



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
CIENCIAS E INGENIERÍA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA
LA DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A EN MUESTRAS DE MÚSCULO DE
POLLO, A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA
RENDIMIENTO ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS DE TRIPLE
CUADRUPOLO (UPLC-MS/MS)

AUTORES:

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

CAMILA FERNANDA DURAND VILCA

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACEÚTICO

MARIA PAZ ZAMBRANO CHAHUAZ

ASESORA:

DRA. MARIA CONCEPCION RIVERA CHIRA

CO-ASESOR:

DR. LUIS HUICHO ORIUNDO

LIMA-PERÚ

2026

Jurado calificador

Presidente: Dra. Monica Jehnny Pajuelo Travezaño

Secretario: Msc. Leon Faustino Villegas Vilchez

Vocal: Dr. Denis Helan Castillo Pareja

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	DURAND VILCA CAMILA FERNANDA
2.	ZAMBRANO CHAHUAZ MARIA PAZ

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA** y **CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA** autores del trabajo titulado: **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A EN MUESTRAS DE MÚSCULO DE POLLO, A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA RENDIMIENTO ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO (UPLC-MS/MS)** el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO DE BIOLOGÍA** y por el **TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACEÚTICO** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	RIVERA CHIRA MARIA CONCEPCION	FACI	ASESORA
2.	HUICHO ORIUNDO LUIS	-	CO ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **17%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3656099595**; fecha de entrega: **21/09/2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 21 de septiembre de 2026**



Firma del asesor
Nº DNI: 10003044
ORCID: 0000-0001-9470-6642



Firma del co asesor
Nº DNI: 10003304
ORCID: 0000-0002-5272-5885

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LaCCSA) del CITEacuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por brindarnos la oportunidad y las facilidades necesarias para desarrollar la presente tesis.

A todos los miembros del LaCCSA, especialmente a los analistas de laboratorio Roy Vega y a Yerelin Santoyo, por su apoyo, disposición y por compartir con nosotras sus conocimientos y experiencia. Agradecemos sinceramente su acompañamiento y apoyo durante cada etapa de este proceso.

A nuestros asesores, la Dra. María Rivera y el Dr. Luis Huicho, por la confianza depositada en nosotras y por brindarnos la oportunidad de desarrollar este trabajo. Agradecemos su orientación, conocimientos, tiempo y acompañamiento, que fueron fundamentales para la culminación de la presente tesis.

DEDICATORIAS

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este momento, y por darme la fortaleza y salud necesarias para alcanzar mis objetivos.

A la memoria de mi mamá, María Esther Vilca Segovia, quien desde el cielo me guía y me acompaña en cada paso. Fuiste mi impulso para seguir adelante y no rendirme, incluso en los momentos más difíciles. Tu amor, tus enseñanzas y tu recuerdo viven siempre en mí. Donde estés, espero que te sientas orgullosa de mí. Te amo infinitamente. Este logro también es tuyo.

A mi papá, Enrique, y a mis hermanos, Alonso y Belén (mi Unnie), por ser pilares fundamentales en mi vida y por acompañarme, motivarme y apoyarme durante cada etapa de este camino. Agradezco profundamente tenerlos en mi vida.

Camila Fernanda Durand Vilca

A Dios, por darme la fortaleza y sabiduría para llegar hasta aquí.

A mis papis, Lizy y Marcos, por ser mi apoyo 24/7 y la razón de todo lo que hago; a mis hermanos, Bruno y Santi, por su amor y a mis abuelitos, por cuidarme, consentirme y hacerme tan feliz.

A mis maestros y amigos, por guiarme, ayudarme a ampliar mi visión, señalarme cuando me equivocaba e impulsarme siempre a hacerlo mejor.

Y a mí, por cada decisión que me trajo hasta aquí, por encontrar siempre una salida y por aprender a transformar cada problema en una oportunidad para seguir siendo icónica.

Maria Paz Zambrano Chahuaz

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO	8
2.1. MICOTOXINAS	8
2.1.1. Ocratoxina A	9
2.1.1.1. Producción fúngica	10
2.1.1.2. Toxicocinética	11
2.1.1.3. Toxicidad	14
2.1.1.4. Regulaciones y límites	15
2.2. AVICULTURA	16
2.2.1. Gestión sanitaria y alimentaria en la producción avícola	17
2.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICOTOXINAS	18
2.3.1. Cromatografía líquida	18
2.3.2. HPLC y UPLC: Diferencias y aplicaciones	19
2.3.2.1. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	19
2.3.2.2. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)	20
2.3.3. Acoplamiento con espectrometría de masas	22
2.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	23
2.5. ANTECEDENTES	27
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	31
V. OBJETIVOS	31
5.1. OBJETIVO GENERAL	31
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1. MATERIALES Y EQUIPOS	32
6.1.1. Lugar de trabajo	32

6.1.2. Muestras	32
6.1.3. Material de laboratorio	33
6.1.4. Reactivos, solventes y estándar	33
6.1.5. Equipos	33
6.2. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA	34
6.2.1. Preparación de las soluciones estándar	34
6.2.2. Condiciones espectrométricas	35
6.2.3. Condiciones cromatográficas	35
6.2.3.1. Preparación de las fases móviles	35
6.2.4. Preparación de la curva de calibración del estándar de OTA	36
6.2.5. Método de extracción	36
6.2.6. Determinación de OTA en la muestra	37
6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	38
6.3.1. Evaluaciones estadísticas preliminares	39
6.3.2. Evaluación de los parámetros de validación	40
6.3.2.1. Selectividad	40
6.3.2.2. Sensibilidad analítica	41
6.3.2.3. Límite de detección y cuantificación	41
6.3.2.4. Linealidad	42
6.3.2.5. Rango de trabajo	43
6.3.2.6. Veracidad	44
6.3.2.7. Precisión	45
6.3.2.8. Robustez	46
6.3.2.9. Incertidumbre	46
6.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS PROCEDENTES DE MERCADOS LOCALES	51
VII. RESULTADOS	51
7.1. RESULTADOS DEL DESARROLLO METODOLÓGICO	51
7.1.1. Optimización de las condiciones espectrométricas	53
7.1.2. Selección del ion precursor y de los iones producto para la detección de	

OTA	53
7.1.3. Optimización de las condiciones cromatográficas	54
7.1.4. Curva de calibración de ocratoxina A	55
7.1.5. Porcentaje de recuperación del método de extracción optimizado	55
7.1.6. Determinación de OTA en la muestra	56
7.2. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO	57
7.2.1. Evaluaciones estadísticas preliminares	57
7.2.2. Parámetros de validación evaluados	60
7.2.2.1. Selectividad	60
7.2.2.2. Sensibilidad analítica	61
7.2.2.3. Límite de detección y cuantificación	61
7.2.2.4. Linealidad	62
7.2.2.5. Rango de trabajo	63
7.2.2.6. Veracidad	64
7.2.2.7. Precisión	64
7.2.2.8. Robustez	65
7.2.2.9. Incertidumbre	67
7.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE MERCADO	71
VIII. DISCUSIÓN	72
IX. CONCLUSIONES	80
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la OTA.	10
Tabla 2. Comparación de características técnicas entre HPLC y UPLC.	21
Tabla 3. Parámetros y definiciones empleados en la validación de métodos cuantitativos según la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).	24
Tabla 4. Parámetros de validación, guías y criterios de aceptación.	26
Tabla 5. Comparación de parámetros de validación de métodos para la determinación de OTA en matrices aviares.	29
Tabla 6. Curva de calibración para OTA en matriz de músculo de pollo.	36
Tabla 7. Criterios estadísticos para la aceptación del modelo de regresión lineal.	43
Tabla 8. Condiciones espectrométricas empleadas para la detección de OTA.	53
Tabla 9. Datos espectrométricos obtenidos para la detección y cuantificación de OTA.	54
Tabla 10. Condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de OTA.	54
Tabla 11. Resultados de recuperación del método de extracción de OTA en músculo de pollo.	55
Tabla 12. Concentraciones y áreas obtenidas a partir de la curva de calibración de OTA en músculo de pollo.	56
Tabla 13. Cálculo de la concentración final de OTA en músculo de pollo.	57
Tabla 14. Resultados de la prueba de normalidad por nivel y analista.	58
Tabla 15. Resultados de la homogeneidad de varianzas entre analistas (prueba F de Fisher).	59
Tabla 16. Comparación de medias con respecto al valor teórico (t de Student).	60
Tabla 17. Resultados obtenidos para la estimación del límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de OTA en músculo de pollo.	62
Tabla 18. Resultado promedio de los 3 días de análisis: SD, LOD y LOQ.	62
Tabla 19. Coeficientes de correlación y determinación obtenidos en la evaluación de la linealidad del método.	63
Tabla 20. Resultados de las pruebas estadísticas de inferencia para la validación del modelo lineal.	63

Tabla 21. Resultados experimentales para el rango de trabajo.	64
Tabla 22. Valores de p obtenidos en la prueba t de Student.	64
Tabla 23. Comparación entre los valores de repetibilidad (%RSDr) y reproducibilidad (%RSDR) experimentales y los teóricos de Horwitz en distintos niveles de concentración de OTA.	65
Tabla 24. Factores evaluados, condiciones nominales y variaciones consideradas para la evaluación de robustez.	65
Tabla 25. Combinaciones experimentales según el diseño de Youden y Steiner y concentración de OTA obtenida.	66
Tabla 26. Comparación de valores observados (V.O.) de cada factor frente al criterio de aceptación en el estudio de robustez.	66
Tabla 27. Valores de las variables empleadas para el cálculo de la concentración final de OTA en músculo de pollo.	67
Tabla 28. Incertidumbres individuales por fuente de variabilidad.	69
Tabla 29. Contribución de los componentes de incertidumbre en la determinación de OTA.	69
Tabla 30. Incertidumbre global y expandida del método.	70
Tabla 31. Resultados de la determinación de Ocratoxina A en muestras de pollo de diferentes mercados de Lima Metropolitana.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases del crecimiento fúngico y momento de la biosíntesis de micotoxinas.	8
Figura 2. Vías del metabolismo de OTA y de sus principales metabolitos.	13
Figura 3. Diagramas de flujo del procedimiento de extracción del método de referencia y el método modificado para la determinación de OTA en músculo de pollo.	37
Figura 4. Flujograma del método desarrollado para la determinación de OTA en músculo de pollo mediante UPLC-MS/MS.	52
Figura 5. Curva de calibración de OTA en matriz de músculo de pollo.	55
Figura 6. Gráficas de prueba de normalidad para evaluar la distribución de los resultados obtenidos por ambos analistas en tres niveles: (A) Nivel I, (B) Nivel II y (C) Nivel III.	59
Figura 7. Cromatogramas obtenidos bajo tres condiciones experimentales: (A) muestra de músculo de pollo libre de OTA, (B) muestra de músculo de pollo fortificada con OTA y (C) estándar puro de OTA.	61
Figura 8. Fuentes principales de incertidumbre en la determinación de ocratoxina A.	68
Figura 9. Contribución porcentual de las fuentes de incertidumbre en la determinación de ocratoxina A en músculo de pollo.	70

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Producción de carne de ave en el Perú por especie (enero 2024 – agosto 2025).	98
Anexo 2. Procedencia del estándar de Ocratoxina A.	98
Anexo 3. Equipo de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-XS (Waters®).	99
Anexo 4. Cromatograma de los fragmentos de ocratoxina A (Cuantificación y confirmación).	100
Anexo 5. Fórmulas utilizadas para el cálculo de RSDr y RSDR.	100
Anexo 6. Resultados y análisis de Z-Score para detección de valores atípicos.	101
Anexo 7. Datos experimentales de linealidad: curvas de calibración de OTA obtenidas durante tres días de análisis.	104
Anexo 8. Datos experimentales del rango de trabajo: concentración teórica y experimental de Ocratoxina A y porcentaje de recuperación.	105
Anexo 9. Datos experimentales de veracidad: porcentaje de recuperación relativa (%).	106
Anexo 10. Datos experimentales de precisión: promedio, varianza y desviación estándar.	109
Anexo 11. Resultados del análisis estadístico de precisión: varianza de repetibilidad, entre analistas y reproducibilidad.	111
Anexo 12. Hoja de cálculo de Evaluación de la Incertidumbre de factores - Determinación de Ocratoxina A por LC-MS/MS	112

ABREVIATURAS

CIPAC: Collaborative International Pesticides Analytical Council.

ESI: Electrospray Ionization.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FDA: Food and Drug Administration.

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography.

IARC: International Agency for Research on Cancer.

ISO: International Organization for Standardization.

ISP Chile: Instituto de Salud Pública de Chile.

LC-MS/MS: Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry.

LMP: Límite Máximo Permisible.

RSD: Relative Standard Deviation.

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria.

UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatography.

RESUMEN

Introducción: La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina con efectos nefrotóxicos, hepatotóxicos y con potencial carcinogénico. Se encuentra en alimentos como cereales, frutas y café, representando un riesgo para la salud pública. Debido a que los cereales constituyen la base de la alimentación de las aves, los pollos pueden exponerse a OTA mediante el consumo de piensos contaminados, favoreciendo su persistencia en órganos y tejidos. Aunque desde la década de 1960 se han establecido límites máximos permisibles (LMP) de micotoxinas a nivel mundial, aún existen vacíos sobre los LMP de OTA en alimentos de origen animal. El pollo es una de las principales fuentes proteicas a nivel mundial y la carne más consumida en el Perú; por ello, es indispensable contar con métodos analíticos confiables que aseguren su inocuidad alimentaria. El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un método para la determinación de OTA en músculo de pollo mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS), siguiendo directrices internacionales de validación.

Metodología: Se desarrolló y validó un método analítico basado en UPLC-MS/MS para la determinación de OTA en músculo de pollo. La validación incluyó la evaluación de los parámetros de selectividad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, linealidad, rango, veracidad, precisión, robustez e incertidumbre, siguiendo los criterios de guías internacionales (FDA, SANTE, ISP Chile y Eurachem). Tras la validación, el método se aplicó a muestras obtenidas de cinco mercados de Lima Metropolitana: Lince, San Isidro, Jesús María, Miraflores y Surquillo.

Resultados: El método fue desarrollado y validado satisfactoriamente, cumpliendo con todos los criterios de validación establecidos por la FDA, SANTE, ISP Chile y Eurachem. Al aplicarse a las muestras recolectadas en los cinco mercados evaluados, no se detectaron concentraciones de OTA por encima del límite de cuantificación del método.

Conclusiones: El desarrollo y validación del método mediante UPLC-MS/MS permitió establecer una herramienta analítica confiable para la determinación de OTA en músculo de pollo. La ausencia de detección de OTA en las muestras analizadas sugiere una baja presencia del contaminante; sin embargo, evidencia la necesidad de ampliar futuras investigaciones mediante el análisis de un mayor número de muestras y otras matrices de origen animal.

Palabras clave: Ocratoxina A, Pollo, Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas, Validación

ABSTRACT

Introduction: Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin with nephrotoxic, hepatotoxic, and potential carcinogenic effects. It is found in foods such as cereals, fruits, and coffee, posing a risk to public health. Because cereals constitute the main component of poultry feed, chickens may be exposed to OTA through the consumption of contaminated feed, promoting its persistence in animal organs and tissues. Although maximum residue limits (MRLs) for mycotoxins have been established worldwide since the 1960s, gaps still exist regarding OTA MRLs in foods of animal origin. Chicken is one of the main sources of dietary protein worldwide and the most consumed meat in Peru; therefore, reliable analytical methods are essential to ensure its food safety. The objective of this study was to develop and validate a method for the determination of OTA in chicken muscle using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), following international validation guidelines.

Methodology: An analytical method based on UPLC-MS/MS was developed and validated for OTA determination in chicken muscle. Validation included evaluation of selectivity, sensitivity, limits of detection and quantification, linearity, range, accuracy, precision, robustness, and uncertainty, following international guidance (FDA, SANTE, ISP Chile, and Eurachem). After validation, the method was applied to samples obtained from five markets in Lima Metropolitana: Lince, San Isidro, Jesús María, Miraflores, and Surquillo.

Results: The method was successfully developed and met all validation criteria established by the FDA, SANTE, ISP Chile, and Eurachem. When applied to the samples collected from the five evaluated markets, no OTA concentrations were detected above the method's limit of quantification.

Conclusions: The development and validation of the UPLC-MS/MS method established a reliable analytical tool for the determination of OTA in chicken muscle. The absence of OTA detection in the analyzed samples suggests a low occurrence of this contaminant; however, it highlights the need to expand future research through the analysis of a larger number of samples and other matrices of animal origin.

Keywords: Ochratoxin A, Chicken, Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Validation

I. INTRODUCCIÓN

La avicultura constituye una de las actividades pecuarias más relevantes del Perú por su aporte económico y nutricional. Este sector representa el 27,2 % del valor bruto de la producción agropecuaria, donde la carne de ave aporta el 23,1 % y los huevos el 4,1 % (1). El pollo es la principal fuente de proteína animal, al cubrir cerca del 70 % del consumo de alimentos de origen animal en nuestro país (2). El consumo per cápita de carne de ave en el Perú es uno de los más altos a nivel mundial. Según datos del 2025, alcanza un promedio de 57,5 kg por persona al año, lo que posiciona al país como el principal consumidor de América Latina (3). Asimismo, la Asociación Peruana de Avicultura (2023) reportó que el consumo per cápita de carne de pollo fue de 52,35 kg por habitante (4). Esta elevada demanda se refleja también en la importancia productiva del sector, ya que en 2022 el Perú se ubicó como el cuarto productor de pollos en América Latina, confirmando el carácter estratégico de esta cadena productiva (5). Este patrón de consumo resalta la relevancia de la carne de pollo como fuente esencial de proteínas en la dieta de la población peruana, tanto en Lima como en el resto del país, con un consumo particularmente alto en zonas urbanas y también significativo en áreas rurales, aunque en menor magnitud. Además, el sector avícola genera más de 460 mil empleos directos e indirectos y beneficia a más de 1,8 millones de personas (2), lo que evidencia su importante aporte al desarrollo económico y social del país.

Debido al elevado consumo de pollo por la población peruana, resulta indispensable garantizar la inocuidad de este alimento durante toda la cadena de producción y comercialización. Cuando las condiciones sanitarias no son las adecuadas, los productos avícolas pueden contaminarse con diversos agentes biológicos y químicos capaces de representar un riesgo para la salud del consumidor. Entre estos contaminantes se encuentran las micotoxinas, metabolitos secundarios producidos por diversos hongos capaces de contaminar una amplia variedad de productos destinados al consumo humano y animal (6,7).

Dentro de este grupo, la ocratoxina A (OTA) es una de las micotoxinas de mayor importancia por su amplia distribución y toxicidad. Esta es producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, capaces de desarrollarse en una amplia gama de sustratos vegetales (8).

La OTA, cuya fórmula molecular es $C_{20}H_{18}ClNO_6$, está constituida por un anillo

dihidroisocumarínico unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida, formado entre el grupo carboxilo del primero y el grupo amino de la fenilalanina (9, 10). Es un compuesto incoloro, altamente estable, soluble en disolventes orgánicos polares y poco soluble en agua; además, es un ácido débil que emite fluorescencia bajo luz ultravioleta.

Dentro del grupo de las ocratoxinas también se encuentran la ocratoxina B, un derivado no clorado de la OTA con menor toxicidad, y la ocratoxina C, un éster de la OTA con escasa capacidad tóxica (9, 10). No obstante, la OTA es la más relevante desde el punto de vista toxicológico, debido a su facilidad de distribución en los organismos y poder de acumulación en órganos principales como el músculo, riñón o hígado. (7)

La presencia de esta micotoxina está estrechamente relacionada con prácticas deficientes de producción, almacenamiento y conservación de cereales y otros insumos vegetales, especialmente cuando son expuestos a condiciones de elevada humedad y temperatura (6, 7). Debido a que estos ingredientes constituyen la base de la alimentación de las aves de corral, el pienso representa la principal vía de exposición a esta micotoxina para estos animales (8).

Diversos estudios han demostrado la presencia de OTA en alimentos destinados a la producción avícola. En el Perú, Castro y col. (2015) detectaron OTA en el 66,2 % de las muestras de maíz y en el 71,9 % de las muestras de torta de soya utilizadas en la alimentación de aves comerciales (11). De manera similar, Guevara y col. (2025) reportaron la presencia de OTA en alimentos balanceados almacenados en granjas avícolas de Ucayali, aunque en bajas concentraciones (12). Estos hallazgos coinciden con lo descrito en otros países. En México se reportó que el 60 % de las muestras contaminadas presentaban concentraciones superiores a los límites establecidos (13), mientras que en Pakistán se detectó OTA en el 63,15 % de los ingredientes destinados a la alimentación animal y en el 29,17 % de los piensos analizados (14). En conjunto, estos estudios evidencian que la contaminación por OTA en alimentos destinados a aves constituye un problema, ya que representa una fuente constante de exposición para los animales.

Una vez ingerida, la OTA presenta una elevada afinidad por proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina sérica, lo que favorece su distribución y bioacumulación en órganos y tejidos animales. Además, esta micotoxina conserva su estabilidad incluso después de los procesos térmicos de cocción, por lo que puede permanecer en los alimentos destinados al consumo humano (15, 16). En consecuencia, el consumo de productos de origen animal

constituye una vía de exposición para la población, siendo el riñón y el hígado los principales órganos de acumulación, aunque también puede detectarse en músculo, la matriz de mayor consumo en la dieta humana de nuestro país (9,17).

La detección de OTA en productos cárnicos resulta relevante, debido a su presencia en diversas matrices de origen animal, reportada en diversos estudios. En carne de cerdo, Tolosa (2020) identificó prevalencias entre 5 y 20% en hígado y riñón (18). De manera similar, Sopel y col. reportaron su presencia en el 40% de productos cárnicos curados comercializados en Países Bajos, con concentraciones que alcanzaron hasta 79,8 µg/kg (19). En aves de corral, Alaboudi y col. evidenciaron la presencia de OTA en hígado, riñón y músculo de pollo, con recuperaciones superiores al 80% (17).

