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción.

***Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción.

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por varias especies de hongos del género *Aspergillus* que crecen en plantas y alimentos de origen vegetal. De entre todas ellas (B1, B2, G1, G2, M1 y M2), destaca desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria la aflatoxina B1, tanto por ser la más prevalente en alimentos como la más tóxica para los seres humanos. El objetivo del trabajo fue validar un método para la detección y cuantificación de aflatoxina en yerba mate comercial, basada en la detección por cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un espectrómetro de masas en tándem, considerando parámetros de validación como selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación repetibilidad, reproducibilidad y efecto matriz, según las directrices de validación de análisis de contaminantes en alimentos. Se observaron resultados en yerba comercial con el método propuesto, como linealidad ($R \geq 0,98$), límites de detección (0.099-1.868 $\mu\text{g/L}$) y cuantificación (0.331-6.226 $\mu\text{g/L}$), repetibilidad y reproducibilidad ($\text{RSD} \leq 20\%$) y el efecto matriz (13-116 %). Este trabajo permite establecer una metodología analítica validada, rápida y sensible para perfilar trabajos futuros de investigación en el control de calidad de yerba mate comercial y que aportaran al aseguramiento de la calidad sanitaria de la yerba mate producida en el país.

Palabras claves: aflatoxinas, *Ilex paraguariensis*, validación, UPLC-MS/MS

“VALIDATION OF A METHOD OF ANALYSIS OF AFLATOXINS IN YERBA MATE COMERCIAL (ILEX PARAGUARIENSIS) BY LIQUID CHROMATOGRAPHY OF ULTRA EFFECTIVENESS COUPLED TO A SPECTROMETER OF MASS IN TANDEM (UPLC-MS / MS)”

Alci Medina *; Silvia Caballero **; Nelson Alvarenga ***

*Biochemistry student, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

** Department of Food Biochemistry, Research Directorate of the Faculty of Chemical Sciences, National University of Asunción

*** Department of Phytochemistry of the Faculty of Chemical Sciences of the National University of Asunción.

ABSTRACT

Aflatoxins are toxic metabolites produced by various species of fungi of the *Aspergillus* genus that grow in plants and plant-based foods. Among all of them (B1, B2, G1, G2, M1 and M2), aflatoxin B1 stands out from the point of view of food safety, both for being the most prevalent in food and the most toxic for humans. The objective of the work was to validate a method for the detection and quantification of aflatoxin in commercial yerba mate, based on the detection by ultra-effective liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer, considering validation parameters such as selectivity, linearity, limits of detection and quantification, repeatability and reproducibility, and the matrix effect, according to the validation guidelines for food contaminant analysis. Results were observed in commercial herb with the proposed method, such as linearity ($R \geq 0.98$), detection limits (0.099-1.868 $\mu\text{g} / \text{L}$) and quantification (0.331-6.226 $\mu\text{g} / \text{L}$), repeatability and reproducibility ($\text{RSD} \leq 20\%$) and the matrix effect (13-116%). This work allows us to establish a validated, fast and sensitive analytical methodology to profile future research projects in the quality control of commercial yerba mate and that will contribute to the health quality assurance of yerba mate produced in the country.

Keywords: aflatoxins, *Ilex paraguariensis*, validation, UPLC-MS / MS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aflatoxinas

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos que constituyen el contaminante natural más vasto a nivel mundial, con un gran impacto negativo tanto en la salud, en la seguridad alimentaria y en la economía de muchos países, particularmente en desarrollo (1).

Las aflatoxinas pertenecen al grupo de las micotoxinas, son metabolitos secundarios, producidos por varias especies del hongo del género *Aspergillus*, de las cuales las más comunes son las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, y se hallan en productos alimenticios, especias y plantas medicinales (2).

1.1.1 Antecedentes

Las investigaciones realizadas sobre aflatoxinas han sido producto de la inquietud que se presentó por una serie de brotes de enfermedades en aves de corral y peces en diversos lugares del mundo durante 1960. El caso de mayor relevancia fue el de pérdidas de pavos en Inglaterra como resultado de un agente etiológico entonces desconocido: así, el padecimiento se denominó como "la enfermedad X del pavo". Esta se caracterizó por necrosis hepática aguda con hiperplasia en los conductos biliares. La sintomatología en su estado agudo se manifestó con pérdida del apetito, letargo y debilidad, en su estado avanzado la muerte era inevitable (2).

En el mes de septiembre de 1960, dos investigadores: Ayerst y Austwick, analizando el alimento consumido por los animales hallaron la presencia de micelio fúngal. Este hallazgo motivó su aislamiento siendo identificado como *Aspergillus flavus*, en harina de maní importada de Sudamérica (FAO, 2011), tomando así el nombre de aflatoxinas (A: referente al género *Aspergillus* y AFLA: referente a la especie *flavus*), simultáneamente en California se observó una aparición masiva de hepatomas en las truchas arcoíris de varias piscifactorías comerciales que habían consumido pienso con semillas de algodón contaminado por aflatoxinas. En esa misma década existieron números informes de tumores

hepáticos en animales de crianza en Europa y América, por esta razón son las micotoxinas más conocidas e intensamente estudiadas en el mundo (2).

1.1.2 Estructura Química y propiedades

Las aflatoxinas pertenecen a la familia de las difurano- cumarinas, y se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química; la serie 1 difuro-cumaro-ciclo-pentanonas (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A y aflatoxicol) y la serie 2 difuro-cumaro-lactonas (AFG1, AFG2, AFG2A, AFGM1, AFGM2, AFGM2A y AFB3) (4). En la **Tabla 1.1** se resumen características de las principales aflatoxinas

Tabla 1.1: Características químicas de las aflatoxinas (4).

Tipo de Aflatoxina	Fórmula Estructural	Peso molecular (g/mol)	Punto de Fusión °C
Serie 1 Difuro-cumaro-ciclo pentanonas			
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299
M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293
Serie 2 Difuro-cumaro-lactonas			
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328	244-246
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	330	237-240

Sin embargo, las más importantes son B1, B2, G1 y G2, distinguidos por su color fluorescente bajo la luz ultravioleta con longitud de onda cercana a 360 nm (B: “blue”, azul y G: “green”, verde), los subíndices se refieren a su posición relativa en las placas cromatográficas. Son cristales sólidos de color que va del blanco al amarillo, sin sabor, sin olor, poco solubles en agua pudiendo ser extraídas con solventes orgánicos moderadamente polares (3). Cuando se encuentran en estado puros son termo resistentes alcanzando sus puntos de fusión temperaturas superiores a 250°C y se funden entre 190 y 310°C; y rangos de pH entre 3 y 10. Son fotosensibles y tienden a descomponerse cuando están en solución sobre todo acuosa o metanólica. Se descomponen bajo la acción de agentes oxidantes o álcalis fuertes e hipoclorito de sodio (2). En la **Figura 1.1.** se observan las estructuras de las principales aflatoxinas.

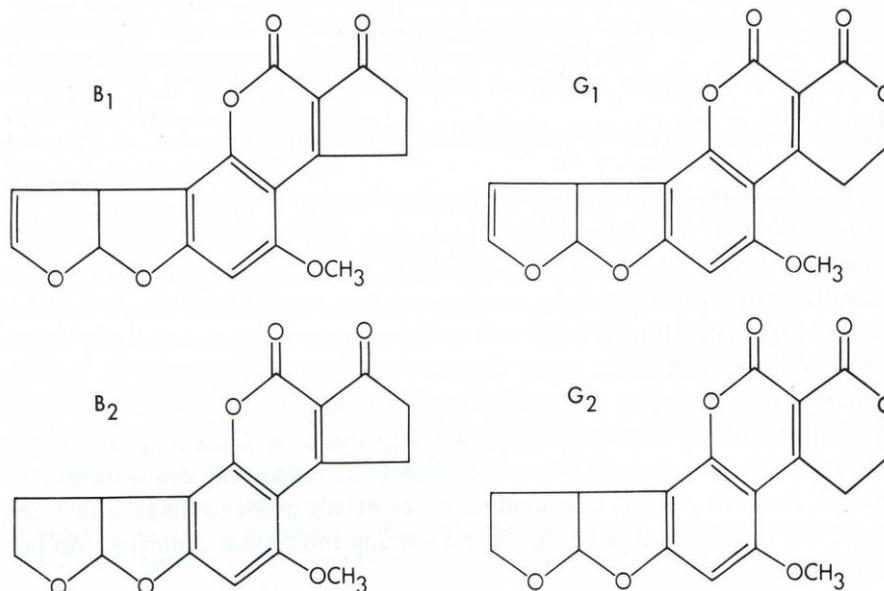


Fig.1.1 Estructuras moleculares de las principales aflatoxinas (3).

1.1.3 Síntesis

Las aflatoxinas son químicamente difuranocumarinas formadas por anillos heterocíclicos donde se relaciona a los furanos con la toxicidad y a la lactona con la fluorescencia de las partículas. En su biosíntesis están involucradas la condensación de un acetil con tres o más unidades de malonil con la pérdida de CO₂. Se relaciona la biosíntesis de aflatoxinas con la de los lípidos y se asume una disminución en la síntesis de proteínas en algunos casos (5).

Las aflatoxinas son sintetizadas extra mitocondrialmente a partir de la Acetil coenzima A, derivada del catabolismo de carbohidratos simples. Los intermediarios glicolíticos estimulan la producción de aflatoxinas asociadas a la caída de niveles de piruvato y fosfoenol piruvato, los cuales son precursores de tres carbonos del acetato y malonato. En la primera fase de la biosíntesis de estas micotoxinas, el acetato y la malonil CoA, son convertidos a hexanoilo mediante una sintetasa de ácido graso. Este hexanoilo, es extendido por una poliketido sintetasa hasta el decacétido ácido norsolorínico, NOR, primer precursor estable en la biosíntesis de las aflatoxinas (5).

1.1.4 Aflatoxinas en alimentos

Las aflatoxinas se han detectado como contaminantes naturales en un gran número de productos agrícolas, habiéndose confirmado su presencia en prácticamente todas las zonas del mundo y, en mayor o menor grado, en casi todos los alimentos de primera necesidad. Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación fúngica con la consiguiente producción de aflatoxinas incluyen típicamente al maíz, cacahuates, pistachos, nueces de Brasil, semillas de algodón y la pulpa seca de coco (copra). También se han encontrado aflatoxinas en semillas oleaginosas como el girasol y la soja, en aceites vegetales sin refinar, en otros frutos secos como las almendras, avellanas y nueces, en las especias como el pimentón, el chile, la pimienta, etc., en las frutas desecadas como los higos secos y las pasas, en el café y el cacao, en el resto de los cereales y sus productos derivados y en los piensos (6).

1.1.5 Efectos tóxicos y Mecanismo de acción de las aflatoxinas

Las aflatoxinas son genotóxicas y se las clasifican dentro de la categoría 1 en base a la existencia de suficientes evidencias acerca de su carácter carcinogénico para el hombre. Los efectos tóxicos dependen de las dosis, duración de la ingestión, edad, especie, sexo y del estado nutricional de la persona o animal (2).