En el contexto nacional, se evaluó recientemente la presencia de OTA en hígado de gallinas ponedoras comercializadas en mercados formales de Lima Norte mediante UPLC-MS/MS. Aunque no se detectaron muestras positivas, el estudio estableció un límite de cuantificación de 0,8 µg/kg, proporcionando información relevante sobre la posible exposición a OTA a través del consumo de productos avícolas (20).

La exposición prolongada a OTA se ha asociado con diversos efectos adversos para la salud, principalmente alteraciones renales. En humanos, se ha relacionado con la nefropatía endémica de los Balcanes; mientras que en aves, el riñón constituye uno de los principales órganos diana, observándose lesiones renales, disminución del crecimiento y alteraciones en el rendimiento productivo. Asimismo, la OTA ha sido asociada con hepatotoxicidad y teratogenicidad. Debido a su potencial carcinogénico, la IARC la ha clasificado en el Grupo 2B como posiblemente carcinógena para los seres humanos (7, 21, 22).

Aunque la Unión Europea cuenta con normativa actualizada para micotoxinas en productos vegetales (Reglamento UE 2022/1370), aún no se han establecido límites obligatorios para tejidos animales (23). Una situación similar se observa en países como Estados Unidos, mientras que, en otros, como Eslovaquia, se han propuesto valores de referencia, estableciendo un máximo de 5 µg/kg para carne de aves de corral (24, 25). En el Perú no existen límites específicos para OTA en productos cárnicos, lo que evidencia la necesidad de generar información analítica que permita evaluar su presencia y sustentar futuras decisiones regulatorias (18).

Se entiende como límites máximos permisibles (LMP) en alimentos destinados al consumo

humano a aquellos valores normativos que establecen la concentración máxima aceptable de contaminantes físicos, químicos o biológicos, con el fin de prevenir riesgos para la salud pública. Su cumplimiento es obligatorio y su establecimiento permite la ejecución de actividades de fiscalización, constituyéndose en una herramienta fundamental para el control de la contaminación. En el Perú, SENASA es la autoridad encargada de garantizar la inocuidad agroalimentaria, mediante la vigilancia y la verificación del cumplimiento de los LMP de contaminantes como plaguicidas, medicamentos veterinarios, metales pesados, contaminantes microbiológicos y toxinas (26, 27), entre ellas las micotoxinas. Sin embargo, en el caso específico de la OTA, aún no se han establecido LMP a nivel nacional, por lo que se emplean como referencia estándares internacionales, particularmente los de la Unión Europea.

El control de micotoxinas como la OTA requiere métodos con elevada sensibilidad, selectividad y capacidad de confirmación estructural. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) ha demostrado un desempeño óptimo en diversas matrices animales, con recuperaciones adecuadas y parámetros de validación satisfactorios, como lo evidencian estudios realizados en Italia y Austria, países que, si bien cumplen con las regulaciones de la Unión Europea para OTA en insumos vegetales, han buscado cuantificar esta micotoxina en tejidos animales (16, 23).

En un estudio realizado en Italia en 2018, se desarrolló un método para la detección de OTA en muestras de aves de corral mediante LC-MS/MS, que alcanzó recuperaciones entre 82 % y 109 % y un límite de detección de 0,27 µg/kg, cumpliendo los criterios de validación y demostrando una alta eficacia analítica (23). De manera similar, una investigación reciente en Austria propuso una metodología aplicable a múltiples matrices biológicas de aves y cerdos, como hígado, riñón, músculo, piel, grasa, sangre y excretas. Mediante LC-MS/MS se logró detectar y cuantificar OTA y su metabolito OTα, con recuperaciones entre 80 % y 120 % y una precisión adecuada ($RSD \leq 15\%$), validando la efectividad de la técnica (16).

Estas investigaciones respaldan la viabilidad del uso de LC-MS/MS para el análisis de OTA en aves. Sin embargo, Perú no dispone de metodologías orientadas a la determinación de OTA en músculo de pollo, por lo que se desconoce la magnitud de la contaminación en productos avícolas comercializados para consumo humano.

El presente estudio propone la implementación de una metodología basada en UPLC-MS/MS

debido a sus ventajas frente a LC-MS/MS, ya que emplea cromatografía líquida de ultra alto rendimiento, la cual opera a mayores presiones y permite una mayor resolución, sensibilidad y tiempos de análisis más cortos, gracias al uso de columnas con partículas menores de 2 μm y menores flujos. Estas características son especialmente relevantes para la detección de compuestos como la OTA, que suele encontrarse en niveles bajos en músculo de pollo ($0,31 \pm 0,22 \mu\text{g/kg}$) (28, 29). La combinación de UPLC con espectrometría de masas en tándem y C18 absorbente, que se refiere al uso de una fase estacionaria C18 (octadecilo), constituye una herramienta analítica robusta para la separación, identificación y cuantificación de analitos en matrices complejas.

La validación de un método desarrollado previamente es un paso crucial en el proceso de demostrar que un determinado método analítico tiene la capacidad de medir adecuadamente el analito de interés (30). Este proceso implica la evaluación de parámetros clave como selectividad, sensibilidad, linealidad, rango de trabajo, veracidad, precisión, límites de detección y cuantificación, robustez e incertidumbre. Dichos parámetros deben evaluarse bajo un procedimiento documentado que establezca los criterios de aceptación, describa los ensayos necesarios y garantice la calidad de los resultados, la correcta calibración de los equipos y la competencia del personal (30).

Si bien la validación está estrechamente vinculada al desarrollo del método, debe realizarse formalmente sobre su versión final y sus resultados deben ser reportados conforme a un protocolo documentado (30). En términos generales, el proceso de validación comprende: a) la definición del requerimiento analítico, b) la selección y desarrollo del método, c) la evaluación de su desempeño, d) la determinación de su idoneidad para el propósito establecido y e) la elaboración del informe de validación (30).

Por tanto, el objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación de OTA en muestras de músculo de pollo mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS), con la finalidad de contribuir con evidencia científica que fortalezca la vigilancia de micotoxinas en el Perú. Asimismo, la metodología fue aplicada a muestras de músculo de pollo provenientes de mercados de abasto de Lima Metropolitana, para determinar la presencia de OTA, considerando este análisis como una evaluación preliminar y no representativa.

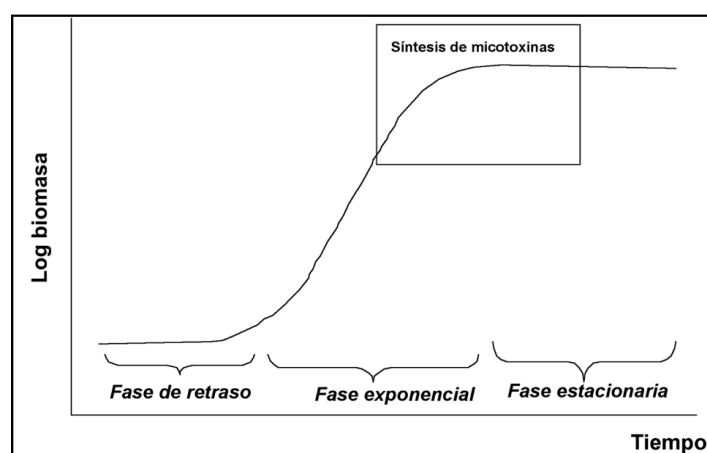
II. MARCO TEÓRICO

2.1. MICOTOXINAS

Para asegurar su supervivencia y crecimiento, los organismos del reino Fungi (hongos, setas y levaduras) producen metabolitos primarios, como proteínas y lípidos, así como metabolitos secundarios, entre los que destacan las micotoxinas. La biosíntesis de estas toxinas, es decir, la vía metabólica mediante la cual se generan, aún se encuentra en investigación; sin embargo, se reconoce que su producción ocurre al final de la fase de crecimiento exponencial del hongo y al inicio de la fase estacionaria (**Figura 1**) (6, 7).

Figura 1. Fases del crecimiento fúngico y momento de la biosíntesis de micotoxinas.

Extraído de referencia 6.



Este grupo de metabolitos secundarios es responsable de diversas intoxicaciones en humanos, animales e incluso plantas, lo que dio origen al término micotoxicosis (8). Las vías de exposición son múltiples; sin embargo, la principal ruta es la ingestión de alimentos contaminados (31). Los efectos tóxicos pueden manifestarse a corto plazo, en forma de intoxicaciones agudas, o a largo plazo, como intoxicaciones crónicas, que pueden desencadenar inmunosupresión o el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Cabe resaltar que la magnitud de los efectos depende del tipo específico de micotoxina involucrada en la contaminación alimentaria.

Las micotoxinas pueden contaminar una amplia variedad de alimentos, desde cereales hasta productos cárnicos, aprovechando tanto condiciones físicas, como daños por insectos, como

factores ambientales, tales como temperaturas cálidas, elevada humedad y valores de pH entre 4 y 8 (7, 8). Se caracterizan por su rápida proliferación y alta resistencia, lo que facilita su presencia en distintas etapas de la cadena alimentaria: desde el cultivo y la cosecha, hasta el procesamiento industrial e incluso la preparación doméstica, ya que soportan procesos de cocción a altas temperaturas. Por estas características, representan actualmente un problema alarmante para la seguridad alimentaria (32, 33, 34).

De acuerdo con la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), se han identificado más de 300 micotoxinas, aunque solo alrededor de 30 constituyen un riesgo significativo para la salud (32). Las más relevantes son producidas principalmente por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (31, 32, 35), responsables de diversas toxinas, entre las que destaca la ocratoxina A, considerada una de las más comunes y perjudiciales (30).

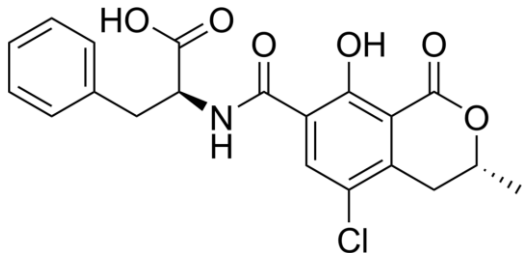
2.1.1. Ocratoxina A

La OTA es un metabolito secundario producido por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, entre ellas *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *P. verrucosum*. Su estructura química está constituida por un anillo dihidroisocumarínico unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida, formado entre el grupo carboxilo del primero y el grupo amino de la fenilalanina (**Tabla 1**) (35, 36).

Existen otras variantes de ocratoxinas como B, C, α y β , pero la OTA es la de mayor relevancia toxicológica para la salud pública. Su elevada toxicidad se atribuye a la presencia de un átomo de cloro en la posición 5 del anillo dihidroisocumarínico, el cual favorece la formación de enlaces estables y de alta afinidad con proteínas plasmáticas, particularmente con la albúmina, lo que prolonga su permanencia en el organismo (37).

Entre sus características físicas, la OTA se presenta como un cristal sólido blanquecino, inodoro y altamente estable a elevadas temperaturas, con un punto de fusión entre 168 y 173 °C. Es soluble en disolventes orgánicos polares, como cloroformo, etanol y metanol, aunque presenta muy baja solubilidad en agua. Posee dos valores de pKa (4,3 y 7,2), lo que le confiere el comportamiento de un ácido débil en función del pH del medio en que se encuentre (35, 36, 36). Asimismo, debido a la presencia del anillo cumarínico, la OTA puede absorber radiación ultravioleta y emitir fluorescencia, con tonalidades que varían entre verde y azul (35, 39).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la OTA.

OCRATOXINA A	
Fórmula estructural	
Peso molecular	403,8 g/mol
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆
Apariencia	Sólido cristalino blanquecino
Punto de fusión	168 - 173 °C
Solubilidad en agua	1 - 3 mg/L a 25 °C (muy baja)
Solubilidad en metanol	Buena
Solubilidad en cloroformo, tolueno, xileno	Alta
pKa	4,3 (ácido carboxílico), 7,2 (fenol)

Elaboración propia con datos de las referencias 35, 36, 38, 39.

2.1.1.1. Producción fúngica

La OTA fue aislada por primera vez en 1965 a partir de *Aspergillus ochraceus*. Posteriormente, se identificaron diversas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* como productoras de esta micotoxina, siendo las más relevantes *P. verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. niger* y *A. carbonarius* (35, 40, 41)

La producción y acumulación de esta micotoxina dependen principalmente de factores ambientales, especialmente de la temperatura y de la actividad del agua (*aw*, en inglés *activity of water*). En el caso del género *Aspergillus*, las condiciones óptimas de producción corresponden a temperaturas entre 20 y 35 °C y valores de *aw* de 0,95 a 0,99, lo que se asocia a climas cálidos y tropicales, característicos de regiones como América Latina y África. En contraste, las especies del género *Penicillium* producen OTA en un rango de 10 a 20 °C y con valores de *aw* entre 0,80 y 0,85, lo que favorece su desarrollo en zonas frías, como Europa y el hemisferio norte (40, 42).

2.1.1.2. Toxicocinética

La OTA puede encontrarse en una amplia variedad de alimentos, incluidos aquellos de origen animal, con especial impacto en el sector avícola. En estos casos, la principal vía de contaminación es el consumo de piensos que contienen OTA, lo que favorece su acumulación en los tejidos de las aves (39). En consecuencia, la exposición tanto en humanos como en aves ocurre principalmente por vía oral, tras lo cual la toxina sigue procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (22).

Absorción

Tanto en humanos como en aves, particularmente en pollos, la absorción de la OTA ocurre a lo largo del tracto gastrointestinal, desde el estómago hasta el colon, siendo más frecuente en el duodeno y yeyuno (22, 43). En estas regiones, el pH favorece la forma no ionizada de la molécula, lo que permite su paso por difusión pasiva a través de las membranas lipídicas. Como resultado, la biodisponibilidad oral alcanza valores de hasta 93 % en humanos y alrededor del 40 % en pollos (22, 35).

La velocidad de absorción varía entre especies: en pollos, se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas en apenas 20 minutos, mientras que en humanos alrededor de 8 horas tras la ingestión (22, 35, 43).

Distribución

Una vez en el torrente sanguíneo, la OTA presenta una elevada afinidad por la albúmina sérica, alcanzando hasta un 99,8 % de unión en humanos. Esta interacción ocurre principalmente en el sitio I de Sudlow (subdominio IIA de la albúmina), a través de enlaces hidrófobos, interacciones de Van der Waals y puentes iónicos, lo que estabiliza su forma dianiónica (38). Cabe resaltar que dicho sitio también es conocido como el “sitio de warfarina”; dado que la OTA posee una estructura cumarínica semejante a la de este fármaco, su afinidad por la albúmina resulta particularmente elevada (9). Esta unión estable explica su prolongada vida media, que puede alcanzar hasta 840 horas (≈ 35 días) en humanos (10).

Por otra parte, la OTA sufre reabsorción activa en los túbulos proximales del riñón a través de los transportadores de aniones orgánicos (OAT1), lo que incrementa su bioacumulación (15). La OTA se deposita principalmente en hígado y riñón, aunque también se ha detectado en músculo, tejido adiposo, cerebro e incluso en leche materna (35, 38).

En aves, la unión a proteínas plasmáticas sigue mecanismos similares, pero con menor afinidad, lo que favorece una distribución más rápida hacia los órganos diana: riñón, hígado, músculo e incluso huevo (43).

Metabolismo

El hígado es el principal órgano en el que la OTA se biotransforma hacia metabolitos menos tóxicos. En humanos, los metabolitos más frecuentes son la OT α , los hidroxilados 4-OH-OTA, con sus esteroisómeros 4R y 4S, y 10-OH-OTA (I, A) (**Figura 2**).

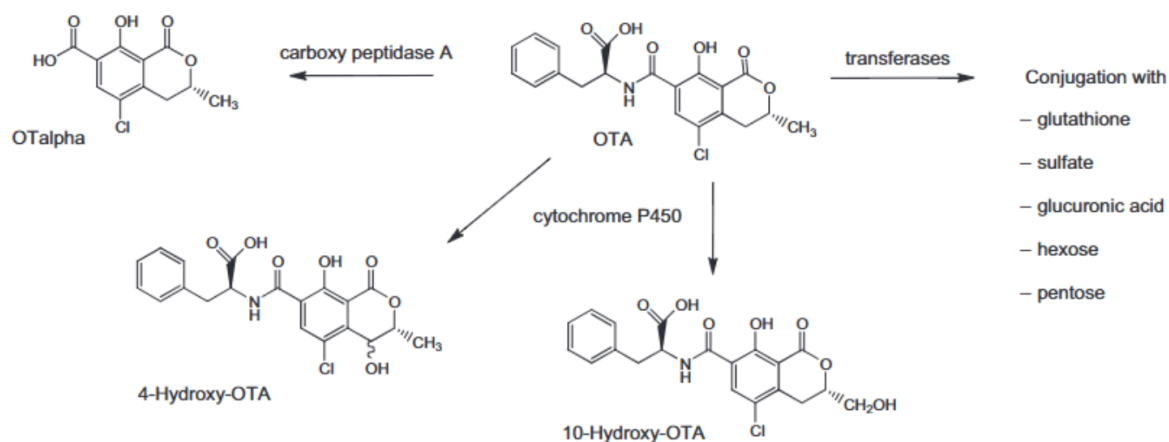
La OT α es un metabolito generado principalmente por el microbiota intestinal, mediante la hidrólisis del enlace amida entre la fenilalanina y el ácido dihidroisocumárico, catalizada por carboxipeptidasas A. Posteriormente, puede sufrir una segunda fase de conjugación formando OT α -glucurónido, un metabolito de detoxificación que no se acumula en el riñón (35, 38).

Los hidroxilados (4R- y 4S-OH-OTA, y 10-OH-OTA) son productos del metabolismo hepático mediados por el citocromo P450. Estos metabolitos son menos tóxicos que la OTA, y el 4-OH-OTA es el más abundante en el hígado humano. En menor medida, también se ha detectado la formación de 10-OH-OTA *in vivo* (35, 44). Estos metabolitos hidroxilados pueden sufrir conjugación con sulfato, ácido glucurónico, hexosas/pentosas (Hex/Pen-OTA) o glutatión (OT-GSH), lo que aumenta su hidrosolubilidad y favorece su excreción. No obstante, también se han detectado en músculo, sangre y orina, lo que indica persistencia parcial en los tejidos (38).

En aves, el metabolito predominante es la OT α (35); sin embargo, la baja eficiencia metabólica en ambas especies contribuye a la persistencia de la molécula madre, lo que incrementa su potencial nefrotóxico, inmunosupresor y genotóxico (15, 35, 44).

Figura 2. Vías del metabolismo de OTA y de sus principales metabolitos.

Extraído de referencia 35.



Excreción

En aves, la eliminación de OTA ocurre principalmente mediante las vías renal y hepatobiliar; sin embargo, este proceso es limitado, debido a la elevada afinidad de la micotoxina por proteínas plasmáticas, lo que favorece su bioacumulación principalmente en órganos como el hígado y el riñón. Aquello ha sido evidenciado en estudios experimentales, como el realizado en Egipto en 2017, donde pollos de engorde expuestos a OTA presentaron lesiones degenerativas en hígado, riñón e intestino (45).

Con respecto a los humanos, la vía renal es la más relevante, donde participan los transportadores de aniones orgánicos (OATs): el OAT1 en el riñón y el OAT3 en hígado y cerebro, los cuales facilitan la captación de la toxina desde los tejidos. Posteriormente, el MRP2 transporta la toxina hacia la orina. El pH urinario influye notablemente en este proceso, ya que condiciona la reabsorción de la OTA. Los principales compuestos excretados por esta vía son la OTA y su metabolito OTα, tanto en humanos como en pollos (44).

Por otro lado, la excreción hepatobiliar es la más común en roedores, aunque también ocurre en humanos y otras especies. En este caso, intervienen los transportadores MRP2 y BCRP, que permiten la secreción hacia la bilis y, posteriormente, la eliminación por vía fecal (38).

Finalmente, la excreción a través de la leche materna constituye otra vía relevante, ya que las propiedades fisicoquímicas de la OTA (peso molecular y lipofilicidad) facilitan su paso a esta secreción. De hecho, se han detectado OTA y OTα en sangre y leche de mujeres durante los primeros días de lactancia (35).

2.1.1.3. Toxicidad

La OTA es reconocida como una de las micotoxinas más tóxicas, principalmente por su efecto nefrotóxico (46). Su órgano diana es el riñón, especialmente los túbulos proximales, donde puede provocar degeneración y fibrosis. En estudios experimentales con animales, también se ha observado el desarrollo de tumores renales y del tracto urinario tras exposiciones prolongadas (8). Estos efectos han sido ampliamente descritos en diferentes especies, entre ellas cerdos, ratas y aves (8, 42).

En aves, el riñón constituye uno de los principales órganos afectados, debido a la elevada afinidad de la OTA por proteínas plasmáticas, lo que favorece su distribución y acumulación en los tejidos (47). Diversos estudios han demostrado que la exposición a OTA produce hipertrofia de las células epiteliales de los túbulos proximales, degeneración y necrosis tubular, acompañadas de alteraciones en la función renal (47, 48). Asimismo, en pollos de engorde, se ha asociado con una disminución de la tasa de crecimiento, menor eficiencia alimenticia y mayor incidencia de nefropatía (48). En gallinas ponedoras, la exposición a OTA reduce el rendimiento productivo, reflejado en una disminución del número y del peso de los huevos (48).

En humanos, la exposición crónica a OTA se ha relacionado con diversas alteraciones renales. Entre ellas destaca la nefropatía endémica de los Balcanes (NEB), una enfermedad renal crónica y letal que afecta a poblaciones del sureste europeo, caracterizada por una progresión lenta del daño renal y una alta incidencia de cánceres uroteliales (49, 50). Aunque la etiología de esta enfermedad es multifactorial, diversos estudios han propuesto que la OTA pudiera actuar como un cofactor en su desarrollo. En este contexto, un estudio experimental publicado en 2025 demostró que la administración diaria de OTA en ratas produjo daño progresivo en los túbulos proximales corticales y favoreció el desarrollo de tumores renales, aportando evidencia experimental que respalda dicha hipótesis (51).