La toxicidad aguda a causa de las aflatoxinas se produce cuando se ingieren grandes cantidades de aflatoxinas en el hígado da lugar a una infiltración de lípidos que dará lugar a necrosis celular hepática. Los metabolitos originados reaccionan con diferentes proteínas celulares lo cual origina la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la inhibición de la síntesis de carbohidratos y lípidos. Esto produce anorexia, depresión, ictericia, diarrea, fotosensibilidad y muerte y la toxicidad crónica se produce debido al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de aflatoxinas durante semanas y/ o meses. Los síntomas no son muy específicos: reducción en la ganancia de peso, menor índice de conversión, disminución en la producción de huevos y leche y mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades (2).

Las aflatoxinas ingeridas con los alimentos son absorbidas en la mucosa intestinal y pasan al torrente circulatorio, a través del cual llegan al hígado, riñones, canales biliares y sistema nervioso donde se acumulan. En los animales es evidente el daño al hígado y la disminución de la transformación de alimento en carne, huevo o leche (7). La AFB1 se considera la aflatoxina más importante, no solo porque aparece con más frecuencia y en más abundancia, sino también porque es la más tóxica. La AFB1, es absorbida en el intestino delgado y es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas hasta el hígado, mayoritariamente por la vía portal. La toxina entra en la célula y es metabolizada en el retículo endoplásmico para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos de aflatoxina. El rol de la Aflatoxina B1 en el cáncer humano requiere una activación para producir mutaciones, de manera que para que la acción tóxica de la aflatoxina ocurra es necesario que ésta tenga un cambio metabólico, el cual ocurre cuando la AFB1 llega al hígado de los seres que la ingieren. Dicho cambio ocurre en las células hepáticas, en la función microsomal citocromo P-450 y participa el O₂- y las enzimas dependientes del NADPH localizadas en el retículo endoplásmico de las células involucradas en la bioactivación de la aflatoxina B1 (8,9). El fenómeno de mutagenicidad puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable, en donde el producto final de la Fase I, el AFB1 exo- 8,9-epóxido (9.10), el cual al ser altamente inestable se une con mucha afinidad a la guanina, mediante la unión covalente con el nitrógeno N-7 con los residuos guanil del ADN (o ARN) para formar aductos que inducen depurinación y escisión de la hebra, siendo así responsables del efecto carcinogénico y mutagénico de las aflatoxinas en las células somáticas (11,12). Esta formación de ligandos o aductos persistentes se lleva a cabo en regiones ricas en guanina, y en el proceso de replicación del ADN, el complejo formado se intercala causando mutación, pues la guanina sufre transversión a timina, lo cual ocurre en el codón 249 del gen p53, implicado en el chequeo durante la síntesis y reparación del ADN, provocándose así su inactivación y función controladora del ciclo celular, facilitando de ésta forma la aparición de tumores (13,14). El aducto identificado como el 8,9 dihidro-8-(N7-guanil)-9- hidroxiaflatoxina B1 (AFB1- ADN), es el que más se forma tanto in vitro como in vivo. Este aducto, AFB1-N7-Guanidina no es removido del ADN, pero su anillo imidazol se abre y forma una molécula más estable química y biológicamente, la AFB1- formamidopirimidina (AFB1- FAPY), la cual causa

errores en las transcripciones subsecuentes del ADN (15.16). En la **figura 1.2** se observa el mecanismo de toxicidad de aflatoxina B1.

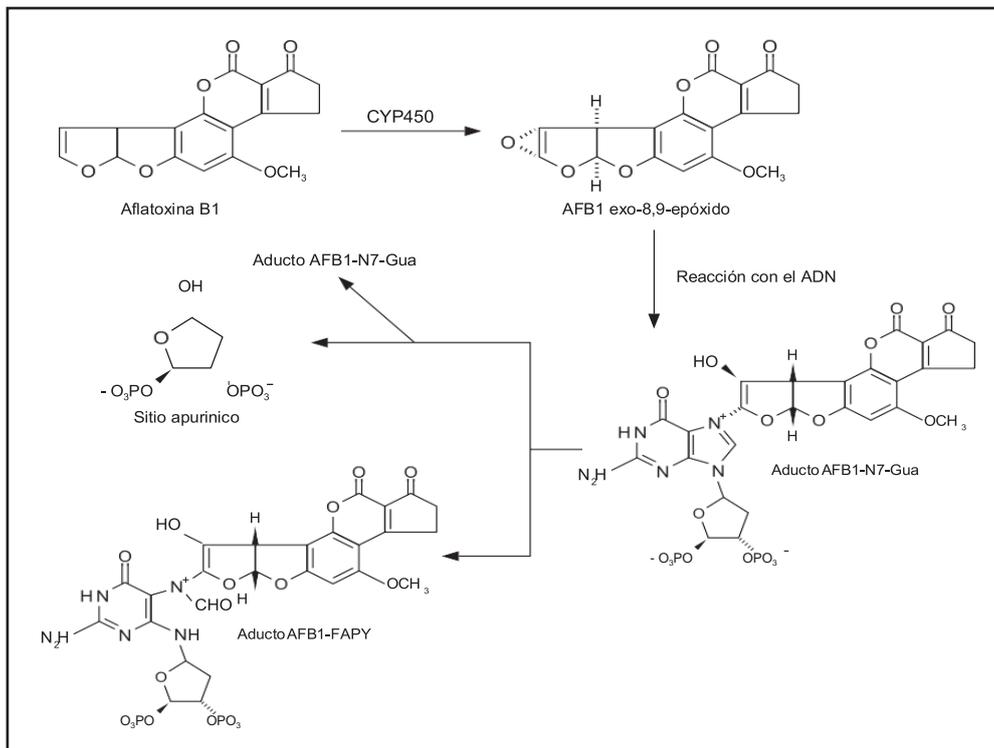


Figura 1.2 Activación y reacción de Aflatoxina B1 con el ADN (12).

1.1.6 Condiciones para la producción de aflatoxinas

La producción de aflatoxinas está condicionada por una serie de factores (17):

- a) el hongo productor;
- b) el sustrato;
- c) el contenido de humedad del ambiente y del sustrato;
- d) la temperatura;
- e) la microbiota asociada;
- f) el oxígeno en la atmósfera de almacenamiento;
- g) el período de almacenamiento.

La sola presencia del hongo no implica la presencia de aflatoxinas o que las mismas vayan a producirse. Bajo condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos, la producción de aflatoxinas puede ser alta a las 24 horas. El máximo se

alcanza a los 7 a 10 días y posteriormente el nivel de aflatoxinas fluctúa con el tiempo, pero bajo las condiciones en que normalmente se manejan los productos agrícolas, las mismas son muy estables, resistiendo las temperaturas de elaboración de los alimentos (18).

1.1.7 Reglamentación

Debido a la importancia de estas micotoxinas en salud pública se han hecho esfuerzos para controlar la contaminación de alimentos y la exposición en seres humanos, es por ello que el número de países que han reglamentado las aflatoxinas ha aumentado con los años. Los reglamentos para las aflatoxinas son con frecuencia detallados y específicos para los alimentos, para los productos lácteos y para las raciones animales.

Recientemente, el Codex Alimentarius ha establecido límites máximos para aflatoxinas totales (suma de aflatoxinas B1, B2, G1y G2) en frutos con cáscara (almendras, cacahuetes, avellanas, pistachos y nueces de Brasil) destinados a una transformación posterior, situándolos en 15 µg/kg con respecto a los 10 µg/kg permitidos para estos mismos productos listos para el consumo basándose en la información proporcionada por JECFA (Codex Alimentarius, 2008) (19).

En la Unión Europea, debido a la toxicidad de estos compuestos, y con el fin de garantizar una protección eficaz de la salud pública, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 (UE, 2006a) ha establecido contenidos máximos para, entre otros contaminantes, de 5 µg/kg la aflatoxina B1y de 10 µg/kg para la suma de aflatoxinas B1, B2, G1y G2 en distintos alimentos, incluyendo frutos de cáscara arbóreos, frutos secos, cereales, maíz y arroz, cacahuetes y semillas oleaginosas y los productos derivados y transformados de todos ellos, determinadas especias, alimentos elaborados a base de cereales transformados, alimentos para lactantes y niños de corta edad, preparados para lactantes y preparados de continuación y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes (20).

1.1.8 Métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas en alimentos

Los métodos analíticos clásicos y de mejor aproximación en la cuantificación de las aflatoxinas incluyen cromatografía en capa fina (TLC) ,método de cuantificación fiable (combinado con densitometría) posee exactitud y precisión comparable con HPLC, es un método oficial de referencia para las aflatoxinas, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una metodología de cuantificación fiable, sensible, selectivo y repetible, puede ser automatizado y Cromatografía líquida /Espectrometría de masas (MS) permite el análisis simultáneo de micotoxinas, posee un límite de detección bajo (LCMS/ MS), es considerado un método confirmatorio. No requiere derivatización. En los últimos años, la mayoría de estas técnicas han sido acopladas con técnicas de Inmunoafinidad para simplificar la extracción y mejorar la recuperación y medición de micotoxinas en productos alimenticios, así como incorporar la rapidez de obtención en resultados (21).

1.1.8.1 Cromatografía Líquida de ultra eficacia acoplada a un espectrómetro de masa en tándem

El UPLC, conserva el sentido práctico y principios del HPLC al mismo tiempo que aumenta los atributos generales de la velocidad, sensibilidad y resolución. La tecnología aprovecha al máximo los principios de cromatografía para ejecutar separaciones utilizando columnas de relleno con partículas más pequeñas y/o las tasas de flujo más altas para aumentar la velocidad, con resolución y sensibilidad superior. Gracias a la eficacia de separación mucho mayor del sistema cromatográfico en comparación con la HPLC convencional, el sistema UPLC es actualmente una solución óptima para la separación cromatográfica de mezclas multicomponentes (22). La espectrometría de masas en (MS por sus siglas en inglés, de *Mass Spectrometry*) es una técnica instrumental que permite extraer información acerca de la masa molecular y la estructura del compuesto analizado. Cada espectrómetro de masas consta de tres componentes básicos: una fuente de iones, un analizador donde los iones se separan de acuerdo con su relación masa/carga y un detector donde se cuentan los iones (23).

En LC-MS la muestra líquida inyectada en el cromatógrafo se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Las moléculas del analito luego de ser ionizadas son atraídas o repelidas por un apropiado campo eléctrico. Existen numerosas técnicas de ionización, entre ellas se encuentran la ionización por *electrospray* o electronebulización (ESI) donde se produce la ionización de los analitos a presión atmosférica que se basa en la introducción de la muestra a través de un capilar al que se le aplica un elevado potencial, lo que permite producir un spray de micro-gotas cargadas, los cuales debido a repulsiones electrostáticas se dividen hasta provocar la desolvatación y evaporación de iones. En ESI se puede producir protonación (en el modo de ión positivo) o desprotonación (en el modo de ión negativo) (24,25).

Consiste en el acoplamiento de una técnica de separación en donde la fase móvil actúa de portador de la muestra y los componentes de la solución emigran de acuerdo a interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna (fase estacionaria) y una técnica analítica que combina dos analizadores cuadrupolares en los que la moléculas de una muestra son ionizadas positivamente, separadas por su relación masa/carga (m/z) que atraviesa el primer cuadrupolo Q1 donde los iones pasan por un túnel formado por las cuatro barras o polos de sección cilíndrica alineadas paralelamente entre si sobre la cual es aplicado un voltaje y actúa como filtro, siguiendo trayectorias oscilante estables que conducen a la celda de colisión Q2 mientras que el resto de iones se desvía, variando el voltaje aplicado, donde se puede seleccionar los iones de diferentes masas que llegan a Q2, el ion se fragmentara al chocar contra las moléculas de gas inerte en función de su estructura química, la configuración hexapolar u octopolar de Q2 juega un papel importante para la obtención de una óptima transmisión de los "iones productos" generados hasta el segundo analizador cuadrupolar Q3 (26).

1.2 Yerba Mate

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es una planta que crece en forma silvestre principalmente en el norte de Misiones (Argentina) y en la región oriental del Paraguay (región central del MERCOSUR), a partir del cual se obtiene la

yerba elaborada, donde el consumo de yerba mate forma parte de la cultura popular, siendo consumida diariamente por la población adulta e infantil en la forma denominada “mate” o “tereré” (29).

La yerba mate posee varias propiedades fitoquímicas como nutricionales, actúa sobre varias zonas del organismo incrementando el equilibrio y el balance de sus elementos, es conocida por sus efectos sobre el nivel de pH del cuerpo humano, en el cual crea una base alcalina que, por su contribución de nutrientes, estimula el sistema nervioso y contribuye a la claridad mental (principal propiedad de la cafeína). Contiene potasio, el cual es esencial para el correcto funcionamiento del corazón, y magnesio, que ayuda a incorporar las proteínas y a formar un individuo sano, produce mejoría casi inmediata de la digestión y la reparación de células intestinales dañadas. También tiene efectos en el sistema circulatorio-cardiovascular en el cual actúa, especialmente, en momentos de stress o ejercicio físico incrementando la provisión de oxígeno al corazón (28).

Además, contiene polifenoles que inhiben el proceso de oxidación, anula el efecto dañino de los radicales libres, causantes principales del envejecimiento de las células del cuerpo. Finalmente, su contenido de xantinas (cafeína, teobromina) tiene un efecto estimulante directo sobre el sistema nervioso, lo que ayuda a un mayor esfuerzo mental como muscular y lo hace ideal para personas que realizan esfuerzo físico y mental. Las xantinas son alcaloides de los que deriva la cafeína (principal estimulante del café, el té y las bebidas gaseosas), son elementos muy parecidos en su estructura química, pero diferentes radicalmente en sus propiedades. Por años se aseguró la presencia de una importante cantidad de cafeína en la yerba mate, sin embargo, nuevos estudios certifican el bajo contenido respecto a otras infusiones (29,30).

Su procesamiento comprende seis etapas: 1) Zapicado; 2) Secado; 3) Molienda Gruesa o Canchado; 4) Estacionamiento; 5) Molienda y 6) Envasado. Las tres primeras etapas se llevan a cabo en establecimientos denominados “secaderos”, donde se realiza la eliminación de la humedad a través de calor seco (100°C), de una duración de 8 a 24 hs. y la quinta etapa en establecimientos industriales denominados “molinos”. El estacionamiento se realiza indistintamente en los secaderos o en los molinos, es allí donde el estacionamiento es una de las

etapas más importante en la cual la yerba mate adquiere su sabor, aroma y color característico (30).

Durante su almacenamiento la yerba mate es un sustrato favorable para la contaminación fúngica, donde la temperatura y la humedad favorecen para el desarrollo de los hongos (24). Hasta el presente se han realizados pocos estudios acerca de las micoflora presente en la Yerba Mate, donde se observó que la presencia de estos hongos se halla fuera de los límites permitidos, tanto en Argentina, Brasil y Paraguay (31,32).

La Norma Paraguaya NP 35001 93 (33), que actualmente está en revisión, contempla en su ítem 3.4 los requisitos de residuos tóxicos que debe cumplir la yerba mate elaborada, que no debe sobrepasar 1800 Unidades Formadoras de Colonias (UFC). En relación a los límites máximos de aflatoxinas $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) en yerba reglamentada: 2 para B1y 2,6 para B2, G1 y G2. Pero actualmente no existe un método de análisis validado para la determinación de aflatoxina en yerba mate comercial para su verificación.

1.3. Validación

La validación de un método analítico es un estudio experimental y documentado (34). El objetivo es demostrar que el método utilizado es el adecuado para la aplicación en que se propone utilizar, así también que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afecte el desempeño ni la confiabilidad de los resultados (35). Es un requisito de los organismos de acreditación, y debe ser respaldado y ampliado mediante la verificación del desempeño del método durante el análisis de rutina (control de calidad analítico y validación continua del método) (34).

1.3.1 Parámetros de Validación

1.3.1.1 Efecto Matriz: es un ensayo que tiene como objetivo determinar si la matriz analizada cuenta con posibles interferencias causadas por las diversas sustancias que la componen, generando fenómenos de disminución o ampliación de la señal instrumental o respuesta instrumental (34).

1.3.1.2 Selectividad: es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de otras sustancias (interferencias) que también se encuentran en la matriz analizada. En tanto que la especificidad se refiere a la capacidad de un método para evaluar inequívocamente al analito de interés en presencia de posibles impurezas, componentes de la matriz, entre otros (35).

1.3.1.3 Linealidad: es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la concentración del analito que se determinará en la muestra de laboratorio. El intervalo de trabajo está definido por la finalidad del método y deberá establecerse por el analista. La linealidad se determina mediante el coeficiente de correlación (r^2) del gráfico de los datos obtenidos en función a la concentración del analito (35).

1.3.1.4 Recuperación: de analito en un ensayo se entiende la respuesta del detector ante una adición o extracción de analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero. También puede entenderse como la proporción de metabolito presente inicialmente que llega hasta el final del procedimiento (35).

1.3.1.5 Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ): LOD es la cantidad o concentración mínima de una sustancia que puede distinguirse del ruido con un determinado grado de confianza. En tanto que, el límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de precisión y exactitud (35).

1.3.1.6 Exactitud: expresa el grado de concordancia del resultado de una medición experimental a un valor de referencia. La determinación de la exactitud se lleva a cabo mediante ensayos de recuperación utilizándose matrices fortificadas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta), o bien utilizando un valor de concentración en la zona de trabajo de la curva de calibrado (35).

1.3.1.7 Precisión: se expresa habitualmente en términos de repetibilidad y reproducibilidad. Mide el grado de concordancia entre los resultados analíticos

obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método empleado. Este parámetro refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza el método (34).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Validar un método de análisis de aflatoxinas en yerba mate comercial (*Ilex paraguariensis*) por Cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS/MS)

2.2 Objetivos específicos

- Establecer el método de extracción óptimo para la matriz yerba mate.
- Establecer las condiciones cromatográficas óptima para análisis de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 en la matriz yerba mate.
- Evaluar parámetros estadísticos de validación de métodos, como selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad y efecto matriz.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo, realizado entre los meses de octubre del 2019 a febrero del 2020, implicó la validación del método analítico para la determinación de aflatoxinas en yerba mate comercial (*Ilex paraguariensis*) utilizando la técnica de cromatografía líquida ultra eficacia acoplada a una espectrometría de masa en tándem (UPLC) MS/MS, cuyos ensayos fueron realizados en el Departamento de Bioquímica de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción.

Este trabajo se encuentra dentro del Proyecto 14-INV-046 financiado por CONACYT, donde uno de los aspectos u objetivos que enfoca el proyecto es la validación de un método analítico para la matriz yerba, considerado importante ya que actualmente no se tiene validado ningún método para esa matriz, además para el mismo será utilizada una tecnología de vanguardia como la UPLC (cromatografía líquida de ultra eficacia) de modo a obtener resultados con alta sensibilidad.

Por todo lo expuesto este trabajo será la base para realizar posteriormente las determinaciones en muestras reales, teniendo en cuenta que la presencia de hongos productores de aflatoxinas, además de ser un importante parámetro como control de calidad para las Normas Paraguayas para yerba mate, es considerado un problema serio de salud pública y muy importante para la calidad de la yerba mate.

3.1 Diseño

El diseño de estudio se planteó como un trabajo experimental analítico para la validación metodológica.

3.2 Métodos y técnicas

Para la aplicación del método se utilizaron estándares de concentración conocida de las diferentes aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), de existencia en el Laboratorio de Bioquímica de Alimentos, que se mantuvieron conservadas a -

20°C, para la determinación del efecto matriz se utilizaron muestras blanco de yerba comerciales de dos marcas y tres lotes diferentes.

3.2.1 Validación del método cromatografico

En la validación del método por UPLC fueron determinadas las siguientes características: selectividad, linealidad, límite de detención (LOD) y cuantificación (LOQ), repetibilidad y reproducibilidad según el Manual de Garantía de la Calidad Analítica para Residuos y Contaminantes en Alimentos, del Ministerio de Agricultura, Pecuaria y de Abastecimiento de Brasil (38), y para la evaluación del efecto matriz se basó en el método que fue desarrollado, validado y optimizado para matriz cereales por LACOSA/LANAGRO/MG basado en estudios publicados por Truksess et al. (1991) (Método AOAC 991.31, 1995) y Stroka et al. (2000).

3.2.2 Extracción de aflatoxinas

El fundamento de esta metodología está basado en la extracción de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 con la solución metanol/agua y hexano como solvente orgánico, para la purificación del extracto se utilizaron columnas de inmunoafinidad que contienen anticuerpos específicos para cada aflatoxina utilizando como eluyente metanol. Todos estos procedimientos fueron optimizados de acuerdo a la matriz yerba mate, cuya condición se desarrollaron durante el procesamiento.

3.3 Manipulación de aflatoxinas

Debido a que las aflatoxinas son sustancias carcinógenas, se procedió a trabajar bajo campana, evitando así la inhalación, el contacto con la piel y solo se procedió a abrir los envases que contienen las soluciones stock para realizar las diluciones empleadas. Para la descontaminación y lavado de los materiales de vidrio, se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 1% y luego se procedió al lavado con metanol evitando así trazas que puedan quedar por una descontaminación incorrecta. Los residuos fueron eliminados de acuerdo con el procedimiento de manejo de desechos tóxicos de la Facultad de Ciencias Químicas.

3.4 Ensayos preliminares

3.4.1 Preparación de los estándares de aflatoxinas

Se adquirió los patrones de Aflatoxina B1, B2, G1 y G2 de Romer Labs Division Holding GmbH. Para la preparación de las soluciones estándar se utilizó la metodología AOAC 991.31, (1995), donde cada patrón de Aflatoxina de 0,5 mg/ml (500 ppm) fue diluido primeramente en metanol HPLC (filtrado) con una concentración de 10 ppm que corresponde a la solución intermedia, posteriormente se prepararon soluciones de trabajo de 100 ppb y 1000 ppb que fueron utilizadas en la cuantificación y detección de aflatoxinas. El metanol utilizado se filtró con membranas de Nylon de poros de 0,22 micras.