De manera consistente, diversos estudios han reportado concentraciones de OTA significativamente más elevadas en sangre de pacientes con enfermedad renal crónica, particularmente en aquellos sometidos a diálisis, en comparación con individuos sanos (22). Por ejemplo, Abid y col. (2003) evaluaron a 244 pacientes con distintas nefropatías y detectaron OTA en el 95 % de las muestras correspondientes a pacientes con nefropatía

intersticial crónica de causa desconocida, con una concentración media de 52,7 ng/mL, mientras que en el grupo control la concentración media fue de 2,6 ng/mL (52). Estos resultados respaldan la posible asociación entre la exposición crónica a OTA y la progresión del daño renal en humanos. Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado estudios en el Perú que evalúen los niveles de OTA en pacientes con enfermedad renal crónica, lo que evidencia un importante vacío de conocimiento en el contexto de la salud pública nacional.

Además de su nefrotoxicidad, la OTA presenta propiedades inmunotóxicas, teratogénicas, hepatotóxicas, neurotóxicas, genotóxicas y carcinogénicas, razón por la cual la IARC la ha clasificado en el Grupo 2B, como posiblemente carcinógena en humanos (7, 8, 23, 53).

A nivel celular, su toxicidad se explica por varios mecanismos: induce estrés oxidativo mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), altera la señalización celular, afecta la regulación de genes, daña el ADN e interfiere con la respiración mitocondrial (49, 53). Estos efectos combinados contribuyen a su amplia gama de daños potenciales en distintos órganos. No obstante, la evidencia directa en humanos aún es insuficiente, por lo que se necesitan más investigaciones que permitan entender completamente los riesgos asociados, considerando que su toxicidad está influenciada por la dosis y el tiempo de exposición (54).

2.1.1.4. Regulaciones y límites

La normativa europea, mediante el Reglamento (CE) 1831/2003 y su actualización 2022/1370, establece límites máximos de OTA principalmente en productos de origen vegetal, como cereales, granos de café y semillas (24). Además, la Recomendación 2006/576/CE fija un valor guía de 100 µg/kg de OTA en piensos completos para aves, con el fin de prevenir efectos adversos en su salud (47, 55). Este valor guía se estableció con base en estudios experimentales que demostraron que la toxicidad de la OTA en aves depende de la dosis y del tiempo de exposición, observándose alteraciones renales y productivas conforme aumenta la concentración de la micotoxina en el alimento. No obstante, aún no se han establecido límites obligatorios de OTA en productos cárnicos, lo que ha llevado a algunos países a establecer directrices orientativas propias.

En este contexto, Eslovaquia ha sido pionera al fijar un valor de referencia de 5 µg/kg para carne de aves de corral destinada al consumo humano. En cuanto a otras especies, se observan regulaciones similares en porcinos: Dinamarca establece un valor de referencia de 10 µg/kg en

riñón; Estonia, 10 µg/kg en hígado; Rumania, 5 µg/kg en riñón, hígado y músculo; Eslovaquia, 5 µg/kg en músculo; e Italia impone una normativa más estricta con un valor de referencia de 1 µg/kg en carne de cerdo y embutidos (56). Sin embargo, salvo el caso eslovaco, ninguna de estas disposiciones contempla explícitamente la carne de pollo, lo que evidencia un vacío normativo en la protección frente a esta micotoxina en productos avícolas.

En el ámbito científico, estudios realizados en condiciones controladas han demostrado la capacidad de la OTA para bioacumularse en tejidos de aves de corral (21). Por ejemplo, Zaghini y col. administraron una dieta suplementada con 0,2 mg/kg de OTA a gallinas ponedoras durante 12 semanas, detectando su presencia en riñón ($2,47 \pm 1,10$ µg/kg), sangre ($1,06 \pm 0,48$ µg/kg) y músculo ($0,31 \pm 0,22$ µg/kg) (57). Asimismo, Biró y col. reportaron la acumulación de OTA en pollos de engorde expuestos a una dieta contaminada con 0,5 mg/kg durante 4 semanas, encontrando niveles de 0,84 µg/kg en muslo y pechuga (28).

Nuevamente estos hallazgos evidencian que la acumulación de OTA en tejidos aviares depende principalmente de la concentración administrada y el tiempo de exposición. Sin embargo, se requiere mayor investigación para establecer con precisión los riesgos asociados al consumo de productos cárnicos avícolas contaminados y para respaldar la implementación de límites regulatorios específicos.

2.2. AVICULTURA

La avicultura se define como la crianza y el cuidado de aves, con fines comerciales, de autoconsumo u otros. Es uno de los sectores más dinámicos y productivos dentro de la ganadería, contribuyendo considerablemente a la provisión de proteínas mediante la producción de carne y huevos (58). Este concepto abarca una variedad de especies, como pollos, gallinas, pavos, entre otras; destacándose el pollo como la especie con mayor producción dentro de la población avícola (**Anexo 1**) (58, 59).

En el Perú, la avicultura es una de las actividades agropecuarias más importantes, tanto por su impacto económico como por su aporte nutricional. En agosto del 2025, este sector representó el 27,2 % del Valor Bruto de la Producción Agropecuaria, distribuido en un 23,1% correspondiente a carne de ave y un 4,1% a huevos de gallina (1). La carne de pollo se ha consolidado como la principal fuente de proteína animal para la población, al cubrir cerca del 70% del consumo total de origen animal (2).

Perú ocupa el cuarto lugar en producción de carne de pollo en América Latina (3), con Lima como principal zona productora (60%), seguida por La Libertad (18%) y Arequipa (8%) (60). Asimismo, el país lidera el consumo per cápita de carne de pollo en Latinoamérica, lo que evidencia una demanda elevada y sostenida (4, 61). Además de su relevancia nutricional, el sector avícola genera más de 460 mil empleos y beneficia a 1,8 millones de personas (2), evidenciando su importancia económica y social en el país.

Sin embargo, la industria avícola enfrenta desafíos relevantes relacionados con la inocuidad alimentaria, especialmente por la contaminación de insumos con micotoxinas. La OTA representa una amenaza significativa, ya que las aves de corral son más sensibles a esta toxina en comparación con los mamíferos (47). Estudios internacionales indican que la OTA está presente en el 31 % de los ingredientes de alimentos y en el 38 % de los piensos completos para aves, con concentraciones promedio de 51 µg/kg y 75 µg/kg (62), respectivamente. Esta micotoxina afecta la salud intestinal de las aves, generando disbiosis, aumento de la permeabilidad intestinal y daño en órganos, lo que repercute en su bienestar y productividad (47).

2.2.1. Gestión sanitaria y alimentaria en la producción avícola

Para garantizar la productividad de las aves de corral, es importante implementar un programa de manejo integral que considere factores como el ambiente, el clima, las instalaciones, la inocuidad del alimento y condiciones sanitarias. En Perú, la entidad a cargo de ejecutar y concretar estos programas es SENASA. En 2014, elaboró una guía de Buenas Prácticas Avícolas teniendo como fin asegurar la calidad de los alimentos, la sanidad y el bienestar animal (63).

Dentro de este marco, el manejo sanitario desempeña un papel clave en la prevención de enfermedades que puedan afectar la salud pública y la calidad de los productos. Este debe incluir la implementación de protocolos de bioseguridad para el personal encargado, limpieza y desinfección de las instalaciones, uso responsable de medicamentos veterinarios y supervisión constante por parte de médicos veterinarios (64).

Por otro lado, asegurar la calidad de los piensos es esencial, ya que constituyen una vía crítica de exposición a contaminantes como la OTA, una micotoxina que puede estar presente debido al uso de ingredientes contaminados o a malas prácticas de almacenamiento (17). Su presencia

puede representar un riesgo para la salud del consumidor, debido a su transferencia a tejidos comestibles del ave, como el músculo (pechuga) (16, 35).

La OTA se desarrolla en condiciones favorables como humedad relativa superior al 70 % y temperaturas entre 25 °C y 30 °C (6, 7, 54). Otras fuentes de contaminación incluyen materias primas afectadas, limpieza deficiente, y fallas en transporte o almacenamiento. Por ello, es indispensable aplicar medidas preventivas como el análisis regular de materias primas y productos terminados, trazabilidad de los insumos, y almacenamiento en ambientes secos, ventilados y con temperatura controlada (7, 8, 65).

Desde el enfoque regulatorio, es necesario establecer y monitorear los límites máximos permisibles de micotoxinas tanto en piensos como en productos avícolas. Estos controles, junto con la fiscalización por autoridades sanitarias y profesionales veterinarios, son fundamentales para garantizar productos seguros que cumplan con los estándares nacionales e internacionales (63, 65).

2.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICOTOXINAS

La determinación de OTA en diversos alimentos, incluidos los cárnicos, requiere contar con métodos analíticos sensibles, específicos y reproducibles. Entre las técnicas más empleadas destacan las cromatográficas, en particular la cromatografía líquida de alta resolución (high-performance liquid chromatography, HPLC) y la cromatografía líquida de ultra desempeño (UPLC). Estas suelen complementarse con sistemas de detección de alta sensibilidad, capaces de identificar la micotoxina incluso en bajas concentraciones.

2.3.1. Cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una técnica instrumental analítica utilizada para separar compuestos de una misma mezcla, que permite de manera simultánea la identificación, purificación y cuantificación del analito. (66-68). Este utiliza el principio de afinidad diferencial de las moléculas hacia la fase móvil y la fase estacionaria. De ellas, como su mismo nombre lo dice, la fase "móvil" es líquida y transporta la muestra disuelta a través del cromatógrafo. Esta puede estar compuesta por uno o varios disolventes. En cuanto a la fase estacionaria, esta se encuentra contenida en la columna, generalmente constituida por materiales como sílice o C18, cuya función es retener y separar los analitos según sus afinidades o interacciones específicas.

El equilibrio dinámico entre el analito, la fase móvil y la fase estacionaria es fundamental para lograr el aislamiento de los componentes. Dicho equilibrio depende de las propiedades fisicoquímicas del analito, en función de las cuales se seleccionan las fases más adecuadas para el procedimiento. Cuando el analito presenta mayor afinidad por la fase estacionaria, queda retenido en esta, lo cual suele deberse a interacciones moleculares, diferencias de tamaño o fenómenos de adsorción. En cambio, si el analito interactúa con mayor afinidad con la fase móvil, el comportamiento estará determinado principalmente por la polaridad y por interacciones químicas como fuerzas iónicas o la formación de puentes de hidrógeno. Una vez seleccionadas las fases que favorecen el equilibrio, la difusividad de la molécula determinará su retención o elución. Este proceso se refleja en los tiempos de retención registrados en la columna, los cuales permiten la separación e identificación de los compuestos que están en la muestra (66).

Las ventajas de emplear cromatografía líquida, como HPLC o UPLC, frente a otros tipos de cromatografía no líquida, radican en la precisión del proceso de separación molecular, la alta sensibilidad hacia los componentes de interés y la capacidad de analizar una amplia variedad de moléculas, independientemente de su volatilidad u otras características (69).

2.3.2. HPLC y UPLC: Diferencias y aplicaciones

2.3.2.1. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, en inglés) es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas en diversos análisis, cuyo objetivo es identificar, cuantificar y separar compuestos presentes en diferentes tipos de muestras líquidas (68). Al igual que toda cromatografía líquida, se basa en el equilibrio dinámico entre el analito y las fases móvil y estacionaria; por ello, el aislamiento dependerá de las interacciones preferenciales con cada fase, lo que se refleja en el tiempo de retención y en la posterior identificación del analito. Este fenómeno puede comprenderse a través de la constante de retención (K), la cual indica el grado de afinidad del analito por la fase estacionaria. Valores altos de K implican mayor retención y afinidad hacia la fase estacionaria, mientras que valores bajos indican mayor interacción con la fase móvil (70).

La elución puede realizarse en modo isocrático o en gradiente. En el modo isocrático se emplea una sola fase móvil que permanece constante durante todo el análisis (66, 71). En cambio, el

modo en gradiente utiliza dos fases móviles (A y B), cuyas proporciones varían progresivamente durante la corrida, de acuerdo con las características del analito a determinar. Generalmente, la fase A es de naturaleza acuosa y la fase B es de naturaleza orgánica. Este sistema en gradiente permite ajustar la polaridad de la corrida, mejorando la resolución y el aislamiento del analito (71). En el caso de micotoxinas como la OTA, suele emplearse un gradiente en favor de la fase B debido a su polaridad, lo que optimiza la separación y resolución en matrices complejas con múltiples interferentes (68).

El sistema HPLC puede emplearse en los modos normal y reverso. En el modo reverso, la fase móvil es polar y la fase estacionaria es no polar, por lo que los compuestos menos polares presentan una mayor retención, mientras que los más polares eluyen con mayor rapidez. En el modo normal ocurre lo contrario: la fase estacionaria es polar y la fase móvil menos polar, lo que invierte el comportamiento de retención de los compuestos (68).

El principio de funcionamiento del HPLC inicia con la inyección de la muestra contenida en viales. Esta es arrastrada por la fase móvil a través de la columna, que contiene partículas de 3 a 5 μm . El sistema cuenta con una bomba que genera el flujo y la presión necesaria para impulsar la fase móvil y transportar el analito. Al atravesar la fase estacionaria, ocurre la separación basada en interacciones fisicoquímicas. Finalmente, mediante un sistema de detección acoplado, como la espectrometría de masas, es posible identificar y cuantificar el analito (66-68).

2.3.2.2. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

La Cromatografía Líquida de Ultra Desempeño (UPLC, en inglés) es una técnica analítica basada en los mismos principios fundamentales del HPLC, ya que constituye una evolución de esta. Sin embargo, presenta mejoras significativas en tres aspectos principales: velocidad de análisis, resolución del cromatograma y sensibilidad (72). Este sistema fue desarrollado bajo el fin de optimizar tiempos de análisis y permitir la detección de analitos de difícil identificación. En UPLC, se emplean columnas empacadas con partículas de aproximadamente 2 μm , capaces de operar a presiones de 15000 - 18 000 psi (72-74). El fundamento de estas mejoras puede explicarse mediante la ecuación de Van Deemter (S):

$$H = A + \frac{B}{v} + C(v)$$

Donde:

- H = Altura del plato teórico
- A = Difusión turbulenta (las moléculas no atraviesan la columna de manera lineal y presentan diferentes tiempos de paso)
- B = Difusión longitudinal
- C = Resistencia a la transferencia de masa
- v = Velocidad de flujo

Asimismo, la relación entre eficiencia y columna se expresa como:

$$H = \frac{L}{N}$$

Donde:

- L = Longitud de la columna
- N = Número de platos teóricos

Esta ecuación demuestra que el tamaño de partícula está directamente relacionado con la eficiencia de separación: cuanto más pequeñas son las partículas, menor es la altura del plato teórico y mayor la definición de los picos cromatográficos. Aunque esta optimización incrementa la presión interna, el UPLC incorpora diseños adaptados que permiten mantener la eficiencia sin pérdida de carga (72). Además, el sistema reduce el consumo de solvente, lo que lo convierte en un método más eficiente y sostenible.

En la **Tabla 2**, se compara las características técnicas de HPLC y UPLC.

Tabla 2. Comparación de características técnicas entre HPLC y UPLC.

	HPLC	UPLC
Tamaño de partícula	3 - 5 um	< 2 um
Presión soportada	6,000 psi max	18,000 psi max
Resolución	Buena	Mayor resolución
Velocidad de corrida	10 - 30 min	1,5 - 10 min
Sensibilidad	Buena	Mayor sensibilidad
Consumo de solventes	Mayor	Menor

Costo	Menor	Mayor
Compatibilidad con equipos	Amplia	Requiere sistemas compatibles

Elaboración propia con datos de las referencias 66-74.

2.3.3. Acoplamiento con espectrometría de masas

La cromatografía líquida puede acoplarse a diversas técnicas instrumentales para obtener información más precisa sobre los analitos. Entre ellas, se encuentra la espectrometría de masas (MS) debido a su alta sensibilidad y capacidad de identificación.

La MS permite hallar, seleccionar y cuantificar átomos, moléculas e incluso macromoléculas. El proceso inicia con la ionización de las moléculas del analito, que posteriormente son separadas de acuerdo con su relación masa/carga (m/z), y finalmente detectadas. Cada compuesto genera un patrón único de picos, que revela su estructura y composición, conocido como espectro de masas o “huella molecular” (75, 76).

El sistema de MS se compone de tres partes principales:

- Fuente de ionización
- Analizador de masas
- Detector

En el caso de la cromatografía líquida, la interfase entre ambas técnicas permite adaptar el analito, vaporizando o nebulizando la fase móvil líquida para su posterior ionización.

Las fuentes de ionización más utilizadas son:

- **ESI (Electrospray Ionization):** convierte la muestra líquida en un spray de gotas finas bajo un campo eléctrico, ionizando las moléculas.
- **APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization):** evapora el líquido y genera iones mediante descargas eléctricas.
- **APPI (Atmospheric Pressure Photoionization):** empleada para compuestos no polares difíciles de ionizar, mediante radiación UV.

Posteriormente, los iones generados se separan en el analizador de masas, como los cuadrupolos, según su relación m/z . Finalmente, llegan al detector, donde la señal se amplifica para obtener el espectro de abundancia relativa de cada ion.

Esta técnica es especialmente útil en combinación con la cromatografía líquida, ya que permite una identificación precisa, selectiva y altamente sensible, incluso en matrices complejas o cuando los analitos se encuentran en concentraciones muy bajas, como ocurre en los sistemas UPLC-MS/MS (77). El uso de ionización por electrospray (ESI) y de analizadores de triple cuadrupolo permite alcanzar una alta sensibilidad, con límites de cuantificación inferiores a 1 ng/g, incluso en matrices complejas. Un ejemplo de ello es el estudio de Zhang y col., donde se logró la detección de aproximadamente 50 micotoxinas en muestras de maíz. Este tipo de aplicaciones evidencia como la combinación de ambas técnicas constituye una herramienta poderosa, eficaz y eficaz para estudios que involucran múltiples analitos de distinta naturaleza dentro de una misma matriz (78).

2.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validar métodos analíticos es un proceso necesario en todo laboratorio, ya que permite garantizar que los resultados generados sean precisos, reproducibles y adecuados para el propósito analítico establecido. Este procedimiento tiene como objetivo demostrar, mediante fundamentos técnicos y estadísticos, que un método es eficaz para el análisis previsto bajo condiciones específicas (30, 79).

De acuerdo con las directrices internacionales emitidas por organizaciones como ISO y FDA, existen distintos enfoques de validación dependiendo del tipo de método empleado (30, 80):

- Métodos no normalizados: Son desarrollados internamente por el laboratorio o que son completamente nuevos. Al no haber sido previamente evaluados por organismos acreditados, requieren una validación completa, que cubra todos los parámetros pertinentes.
- Métodos normalizados con modificaciones relevantes: Son los métodos previamente estandarizados, pero que han sufrido cambios significativos, ya sea en la matriz analizada, en el equipamiento, en los reactivos o en las condiciones experimentales. Estas modificaciones pueden afectar el rendimiento del método, por lo que se requiere una validación parcial o completa, dependiendo del grado de alteración.

- Métodos normalizados sin modificaciones: Son procedimientos establecidos por organismos reconocidos (como ISO o FDA), y que se aplican sin cambios. Para estos, no se requiere una validación completa, sino una verificación, que tiene por objetivo confirmar que el laboratorio es capaz de ejecutar correctamente el método bajo sus condiciones específicas y obtener resultados comparables a los originalmente publicados (30, 79).

La validación analítica requiere el cumplimiento de una serie de parámetros, cuya selección dependerá del objetivo del análisis (cualitativo o cuantitativo), del tipo de técnica utilizada (química, microbiológica, espectroscópica, etc.) y del contexto regulatorio (79, 80). Un ejemplo representativo se encuentra en la guía de validación de métodos químicos del Programa de Alimentos de Medicina Veterinaria de la FDA, la cual establece parámetros diferenciados para análisis cualitativos y cuantitativos, según el propósito analítico del método (80). Esta clasificación distingue entre:

- Método cuantitativo: Confirmación de identidad del analito, Selectividad, Linealidad, Sensibilidad analítica, Límite de detección, Límite de cuantificación, Veracidad, Recuperación, Rango, Robustez e Incertidumbre.
- Método cualitativo: Confirmación de identidad del analito, Sensibilidad, Selectividad, Falso positivo, Falso negativo, Concentración mínima detectable y robustez.

En el presente estudio, para la validación del método analítico destinado a la determinación de OTA en músculo de pollo, se consideraron los parámetros establecidos para un método cuantitativo. En la **Tabla 3** se describen las definiciones de dichos parámetros, mientras que en la **Tabla 4**, se detallan los criterios de aceptación correspondientes.

Tabla 3. Parámetros y definiciones empleados en la validación de métodos cuantitativos según la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

Parámetro	Definición
Selectividad	Capacidad del método para identificar y cuantificar de manera adecuada el analito de interés, aun en presencia de posibles interferentes, como impurezas, degradantes o componentes de la matriz.

Sensibilidad analítica	Relación entre la variación de la señal de respuesta instrumental y los cambios en la concentración del analito, que refleja la capacidad del método para detectar pequeñas variaciones en su concentración.
Límite de detección (LOD)	Mínima concentración del analito que puede ser detectada.
Límite de cuantificación (LOQ)	Mínima concentración del analito que puede ser cuantificada con exactitud y precisión aceptable.
Linealidad	Capacidad del método para generar resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro del intervalo de trabajo establecido.
Rango de trabajo	Intervalo comprendido entre las concentraciones más bajas y altas del analito en la muestra.
Veracidad	Grado de correspondencia entre el valor promedio obtenido mediante varias mediciones y el valor de referencia aceptado. Se evalúa comúnmente mediante estudios de recuperación.
Precisión	Expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones independientes realizadas bajo condiciones específicas. Se subdivide en (81): - Repetibilidad: mediciones bajo las mismas condiciones operativas. - Precisión intermedia/Reproducibilidad intralaboratorio: incluye variaciones entre días, analistas o equipos. - Reproducibilidad interlaboratorio: se refiere a la precisión entre diferentes laboratorios.
Robustez	Capacidad del método para conservar su desempeño frente a cambios intencionales en los parámetros, como temperatura, pH, tiempo de extracción, entre otros. Evalúa la confiabilidad del método bajo condiciones no ideales.
Incertidumbre	Variabilidad y posibles errores asociados con la medición del analito en la muestra.