3.5 Condiciones cromatograficas para el análisis de aflatoxinas

Las condiciones cromatográficas para el análisis de aflatoxinas por cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a espectrómetro de masa en este trabajo fueron las sgtes:

Se utilizó un equipo cromatográfico Waters ACQUITY Ultra Performance LC® (Waters Corporation, Milford, USA), equipado con una columna ACQUITY UPLC® BEH C18,21×50mm×1.7µm (Torrance, Milford, USA) a una temperatura de la columna 15°C y temperatura del inyector a 4°C. Los datos fueron adquiridos usando el programa MassLynx™, v 4.1.

La elución del sistema cromatográfico se realizó siguiendo las condiciones cromatográficas en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1: Condiciones cromatográficas UPLC-MS/MS.

Condiciones cromatográficas	
Fase Móvil	A; 0,1% Ácido fórmico en agua y B; metanol.
Gradiente	10% B, hasta 2 min, 45% B hasta 4.01 min., 10% B hasta 5 min.
Flujo	0,7 min
Tiempo corrido	10 min
	10 µL con autoinyector (Waters Autosampler manager FTN).
Condición Detector de Masa (MS)	
Detector	Espectrómetro de masas triple cuadruplo (QqQ) Xevo TQD CEE(Waters Corporation, Manchester, UK).
Modo de ionización	electropray positivo (ESI+).
Voltaje de capilar	2 kV.
Gas de desolvatación	Nitrógeno, 999 L/Hr, 500°C.
Gas del cono	Nitrógeno, 51 L/Hr.
Temperatura de la fuente	150°C
Temperatura de desolvatación	500°C
Gas de colisión	Argón a 3.5×10^{-3} mBar.
Modo de adquisición	Múltiple Reaction Monitoring (MRM).

3.6 Preparación de la muestra

- Curva de calibración: Fueron preparadas a partir una solución de 100 ppb (para B1 y G1) y 1000 ppb (para B2 y G2) a 5 niveles de concentración.
- Muestras blanco: Fueron preparadas muestras de yerba mate comercial sin el agregado de estándar (**Anexo 1**).

3.7 Procesamiento y extracción de aflatoxinas

3.7.1 Muestras

Se procedió a moler las muestras de yerba mate elaborada, hasta polvo fino. Las muestras de yerba mate elaborada fueron utilizadas como blanco matriz y posteriormente, fueron fortificadas con soluciones estándar de concentraciones conocidas para la determinación del efecto matriz.

3.7.2 Extracción de las aflatoxinas

Se pesaron 50 gr. de la muestra a temperatura ambiente y se adiciono 200 ml metanol/agua (8:2, v/v) y 50 ml hexano como solventes orgánicos y 5g cloruro de sodio, se homogenizo por 3 min a alta velocidad en un (aproximadamente 800 rpm); y se filtró, al vacío, el extracto en un Erlenmeyer con papel de filtro cuantitativo y seguidamente se realizó una segunda filtración. Se realizó la dilución del extracto con una solución tampón PBS (**Anexo 2**).

3.7.3 Purificación de las muestras

Se utilizaron columnas de inmunoafinidad para cada aflatoxina con solución tampón de fosfato (PBS) con un flujo de 2-3 ml /min. A continuación, la columna se lavó con agua grado HPLC, donde las aflatoxinas puras se eluyeron con metanol HPLC y se llevó a sequedad por evaporación en rota vapor a 50°C, se recolectaron los eluatos en frascos adecuados (**Anexo 3**). Posteriormente se retomaron los residuos con metanol -1% Ac. Fórmico, se homogeneizo en ultrasonido por 1 min. y se efectuó nuevamente la filtración con papel de filtro cualitativo 0,22 HPLC. Posteriormente, se procedió a la inyección en el equipo (**Anexo 4**). Señalada en la **Figura 3.1**.

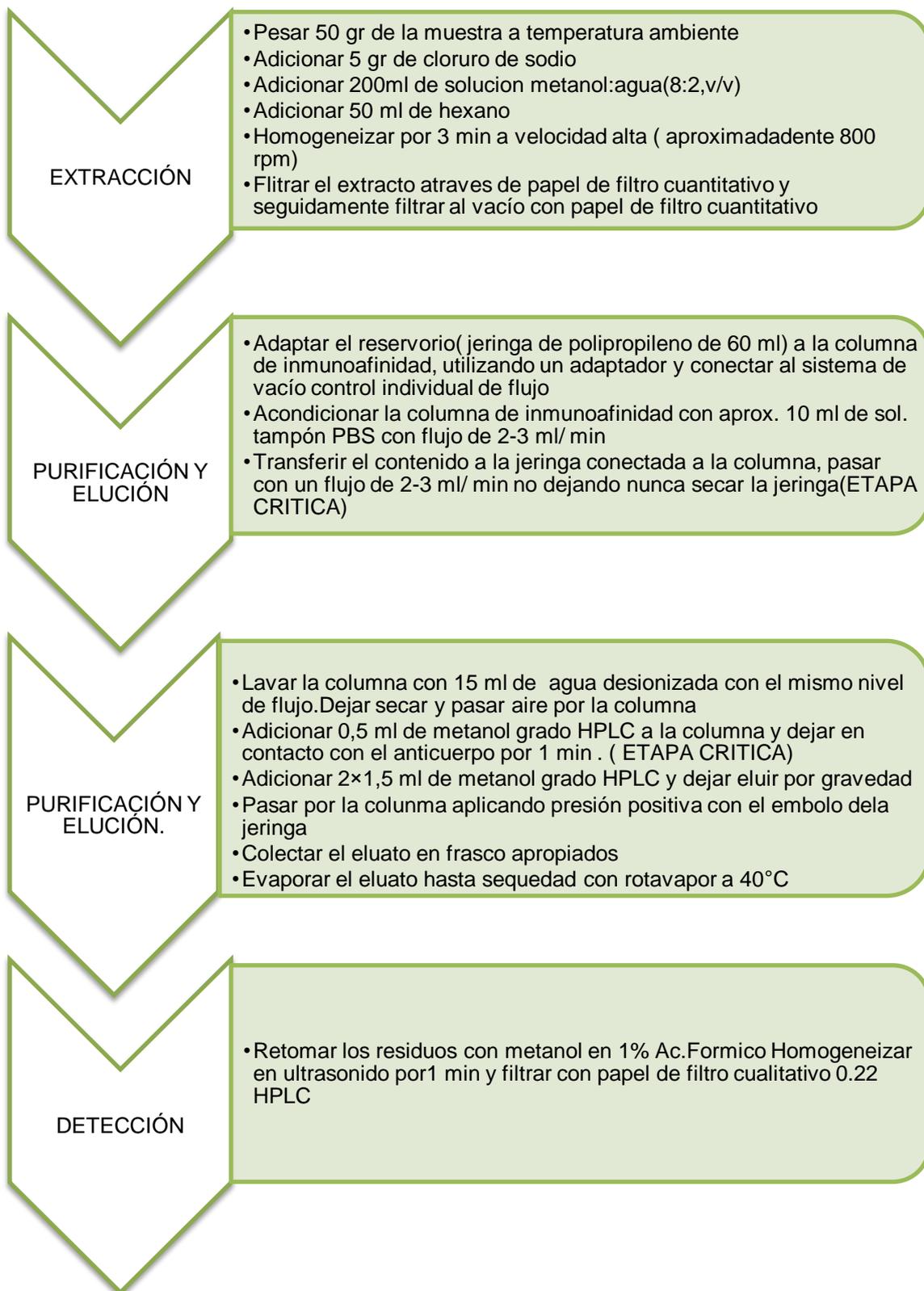


Fig. 3.1. Esquema del flujo de trabajo para el análisis de aflatoxinas en yerba mate comercial

3.8 Validación de la metodología

El trabajo de validación del método para la cuantificación y detección de aflatoxinas en yerba comercial por UPLC/MS-MS, proporcionó los siguientes resultados para los distintos parámetros de validación analizados:

3.8.1 Selectividad/ Especificidad

La selectividad y la especificidad del método se evaluó mediante el monitoreo de iones característicos para cada aflatoxina (B1, B2, G1 y G2) junto con sus respectivos tiempos de retención, luego fueron realizadas inyecciones en modo MRM, con lo cual se lograron determinar las energías de ionización necesarias para cada fragmentación.

3.8.2 Linealidad

La determinación de linealidad se realizó preparando curvas de calibración de una mezcla de estándares de las 4 aflatoxinas, cada punto de la curva fue preparado a partir de soluciones stock individuales de aflatoxina B1, G1, B2, y G2 de 100 µg/mL o ppb por triplicado para cada nivel de concentración, para realizar diluciones de 6-120 µg/mL o ppb de aflatoxinas totales. Para verificar la linealidad se calculó el coeficiente de correlación (R) de la recta de calibración obtenida para cada compuesto estudiado.

3.8.3 Límite de detección y Límite de cuantificación

Los cálculos de los límites de detección y cuantificación se basaron en la determinación de la señal-ruido. Posteriormente se ensayaron niveles bajos de concentración que den una señal analítica ($S/N \geq 3$) y a partir estas el cálculo teórico de la concentración dada por la relación señal –ruido S/R:3 para el LOD y S/R:10 para el LOQ.

3.8.4 Repetibilidad

La precisión del método se evaluó en condiciones de repetibilidad a través del análisis de la curva de calibración, se determinó calculando la desviación estándar relativa porcentual (RSD %), en base a tres inyecciones por triplicado que fueron extraídas el mismo día, en el mismo laboratorio, equipo UPLC y operatorio.

$$\text{RSD (\%)} = (\text{DS} / \text{X}) \times 100$$

Donde:

X: promedio de las concentraciones obtenidas de tres réplicas.

DE: Desviación estándar de las concentraciones de tres réplicas.

3.8.5 Reproducibilidad

Para determinar reproducibilidad se ha analizado a partir de la curva de calibración en base a tres inyecciones en tres días diferentes, por el mismo analista, en el mismo laboratorio y equipo UPLC. Para evaluar este parámetro se determinó el coeficiente de variación (% CV) de las áreas obtenidas en los días de análisis.

3.8.6 Efecto matriz

Para evaluar el efecto matriz (%EM) de cada aflatoxina, fueron empleadas las pendientes de las curvas de calibración en matriz y en solvente. Los datos obtenidos fueron tabulados y calculados mediante la siguiente ecuación:

$$\%EM = [\text{pendiente matriz} / \text{pendiente solvente}] \times 100.$$

3.9 Análisis de datos

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó una planilla electrónica Excel7.0. Para la discusión de los resultados, se utilizó un software Graph Pad Prism 5.0 Inc (36). Y se trataron los datos mediante estadística descriptiva.

3.10 Consideraciones Éticas

El presente trabajo no requirió evaluación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, de acuerdo a la resolución 551/19. Los residuos fueron eliminados de acuerdo a las condiciones establecidas para el manejo de desechos tóxicos de la Facultad de Ciencias Químicas. Los desechos sólidos como punteras, jeringas, filtros, viales de cromatografía contaminados con aflatoxinas fueron almacenadas en recipientes correctamente identificadas para su disposición.

4. RESULTADOS

4.1 Selectividad/Especificidad

De acuerdo a las condiciones cromatográficas desarrolladas, se establecieron los tiempos de retención, iones cuantificadores y cualificadores de las aflatoxinas estudiados en el UPLC/MS-MS, y la energía de ionización para la fragmentación de los mismos, como se muestra en la **Tabla 4.1.** y **Figura 4.1.** se presentan como ejemplo los cromatogramas característicos de la Aflatoxina B1. (**Anexo 5- 8** se adjuntan los cromatogramas; **Anexo 9-12** los espectros de masas correspondientes).

Tabla 4.1: Condiciones experimentales del método optimizado LC (ESI+) /MS/MS por Intellistart™. Transiciones de cuantificación (Q) y confirmación (q).

Compuesto	Fórmula	Tiempo de retención (min.)	Ión [M+H] ⁺	Transiciones MRM	Voltaje cono (V)	Energía colisión (eV)	
Aflatoxina B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	6.89-6.92	313.10	313.10 > 241.17	Q	54	36
				313.10 > 284.98	Q	54	22
Aflatoxina B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	6.30-6.35	315.11	315.11 > 259.07	Q	50	28
				315.11 > 287.13	Q	50	24
Aflatoxina G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	5.74-5.77	329.09	329.09 > 199.83	Q	56	40
				329.09 > 243.06	Q	56	26
Aflatoxina G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	5.36-5.38	331.17	331.17 > 189.08	Q	60	42
				331.17 > 245.14	q	60	30

4.2 Linealidad

Se determinaron los coeficientes de correlación necesarios para establecer la linealidad ($r \leq 0,988$), además de sus respectivos interceptos y pendientes, a partir de las curvas de calibración, como se muestra en la **Tabla 4.2.** y en la **Fig. 4.2.** muestra una curva de calibración de la Aflatoxina B1, en las condiciones de ensayo.

Tabla 4.2: Linealidad, pendiente e intercepto

Compuesto	Coefficiente de correlación (r)	Pendiente	Intercepto
Aflatoxina B1	0.9907	23.918	1.41241
Aflatoxina B2	0.9802	4.96551	7.81478
Aflatoxina G1	0.9884	25.3691	4.04472
Aflatoxina G2	0.9966	39.3743	35.062

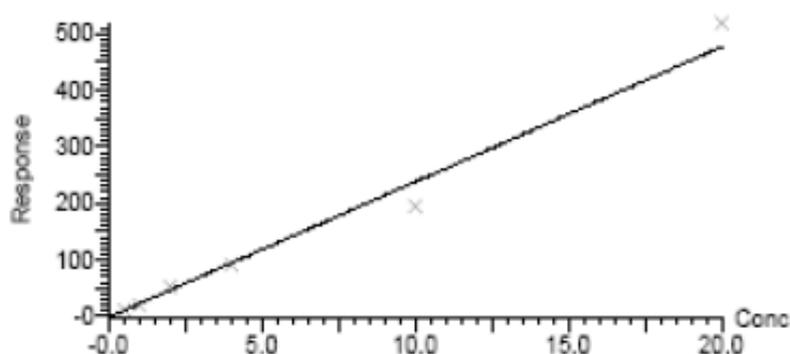


Figura 4.2. Curva de calibración de Aflatoxina B1
Ecuación: $23.9418x - 1.41241$, $r=0.990$, $r^2= 0.9814$

4.3 Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

Los límites de detección y cuantificación experimentales fueron calculados a partir de la desviación estándar y el ruido generado por la matriz blanco. Estos datos fueron extrapolados a las curvas de calibración y arrojaron los resultados que se resumen en la **Tabla 4.3.**

Tabla 4.3: Límites de Detección y Cuantificación para cada aflatoxina

Compuesto	Límite de Detección (µg/L)	Límite de Cuantificación (µg/L)
Aflatoxina B1	0,183	0,609
Aflatoxina B2	0,099	0,331
Aflatoxina G1	1,868	6,226
Aflatoxina G2	0,183	0,610

4.4 Repetibilidad y Reproducibilidad

Para la repetibilidad y reproducibilidad se analizaron muestras inyectadas por triplicado. Las aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) mostraron buenos resultados de precisión tanto intra-día como inter-día. Las aflatoxinas presentaron medidas de precisión adecuadas ($RSD \leq 20\%$), que se muestra en la **Tabla 4.4**.

Tabla 4.4: Repetibilidad y reproducibilidad del método

Compuesto	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	Desv.Estándar	%RSD INTRA-día	Desv.Estándar	%RSD INTER-día
Aflatoxina B1	95.03	7.94	105.01	9.68
Aflatoxina B2	134.17	2.98	254.75	5.87
Aflatoxina G1	182.21	12.39	67.55	1.15
Aflatoxina G2	715,03	20	266.08	7.34

RSD Intra-día: Desviación estándar relativa o coeficiente de variación de 3 inyecciones.

RSD Inter-día: Desviación estándar relativa o coeficiente de variación de 3 inyecciones en 3 días diferentes.

4.5 Efecto matriz

Los resultados de efecto matriz demostraron que la mayoría de aflatoxina, como se muestra en la **Tabla 4.5**.

Tabla 4.5: Efecto Matriz de Aflatoxinas

AFLATOXINAS	Efecto Matriz expresado en %
Aflatoxina B1	+116
Aflatoxina B2	-76
Aflatoxina G1	+13
Aflatoxina G2	-96

5. DISCUSIÓN

Con los métodos analíticos utilizados para la detección y determinación cuantitativa de aflatoxinas en yerba mate comercial (*Ilex paraguariensis*) mediante el análisis instrumental por UPLC-MS/MS, juegan un importante rol tanto en la evaluación e interpretación de los datos citados para el desarrollo de estudios de seguridad e inocuidad de alimentos destinados al consumo humano, por lo tanto, tales estudios son de fundamental importancia para la determinación de los límites máximos de residuos (LMR).

La falta de interferencias y la adecuada simetría de los cromatogramas sugieren que el método estudiado fue selectivo y específico para cada compuesto de aflatoxinas (B1, B2, G1, y G2), ya que han presentado iones de transiciones estables e intensidad de señal adecuadas para su cuantificación y confirmación por el método experimental utilizado, en modo ESI+, presentando así una buena resolución de los analitos monitoreados. Además, se pudo apreciar que, en las inyecciones del blanco matriz, no se generaron señales que pudieran interferir en la determinación de los analitos estudiados.

La linealidad del procedimiento analítico determinada, siguió un comportamiento lineal en un rango de concentración analizado de (6-120 $\mu\text{g} / \text{mL}$) de aflatoxinas, por el análisis de regresión de la recta de calibración presentando coeficientes de correlación ($r \geq 0.98$). Esto da un resultado acorde a la Guía SANTE/11813/2017, en donde el coeficiente de correlación debe ser superior o igual a 0,98 para que el método sea lineal (37).

Así también, en los ensayos realizados para los límites de detección y cuantificación se obtuvieron valores aceptables. En el caso de B1(0.1-0.609 $\mu\text{g} / \text{L}$), B2(0.099-0.331 $\mu\text{g} / \text{L}$), G1(1.8-6.26 $\mu\text{g} / \text{L}$) y G2(0.18-0.610 $\mu\text{g} / \text{L}$) teniendo en cuenta que éstos se encontraron por debajo del límite máximo de residuos considerado en este trabajo (MAPA,2011). Si bien, los límites de detección y cuantificación de un método deben ser lo más bajos posibles, esto puede variar dependiendo de la metodología que cada laboratorio emplee para la determinación de los analitos de interés y de la sensibilidad de los equipos utilizados.

En cuanto a los parámetros de precisión del método, los valores de CV calculados sugieren que tanto para la repetibilidad (7.94;2.98;12.39;20) %y reproducibilidad (9.68;5.87; 1.15;7.34%) para los distintos tipos de aflatoxinas estudiadas, realizada por un mismo operador, son aceptables, que de acuerdo a lo que establece la Guía SANTE/11813/2017, el coeficiente de variación para estas determinaciones debe ser igual a $CV \leq 20\%$ (37) y que, por lo tanto, permitirá la utilización de las rectas de calibración en el rango establecido para la interpolación de valores relativos a concentraciones de aflatoxinas en muestras de yerba mate.

Además, en el ensayo de efecto matriz, se observó en las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (**Anexo 13-16** se observan las curvas de calibración de las Aflatoxinas). En los casos de la aflatoxinas B2 y G2 los resultados sugieren la supresión de la señal analítica, demostrando efectos interferentes con los analitos, lo que implica que, en el caso de la cuantificación de estos analitos, dieron un resultado estadísticamente por encima del requerimiento que supera el valor de referencia igual $\pm 20\%$ de la Guía SANTE/11813/2017 (37). Cabe destacar que la señal obtenida para las aflatoxinas en presencia de la matriz es muchas veces aumenta cuando estas son determinadas en forma de estándar. Esto indica a simple vista que a medida que aumenta las concentraciones de los estándares, la matriz, por interacciones entre sus componentes y las aflatoxinas, disminuye la señal que es detectada. cabe destacar, que la matriz tiene una influencia muy fuerte sobre la señal del analito, modificándola.

Los resultados obtenidos mediante el procedimiento de validación descrito, aseguran que un método preciso y confiable para la detección y cuantificación de aflatoxinas en yerba mate comercial, demostrando así la capacidad del procesamiento para cumplir con las especificaciones de la mayoría de las regulaciones importantes, como las establecidas por la Comunidad Europea (CE).

Por otro lado, todos los parámetros de validación analizados, demostraron que el método de determinación de aflatoxina en yerba mate comercial por UPLC-MS/MS, es apto ya que esta técnica permite disminuir el tiempo de análisis y por tanto obtener una mejor resolución cromatografica para la detección de las 4 aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) que la HPLC.

Es, por tanto, que el método que se presenta en este trabajo, correspondiente a la extracción de las aflatoxinas como su separación mediante la UPLC, indican que su identificación puede realizarse con un tiempo de análisis corto y bajo consumo de solventes de fase móvil, lo que es favorable desde el punto de vista económico y sobretodo medioambiental.

Finalmente, los buenos resultados obtenidos en la selectividad, linealidad, repetitividad, reproducibilidad, límites de detección y cuantificación contribuyen de manera importante al estudio de validación del método de análisis de estos en matriz yerba mate comercial y cuantificación por un método MRM en UPLC/MS/MS. A partir de estos resultados, se podrá proseguir con estudios de los parámetros de desempeño no estudiados en este trabajo, en muestras de yerba mate comercial contaminadas.