Elaboración propia con datos de las referencias 30, 79, 81, 82, 83, 84.

Tabla 4. Parámetros de validación, guías y criterios de aceptación.

Parámetro	Guía de referencia	Criterio de aceptación
Selectividad	ISP Chile, Eurachem	Comparar el estándar del analito, la matriz blanca y fortificada; iones característicos del analito deben coincidir con el estándar; ausencia de interferencias en el blanco.
Sensibilidad analítica	ISP Chile	Evaluada a través de la pendiente de la curva de calibración.
Límite de detección (LOD)	ISP Chile	Si $LMP < 100 \mu\text{g/kg} \rightarrow LOD \leq 1/5 LMP$
Límite de cuantificación (LOQ)	ISP Chile	Si $LMP < 100 \mu\text{g/kg} \rightarrow LOQ \leq 2/5 LMP$
Linealidad	ISP Chile	Coefficiente de correlación (r^2) $\geq 0,98$.
Rango de trabajo	ISP Chile	$r^2 \geq 0,98$ en el rango de concentraciones evaluado.
Veracidad (recuperación)	Comisión Europea	70 – 120%.
Precisión	Comisión Europea	Repetibilidad ($\%RSD_r$) $\leq 20\%$. Reproducibilidad intralaboratorio ($\%RSD_R$) $\leq 30\%$.
	CIPAC	$\%RSD_{exp} < \%RSD_{Horwitz}$
Robustez	ISP Chile	Variación observada (V.O.) $< \sqrt{2} \times SD$.
Incertidumbre	Eurachem	Estimada mediante combinación de fuentes de incertidumbre; valor debe ser compatible con el uso previsto del método.

*LMP = Límite Máximo Permisible. *Elaboración propia con datos de las referencias 30, 79, 85, 86.*

2.5. ANTECEDENTES

Krisztina Biró y col. (2002), en su estudio titulado “*Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens*”, evaluaron la distribución tisular de la OTA en pollos de engorde expuestos semanalmente a 0,5 mg/kg de la micotoxina durante cuatro semanas, simulando condiciones reales de campo. Las concentraciones plasmáticas y los residuos en músculo, hígado y riñón fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia y por ELISA. El método por HPLC presentó un límite de detección de 10 µg/L. Las recuperaciones variaron según el tejido: entre 48–74% para riñón, 42–66,2% para hígado, y 52–72,6% para músculo. Además, observaron que los niveles de OTA disminuían progresivamente en hígado y riñón conforme avanzaban las semanas de exposición. Los autores concluyeron que las diferencias entre ambos métodos analíticos se deben principalmente al proceso de extracción y limpieza, siendo el HPLC más específico al detectar la molécula original de la micotoxina (28).

Paoloni y col. (2018), en “*Development and validation of LC-MS/MS method for the determination of Ochratoxin A and its metabolite Ochratoxin α in poultry tissues and eggs*”, desarrollaron y validaron un método para cuantificar OTA y OTα en tejidos avícolas (hígado, riñón, músculo) y huevos, empleando una ionización positiva para OTA y negativa para OTα. En músculo de pollo, la curva de calibración mostró buena linealidad en el rango de 0,50–15,10 µg/L ($r^2 > 0,99$). El LOD fue de 0,27 µg/L y el LOQ de 0,82 µg/L. Las recuperaciones, obtenidas mediante fortificación con 1–10 µg/kg de OTA, fueron de aproximadamente 92%, con valores de RSD de repetibilidad de 11% y 10%, respectivamente (23).

Youyou Yang y col. (2021), en su estudio titulado “*Simultaneous Determination of 23 Mycotoxins in Broiler Tissues by Solid Phase Extraction UHPLC-Q/Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry*”, desarrollaron y validaron un método para la determinación simultánea de 23 micotoxinas, incluyendo OTA, en tejidos de pollo (músculo, hígado y riñón). El procedimiento empleó UHPLC acoplado a espectrometría de masas de alta resolución (Orbitrap), utilizando ESI negativo para OTA. En músculo de pollo, el método mostró una buena linealidad en el rango de 3–240 µg/L ($r^2 > 0,99$). Asimismo, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron de 0,6 µg/kg y 2 µg/kg, respectivamente. Las recuperaciones, evaluadas mediante fortificación a tres niveles (3, 6 y 15 µg/kg), fueron de 70%, 85% y 66%, con valores de Relative Standard Deviation (RSD) de 6,5%, 5,5% y 7,5%,

respectivamente. Los autores concluyeron que el método presenta alta sensibilidad y buena precisión; sin embargo, no se detectaron residuos de OTA en muestras reales de músculo de pollo, lo que sugiere una baja incidencia de esta micotoxina en dicha matriz (87).

Streit y col. (2022), en su artículo *“Toolbox for the Extraction and Quantification of Ochratoxin A and Ochratoxin Alpha Applicable for Different Pig and Poultry Matrices”*, desarrollaron y validaron un método para la extracción y cuantificación de ocratoxina A (OTA) y su metabolito ocratoxina α (OT α) en matrices porcinas y avícolas, incluyendo músculo, hígado, riñón, piel y grasa. El análisis cuantitativo se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con ionización ESI negativa. En el caso de músculo de pollo, se obtuvo buena linealidad en un rango de 0,50–200 $\mu\text{g/kg}$, con coeficientes de determinación (r^2) superiores a 0,99 tanto para OTA como para OT α . El límite de detección (LOD) fue de 0,15 $\mu\text{g/kg}$ y el límite de cuantificación (LOQ) de 0,5 $\mu\text{g/kg}$. La precisión intermedia, evaluada en dos días, mostró RSD de 10% para OTA y 13% para OT α . En cuanto a la estabilidad en músculo de pollo, la OTA presentó recuperaciones de 99–125% a temperatura ambiente durante 2 días, 103–111% a 4 °C durante 7 días y 95–103% a –20 °C durante 30 días, recomendándose esta última condición para almacenamiento prolongado (16).

Lešić y col. (2025), en *“Mycotoxin Residues in Chicken Breast Muscle and Liver”*, determinaron la presencia de ocho micotoxinas, incluyendo OTA, en músculo e hígado de pollo mediante HPLC-MS/MS. Para OTA, la curva de calibración presentó buena linealidad en el rango de 0,20–5,00 $\mu\text{g/kg}$ ($r^2 > 0,99$). El LOD fue de 0,18 $\mu\text{g/kg}$ y el LOQ de 0,59 $\mu\text{g/kg}$. La recuperación alcanzó un valor de 119,4%, evidenciando concentraciones más elevadas en músculo que en hígado (88).

Tabla 5. Comparación de parámetros de validación de métodos para la determinación de OTA en matrices aviares.

Autor (Año)	Matriz	Técnica analítica	Ionización	Rango de linealidad (r^2)	LOD	LOQ	Recuperación (%)	Precisión (% RSD_r)*
Biró y col. (2002)	Músculo, hígado y riñón de pollo	HPLC con detector de fluorescencia	-	-	10 µg/L	-	52 - 72,6	-
Paoloni y col. (2018)	Músculo de pollo	HPLC-MS/MS	ESI positivo	0,50 – 15,10 µg/L ($r^2 > 0,99$)	0,27 µg/L	0,82 µg/L	92	10–11
Yang y col. (2021)	Músculo de pollo	UHPLC-Q/Orbitrap	ESI negativo	3 – 240 µg/L ($r^2 > 0,99$)	0,6 µg/kg	2 µg/kg	70	6,5
Streit y col. (2022)	Músculo de pollo	LC-MS/MS	ESI negativo	0,50 – 200 µg/kg ($r^2 > 0,99$)	0,15 µg/kg	0,5 µg/kg	114	10
Lešic y col. (2025)	Músculo e hígado de pollo (mezcla)	HPLC-MS/MS	-	0,2 – 5 µg/kg ($r^2 > 0,99$)	0,18 µg/kg	0,59 µg/kg	119,40	–

* RSD_r = desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (intra-día). *Elaboración propia con datos de las referencias 16, 23, 28, 87,*

III. JUSTIFICACIÓN

La avicultura es uno de los sectores más importantes del Perú, ya que aporta cerca del 70% de la proteína animal consumida por la población (2). Al ser un alimento de consumo masivo, el pollo debe cumplir rigurosos controles de calidad para garantizar su inocuidad y cumplir con las regulaciones sanitarias vigentes (63). No obstante, la presencia de contaminantes emergentes como la OTA constituye un riesgo para la seguridad alimentaria. En el Perú, el consumo de carne de pollo alcanza aproximadamente 52,35 kg por persona al año, equivalente a cerca de 1 kg semanal (4), lo que la convierte en una de las principales fuentes de proteína animal del país. En comparación, el consumo de subproductos avícolas, como vísceras comestibles (hígado y riñón), alcanza aproximadamente 3,5 kg por persona al año (20). Esta diferencia evidencia la importancia de evaluar la presencia de contaminantes como la OTA en carne de pollo, debido a su elevada frecuencia de consumo y potencial exposición de la población.

La OTA es una micotoxina de alta relevancia toxicológica debido a sus efectos nefrotóxicos, inmunosupresores y teratogénicos, así como a su clasificación como posible carcinógeno en humanos (8, 22, 46, 53). Su resistencia a los procesos de cocción y a elevadas temperaturas favorece su persistencia en los piensos avícolas y su acumulación en tejidos animales (32).

En el Perú, si bien existen regulaciones para la OTA en alimentos de origen vegetal como café, cacao y cereales, no se ha establecido un límite máximo permisible (LMP) en tejidos avícolas, ni se dispone de un método validado que permita su detección (26). A nivel internacional, tampoco existen límites obligatorios para OTA en productos cárnicos, aunque algunos países han adoptado valores orientativos (56). Esta falta de consenso normativo resalta la necesidad de contar con métodos analíticos confiables que permitan evaluar su presencia en aves.

Además, los estudios sobre la determinación de OTA en tejidos avícolas mediante LC-MS/MS son limitados y, hasta la fecha, no se han reportado investigaciones que empleen UPLC-MS/MS, pese a ser una técnica más avanzada, sensible y eficiente.

En este contexto, el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de OTA en músculo de pollo mediante UPLC-MS/MS constituye un aporte estratégico para la

industria avícola y las autoridades regulatorias, pues contribuye a garantizar la inocuidad de los productos avícolas y fortalecer la seguridad alimentaria nacional.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es factible desarrollar y validar un método analítico basado en cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS) para la determinación confiable y reproducible de ocratoxina A en músculo de pollo?

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar, validar y aplicar un método analítico para la determinación de Ocratoxina A en músculo de pollo mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS).

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar una metodología que permita la determinación de Ocratoxina A en músculo de pollo, estableciendo condiciones óptimas cromatográficas y espectrométricas, mediante UPLC-MS/MS, utilizando soluciones patrón y estándares certificados.
- Validar el método desarrollado mediante la evaluación de los parámetros de desempeño analítico, empleando muestras fortificadas de músculo de pollo.
- Aplicar el método validado para la determinación de Ocratoxina A en muestras de músculo de pollo provenientes de cinco mercados de abasto de Lima Metropolitana, utilizando la técnica de UPLC-MS/MS.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIALES Y EQUIPOS

6.1.1. Lugar de trabajo

El presente estudio fue ejecutado en el Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LaCCSA) del Centro de Investigación para el Desarrollo Integral y Sostenible (CIDIS) y del Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Privado Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CITEacuícola UPCH), ubicado en los Laboratorios de investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la UPCH, Av. Honorio Delgado 430 Urb. Ingeniería-San Martín de Porres.

6.1.2. Muestras

En este estudio se utilizaron dos tipos de muestras, diferenciadas según la etapa del procedimiento analítico:

- **Muestras destinadas al desarrollo y validación del método:** Para el desarrollo y validación del método, se empleó músculo de pollo (pechuga) libre de Ocratoxina A, utilizado como matriz blanco. Este material fue fortificado con concentraciones conocidas de la micotoxina, con el fin de evaluar los parámetros de validación del método. La matriz se almacenó a -18°C en el congelador del LaCCSA hasta su análisis.
- **Muestras obtenidas de los mercados de abastos, destinadas al análisis de OTA:** Una vez validado el método, se recolectaron muestras de músculo (pechuga) de pollos provenientes de cinco mercados de abastos ubicados en Lima Metropolitana. Las adquisiciones se realizaron durante días de semana en el horario de mañana. Los mercados seleccionados fueron:
 - Mercado de Lince (M1)
 - Mercado de San Isidro (M2)
 - Mercado de Jesús María (M3)
 - Mercado de Miraflores (M4)
 - Mercado de Surquillo (M5).

En cada mercado se seleccionó un único puesto de venta, del cual se adquirieron seis muestras individuales de músculo (pechuga) de pollo, con un peso aproximado de 500 g cada muestra, obteniéndose así un total de treinta muestras. Para su conservación, las muestras fueron colocadas en bolsas herméticas tipo Ziploc, debidamente rotuladas con la siguiente

información: número de muestra, distrito y fecha de adquisición. Posteriormente, fueron transportadas en un cooler hasta el LaCCSA de la UPCH, donde fueron almacenadas a -18 °C hasta su análisis.

6.1.3. Material de laboratorio

- Tubos de centrífuga de polipropileno con tapa enroscable de 15 y 50 mL
- Fiolas de 10, 100, 250 y 1000 mL. Clase A.
- Probetas de 100 y 1000 mL. Clase A.
- Vasos precipitados de 10, 50, 100 y 250 mL. Clase A.
- Viales de 2 mL
- Jeringas descartables de 5 mL
- Filtro de jeringa de PVDF, 0,22 µm de porosidad
- Micropipetas de rango variable 10 - 100 µL, 100 - 100µL, 1 - 5 mL y 1 - 10 mL.

6.1.4. Reactivos, solventes y estándar

- Agua ultrapura con conductividad eléctrica de 0.056 µS/cm
- Acetonitrilo, grado LC-MS/MS (Reagents DUKSAN®)
- Metanol, grado LC-MS/MS (Reagents DUKSAN®)
- Formiato de amonio, grado espectrómetro de masas (Sigma-Aldrich®)
- Ácido fórmico, grado LC-MS/MS (Scharlau®)
- Cloroformo, grado HPLC (J.T. Baker®)
- Cloruro de sodio (J.T. Baker®)
- Sulfato de Magnesio anhidro (J.T. Baker®)
- Amina Primaria-Secundaria (PSA) (Supelco®)
- C18 absorbente (COLE-PARMER®)
- Estándar de ocratoxina A (Sigma-Aldrich®) (**Anexo 2**)

6.1.5. Equipos

- Cromatógrafo Líquido de Ultra Rendimiento (UPLC) acoplado a un detector de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-XS (Waters®) (**Anexo 3**)
- Columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm de largo x 2.1 mm de diámetro, 1.7 µm tamaño de partículas)
- Congeladora FRT 18G6JW0 (Frigidaire®)
- Congeladora BDF-25V328 (BIOBASE®)

- Centrífuga ORVALL ST 8R (Thermo Scientific®)
- Vortex VXMNDG (Ohaus®)
- Agitador de tubos MULTI REAX (Heidolph®)
- Baño de ultrasonido UCI-75 (Raypa®)
- Balanza analítica PA224 (OHAUS®)
- Purificador de agua Arium Mini (Sartorius®)
- Conductímetro ORION STAR A212 (Thermo Scientific®)
- Campana extractora APR-1500 (Chcairos®)

6.2. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

En este estudio se utilizó la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS) para determinar ocratoxina A en muestras de músculo de pollo.

Previamente al desarrollo de la metodología, se efectuó una revisión exhaustiva de la literatura científica relacionada con la determinación de OTA en músculo de pollo, otros tejidos animales y piensos, con la finalidad de identificar métodos analíticos previamente validados.

Con base en esta revisión, se seleccionó como método de referencia el propuesto por Wang y colaboradores (2021), desarrollado para la determinación simultánea de ocratoxina A y zearalenona en muestras de pienso para aves de corral del sur de China mediante HPLC-MS/MS (89).

Debido a las diferencias entre las matrices, fue necesario optimizar la metodología de referencia para su aplicación en la matriz de músculo de pollo correspondiente a nuestro estudio. Para ello, se evaluaron y ajustaron las condiciones cromatográficas, las condiciones espectrométricas y el procedimiento de extracción.

Se describen a continuación en detalle las diferentes etapas del desarrollo del método del presente estudio.

6.2.1. Preparación de las soluciones estándar

- **Stock madre de OTA de 100 ppm:** Se pesó 1 mg de estándar de OTA en un vaso precipitado de 10 mL, se disolvió en cloroformo y se transfirió a una fiola de 10 mL, completando el volumen con el mismo solvente. La solución se almacenó a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, este stock madre tiene una duración máxima de 12 meses.

- **Stock intermedio de OTA de 250 ppb:** Se pipeteo 1000 μL del stock madre de 100 ppm en una fiola de 10 mL y se completó el volumen con metanol. La solución se almacenó a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, este stock intermedio tiene una duración máxima de 5 meses.
- **Stock de trabajo de OTA de 10 y 50 ppb:** A partir del stock intermedio de OTA de 250 ppb, se tomaron 400 μL y 2 mL, respectivamente, y se transfirieron a fiolas de 10 mL, enrasando con metanol. Las soluciones se conservaron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una semana, y se utilizaron tanto para la construcción de la curva de calibración como para la fortificación de muestras.

6.2.2. Condiciones espectrométricas

En el método de referencia (89), Wang y col. emplearon el modo de ionización negativo (ESI⁻), con un voltaje de cono de 28 V, una energía de colisión de 25 eV, una temperatura desolvatación de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, una temperatura del bloque de calentamiento de $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, un flujo de gas nebulizador de 3 L/min y un flujo de gas de secado y calentamiento de 10 L/min (89). En el presente estudio, se realizaron modificaciones en las condiciones espectrométricas, a fin de mejorar la resolución y la definición de los picos cromatográficos correspondientes a la OTA, para optimizar su detección e identificación.

Se empleó una fuente de ionización por electrospray (ESI), la cual permite la detección sensible y selectiva de analitos presentes a bajas concentraciones en matrices complejas.

6.2.3. Condiciones cromatográficas

Con base en la información recopilada, se verificaron y establecieron las condiciones de flujo, temperatura de la columna, composición de las fases móviles y tiempo de corrida, con el propósito de obtener una adecuada separación cromatográfica.

6.2.3.1. Preparación de las fases móviles

- **Fase móvil A:** Se preparó una solución de 3 mM de formiato de amonio en agua ultrapura con 0,1 % de ácido fórmico.
- **Fase móvil B:** Se preparó una solución de 3 mM de formiato de amonio en metanol con 0,1 % de ácido fórmico.

6.2.4. Preparación de la curva de calibración del estándar de OTA

La curva de calibración se preparó con el objetivo de establecer la relación entre la concentración de OTA y la respuesta instrumental. Se elaboraron seis puntos de calibración (STD1–STD6) mediante la adición de volúmenes específicos de las soluciones de 10 y 50 ppb de OTA en la matriz blanco, hasta completar un volumen final de 1000 μ L. Se obtuvieron concentraciones finales de 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 5 μ g/L, tal como se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Curva de calibración para OTA en matriz de músculo de pollo.

Curva de calibración de OTA					
Identificación del Estándar	Concentración final (ug/L)	Volumen de matriz (uL)	Volumen del estándar de 10 ppb de OTA (uL)	Volumen del estándar de 50 ppb de OTA (uL)	Volumen final (uL)
STD1	0,25	975	25	-	1000
STD2	0,5	990	-	10	1000
STD3	1	980	-	20	1000
STD4	2	960	-	40	1000
STD5	4	920	-	80	1000
STD6	5	900	-	100	1000

6.2.5. Método de extracción

La extracción de la ocratoxina A constituye una etapa crítica en el desarrollo del método analítico, ya que de ella depende la eficiencia en la recuperación del analito y la eliminación de compuestos interferentes presentes en la matriz.

Se describen a continuación las principales modificaciones realizadas al método de referencia de Wang y col. en la fase de extracción y se ilustran los cambios en la **Figura 3**.

a. Incorporación de una etapa de hidratación de la muestra.

Se adicionaron 2,5 mL de agua ultrapura a la muestra antes de la extracción con metanol, a fin de favorecer la liberación de la OTA desde el tejido muscular.

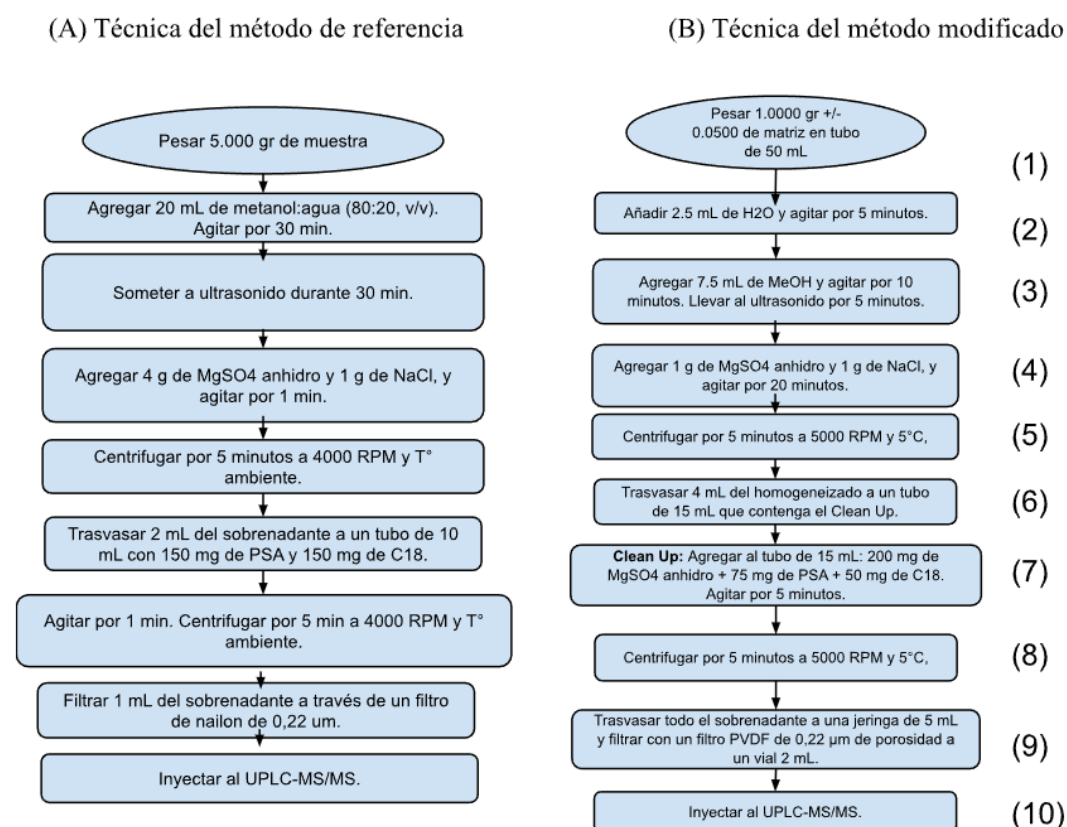
b. Optimización del procedimiento de limpieza (dSPE).