6. CONCLUSIONES

El método estudiado para la cuantificación de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en yerba mate comercial mediante la detección por cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un espectrómetro de masa, demostró una adecuada precisión y linealidad; en cuanto al análisis ensayado para la determinación de aflatoxinas por el método MRM con modo de ionización electrospray positiva (ESI) optimizado por Intellistart, ha demostrado buenos parámetros de desempeño en el método cromatográfico para la cuantificación de aflatoxinas.

Con los parámetros estadísticos de validación se obtuvieron resultados favorables para las aflatoxinas analizadas con el método propuesto, pudiéndose así seleccionar favorablemente los iones de confirmación y cuantificación de aflatoxinas estudiados y establecer del mismo modo los intervalos de trabajos relativo a los estándares en solvente y matriz, como así también la linealidad de cada aflatoxina, que demostraron un comportamiento lineal con un coeficiente de correlación ($r \geq 0,98$), tanto así los demás parámetros analizados, los límites de detección y cuantificación, la repetibilidad, reproducibilidad, y presentaron valores aceptables, que favorecen al estudio de validación del método. Mediante este estudio, también se logró evaluar el efecto matriz de las aflatoxinas analizadas en muestras de yerba mate comercial.

Este trabajo permite asentar una metodología rápida, segura y sensible para delinear futuros trabajos de investigación en el control de aflatoxinas en matriz yerba mate comercial, que podrán colaborar con la calidad e inocuidad alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Food and Agriculture Organization (FAO). (2003). Manual sobre el sistema de aplicación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos en la prevención y el control de las micotoxinas. Estudio FAO de Alimentación y Nutrición, 73.
2. Juan C, Soriano JM, Burdaspal P. Aflatoxinas Grupo B y G. In: Soriano JM, editor. Micotoxina en Alimento. Primera Ed. España: Ediciones Díaz de Santos, 2007. pág. 167-176.
3. Fu Z, Huang X, Min S. (2008). Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal of Chromatography A*, 1209, 271–274.
4. Sohayla M, Somaia M, El- Azab. Is Aflatoxin B1 a Common Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma Mansoura J. *Forensic Med. Clin. Toxicology*. Vol XVII, No. 2, July 2009.
5. Yu J, Bhatnagar D, Ehrlich K. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Revista Iberoamericana de Micoogía* 19: 191-200.
6. FAO. Reglamento a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones. Estudio FAO. Alimentación y Nutrición. Roma, Italia;2004. p.2.
7. Ortiz, A. 1992. Manual de procedimientos para el análisis de aflatoxinas. Almacenes Nacionales de Depósito. Centro Nacional de Investigación, Certificación y Capacitación. 223p.
8. Kew, Michael C. Aflatoxins as a cause of Hepatocellular Carcinoma. *Gastrointestin Liver Dis*, September 2013. Vol 22 No 3:305-310.
9. Kirk, Gregory D, Turner, Paul C. Hepatocellular Carcinoma and Polymorphisms in Carcinogen- Metabolizing and DNA Repair Enzymes in a Population with Aflatoxin Exposure and Hepatitis B Virus Endemicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(2):373-9.
10. Valdivia F, Arturo G, Quezda T, Teódolo, Ortíz Martínez R. Implicaciones de la Contaminación de Alimentos por Aflatoxinas. *Investigación y Ciencia* 2014. Departamento de Clínica Veterinaria, Aguas Calientes 20900.
11. Álvarez Buñuelos M T, Carvajal Moreno M. Aductos-ADN- Aflatoxina como Biomarcadores de Exposición en grupos de riesgo de Cáncer de Hígado. *Revista Cubana de Oncología* 2000; 16(1):35-9.
12. Uribe Yuanda, Diego F, Navas M C. Mecanismos Moleculares Involucrados en la Mutagenicidad inducida por Aflatoxina B1. *Rev Ciencias Salud* 2012; 10 (3): 403-419.
13. Natasa J, Strelac, Zvonko M, Magic. Influence of aflatoxin B1 on mRNA levels of acute-phase proteins and oncoproteins in albino rat liver. *Arch Oncol* 2009; 17(1-2):3-6.
14. Urrego Novoa J R, Díaz G J. Aflatoxinas: Mecanismo de Toxicidad en la Etiología de Cáncer Hepático Celular. *Rev Fac Med Univ Nac Colombia* 2006. Vol. 54 No. 2.
15. Guzmán de Peña, Doralinda. La exposición a la Aflatoxina B1 en animales de Laboratorio y su significado en la Salud Pública. *Salud Pública Mex* 2007; 49:227-235.
16. Santos Chona, Oscar M. Importancia y Efectos de la Aflatoxina en los Seres Humanos. *Microbiología de Alimentos-Universidad Autónoma de Bucaramanga*. No 19-55. 7.
17. Moreno E, Gil M. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. UNAM. México, Df. 42 p.
18. Moreno, E. 1988. Manual para la identificación de hongos de granos y sus derivados. UNAM. México, DF. 109 p.
19. Codex Alimentarius (2008). Codex General Standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Stan193-1995.

- pp:9.Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf [acceso: 5-4-2011]
20. Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, y sus posteriores modificaciones (165/2010 y 1058/2012).
 21. Huang B, Han Z, Wu Y, Ren Y. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. Netherlands; 2010 Mar; 662(1):62-8.
 22. Skoog D., Holler F., Crouch S. Principios de análisis instrumental .6ª Ed. Cengage Learning ;2007.
 23. Srivastava B., Sharma B., Baghel U., Sethi N. Review Article Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A Chromatography Technique. *IJPQA*. 2010;2(1):19–25.
 24. Stachniuk A., Fornal E. Review Article Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Anal. Methods*. 2015.
 25. Adaway J., Keevil B., Owen L. Review Article Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Annals of Clinical Biochemistry* .2015;52(1):18–38.
 26. Gómez M, González M. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia; 2010.
 27. Arrúa Alvarenga AA, Peralta López IP, Rojas Abraham CM, Reyes Caballero YM, Toledo Popoff C, Vázquez L, Mendes Arrúa JM. Presencia de hongos filamentosos en yerba mate compuesta y eficiencia de medios de cultivo para el aislamiento de *Aspergillus*. *Investig. Agrar*. 2016; 18(1):49-55.
 28. Fugeri C, Fanaro GB, Koike ACR, Rodriguez FT, Bastos DH, Villavicencio AL. Evaluation of fungi contamination and xanthine and phenolic compounds content in irradiated Mate (*Ilex paeaguariensis*) . *Int Nucl Atl Conf*. 2013.
 29. Perez Paiva J, Piris Morales L, Ulke Mayans G, Arias Villalba M, Mendoza de Arbo L, Sanchez Bernal S. Evaluación del Perfil Micológico de la Yerba Mate durante el proceso productivo y producto final en establecimientos yerbateros. *Paraguay 2012. Rev Salud Publica Parag* 2013;3(1):8-13.
 30. Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food ci*. 2007;72(9): R138-15.
 31. Renovatto Y, Agostini J. Qualidade microbiológica e físico-química de amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) comercializadas em Dourados. *Interbio*. 2008;2(2):12-20.
 32. Castrillo M, Horianski M, Jerke G. Aislamiento de cepas *Aspergillus* sección *Nigri* en la Yerba Mate comercializada en Posada (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico. *Rev Argent Microbiol*. 2013;4 (2):110-13
 33. INTN. Norma Paraguaya NP 3500193: Yerba mate elaborada. Requisitos. 3ª. Edición. Asunción, Paraguay; 2007.
 34. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Resíduos e contaminantes em alimentos. 1º. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.; 2011. 248 p.
 35. Duffau D, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Sandoval S, Soto M. Guía técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago: Instituto de Salud Pública, Chile; 2010. p.21,22,27,28,37,70.

36. GraphPad Software, (1989). GraphPad Prisma 5Inc[Windows]. California,USA. Disponible en la web: www.graphpad.com.
37. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed (SANTE/11813/2017). European Commission. Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. 2017;46.
38. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. 1a. Edicao. Brasilia: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimiento; 2011.

ANEXOS

B)

A)

C)

Anexo 1. Preparación de muestras: **A)** Muestras de estándar de aflatoxina, de curva de calibración preparadas. **B)** Muestra de yerba mate comercial molidas hasta polvo fino **C)** Molino triturador



A)



B)



C)



D)



E)

Anexo 2. Extracción de las aflatoxinas: A) Muestras de yerba mate pesadas con el agregado de NaCl B) Muestras con solventes utilizados para la extracción C) Homogenización de la solución en Ultraturrax D) Filtración de muestras en bomba al vacío E) Muestras después de la filtración



A)



B)



C)

Anexo 3. Purificación de las muestras: A) Manifold ensamblado B) Purificación C) Columna de inmunoafinidad utilizada para el proceso de extracción

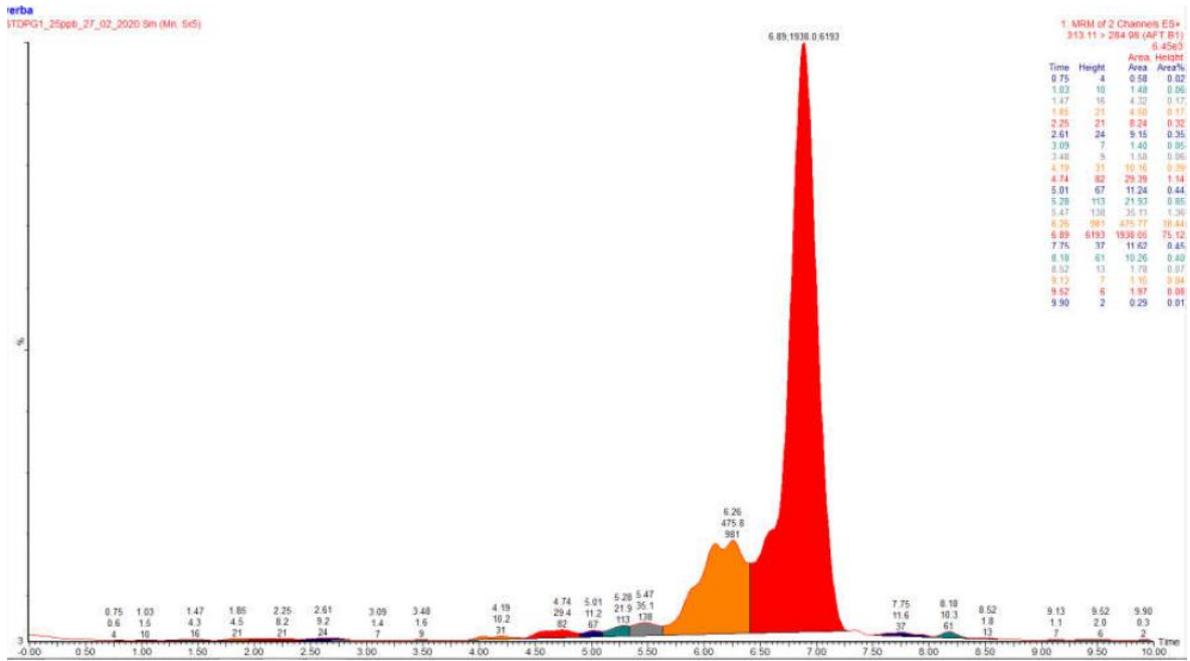


A)

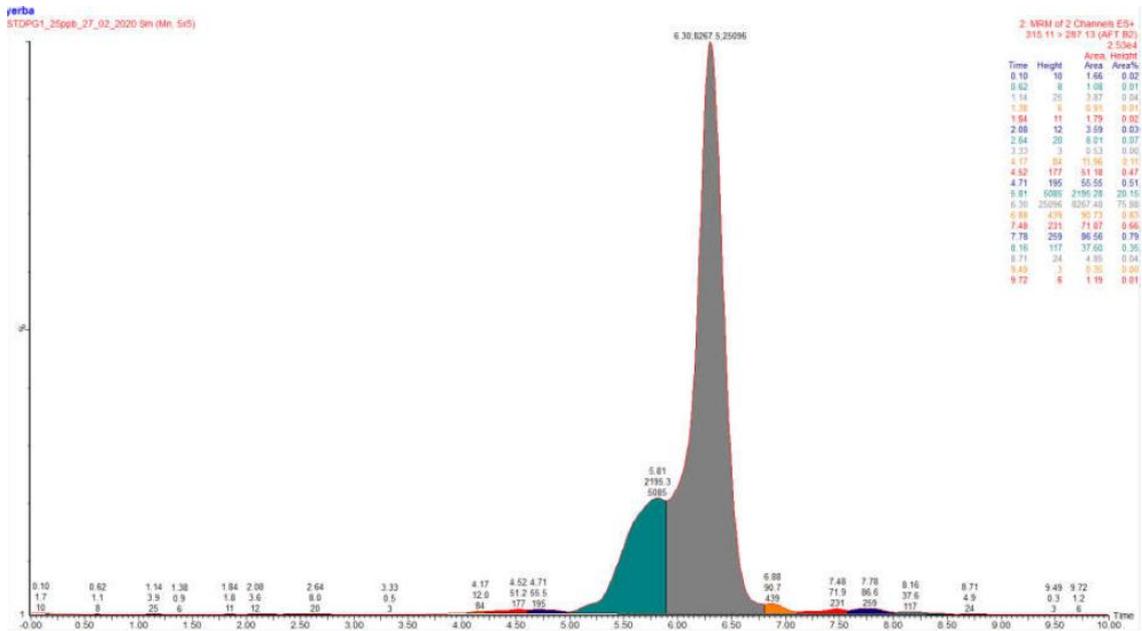


B)

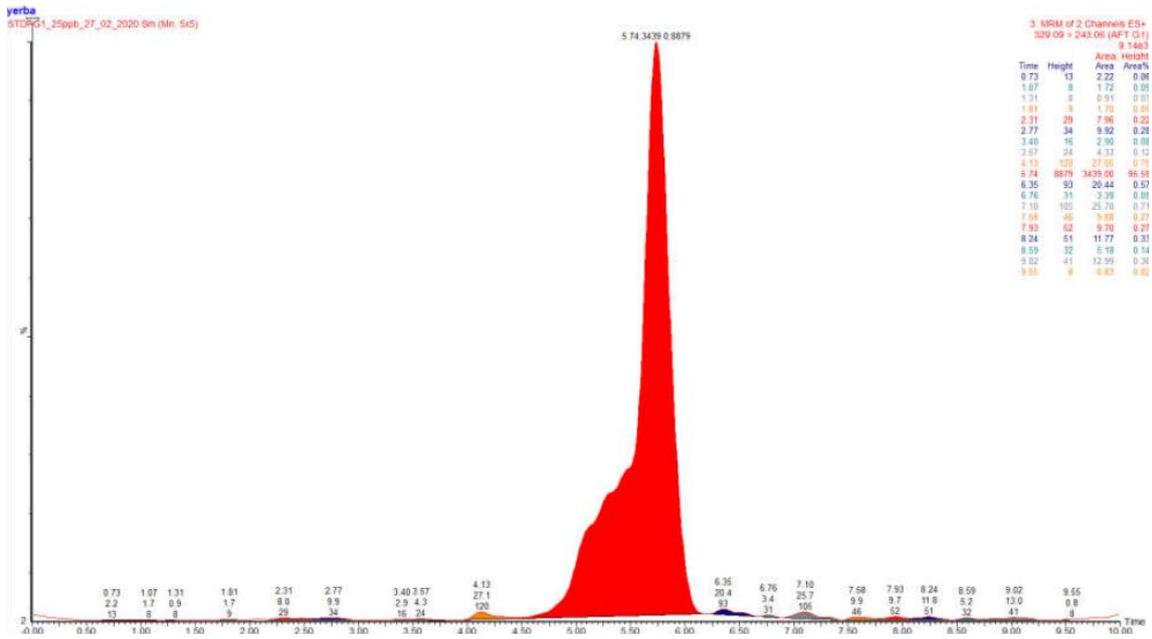
Anexo 4. Análisis instrumental de muestras: **A)** Filtrado del extracto y llenado de viales de UPLC **B)** Equipo de cromatografía líquida de ultra alta presión acoplado al detector de masas en tándem(UPLC/MS/MS).