Se redujo la cantidad de sales utilizadas en el procedimiento de limpieza.

c. Control de la temperatura durante la centrifugación.

La centrifugación se realizó a 5000 rpm durante 5 minutos a 5 °C, con la finalidad de mejorar la separación de fases.

Figura 3. Diagramas de flujo del procedimiento de extracción del método de referencia y el método modificado para la determinación de OTA en músculo de pollo.



6.2.6. Determinación de OTA en la muestra

Para la determinación de la concentración de OTA en músculo de pollo, se utilizaron dos ecuaciones que permiten estimar la concentración de la micotoxina en función del área del pico cromatográfico obtenido.

Se calculó la concentración inicial de OTA a partir de la curva de calibración, mediante la **Ecuación 1**. Posteriormente se estimó la concentración final de OTA presente en la muestra, mediante la **Ecuación 2**.

Ecuación 1: Concentración inicial de OTA a partir de la curva de calibración

$$C_o = b (A) + a$$

Donde:

- C_o = Concentración en ng/mL del estándar de calibración.
- b = Pendiente de la ecuación lineal.
- A = Área del pico cromatográfico
- a = Intercepción en el eje y.

Ecuación 2: Concentración final de OTA en músculo de pollo

$$C_{MET} (\mu g/kg) = C_o \times \frac{f_c \times V_e}{W}$$

Donde:

- $C_{MET} (\mu g/kg)$ = Concentración final de OTA en la muestra, expresada en $\mu g/kg$ (equivalente a ppb).
- C_o = Concentración obtenida a partir de la curva de calibración (ng/mL).
- f_c = Factor de concentración, que representa la relación entre el volumen final y el volumen inicial del extracto ($\frac{V_f}{V_i}$); en este caso, $\frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$.
- V_e = Volumen de extracción de la muestra (10 mL).
- W = Peso de la muestra analizada (1 g).

6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Tras obtener resultados preliminares satisfactorios con el método propuesto, se procedió a su validación considerando los criterios establecidos en la *Directriz para la validación de métodos de ensayo* – DA-acr-20D (82). Durante este proceso se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño: selectividad, sensibilidad analítica, límite de detección y cuantificación, linealidad, rango de trabajo, veracidad, precisión, robustez e incertidumbre.

Adicionalmente, se tomaron como referencia diversas normativas internacionales, tales como la guía *Eurachem: The Fitness for Purpose of Analytical Methods* (30), la *Guía de validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la*

validación de métodos del Instituto de Salud Pública de Chile (79), la *Guía de Validación de Métodos en Análisis Químico Cuantitativo* del Instituto Nacional de Metrología de Colombia (83) y las *Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials* (90, 91), entre otras.

Para la validación del método analítico se utilizaron muestras de músculo de pollo libres de Ocratoxina A (OTA).

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa estadístico Minitab® (versión 22.1.0), y los parámetros fueron procesados adicionalmente mediante el software de hojas de cálculo Excel de Microsoft Office 365 (versión 18.0).

Finalmente, con el objetivo de evaluar la precisión intermedia o reproducibilidad intralaboratorio, se evaluó específicamente la variabilidad atribuible al cambio de analista, para lo cual se contó con la participación de dos analistas.

6.3.1. Evaluaciones estadísticas preliminares

Previo a la validación de los parámetros del método, se realizaron evaluaciones estadísticas con el objetivo de determinar si los datos obtenidos tienen características adecuadas para la aplicación de pruebas paramétricas (92). Para ello, se llevaron a cabo ensayos en tres niveles de concentración de OTA, vale decir 2,5; 10 y 50 µg/kg. En cada nivel se analizaron 15 datos por analista, considerándose dos analistas en total.

Las evaluaciones estadísticas preliminares comenzaron con la detección de posibles valores atípicos mediante el cálculo del Z-score, considerando que no existen datos atípicos cuando el valor absoluto del Z-score es menor o igual a 2,0 (93). Posteriormente, se evaluó la normalidad de los datos mediante una prueba de normalidad de Anderson-Darling, asumiendo distribución normal cuando el valor de p era mayor a 0,05. Luego, se evaluó la homogeneidad de varianzas entre los resultados de ambos analistas mediante la prueba F de Fisher, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Se planteó que la hipótesis nula se refiere a que las varianzas son iguales, mientras que la alterna planteó diferencias entre ellas. Si el valor-p era mayor a 0,05 no se rechazó la hipótesis nula, lo que permite concluir que ambos analistas presentaron varianzas homogéneas y, por ende, similar precisión en sus resultados. Finalmente, se utilizó la prueba t de Student, aplicada por separado a los resultados de cada analista y también de forma global. Esta prueba permitió evaluar si los valores obtenidos se aproximaban al valor

teórico de fortificación. Se consideró que los analistas recuperaban correctamente la micotoxina si no existía diferencia significativa entre las medias ($p > 0,05$).

En conjunto, estas pruebas establecieron una base estadística sólida para continuar con la validación del método propuesto.

6.3.2. Evaluación de los parámetros de validación

La validación del método comprendió la evaluación de los parámetros previamente señalados, a fin de verificar su aptitud para la determinación de OTA en músculo de pollo. Estos fueron analizados conforme a los criterios establecidos en guías internacionales, asegurando así la confiabilidad de los resultados obtenidos.

6.3.2.1. Selectividad

Con base en los lineamientos propuestos por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (94), este parámetro se evaluó mediante la comparación cualitativa de cromatogramas obtenidos a partir de muestras fortificadas y no fortificadas, con el fin de verificar la ausencia de interferencias provenientes de la matriz.

Para ello, los análisis se realizaron bajo tres condiciones experimentales. La primera correspondió a muestras de músculo de pollo (matriz blanco) fortificadas con 10 $\mu\text{g/kg}$ de OTA, en las cuales se esperaba observar una señal cromatográfica clara y definida en el tiempo de retención del analito. La segunda condición correspondió a muestras de la misma matriz no fortificadas (sin OTA), en las que no se esperaba detectar señal alguna en dicho tiempo de retención. Finalmente, se inyectó una solución estándar de OTA, con el propósito de confirmar que el tiempo de retención del analito coincidiera con el observado en las muestras fortificadas.

La comparación de estos cromatogramas permite confirmar la selectividad del método frente a posibles compuestos presentes en la matriz.

6.3.2.2. Sensibilidad analítica

Este parámetro fue evaluado a partir de la pendiente de la curva de calibración, la cual representa la relación entre la concentración de ocratoxina A y la respuesta instrumental obtenida (área del pico cromatográfico), de acuerdo con el ISP Chile (79).

Una pendiente mayor indica una mayor eficiencia del sistema para evidenciar pequeñas variaciones en la concentración. En términos prácticos, una pendiente inclinada (más vertical) indica que ligeros incrementos en la concentración generan cambios significativos en la señal, lo que se traduce en alta sensibilidad. Por el contrario, una pendiente menos inclinada (más horizontal) sugiere que la señal varía poco frente a cambios en la concentración, lo que se asocia con una baja sensibilidad del método (95, 96).

6.3.2.3. Límite de detección y cuantificación

Con el objetivo de estimar el límite de detección (LOD) del método, se fortificaron 7 muestras de músculo de pollo con una concentración de 1 µg/kg de OTA, durante tres días distintos. En técnicas analíticas como la cromatografía, es común fortificar muestras con concentraciones muy bajas, con el fin de obtener una desviación estándar (SD) distinta de cero.

De acuerdo con el INMETRO de Brasil (97), el límite de detección puede calcularse mediante la siguiente expresión (96):

$$\text{LOD} = \text{SD} \times t\text{-value}$$

Donde:

- SD corresponde a la desviación estándar total obtenida a partir de los valores obtenidos de cada uno de los tres días de análisis.
- t-value es el valor crítico de la distribución t de Student para un nivel de confianza del 99% (una cola).

En este caso, se realizaron 7 inyecciones por día, cumpliendo con la recomendación de la guía Eurachem (30), que sugiere entre 6 y 15 réplicas para obtener una estimación válida. Por tanto, se consideraron 6 grados de libertad, y el valor de t empleado fue 3,143 (98). Se empleó un enfoque unilateral, ya que el objetivo es establecer el límite mínimo en el que el analito puede ser detectado por encima del ruido de fondo, sin considerar desviaciones hacia valores negativos (99).

Por otro lado, el límite de cuantificación (LOQ) se determinó mediante la siguiente expresión (30, 97):

$$\text{LOQ} = kQ \times \text{SD}$$

Donde kQ representa el factor multiplicador de la desviación estándar (89). En este caso, se empleó un valor de $kQ = 10$, el cual es comúnmente aceptado para definir una cuantificación confiable en niveles bajos de concentración, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (30).

Finalmente, de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos por el ISP de Chile para LOD y LOQ, en métodos cuyo límite máximo permisible (LMP) es inferior a 100 $\mu\text{g/kg}$, el LOD debe ser $\leq 1/5$ del LMP y el $\text{LOQ} \leq 2/5$ del LMP. Para este estudio, se consideró un LMP orientativo de 5 $\mu\text{g/kg}$, correspondiente al valor de referencia establecido por Eslovaquia para carne de aves de corral (56, 79).

6.3.2.4. Linealidad

La linealidad fue evaluada a partir del análisis de tres curvas de calibración construidas con OTA en matriz de músculo de pollo durante tres días distintos, utilizando seis niveles de concentración: 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 5 $\mu\text{g/kg}$. Para verificar si la relación entre concentración y respuesta analítica es lineal, se aplicaron dos criterios complementarios: el valor del coeficiente de determinación (r^2) y la comprobación estadística del modelo de regresión lineal (90, 100).

En cuanto al primer criterio, el r^2 se emplea como indicador de la regresión lineal. Este coeficiente proporciona la correlación entre la concentración del analito y la señal analítica. Su valor oscila entre 0 y 1, siendo 1 el indicador de una correlación perfecta. En métodos cromatográficos, se considera aceptable un valor de r^2 mayor o igual a 0,98 (101).

Respecto al segundo criterio, se comprobó estadísticamente el modelo de regresión lineal de primer orden ($y = a + bx$), donde b representa la pendiente y a el intercepto. Para ello, se realizaron pruebas de inferencia sobre los parámetros del modelo, formulando tres hipótesis estadísticas: la significancia de la pendiente, del intercepto y del coeficiente de correlación. Estas fueron evaluadas mediante pruebas t de Student para una muestra, aplicando los siguientes criterios de aceptación:

Tabla 7. Criterios estadísticos para la aceptación del modelo de regresión lineal.

Parámetro del modelo	Hipótesis nula (H_0)	Hipótesis alterna (H_1)	Criterio de aceptación
Pendiente (b)	$H_0: b = 0$	$H_1: b \neq 0$	$p < 0,05$
Intercepto (a)	$H_0: a = 0$	$H_1: a \neq 0$	$p > 0,05$ o $p < 0,05^*$
Coefficiente de correlación (r)	$H_0: r = 0$	$H_1: r \neq 0$	$p < 0,05$

* El intercepto (a) no tiene un criterio específico.

Se establece que, cuando $p < 0,05$, se rechazaba la hipótesis nula (H_0) y se aceptaba la hipótesis alterna (H_1). Se consideró que el modelo presentaba una relación lineal válida únicamente si se cumplían los tres criterios mencionados.

6.3.2.5. Rango de trabajo

Este parámetro se determinó mediante una regresión lineal basada en tres niveles de concentración, generando un total de 30 datos experimentales (10 réplicas por nivel). Las concentraciones seleccionadas fueron: el límite de cuantificación (LOQ) del método como nivel bajo, un nivel intermedio representativo de la curva de calibración y la concentración máxima de dicha curva como nivel alto, previamente verificada dentro del rango lineal. La selección de estos niveles permite evaluar el desempeño del método a lo largo de todo el intervalo propuesto.

El rango de trabajo debe incluir niveles de concentración que presenten resultados aceptables de veracidad y precisión, ya que estos parámetros confirman la confiabilidad del método dentro del intervalo estudiado (30).

Para la validación estadística de este parámetro, se aplicó una regresión lineal entre las concentraciones mencionadas y las áreas de respuesta obtenidas (30). Como criterios de aceptación, se estableció que el coeficiente de correlación (r) debía ser superior a 0,99 (92) y el coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0,98 en técnicas cromatográficas (101). El cumplimiento de estos criterios permite confirmar la linealidad del método y, en consecuencia, establecer el rango de trabajo válido.

6.3.2.6. Veracidad

Este parámetro se evaluó mediante la prueba t de Student para una muestra, aplicada de forma independiente a cada uno de los tres niveles de concentración (2,5; 10 y 50 µg/kg), con 30 datos por nivel. Para ello, se fortificaron muestras de músculo de pollo libres de OTA con el analito en los tres niveles de concentración mencionados.

En primer lugar, se calculó el porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración mediante la siguiente ecuación (97):

$$\%R = \left(\frac{C_{exp}}{C_{Ref}} \right) \times 100$$

Donde:

- C_{exp} es la concentración experimental obtenida
- C_{Ref} es la concentración teórica de fortificación

Posteriormente, se aplicó la prueba t de Student considerando como valor de referencia los límites del rango de aceptación (70% y 120%), establecidos en el Reglamento de Ejecución (UE) 2023/2783 y en las recomendaciones del ISP Chile (79, 102).

Las hipótesis planteadas fueron:

- Para el límite inferior (70%):
 - H_0 : la media de recuperación es igual a 70%.
 - H_1 : la media de recuperación es mayor a 70%.
- Para el límite superior (120%):
 - H_0 : la media de recuperación es igual a 120%.
 - H_1 : la media de recuperación es menor a 120%

Se consideró que, si $p < 0,05$, se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_1), lo que confirma que las medias de recuperación se encuentran significativamente por encima del 70% y por debajo del 120%, respectivamente. Esto valida la veracidad de los resultados y respalda la confiabilidad del método analítico.

6.3.2.7. Precisión

Este parámetro fue evaluado en términos de repetibilidad y reproducibilidad, siguiendo las recomendaciones de la guía Eurachem (30, 103). Para ello, se fortificaron muestras de músculo de pollo con OTA en tres niveles de concentración: 2,5; 10 y 50 µg/kg. En cada nivel, se generaron 30 datos, obtenidos por dos analistas (15 por analista). La repetibilidad fue evaluada bajo condiciones controladas, es decir, empleando el mismo analista y las mismas condiciones operativas (30); mientras que la reproducibilidad se estimó considerando la variabilidad entre analistas, como una medida de la reproducibilidad intra-laboratorio (103-105).

Para el cálculo de los componentes de varianza, se emplearon sumatorias intermedias identificadas como T_1 , T_2 , T_3 , T_4 y T_5 (106) (**Anexo 5**). A partir de estas se determinaron: la varianza de repetibilidad (S_r^2), la varianza entre analistas (S_L^2) y la varianza de reproducibilidad ($S_R^2 = S_r^2 + S_L^2$). A partir de estas varianzas, se calcularon las desviaciones estándar correspondientes:

$$S_r = \sqrt{S_r^2}$$

$$S_R = \sqrt{S_R^2}$$

Y los coeficientes de variación porcentual (%RSD) para cada componente de precisión (107).

$$\%RSD_r = \frac{S_r}{Y} \times 100$$

$$\%RSD_R = \frac{S_R}{Y} \times 100$$

Finalmente, la precisión fue evaluada comparando los valores experimentales de %RSD, tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad, con los valores teóricos calculados mediante la ecuación de Horwitz (86):

$$\%RSD_r \text{ Horwitz} = 0,67 \times 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

$$\%RSD_R \text{ Horwitz} = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

Donde C representa la concentración del analito expresada como fracción en masa en base 10 (por ejemplo, 1 ppm = 1×10^{-6}).

El cumplimiento del criterio de aceptación $\%RSD_{exp} < \%RSD_{Horwitz}$ en los tres niveles de concentración evaluados confirma que el método presenta una precisión adecuada (86). Además, se tomó en cuenta el criterio de aceptación de la Comisión Europea que menciona

que el %RSD de repetibilidad tiene que ser menor al 20%; mientras que el %RSD de reproducibilidad tiene que ser menor al 30%.

6.3.2.8. Robustez

Para evaluar la robustez del método, se aplicó el diseño experimental propuesto por Youden y Steiner, el cual permite identificar si pequeñas variaciones en los parámetros afectan significativamente el resultado (94). Esta estrategia se encuentra respaldada por las recomendaciones del INMETRO de Brasil en su guía para validación de métodos analíticos.

En este caso, se consideraron siete factores relacionados con las condiciones cromatográficas y el procedimiento de extracción. Para cada uno se definieron dos niveles: uno alto, representado con letras mayúsculas (A–G), y uno bajo, indicado con letras minúsculas (a–g). A partir de estas combinaciones, se generaron ocho ensayos experimentales, con el fin de evaluar el posible efecto individual de cada factor sobre el resultado final (97).

Con el objetivo de determinar si alguno de los factores tiene una influencia significativa sobre el resultado, se estableció el siguiente criterio de aceptación para la robustez (79, 108):

$$(V.O.)_{factor} < \sqrt{2} \times SD$$

Donde:

- V.O. corresponde a la diferencia de medias entre los niveles alto y bajo de cada factor, denominada valor observado.
- SD representa la desviación estándar de precisión del método.

Si esta condición se cumple para todos los factores evaluados, se concluye que ninguno de ellos influye significativamente en el resultado; y, por lo tanto, el método se considera robusto frente a las variaciones estudiadas.

6.3.2.9. Incertidumbre

Con el fin de evaluar la confiabilidad del método empleado para la determinación de OTA en músculo de pollo, se estimó la incertidumbre de medición siguiendo las recomendaciones establecidas en la Guía Eurachem para la cuantificación de la Incertidumbre en mediciones analíticas (109–112).

El procedimiento se desarrolló en tres etapas principales: definición del mensurando, identificación de las fuentes de incertidumbre y estimación de los componentes individuales de incertidumbre.

- A. Definición del mensurando:** El mensurando se definió como la concentración final de OTA en la matriz de músculo de pollo, expresada en $\mu\text{g/kg}$. Este parámetro representa el resultado analítico final obtenido mediante el método, el cual puede verse afectado por diferentes fuentes de variabilidad asociadas al proceso analítico, incluyendo la preparación de la muestra, la medición instrumental y las operaciones volumétricas y gravimétricas involucradas en el procedimiento.
- B. Identificación de fuentes de incertidumbre:** Las principales fuentes de incertidumbre que pueden afectar la determinación de OTA fueron identificadas mediante la elaboración de un diagrama de causa-efecto (diagrama de Ishikawa). Este recurso gráfico permitió organizar las posibles causas de variabilidad en categorías como metodología, analista y sesgo.
- C. Estimación de los componentes de incertidumbre:** Una vez identificadas las fuentes de incertidumbre, se procedió al cálculo de los principales componentes que contribuyen a la incertidumbre global del método: incertidumbre combinada de la metodología, incertidumbre del analista, incertidumbre combinada del sesgo e incertidumbre expandida.

a. Incertidumbre combinada de la metodología ($U_{comb.met.}$)

La incertidumbre asociada a la metodología se calculó considerando la propagación de las incertidumbres de las variables que intervienen en la concentración final del analito (C_{MET}), mediante el método de derivadas parciales.

$$C_{MET} = C_O \times \frac{f_c \times V_e}{W} \times f_d$$

Donde:

- C_O = Concentración obtenida a partir de la curva de calibración (ng/mL).
- f_c = Factor de concentración, que representa la relación entre el volumen final y el volumen inicial del extracto ($\frac{V_f}{V_i}$).
- V_e = Volumen de extracción de la muestra (mL).

- W = Peso de la muestra analizada (g).
- f_d = Factor de dilución

A partir de esta ecuación, se calculó la incertidumbre combinada de la metodología ($U_{comb.met.}$) como la suma de las contribuciones cuadráticas de cada fuente de incertidumbre (102, 103):

$$U_{comb.met.} = \sqrt{u^2 C_O + u^2 V_e + u^2 f_c + u^2 f_d + u^2 W}$$

Siguiendo el modelo general de incertidumbre típica combinada:

$$u^2 c(y) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 u^2(x_i)$$

Donde:

- f = Función matemática que describe el modelo analítico (en este caso, la ecuación de concentración final del analito)
- x_i = Variables de entrada (C_O , V_e , f_c , f_d , W)
- $u(x_i)$ = Incertidumbre estándar asociada a cada variable

A continuación, se aplicaron las derivadas parciales para cada factor involucrado:

$$u^2 C_{MET} = \left(\frac{\partial C_{MET}}{\partial C_{MET}} \right)^2 (u_{C_{MET}})^2 = (u_{C_{MET}})^2$$

$$u^2 C_O = \left(\frac{\partial C_{MET}}{\partial C_O} \right)^2 (u_{C_O})^2 = \left(\frac{u_{C_O} \times V_e \times f_c \times f_d}{W} \right)^2$$

$$u^2 V_e = \left(\frac{\partial C_{MET}}{\partial V_e} \right)^2 (u_{V_e})^2 = \left(\frac{u_{V_e} \times C_O \times f_c \times f_d}{W} \right)^2$$

$$u^2 f_c = \left(\frac{\partial C_{MET}}{\partial f_c} \right)^2 (u_{f_c})^2 = \left(\frac{u_{f_c} \times C_O \times V_e \times f_d}{W} \right)^2$$

$$u^2 f_d = \left(\frac{\partial C_{MET}}{\partial f_d} \right)^2 (u_{f_d})^2 = \left(\frac{u_{f_d} \times C_O \times V_e \times f_c}{W} \right)^2$$

$$u^2 W = \left(\frac{\partial C_{MET}}{\partial W} \right)^2 (u_W)^2 = \left(-\frac{u_W \times C_O \times V_e \times f_c \times f_d}{W^2} \right)^2$$

Por lo tanto, la incertidumbre combinada de la metodología ($U_{comb.met.}$) se expresa como:

$$= \sqrt{\left[\frac{u_{Co} \times V_e \times f_c \times f_d}{W}\right]^2 + \left[\frac{u_{Ve} \times C_o \times f_c \times f_d}{W}\right]^2 + \left[\frac{u_{fc} \times C_o \times V_e \times f_d}{W}\right]^2 + \left[\frac{u_{fd} \times C_o \times V_e \times f_c}{W}\right]^2 + \left[\frac{u_W \times C_o \times V_e \times f_c \times f_d}{W^2}\right]^2}$$

Esta fórmula permite cuantificar la contribución individual de cada variable experimental a la incertidumbre combinada de la metodología.

b. Incertidumbre del analista ($U_{analista}$)

La incertidumbre asociada al analista se estimó a partir de la repetibilidad del método, evaluada mediante ensayos realizados por dos analistas en tres diferentes niveles de concentración.

$$U_{Analista} = \frac{C_{MET} \times RSD_r}{100}$$

Donde:

- C_{MET} = Concentración final del analito
- RSD_r = Desviación estándar relativa de la repetibilidad (%)

Este componente representa la variabilidad asociada a la intervención del analista y a las condiciones operacionales durante la ejecución del método.

c. Incertidumbre combinada del sesgo ($U_{comb.sesgo}$)

La incertidumbre combinada del sesgo se calcula a partir de la suma cuadrática de la incertidumbre del estándar de veracidad y la incertidumbre asociada al sesgo relativo.

$$U_{comb.sesgo}^2 = U_{std.verac.}^2 + U_{Sesgo}^2$$

Para obtener la incertidumbre del estándar de veracidad, se consideran dos componentes: la incertidumbre asociada al estándar analítico y la incertidumbre del proceso de veracidad:

$$U_{std.verac.}^2 = U_{estandar}^2 + U_{std.proce.verac.}^2$$

donde la incertidumbre del proceso de veracidad se calcula como:

$$U_{std.proce.verac.}^2 = \frac{Sr}{\sqrt{n}}$$

- S_r = Desviación estándar de las mediciones.
- n = Número de réplicas o datos.

Por otro lado, la incertidumbre asociada al sesgo relativo se determina mediante la siguiente expresión:

$$U_{\text{Sesgo}}^2 = \frac{C \times \text{Sesgo relativo}(\%)}{100}$$

donde el sesgo relativo se calcula como:

$$\text{Sesgo Relativo}(\%) = \frac{C - x}{C} \times 100$$

- C = Concentración media ($\mu\text{g/kg}$).
- x = Valor esperado.

d. Incertidumbre global (U_{global})

La incertidumbre global del método se obtuvo mediante la combinación cuadrática de los principales componentes de incertidumbre involucrados en el procedimiento analítico:

$$U_{\text{global}} = \sqrt{U_{\text{comb.met.}}^2 + U_{\text{analista}}^2 + U_{\text{comb.sesgo}}^2}$$

e. Incertidumbre expandida (U_E)

Finalmente, se calculó la incertidumbre expandida (U_E) aplicando un factor de cobertura $k = 2$, que corresponde a un nivel de confianza del 95 % (110):

$$U_E = k \times U_{\text{global}}$$

Este valor define el intervalo dentro del cual se espera que se encuentre el valor verdadero del mensurando.

6.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS PROCEDENTES DE MERCADOS LOCALES

Con el método desarrollado y validado en el presente estudio, se procedió a su aplicación en muestras obtenidas de mercados de abastos, con el objetivo de evaluar su desempeño en condiciones prácticas. Para ello, se seleccionaron 30 muestras de músculo de pechuga de pollo, adquiridas en mercados de abastos ubicados en cinco distritos de Lima Metropolitana (Lince, San Isidro, Jesús María, Miraflores y Surquillo).

Se utilizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, el cual se caracteriza por la selección intencional de muestras accesibles y disponibles en el momento del estudio (113). Esta estrategia permitió analizar productos provenientes de mercados tradicionales que presentan condiciones de manipulación, almacenamiento y control sanitario distintas a las de establecimientos regulados como los supermercados.

VII. RESULTADOS

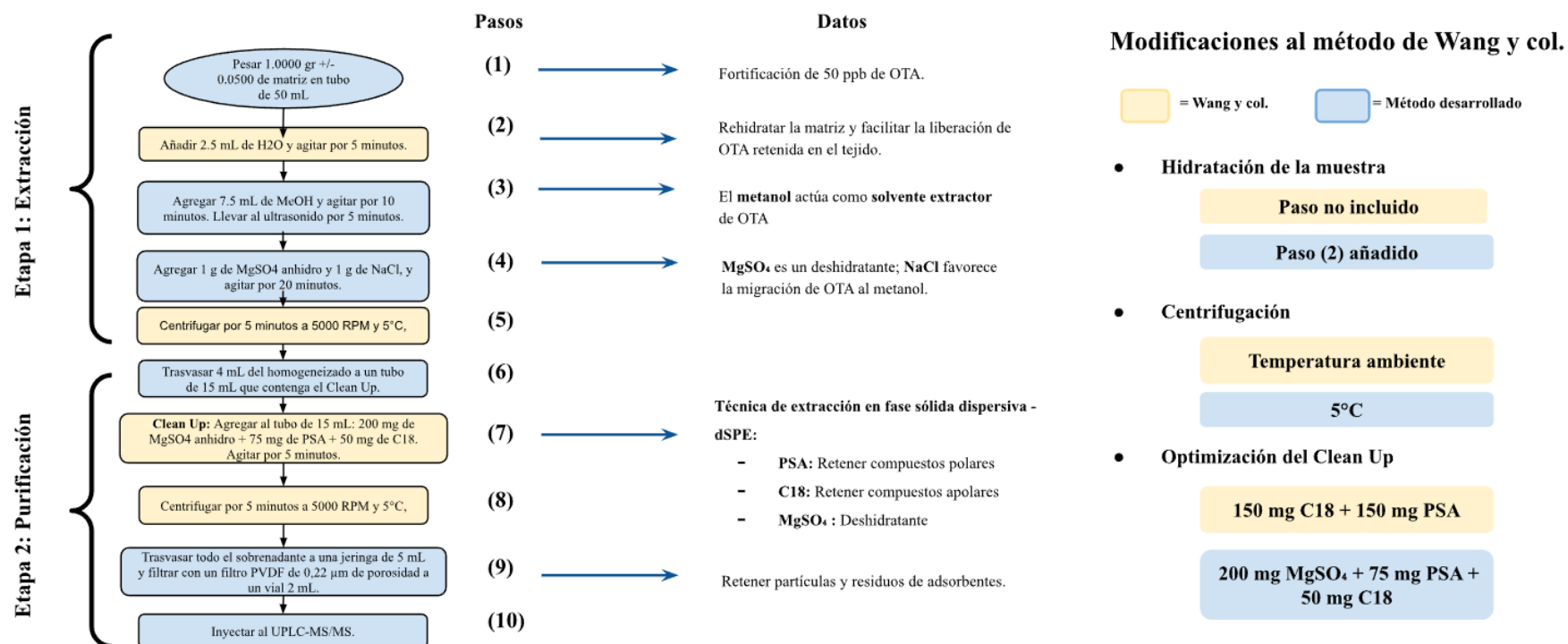
7.1. RESULTADOS DEL DESARROLLO METODOLÓGICO

Las modificaciones realizadas en nuestro método desarrollado con respecto al método de referencia de Wang y col. (89), se muestran en la **Figura 4**, en la que las modificaciones realizadas respecto al método de referencia se indican mediante recuadros amarillos y corresponden a los pasos (2), (5), (7) y (8). Las ventajas resultantes de las modificaciones indicadas se describen en las secciones que siguen.

Figura 4. Flujoograma del método desarrollado para la determinación de OTA en músculo de pollo mediante UPLC-MS/MS.

Nota: A la derecha se presentan las modificaciones realizadas con respecto al método de referencia, así como las ventajas obtenidas con cada una de ellas.

FLUJOGRAMA DEL MÉTODO DESARROLLADO



7.1.1. Optimización de las condiciones espectrométricas

La sintonización (*tuning*, en inglés) corresponde al proceso de ajuste de los parámetros del espectrómetro de masas, con el propósito de optimizar la precisión, sensibilidad y selectividad en la detección de la OTA. Este procedimiento permite establecer un patrón de identificación confiable del analito, mediante ensayos experimentales respaldados por la experiencia previa de los analistas, garantizando así un desempeño analítico óptimo (114).

Durante esta etapa se optimizaron los parámetros de la fuente de ionización y del sistema de detección, incluyendo el modo de ionización, voltaje de capilaridad, voltaje de cono, temperaturas de la fuente y de desolvatación, así como los flujos de gas. Las condiciones espectrométricas empleadas en nuestro método desarrollado para la detección de OTA se presentan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Condiciones espectrométricas empleadas para la detección de OTA.

Condiciones espectrométricas	
Modo de ionización	ES+
Capilaridad	0.50 kV
Voltaje de cono	20 V
Temperatura de desolvatación	500 °C
Temperatura de la fuente	150 °C
Energía de colisión	30 eV
Flujo de gas cono (N_2)	150 L/hr
Flujo de gas de desolvatación (N_2)	1000 L/hr
Flujo de gas de colisión	0,15 mL/min
Volumen de inyección	2 uL

7.1.2. Selección del ion precursor y de los iones producto para la detección de OTA

Una vez optimizadas las condiciones de la fuente de ionización, se procedió a la selección del ion precursor y de los iones producto característicos de la OTA. Para ello, se evaluaron diferentes valores de voltaje de cono y energía de colisión, con el fin de obtener una fragmentación adecuada del analito, y lograr señales con alta intensidad y reproducibilidad.

Asimismo, se registró el tiempo de retención correspondiente a la solución estándar de OTA. Estos parámetros se establecieron como referencia para la identificación y cuantificación del analito durante el análisis de las muestras.

Los datos espectrométricos obtenidos para la detección y cuantificación de OTA se presentan en la **Tabla 9** y **Anexo 4**.

Tabla 9. Datos espectrométricos obtenidos para la detección y cuantificación de OTA.

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Producto (m/z)	Modo de ionización	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)	Tiempo de retención (min)
Ocratoxina A	404,2	238,9	221	Positivo	35	24	2,18

7.1.3. Optimización de las condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas del método se evaluaron mediante la inyección de un estándar de Ocratoxina A (OTA), con el objetivo de optimizar la resolución del pico cromatográfico. Las condiciones empleadas se detallan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de OTA.

Condiciones cromatográficas				
Columna	Acquity UPLC BEH C18 (100 mm de largo x 2.1 mm de diámetro, 1.7 µm tamaño de partículas).			
Temperatura columna	40°C			
Tiempo de corrida	6 minutos			
Gradiente	Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B	Flujo (mL/min)
	0	50	50	0,35
	2.0	5	95	0,35
	3.0	0	100	0,35
	3.5	0	100	0,35
	4.0	50	50	0,35
	5.0	50	50	0,35

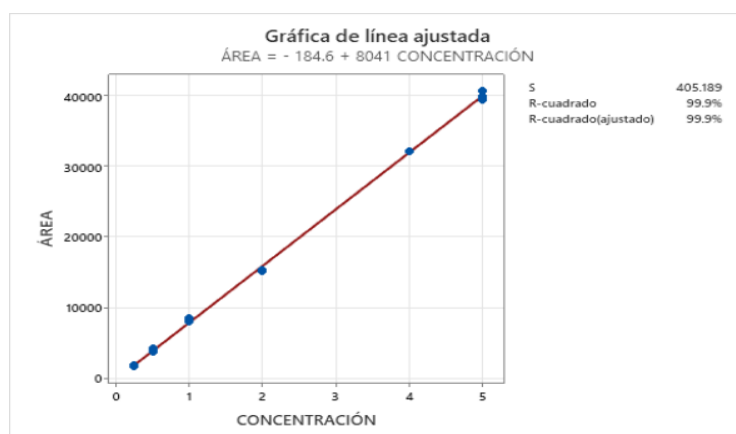
7.1.4. Curva de calibración de ocratoxina A

Se obtuvo una excelente relación lineal entre el área del analito y la concentración, con un coeficiente de determinación ($r^2 = 0,999$).

La ecuación de regresión lineal obtenida fue:

Figura 5. Curva de calibración de OTA en matriz de músculo de pollo.

$$y = -184,617 + 8041,258 x$$



El valor de la pendiente (8041,258) refleja la sensibilidad del método, mientras que la ordenada al origen ($-184,617$) puede considerarse cercana a cero, lo que indica una mínima contribución del ruido de fondo (95). En conjunto, estos resultados demuestran que la calibración es confiable y adecuada para la cuantificación de OTA en muestras de músculo de pollo.

7.1.5. Porcentaje de recuperación del método de extracción optimizado

Los resultados obtenidos a partir de la aplicación del diagrama de flujo del método de extracción ilustrado en la **Figura 4**, se presentan en la **Tabla 11**. Este ensayo se realizó con el objetivo de evaluar la eficiencia del proceso, considerando el porcentaje de recuperación de OTA en músculo de pollo.

Tabla 11. Resultados de recuperación del método de extracción de OTA en músculo de pollo.

MUESTRA	OTA adicionada (µg/kg)	OTA recuperada (µg/kg)	% Recuperación
Muestra - 1	20	19,10	95,5%
Duplicado - 1	20	19,80	99,0%

7.1.6. Determinación de OTA en la muestra

La cuantificación de OTA en músculo de pollo se realizó en dos etapas. En primer lugar, se calculó la concentración inicial (C_0) en ng/mL a partir de la curva de calibración (**Ecuación 1**), empleando la pendiente ($b = 8041,258$) y la ordenada al origen ($a = -184,617$) obtenidas experimentalmente.

La **Ecuación 1** se reordenó en función de la concentración para expresar el área cromatográfica como:

$$A = b (C_0) + a$$

Esta relación permitió comparar los valores de concentración esperada, concentración real y las áreas cromatográficas correspondientes (**Tabla 12**).

Tabla 12. Concentraciones y áreas obtenidas a partir de la curva de calibración de OTA en músculo de pollo.

Concentración esperada (µg/L)	Concentración real obtenida (µg/L)	Área experimental	Área ajustada
0,25	0,2450	1633,582000	1631,634274
0,25	0,2480	1859,8790000	1834,2750709
0,25	0,2320	1876,2700000	1980,7780904
0,50	0,5060	3735,967000	3735,586799
0,50	0,5010	3872,0820000	3909,1661741
0,50	0,5310	4286,6790000	4085,7153607
1,00	1,0320	7975,735000	7975,736333
1,00	1,0230	8015,3430000	8090,7474778
1,00	1,0530	8494,8960000	8327,8494761
2,00	1,9290	15202,446000	15206,561679
2,00	1,9430	15331,4030000	15221,6950624
2,00	1,9040	15364,1070000	15562,0591749
4,00	4,0310	32152,766000	32151,037574
4,00	4,0560	32130,6990000	31932,1207286
4,00	3,9860	32150,6740000	32514,4658493
5,00	5,0060	40010,691000	40010,630341
5,00	4,9790	39469,6990000	39683,1507118
5,00	5,0450	40692,1090000	40377,7372610

En segundo lugar, se calculó la concentración final de OTA (C_{MET}) en $\mu\text{g/kg}$ empleando la **Ecuación 2**, que ajusta la concentración inicial (C_o) obtenida anteriormente a las condiciones de la matriz, considerando el volumen de extracción y el peso de la muestra.

Dado que los volúmenes inicial y final se mantuvieron constantes ($V_i = V_f = 1$) y no se realizaron diluciones adicionales, la ecuación se simplificó de la siguiente manera:

$$C_{MET} (\mu\text{g/kg}) = C_o \times \frac{V_e}{W}$$

Ejemplo de resolución:

$$C_{MET} (\mu\text{g/kg}) = 0,25 \text{ ng/mL} \times \frac{10 \text{ mL}}{1 \text{ g}} = 2,5 \mu\text{g/kg}$$

Tabla 13. Cálculo de la concentración final de OTA en músculo de pollo.

Concentración de la curva de calibración en ng/mL (C_o)	Volumen de extracción (mL)	Peso de la muestra (g)	Concentración final de OTA en $\mu\text{g/kg}$ (C_{MET})
0,25	10	1	2,5
0,5	10	1	5
1	10	1	10
2	10	1	20
4	10	1	40
5	10	1	50

7.2. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

7.2.1. Evaluaciones estadísticas preliminares

Se realizaron cuatro evaluaciones estadísticas en tres niveles de concentración (2,5, 10 y 50 $\mu\text{g/kg}$ de OTA), con 15 datos por analista. El objetivo de estas pruebas fue verificar que los

resultados presentaran un comportamiento adecuado para aplicar pruebas paramétricas y garantizar la validez de los análisis posteriores.

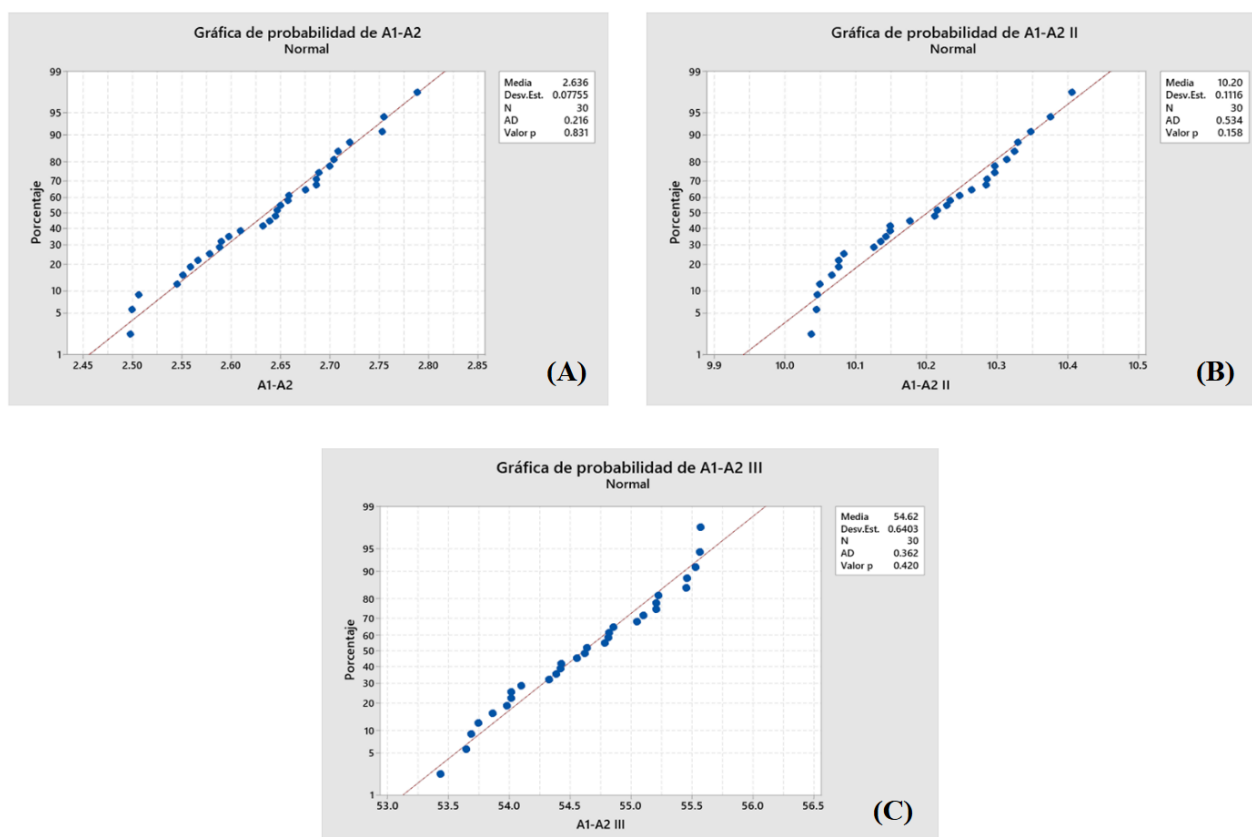
En primer lugar, se evaluó la presencia de valores atípicos en cada nivel y por analista, ya que estos podrían sesgar los resultados. Los valores de Z-score se mantuvieron dentro del criterio de aceptación ($|Z| \leq 2,0$) en todos los casos. Por lo tanto, no se identificaron datos atípicos en ninguno de los niveles evaluados (93) (**Anexo 6**).

En segundo lugar, se aplicó la prueba de normalidad de Anderson-Darling. Los resultados mostraron valores de p mayores a 0,05 en los tres niveles, lo que indica que no existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis de normalidad. Por ende, los datos obtenidos por ambos analistas se distribuyen normalmente.

Tabla 14. Resultados de la prueba de normalidad por nivel y analista.

Nivel	Concentración en $\mu\text{g/kg}$	Media A1	Media A2	Media Global	p-valor A1	p-valor A2	p-valor Global	Conclusión
1	2,5	2,610	2,662	2,636	0,118	0,440	0,831	Normal
2	10	10,176	10,224	10,200	0,071	0,314	0,158	Normal
3	50	54,563	54,672	54,617	0,860	0,141	0,420	Normal

Figura 6. Gráficas de prueba de normalidad para evaluar la distribución de los resultados obtenidos por ambos analistas en tres niveles: (A) Nivel I, (B) Nivel II y (C) Nivel III.