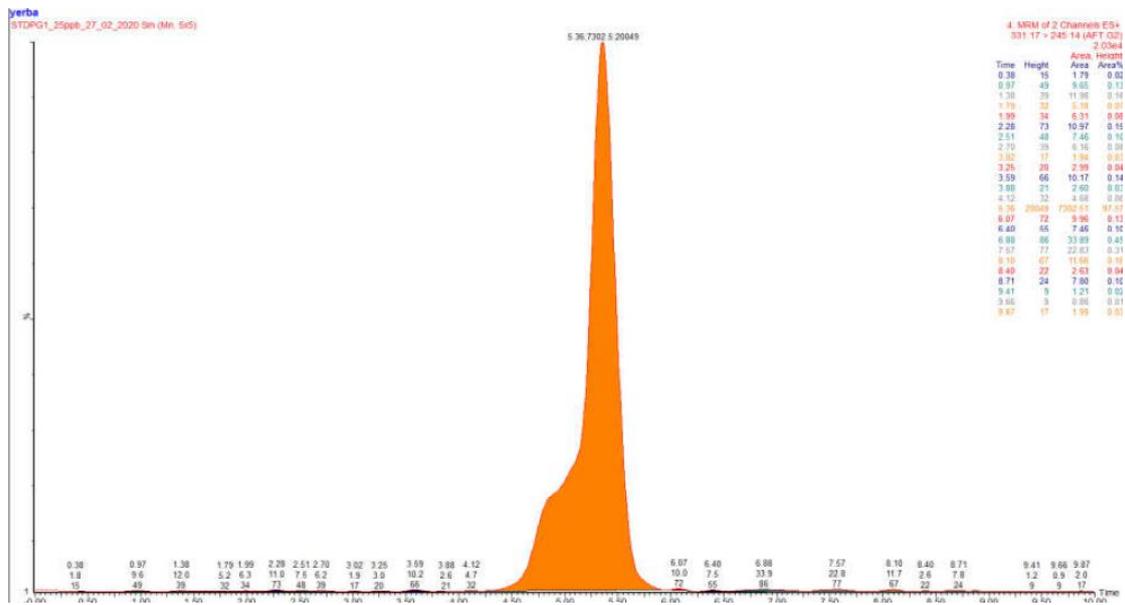
Anexo 5 Cromatograma de Aflatoxina B1



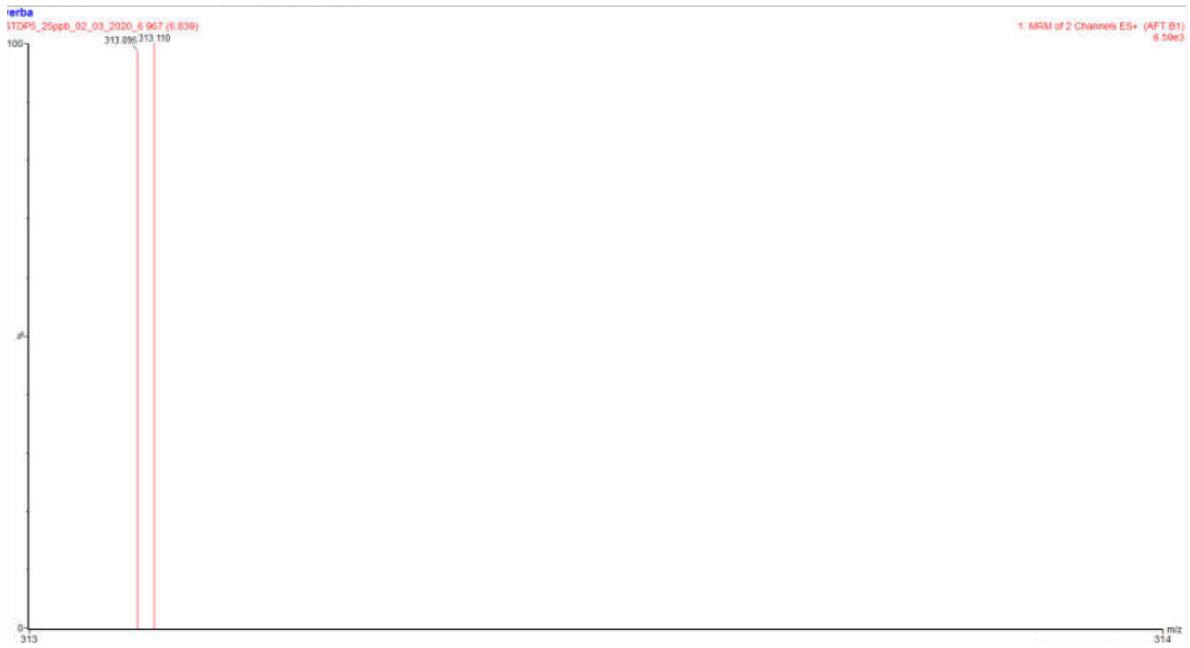
Anexo 6. Cromatograma de Aflatoxina B2



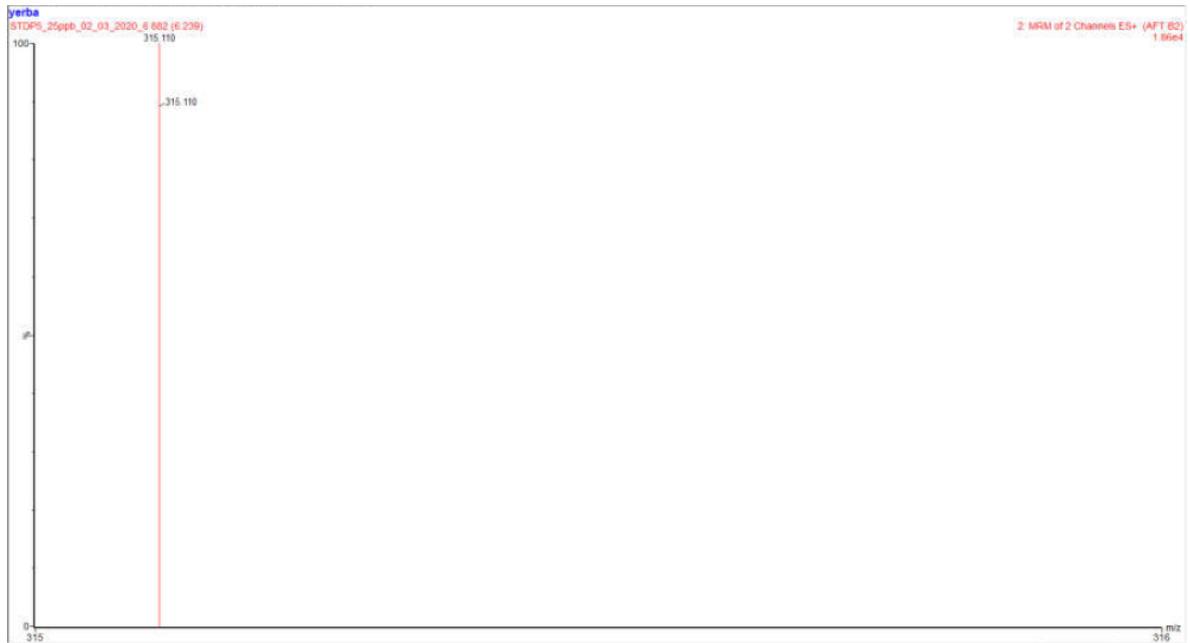
Anexo 7. Cromatograma de Aflatoxina G1



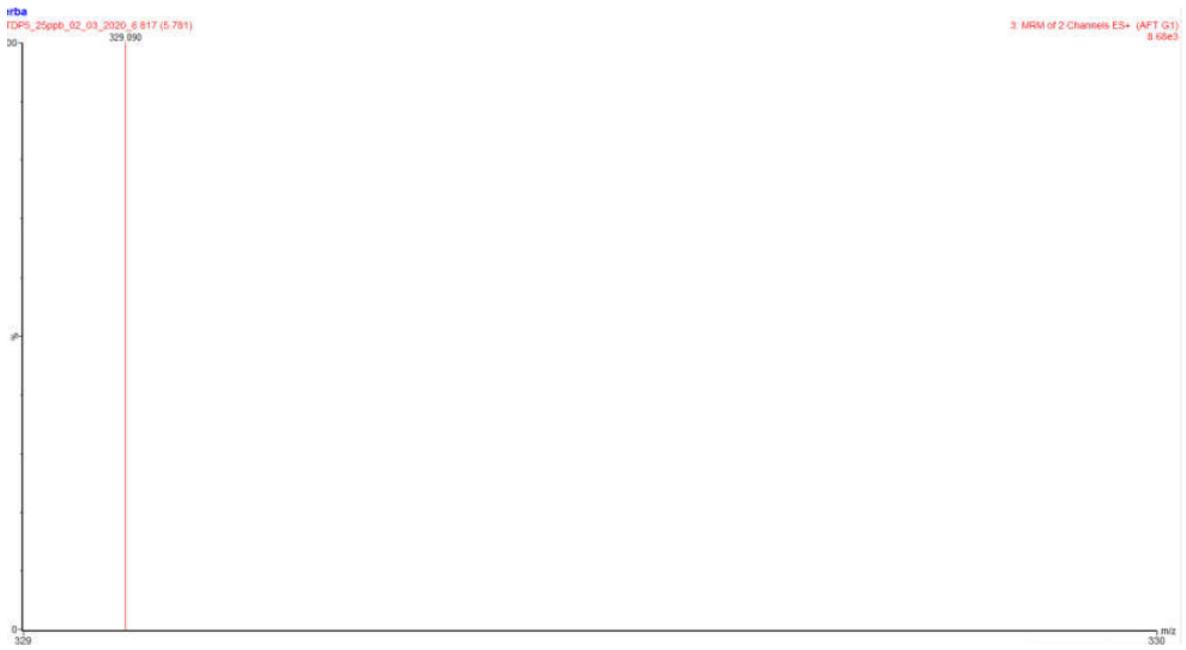
Anexo 8. Cromatograma de Aflatoxina G2



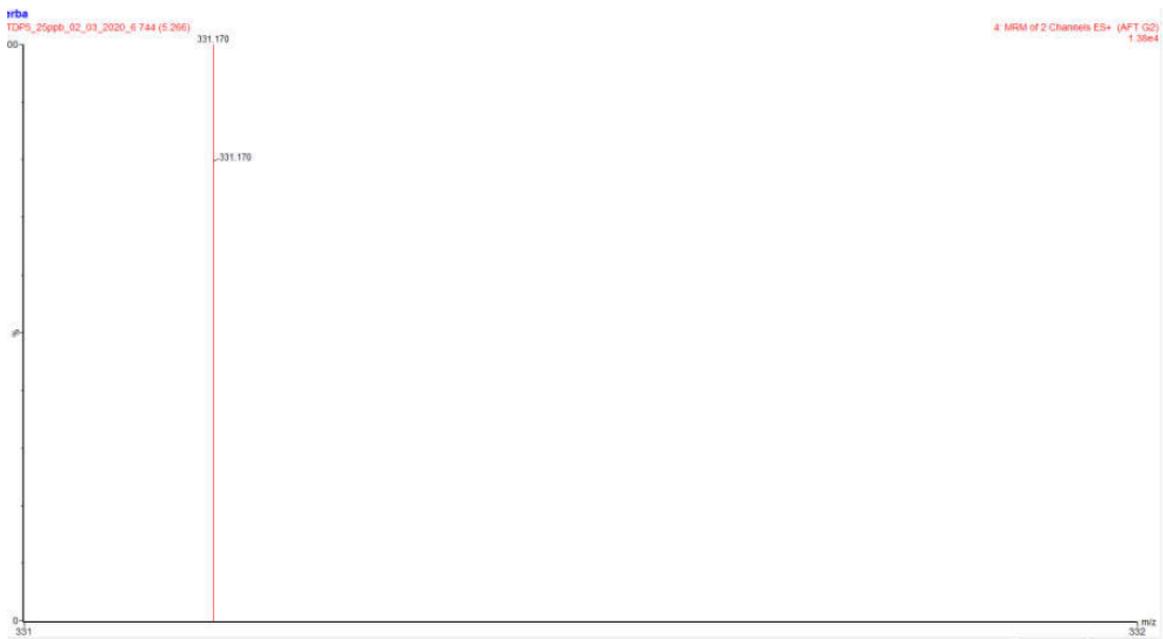
Anexo 9. Espectro de masa de Aflatoxina B1



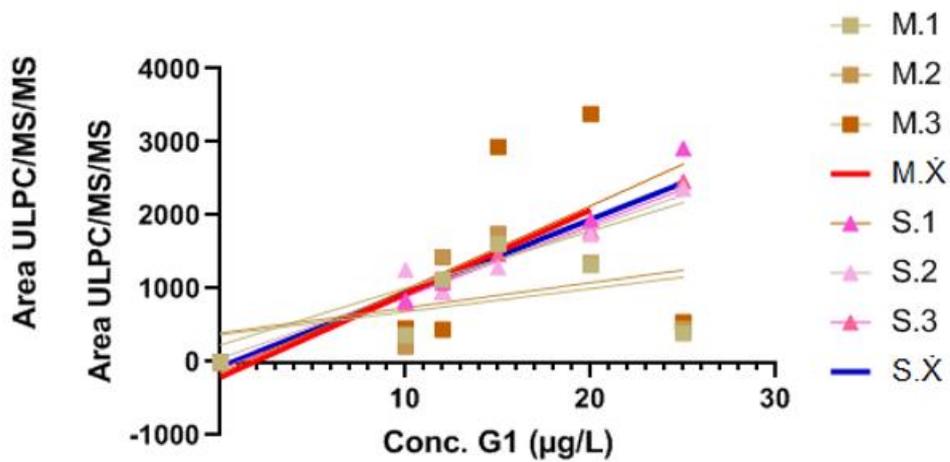
Anexo 10. Espectro de masa de Aflatoxina B2



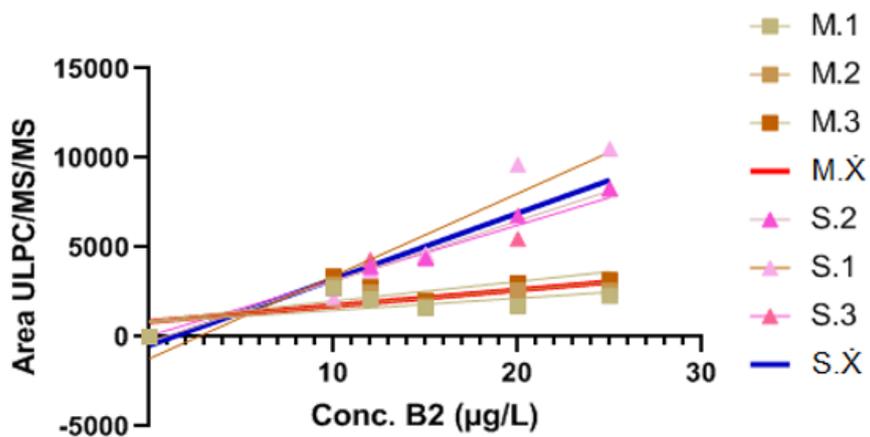
Anexo 11. Espectro de masa de Aflatoxina G1



Anexo 12. Espectro de masa de Aflatoxina G2

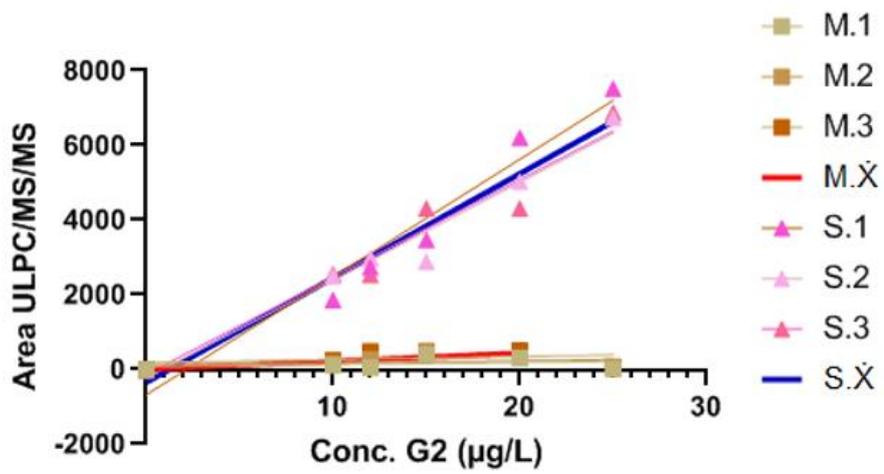


Anexo 13. Curvas de calibración en solvente y matriz para Aflatoxina B1



Anexo 14. Curvas de calibración en solvente y matriz para Aflatoxina B2

Anexo 15. Curvas de calibración en solvente y matriz para Aflatoxina G1.



Anexo 16. Curvas de calibración en solvente y matriz para Aflatoxina G2