Posteriormente, se evaluó la homogeneidad de varianzas mediante la prueba F de Fisher. En todos los niveles, los valores de p fueron superiores a 0,05, lo que indica que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los analistas.

Tabla 15. Resultados de la homogeneidad de varianzas entre analistas (prueba F de Fisher).

Nivel	Concentración en $\mu\text{g/kg}$	Varianza A1	Varianza A2	p-valor (F)	Conclusión
1	2,5	0,007	0,004	0,490	Homogéneas
2	10	0,017	0,007	0,129	Homogéneas
3	50	0,265	0,578	0,157	Homogéneas

Finalmente, se aplicó la prueba t de Student para comparar las medias experimentales frente al valor teórico de fortificación. En todos los casos, tanto a nivel individual (A1 y A2) como global, se obtuvieron valores de p mayores a 0,05. Esto demuestra que no existen diferencias

significativas entre las medias obtenidas y los valores teóricos, confirmando la veracidad de los resultados y una adecuada recuperación de la micotoxina por parte de ambos analistas.

Tabla 16. Comparación de medias con respecto al valor teórico (t de Student).

Nivel	Concentración en µg/kg	Media A1	Media A2	Media Global	p-valor A1	p-valor A2	p-valor Global	Conclusión
1	2,5	2,610	2,662	2,636	0,230	0,155	0,993	Sin diferencias
2	10	10,176	10,224	10,200	0,496	0,298	0,992	Sin diferencias
3	50	54,563	54,672	54,617	0,689	0,782	0,997	Sin diferencias

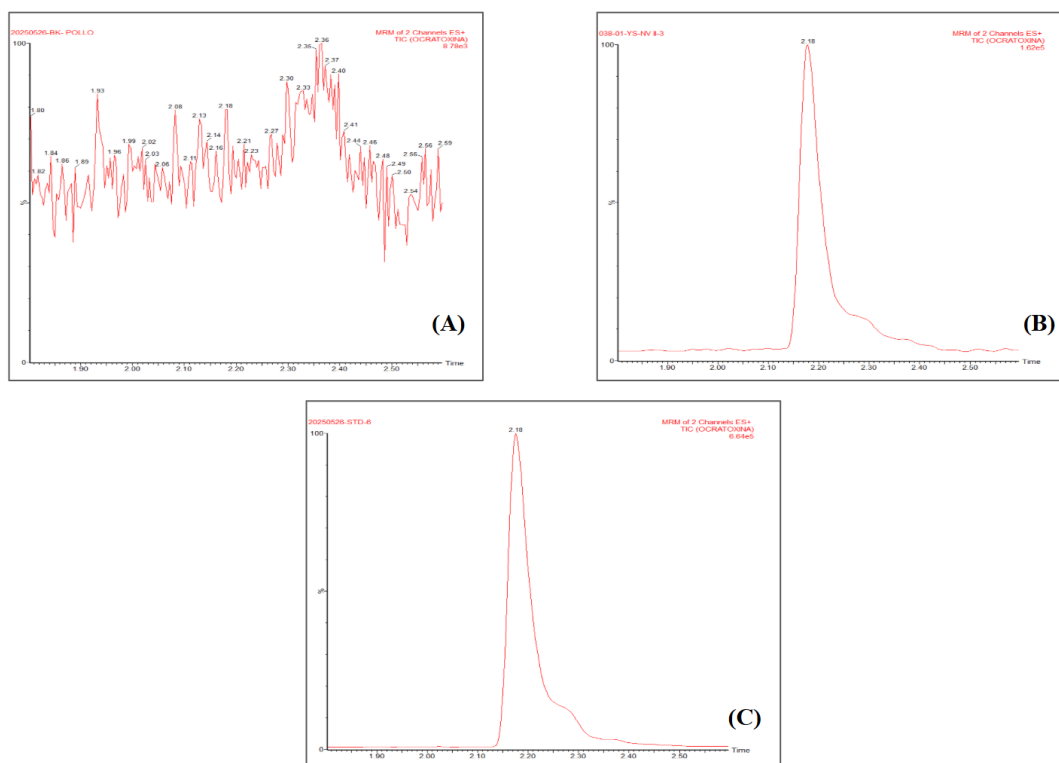
7.2.2. Parámetros de validación evaluados

7.2.2.1. Selectividad

La selectividad del método se evaluó mediante la comparación cualitativa de cromatogramas obtenidos bajo tres condiciones experimentales: muestras de músculo de pollo libres de OTA, muestras de músculo de pollo fortificadas a una concentración conocida de OTA y el estándar puro de OTA.

En los cromatogramas correspondientes a la solución estándar y a las muestras fortificadas se observó un pico claramente definido en el mismo tiempo de retención (2,18 minutos). Por el contrario, en las muestras libres de OTA no se detectaron señales en dicho tiempo de retención (**Figuras 7**).

Figura 7. Cromatogramas obtenidos bajo tres condiciones experimentales: (A) muestra de músculo de pollo libre de OTA, (B) muestra de músculo de pollo fortificada con OTA y (C) estándar puro de OTA.



7.2.2.2. Sensibilidad analítica

La curva de calibración obtenida presentó una pendiente positiva de 8041,258 y un coeficiente de correlación de 0,99965. Estos resultados confirman la existencia de una relación directamente proporcional y altamente significativa entre la concentración del analito y la señal instrumental.

7.2.2.3. Límite de detección y cuantificación

En la **Tabla 17**, se presentan los resultados obtenidos para la estimación del límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de OTA en músculo de pollo. Para cada jornada de análisis se determinaron la desviación estándar, el promedio experimental y el porcentaje de recuperación.

Tabla 17. Resultados obtenidos para la estimación del límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de OTA en músculo de pollo.

Día de análisis	Desviación estándar (µg/kg)	Concentración promedio (µg/kg)	Recuperación (%)
Día 1	0,0880	0,984	98,4
Día 2	0,0792	1,044	104,4
Día 3	0,1184	1,023	102,3

A partir de estos datos, en la **Tabla 18**, se obtuvo una desviación estándar global (SD) de 0,095 µg/kg, que se utilizó para estimar el LOD mediante la fórmula $LOD = SD \times t\text{-value}$, considerando un valor crítico de $t = 3,143$. El valor resultante fue de 0,30 µg/kg. De manera complementaria, el LOQ se calculó aplicando la expresión $LOQ = kQ \times SD$, con un factor $kQ = 10$, obteniéndose un valor de 0,95 µg/kg.

Tabla 18. Resultado promedio de los 3 días de análisis: SD, LOD y LOQ.

Desviación estándar global (SD) (ug/kg)	Límites de detección (LOD) (ug/kg)	Límite de cuantificación (LOQ) (µg/kg)
0,095	0,30	0,95

Finalmente, el LOD (0,30 µg/kg) y el LOQ (0,95 µg/kg) cumplen con los criterios de aceptación establecidos por el ISP de Chile para métodos con un LMP inferior a 100 µg/kg. Considerando un LMP de 5 µg/kg, ambos parámetros se encuentran dentro de los límites establecidos ($LOD \leq 1 \mu\text{g/kg}$ y $LOQ \leq 2 \mu\text{g/kg}$).

7.2.2.4. Linealidad

La linealidad del método se evaluó mediante el análisis de tres curvas de calibración independientes de OTA en músculo de pollo, construidas con seis niveles de concentración (0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 5 µg/kg) (**Anexo 7**). En cada curva, se calcularon los coeficientes de correlación y de determinación, cuyos valores se presentan en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Coeficientes de correlación y determinación obtenidos en la evaluación de la linealidad del método.

Curva	Coeficiente de correlación (r)	Coeficiente de determinación (r ²)
Curva 1	0,999999990	0,999999981
Curva 2	0,999999999	0,999999998
Curva 3	0,999999992	0,999999984
Promedio	>0,9999	>0,9999

Para confirmar estadísticamente la validez del modelo lineal, se realizaron pruebas de inferencia sobre los parámetros de regresión. En la **Tabla 10**, se resumen las hipótesis planteadas y los criterios de aceptación, mientras que en la **Tabla 20** se presentan los resultados obtenidos. Los análisis mostraron que la pendiente y el coeficiente de correlación fueron significativamente diferentes de cero ($p < 0.05$); por otro lado, el intercepto no tuvo significancia estadística; sin embargo, este resultado no afecta la linealidad del método.

Tabla 20. Resultados de las pruebas estadísticas de inferencia para la validación del modelo lineal.

Prueba estadística	Valor p	Criterio de aceptación
Significancia de la pendiente (b)	0,000	$p < 0,05$
Significancia del intercepto (a)	0,231	$p > 0,05$ o $p < 0,05^*$
Significancia del coeficiente de correlación	0,000	$p < 0,05$

* El intercepto (a) no tiene un criterio específico.

7.2.2.5. Rango de trabajo

Se evaluaron tres niveles de concentración de OTA: nivel bajo (0,95 µg/kg), nivel intermedio (10 µg/kg) y nivel alto (50 µg/kg), con un total de 10 réplicas por cada nivel (**Anexo 8**). La **Tabla 21** resume los valores promedio obtenidos para cada concentración evaluada.

La regresión lineal entre las concentraciones teóricas y experimentales evidenció un coeficiente de correlación (r) de 0,99994 y un coeficiente de determinación (r²) de 0,99986.

Tabla 21. Resultados experimentales para el rango de trabajo.

Nivel	Concentración teórica (µg/kg)	Concentración experimental media (µg/kg)	Recuperación media (%)
1 (Bajo)	0,95	0,957	100,74%
2 (Medio)	10	10,766	107,66 %
3 (Alto)	50	54,549	109,10 %

7.2.2.6. Veracidad

La recuperación relativa fue evaluada en tres niveles de concentración (2,5; 10 y 50 µg/kg), utilizando 30 repeticiones por cada nivel (**Anexo 9**). Los valores de p obtenidos para dichos niveles se presentan en la **Tabla 22**. En todos los casos, los resultados comparados con los límites de aceptación (70 % y 120 %) mostraron un valor de p inferior a 0,05.

Tabla 22. Valores de p obtenidos en la prueba t de Student.

Nivel	Concentración en µg/kg	Media de recuperación (%)	Desviación estándar	p vs. 70%	p vs. 120%
1	2,5	105,43	3,1	0,00	0,00
2	10	102	1,12	0,00	0,00
3	50	109,23	1,28	0,00	0,00

7.2.2.7. Precisión

Este parámetro se determinó considerando la repetibilidad (% RSD_r) y la reproducibilidad intra-laboratorio (% RSD_R), mediante el análisis de 30 muestras (15 por cada analista) de músculo de pollo fortificadas con OTA en tres niveles de concentración (2,5; 10 y 50 µg/kg) (**Anexo 10 y 11**).

Los valores experimentales de %RSD se contrastaron con los valores teóricos calculados a través de la ecuación de Horwitz, empleada como criterio de aceptación ($RSDE_{exp} < RSDH_{Horwitz}$). En todos los niveles de concentración evaluados, los porcentajes de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos fueron notablemente inferiores a los límites establecidos por Horwitz. Asimismo, los %RSD experimentales cumplieron con los criterios de aceptación establecidos por la Comisión Europea, presentando valores de $\%RSD_r \leq 20 \%$ y $\%RSD_R \leq 30 \%$.

Tabla 23. Comparación entre los valores de repetibilidad (% RSD_r) y reproducibilidad (% RSD_R) experimentales y los teóricos de Horwitz en distintos niveles de concentración de OTA.

Nivel	Concentración en $\mu\text{g/kg}$	Repetibilidad (r)		Reproducibilidad (R)		Criterio de Precisión
		%RSD Experimental	%RSD Horwitz	%RSD Experimental	%RSD Horwitz	
1	2,5	2,8	26,20	3,0	39,1	$RSD_{Exp.} < RSD_{Horwitz}$
2	10	1,087	21,4	1,109	31,9	$RSD_{Exp.} < RSD_{Horwitz}$
3	50	1,189	16,6	1,257	24,8	$RSD_{Exp.} < RSD_{Horwitz}$

7.2.2.8. Robustez

La robustez del método se determinó mediante el diseño experimental de Youden y Steiner, evaluando siete factores asociados con las condiciones de extracción y cromatografía. En la **Tabla 24**, se resumen los factores analizados, la condición nominal y la variación considerada para cada uno.

Tabla 24. Factores evaluados, condiciones nominales y variaciones consideradas para la evaluación de robustez.

Factor	Descripción	Nominal	Variación
A	Peso de muestra - Etapa 1	1.0000 g $\pm$ 0.0500 g	0.8000 g $\pm$ 0.0500 g
B	Tiempo de extracción - Etapa 3	5 – 10 – 5 min	2,5 – 5 – 2,5 min
C	Tiempo de extracción - Etapa 4	20 min	10 min
D	Volumen de homogenizado - Etapa 6	4 mL	7 mL
E	Sales del Clean Up - Etapa 7	200 mg de MgSO_4 + 75 mg de PSA + 50 mg de C18	200 mg de MgSO_4 + 100 mg de PSA + 100 mg de C18
F	Tiempo de agitación del Clean Up - Etapa 7	5 min	10 min
G	Estabilidad de fases móviles	Preparadas el mismo día	Preparadas con 1 semana de anticipación

Los siete factores fueron evaluados a dos niveles (mayúscula = nivel alto, minúscula = nivel bajo), lo que generó ocho combinaciones experimentales. En la **Tabla 25**, se presentan dichas combinaciones junto con la concentración de OTA determinada en cada caso.

Tabla 25. Combinaciones experimentales según el diseño de Youden y Steiner y concentración de OTA obtenida.

	Combinaciones							
Factor	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A	A	A	A	a	a	a	a
B	B	B	b	b	B	B	b	b
C	C	c	C	c	C	c	C	c
D	D	D	d	d	d	d	D	D
E	E	e	E	e	e	E	e	E
F	F	f	f	F	F	f	f	F
G	G	g	g	G	g	G	G	g
Respuesta OTA (µg/kg)	11,288	10,139	10,182	10,137	10,842	11,048	11,074	10,630

Las concentraciones de OTA en músculo de pollo variaron entre 10,137 y 11,288 µg/kg, con un promedio de 10,667 µg/kg y una desviación estándar (SD) de 0,466 µg/kg.

En la **Tabla 26**, se presentan los valores observados para cada factor $((V.O.)_{factor})$, calculados como la diferencia de medias entre los niveles alto y bajo. Estos se compararon con el criterio de aceptación $(V.O.)_{factor} < \sqrt{2} \times SD$, con el propósito de evaluar si la variación de cada factor influye significativamente en la concentración de OTA.

Tabla 26. Comparación de valores observados (V.O.) de cada factor frente al criterio de aceptación en el estudio de robustez.

Factor	(V.O.) factor	$\sqrt{2} \times SD$	Conclusión
A - a	0,462	0,659	NO existe diferencia significativa
B - b	0,323	0,659	NO existe diferencia significativa
C - c	0,358	0,659	NO existe diferencia significativa
D - d	0,239	0,659	NO existe diferencia significativa
E - e	0,231	0,659	NO existe diferencia significativa
F - f	0,113	0,659	NO existe diferencia significativa
G - g	0,438	0,659	NO existe diferencia significativa

7.2.2.9. Incertidumbre

La estimación de la incertidumbre del método para la determinación de OTA en músculo de pollo se estimó mediante una simulación basada en el cálculo de la concentración de una muestra, utilizando una de las curvas de calibración obtenidas durante la validación (**Anexo 12**). Este enfoque permitió integrar las diferentes fuentes de variabilidad y cuantificar su impacto en el resultado final.

A. Determinación del mensurando

La concentración final del analito (C_{MET}) se calculó a partir de las variables involucradas en el procedimiento analítico. Los valores utilizados para la simulación se presentan en la **Tabla 27**.

$$C_{MET} = C_O \times \frac{f_c \times V_e}{W} \times f_d$$

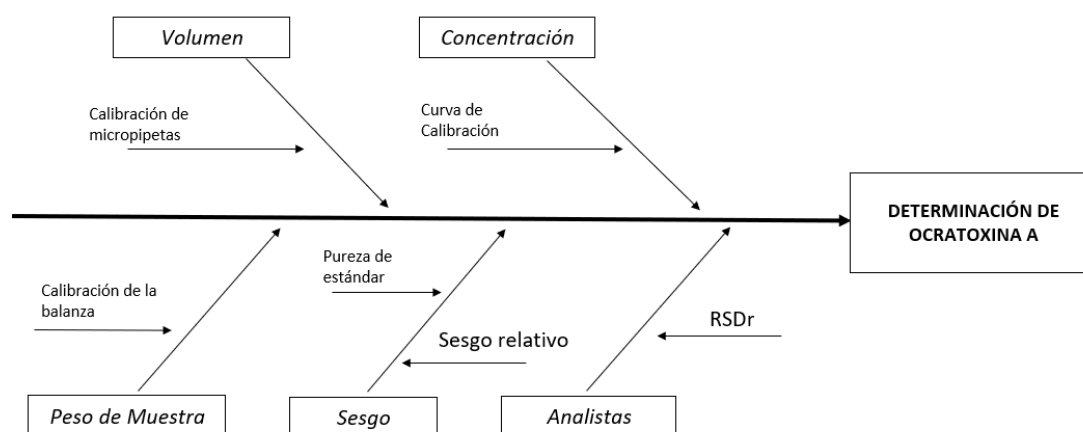
Tabla 27. Valores de las variables empleadas para el cálculo de la concentración final de OTA en músculo de pollo.

Variables	Simulación
Concentración obtenida en la curva de calibración (C_O)	1, 90 ng/mL
Factor de concentración (f_c)	1
Volumen de extracción (V_e)	10 mL
Peso de la muestra (W)	1 g
Factor de dilución (f_d)	1
Concentración final del analito (C_{Met})	19, 04 µg/kg

B. Identificación de las fuentes de incertidumbre

Las fuentes potenciales de variabilidad fueron identificadas mediante un diagrama de Ishikawa (**Figura 8**), las cuales se agruparon en tres categorías principales: **metodología, sesgo y analista**.

Figura 8. Fuentes principales de incertidumbre en la determinación de ocratoxina A.



En la categoría **metodología** se incluyeron los factores directamente involucrados en la ecuación de la concentración final del analito (C_{MET}), tales como:

- La concentración obtenida a partir de la curva de calibración (C_0).
- El volumen de extracción (V_e), asociado a la calibración de la micropipeta de 0.5 mL - 5 mL.
- El factor de concentración (f_c), determinado por la calibración de la micropipeta de 100 - 1000 μ L.
- El peso de la muestra (W), determinado por la calibración de la balanza analítica.
- El factor de dilución (f_d).

En la categoría del **sesgo**, se consideró la incertidumbre asociada a la pureza del estándar analítico y al sesgo relativo entre analistas evaluado en tres niveles de concentración.

Finalmente, en la categoría del **analista**, se evaluó la variabilidad de dos analistas asociada a la repetibilidad del método, estimada a partir de ensayos de precisión realizados en tres niveles de concentración.

C. Estimación de incertidumbres individuales

Las incertidumbres asociadas a cada componente del método fueron estimadas a partir de los datos experimentales y de los certificados de calibración de los equipos utilizados. Los resultados se presentan en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Incertidumbres individuales por fuente de variabilidad.

Categoría	Componente evaluado	Símbolo	Incertidumbre estimada
Metodología	Concentración (curva de calibración)	u_{C_0}	0,03434
	Volumen de extracción	u_{V_e}	0,003150
	Factor de concentración	u_{f_c}	0,00055
	Peso de la muestra	u_W	0,00000000476015
	Factor de dilución	u_{f_d}	0
	Incertidumbre combinada de la metodología	$U_{comb.met.}$	0,344
Analista	Incertidumbre del analista	$U_{Analista}$	0,002604966
Sesgo	Incertidumbre combinada del sesgo	$U_{comb.sesgo}$	0,29660

D. Contribución de las fuentes de incertidumbre

Con el fin de evaluar la influencia de cada variable en el resultado final, se determinó la contribución porcentual de cada fuente de incertidumbre (**Tabla 29 y Figura 9**).

Tabla 29. Contribución de los componentes de incertidumbre en la determinación de OTA.

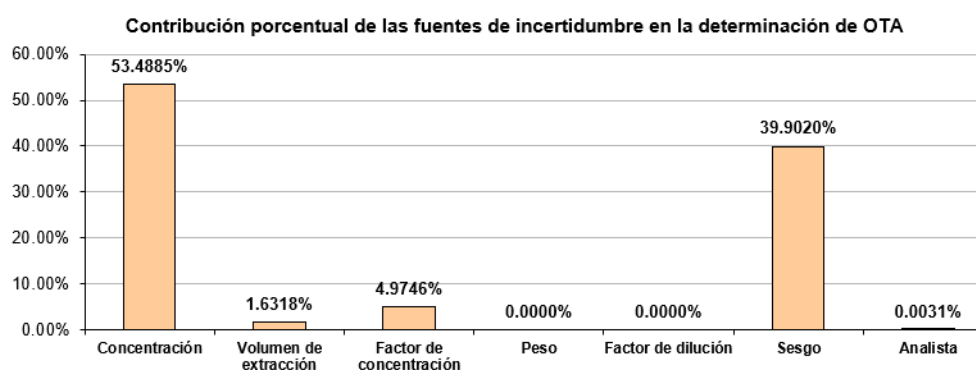
Fuente de incertidumbre	Valor (Xi)	Incertidumbre (Uxi)	Participación (%)
Concentración final del analito (µg/kg)	19,04	0,03434	53,49885
Volumen de extracción (mL)	10	0,003150	1,6318
Factor de concentración	1	0,00055	4,9746
Peso de muestra (g)	1	0,00000000476015	0

Factor de dilución	1	0	0
Sesgo	—	0, 29660	39, 9020
Analista	2	0, 00260	0, 0031

Los resultados muestran que la principal fuente de incertidumbre del método corresponde a la concentración obtenida en la curva de calibración, con una contribución del 53,49 %, seguida por el sesgo, con 39,90 %.

En menor proporción contribuyen el factor de concentración (4,97 %), el volumen de extracción (1,63 %) y el analista (0,0031 %). En contraste, las contribuciones asociadas al peso de la muestra y al factor de dilución resultaron nulas en comparación con las otras fuentes evaluadas.

Figura 9. Contribución porcentual de las fuentes de incertidumbre en la determinación de ocratoxina A en músculo de pollo.



E. Incertidumbre global y expandida

La incertidumbre global del método se obtuvo mediante la raíz cuadrada de la suma cuadrática de las contribuciones individuales de cada incertidumbre. Posteriormente, se calculó la incertidumbre expandida (U_E) aplicando un factor de cobertura $k = 2$, correspondiente a un nivel de confianza del 95 %. Los resultados se presentan en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Incertidumbre global y expandida del método.

Parámetro	Simulación
Concentración del analito ($\mu\text{g/kg}$)	19,04

Incertidumbre global (µg/kg)	0,45
Incertidumbre expandida (µg/kg)	0,91

El valor de la incertidumbre expandida representa el intervalo dentro del cual se espera que se encuentre la concentración de OTA determinada mediante el método analítico con un nivel de confianza del 95 %. En términos prácticos, el resultado final del método se expresa como:

- **$19,04 \pm 0,91 \mu\text{g/kg}$**

lo que indica que el valor verdadero de la concentración de OTA se encuentra en el intervalo de 18,13 a 19,95 µg/kg.

7.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE MERCADO

Se analizaron un total de 30 muestras de músculo de pechuga de pollo provenientes de cinco mercados de abastos de Lima Metropolitana. En todos los casos, la aplicación del método validado no evidenció la presencia de Ocratoxina A (OTA), por lo que no fue necesario aplicar los criterios de confirmación establecidos en la metodología. La **Tabla 31** muestra la distribución de las muestras evaluadas por mercado y el resultado obtenido.

Tabla 31. Resultados de la determinación de Ocratoxina A en muestras de pollo de diferentes mercados de Lima Metropolitana.

Mercado	Código	N° de muestras	Resultado OTA
Lince	M1	6	No detectado
San Isidro	M2	6	No detectado
Jesús María	M3	6	No detectado
Miraflores	M4	6	No detectado
Surquillo	M5	6	No detectado
Total	—	30	No detectado

VIII. DISCUSIÓN

El método desarrollado y validado para determinar ocratoxina A (OTA) en músculo de pollo UPLC-MS/MS presentó un desempeño analítico adecuado y cumplió con los criterios establecidos por la FDA para métodos cuantitativos.

La aplicación del método desarrollado y validado en muestras de músculo de pollo obtenidas por un muestreo por conveniencia en mercados de Lima Metropolitana no detectó niveles de OTA y debe considerarse como una evaluación preliminar, por tratarse de una muestra no representativa. Hay necesidad de llevar a cabo estudios adicionales que sean representativas tanto en Lima Metropolitana como en otras regiones del país, a fin de determinar de manera sistemática la presencia de la OTA en dicho producto.

Cabe señalar que durante el desarrollo y validación del método, se identificaron diversos puntos críticos que resultaron relevantes para el desempeño analítico. Estos se agruparon en tres factores principales: **(a)** Condiciones instrumentales y el método de extracción, **(b)** Criterios de validación y comparación con guías internacionales, y **(c)** Procedimiento aplicado a las muestras recolectadas en mercados de abastos.

A continuación, se discuten las ventajas y las limitaciones derivadas de estos factores, con el fin de contextualizar los resultados y su relevancia en el ámbito analítico y sanitario.

a. Condiciones instrumentales y método de extracción

La optimización de los parámetros cromatográficos y espectrométricos permitió obtener picos bien definidos, simétricos y con resolución adecuada para la separación y detección de OTA. Inicialmente, se realizó la sintonización del sistema con el fin de establecer un patrón de identificación para la micotoxina.

La elección del modo de ionización positivo (ES^+) difiere de lo reportado por Streit y col. (2022) y Yang y col. (2021), quienes emplearon ionización negativa (ES^-) (16, 87). Esta diferencia se debe a que la estructura molecular de la OTA contiene grupos ácidos capaces de ionizarse en ambos modos (positivo y negativo); sin embargo, bajo las condiciones experimentales del presente estudio, el modo positivo proporcionó una señal más intensa para el ion precursor ($m/z\ 404,2 \rightarrow 238,9$), lo que motivó su selección. Este comportamiento podría atribuirse a la interacción del formiato de amonio y el ácido fórmico presentes en las fases

móviles, los cuales estabilizan el ion protonado y favorecen una fragmentación más reproducible (115).

En la literatura, las fases móviles más empleadas en la detección de micotoxinas consisten en mezclas de agua y solventes orgánicos (acetonitrilo o metanol), junto con modificadores como ácido fórmico, ácido acético, formiato o acetato de amonio (116). En este trabajo, la elección de formiato de amonio y ácido fórmico se basó en su capacidad para promover la formación de aductos de amonio $[M+NH_4]^+$, los cuales son más estables y fácilmente fragmentables (116). Asimismo, se optimizaron parámetros como la energía de colisión y el voltaje de cono, logrando una mejor definición del pico y transiciones iónicas comparables con estudios previos. El tiempo de corrida total de seis minutos confirmó la eficiencia del sistema UPLC frente a los métodos HPLC tradicionales, que suelen requerir más de diez minutos (23).

La selección del músculo de pollo (pechuga) como matriz de estudio respondió principalmente a criterios sociales y de consumo. En el Perú, el pollo es la principal fuente de proteína animal, con un consumo promedio de 52,35 kg por persona al año (4), siendo un alimento básico en todos los niveles socioeconómicos y regiones del país (117). De acuerdo con el *Boletín Estadístico Mensual del Sector Avícola* (2025), su consumo continúa en aumento respecto al 2023, posicionando al Perú como el mayor consumidor de carne de pollo en Latinoamérica (1).

Además, su elección se justifica por su amplio uso dentro de la gastronomía peruana, especialmente en la comida criolla, debido a su sabor, accesibilidad y valor nutricional. A diferencia de las vísceras (como hígado o riñón), cuyo consumo es menos frecuente pese a su menor costo, la pechuga de pollo forma parte habitual de la alimentación cotidiana e infantil, lo que refuerza su pertinencia como matriz de estudio (1).

No obstante, dicha elección representa una limitación, ya que órganos con funciones metabólicas, de filtración y excreción, como el hígado y el riñón, presentan mayor tendencia a la bioacumulación de OTA. Estudios como los de Biró y col. (2002) y Paoloni y col. (2018) han reportado concentraciones más elevadas de esta micotoxina en dichos órganos en comparación con el músculo, donde la acumulación ocurre principalmente a través del transporte proteico y sanguíneo (23, 59). Aún así, esta matriz resulta pertinente desde la perspectiva de la salud pública, al proporcionar información útil para futuros estudios que incluyan otros tejidos y permitan comprender mejor la distribución de la micotoxina.

Desde el punto de vista experimental, el músculo de pollo constituye una matriz compleja, debido a su contenido de proteínas y lípidos, lo que puede dificultar la extracción del analito y generar interferencias durante el análisis instrumental. Por esta razón, se desarrolló un procedimiento basado en la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE, *dispersive Solid Phase Extraction*), tomando como referencia el estudio de Wang (89). Esta técnica consiste en incorporar directamente un sorbente sólido al extracto de la muestra, favoreciendo la retención de compuestos interferentes, y por tanto, la limpieza de la matriz. Este enfoque presenta ventajas frente a métodos convencionales, ya que reduce costos, tiempo de procesamiento y consumo de solventes, sin comprometer la eficiencia de recuperación (118).

Con respecto al método de referencia, se realizaron modificaciones en el procedimiento de extracción con el objetivo de adaptarlo a la determinación de OTA en músculo de pollo mediante UPLC-MS/MS. Estas modificaciones incluyeron la incorporación de una etapa de hidratación de la muestra, la optimización del procedimiento de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) y el control de la temperatura durante la centrifugación.

La incorporación de una etapa de hidratación tuvo como propósito optimizar la extracción de OTA desde una matriz compleja como el músculo de pollo. En los métodos QuEChERS, la adición de agua antes de la extracción favorece la hidratación de la muestra, y disminuye la interacción entre el analito y los componentes de esta matriz, lo que se traduce en una mayor eficiencia del proceso. En este sentido, Jettanajit y col., durante el desarrollo de un método para la determinación de OTA en arroz integral mediante UHPLC-MS/MS, reportaron que la hidratación de la muestra favorece la liberación de la micotoxina al reducir su interacción con la matriz (119). Aunque este estudio se desarrolló en una matriz diferente, este principio corresponde al fundamento del método QuEChERS y puede extrapolarse al desarrollo del método en matrices cárnicas, como el músculo de pollo.

Asimismo, se optimizó la composición del procedimiento de limpieza mediante la técnica de dSPE, con el objetivo de reducir el efecto matriz sin comprometer la recuperación de OTA. El C18 se emplea para remover compuestos apolares, principalmente lípidos y grasas; mientras que el PSA elimina compuestos polares, como ácidos orgánicos, azúcares y algunos pigmentos (120). En el presente estudio se utilizaron 50 mg de C18 y 75 mg de PSA, en lugar de los 150 mg de cada sorbente empleados por Wang y col. (2021). Esta modificación se sustentó en el estudio de Jettanajit y col. (2016), quienes evaluaron diferentes cantidades de C18 y observaron que el empleo de 50 mg proporcionó mejores recuperaciones de OTA. Los autores concluyeron que un incremento de este compuesto puede favorecer la retención parcial del analito debido a

sus interacciones hidrofóbicas, disminuyendo su recuperación (119). De manera similar, Hu y col. (2024) señalaron que un exceso de PSA puede comprometer la recuperación de OTA, ya que la naturaleza ácida de esta micotoxina favorece su interacción con este absorbente (121). En conjunto, estos antecedentes respaldan la reducción de ambos sorbentes en el presente estudio, permitiendo mantener una adecuada limpieza del extracto.

Adicionalmente, se incorporó 200 mg de sulfato de magnesio durante el procedimiento de limpieza. Este compuesto actúa como agente deshidratante y ayuda a eliminar el agua residual del extracto. No obstante, la cantidad empleada fue cuidadosamente seleccionada, ya que concentraciones excesivas pueden dificultar la homogenización de la muestra, debido a la formación de conglomerados de sal, afectando la eficiencia de la extracción (122).

Finalmente, se modificó la temperatura de centrifugación, realizándose a 5 °C (5000 rpm durante 5 minutos), con el propósito de mejorar la separación de fases y reducir los interferentes de la matriz. Esta modificación se fundamentó en el estudio de Shuping y colaboradores (121), quienes indicaron que la centrifugación a bajas temperaturas favorece la precipitación de proteínas y lípidos presentes en la muestra, permitiendo obtener extractos más limpios y reduciendo el efecto matriz durante el análisis.

En conjunto, estas modificaciones permitieron adaptar el procedimiento de extracción a las características del músculo de pollo y a las condiciones instrumentales empleadas en el presente estudio, obteniéndose posteriormente recuperaciones satisfactorias y un adecuado desempeño durante la validación del método. Como resultado, el método presentó recuperaciones superiores al 95 %, evidenciando que los cambios introducidos permitieron obtener una extracción eficiente y una adecuada limpieza de la matriz.

Con respecto a la curva de calibración, se obtuvo una excelente linealidad ($r^2 = 0,999$). La ecuación de la recta ($A = b (Co) + a$) permitió relacionar el área cromatográfica con la concentración inicial de OTA, validando el modelo dentro del rango de trabajo establecido.

b. Criterios de validación y comparación con guías internacionales

La validación se realizó siguiendo los parámetros establecidos por la FDA y guías complementarias de ISP Chile, SANTE y Eurachem. Los parámetros evaluados incluyeron selectividad, linealidad, sensibilidad analítica, límites de detección y cuantificación, veracidad, precisión, rango de trabajo, robustez e incertidumbre.

La selectividad se confirmó mediante la comparación de cromatogramas en tres distintas condiciones experimentales, evidenciándose ausencia de interferencias en el blanco y coincidencia en el tiempo de retención entre muestras fortificadas y el estándar.

La sensibilidad analítica, evaluada a través de la pendiente de la curva de calibración, mostró un valor elevado y significativamente distinto de cero, indicando que pequeñas variaciones en la concentración de OTA generan incrementos notables en la señal cromatográfica.

En cuanto a los límites de detección ($LOD = 0,30 \mu\text{g/kg}$) y cuantificación ($LOQ = 0,95 \mu\text{g/kg}$), estos cumplen con el criterio del ISP Chile ($LOD \leq 1/5 \text{ LMP}$ y $LOQ \leq 2/5 \text{ LMP}$), considerando un valor orientativo de $5 \mu\text{g/kg}$. Además, se encuentran dentro del rango reportado en la literatura, Streit y col. (2022) obtuvo un $LOD = 0,15 \mu\text{g/kg}$ y un $LOQ = 0,5 \mu\text{g/kg}$; y Paoloni y col. (2018) obtuvo un $LOD = 0,27 \mu\text{g/kg}$ y un $LOQ = 0,82 \mu\text{g/kg}$. Confirmando que el método es capaz de detectar y cuantificar la micotoxina desde niveles de concentración bajos de manera confiable (16, 23).

La linealidad presentó un coeficiente de determinación (r^2) mayor de 0,99, un valor que supera el mínimo aceptado (0,98) para métodos cromatográficos. Asimismo, las pruebas de inferencia confirmaron la significancia de la pendiente y del coeficiente de correlación; mientras que el intercepto no presentó significancia estadística, demostrando que el modelo se ajusta adecuadamente. El rango de trabajo ($0,95\text{--}50 \mu\text{g/kg}$) mostró buena proporcionalidad lineal ($r > 0,99$; $r^2 > 0,98$), lo que respalda la aplicabilidad del método tanto en concentraciones cercanas al límite de cuantificación como en niveles más altos.

La veracidad mostró recuperaciones entre 102 % y 109,24 %, dentro del rango aceptado por la guía SANTE (70–120 %), y coincide con estudios previos (16, 23, 59). Los análisis estadísticos ($p < 0,05$) confirmaron que los valores se encuentran dentro de los límites establecidos.

La precisión, expresada como desviación estándar relativa (RSD), se situó entre 1,09 % y 2,8 % en condiciones de repetibilidad, y entre 1,11 % y 3 % en reproducibilidad intralaboratorio, cumpliendo los criterios establecidos por la Comisión Europea ($\leq 20 \%$ y $\leq 30 \%$, respectivamente) y por la CIPAC ($\%RSD_{\text{exp}} < \%RSD^{\text{Horwitz}}$). Esto demuestra una baja variabilidad tanto entre réplicas como entre analistas, confirmando que el método es preciso, repetible y reproducible.

En lo que respecta a la robustez, se aplicaron ocho combinaciones experimentales basadas en el peso de muestra, tiempo de extracción, volumen de homogeneizado, cantidad de sales en el

clean-up, tiempo de agitación y estabilidad de las fases móviles. Estas combinaciones se mantuvieron dentro de los límites establecidos, evidenciando que pequeñas variaciones experimentales no afectan significativamente los resultados, confirmando la robustez del método.

Por último, en cuanto a la incertidumbre, las principales fuentes fueron, la concentración derivada de la curva (53,49 %) y el sesgo (39 %), representando más del 90 % de la incertidumbre total. Se obtuvo una incertidumbre global de 0,45 ug/kg y una incertidumbre expandida de 0,91 ug/kg ($k=2$), lo que permitió concluir que el presente método cuenta con un resultado final de $19,04 \pm 0,91 \mu\text{g/kg}$, lo que indica que el valor verdadero de la concentración de OTA se encuentra en el intervalo de 18,13 a 19,95 $\mu\text{g/kg}$.

c. Procedimiento aplicado a las muestras recolectadas

Se analizaron treinta muestras de músculo de pollo procedentes de cinco mercados de abastos de Lima Metropolitana, en las cuales no se detectó la presencia de ocratoxina A (OTA). Estos resultados coinciden con lo reportado por Yang y col. (2021) (87, 90), quienes emplearon una metodología multianálito para la detección de diversas micotoxinas, incluida la OTA, en hígado, riñón, músculo y muslo de pollo. A pesar de que su método mostró una alta sensibilidad y precisión, similares a las del presente estudio, tampoco se evidenció la presencia de OTA en las muestras de músculo.

Este comportamiento podría explicarse por diversas hipótesis. Una de ellas plantea que la musculatura, al no ser un órgano de desintoxicación, no acumula la micotoxina en concentraciones detectables. En el estudio de Yang y col., se registró la presencia de OTA en hígado y riñón, órganos con funciones metabólicas y de excreción, lo que respalda la idea de que dichas matrices presentan mayor tendencia a la acumulación, debido a su participación directa en los procesos de biotransformación y eliminación de toxinas (90).

Asimismo, es importante considerar que este estudio analizó un número limitado de muestras. Se seleccionaron cinco distritos de Lima Metropolitana, y en cada uno se adquirieron seis pechugas de pollo de un único puesto dentro de un centro de abastos. En consecuencia, los resultados no reflejan necesariamente la variabilidad real del comercio avícola en la ciudad. Para futuras investigaciones, se sugiere ampliar el número de muestras y puntos de muestreo por distrito, así como incluir zonas con menor acceso a control sanitario o a buenas prácticas dentro de la cadena productiva.

d. Limitaciones y consideraciones adicionales

El desarrollo metodológico presentó varios retos que deben considerarse en futuras investigaciones.

En primer lugar, aunque el UPLC-MS/MS es una herramienta avanzada y de alta precisión, su adquisición, mantenimiento y operación implican costos elevados. El equipo requiere limpiezas y mantenimientos periódicos para evitar la saturación de bombas y columnas, y su correcta operación demanda personal capacitado, ya que es sensible a variaciones operativas. Rezquellah (2015) destaca la importancia del mantenimiento preventivo y de la formación técnica para garantizar la estabilidad y reproducibilidad de los resultados (123).

Un segundo punto crítico identificado fue la estabilidad del estándar de OTA, ya que se observó una disminución progresiva de la señal después de tres semanas, incluso cuando la solución se mantenía refrigerada a -2°C y protegida de la luz. Un comportamiento similar fue reportado por Biró y col. (2002) (28), quienes evidenciaron una reducción significativa en la detección de OTA en matrices tisulares y plasmáticas hacia el día 21, lo que confirma la alta sensibilidad de esta molécula frente a cambios de pH, exposición a la luz, oxígeno y presencia de medios acuosos o matrices biológicas (124). Además, en dicho estudio, los autores emplearon la técnica ELISA, que permitió detectar señales de OTA hasta el día 28, aunque en forma hidroxilada, lo que sugiere una posible modificación estructural del metabolito. En el presente trabajo, una hipótesis para la pérdida de señal es la formación de productos derivados por interacción de la OTA con los solventes utilizados en la solución madre (cloroformo y metanol), generando compuestos estructuralmente modificados o inestables que no son reconocidos por el método UPLC-MS/MS.

Finalmente, se identifica una limitación regulatoria importante: la ausencia de Límites Máximos Permisibles (LMP) específicos para OTA en carnes avícolas, tanto a nivel internacional como nacional. El Codex Alimentarius (CXS 193-1995, actualización 2023) y el Reglamento (UE) 2022/1370 establecen LMP para cereales, especias y otros productos vegetales, pero no contemplan de forma generalizada productos de origen animal.

El único documento que hace referencia a una propuesta relacionada con la matriz de pollo es el Reglamento (CE) N.º 123/2005 de Eslovaquia, que menciona un valor de referencia de $5\text{ }\mu\text{g/kg}$ de OTA en carnes avícolas, sin mayores especificaciones. En el caso del Perú, la información es aún más limitada: la única normativa disponible vinculada a OTA (*MET-*

UCCIRT-Res-50_2-Ocratoxina-LC) aborda exclusivamente matrices vegetales como cacao, café y ajíes, sin considerar la carne de pollo (125).

Este vacío normativo requiere atención prioritaria, dado el elevado consumo per cápita de pollo en el país y la evidencia de que la exposición crónica a OTA, incluso en bajas concentraciones, puede generar efectos teratogénicos, hepatotóxicos, neurotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos (126). En consecuencia, resulta urgente establecer valores de referencia nacionales y fortalecer los programas de control de micotoxinas, en coordinación con SENASA, con el fin de garantizar la seguridad alimentaria y la protección de la salud pública.

El desarrollo del presente método reviste importancia tanto científica como sanitaria. Desde un enfoque técnico, constituye el primer procedimiento documentado en el Perú que emplea la tecnología UPLC-MS/MS para la determinación de OTA en músculo de pollo, validado conforme a estándares internacionales. Este avance fortalece la capacidad analítica nacional, al proporcionar un método rápido, sensible y reproducible que puede ser implementado en laboratorios de control de calidad alimentaria. Desde una perspectiva de salud pública, la disponibilidad de este método permitirá monitorear contaminantes emergentes en productos de alto consumo, como es el pollo, contribuyendo así a la generación de datos nacionales que sustenten futuras políticas de regulación y vigilancia sanitaria.

IX. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico para la determinación de ocratoxina A (OTA) en músculo de pollo (pechuga) mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) con ionización por electrospray en modo positivo, logrando una adecuada separación, detección y cuantificación del analito en la matriz.
- El método fue validado satisfactoriamente, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos en las principales guías internacionales de validación analítica (Eurachem, SANTE/2023, etc.) (30, 79). Se demostró selectividad y sensibilidad adecuadas para la matriz evaluada, con un límite de detección (LOD) de 0,30 µg/kg y un límite de cuantificación (LOQ) de 0,95 µg/kg. Asimismo, el método presenta una linealidad excelente dentro del rango de trabajo de 0,95 y 50 µg/kg ($r \geq 0,999$ y $r^2 \geq 0,999$). La veracidad del método fue confirmada mediante ensayos de recuperación, obteniéndose valores entre 102% y 109,23%, dentro de los rangos aceptables para este tipo de análisis. La precisión también fue adecuada, evidenciándose valores de repetibilidad ($\%RSD_r$) menores a 2,8% y reproducibilidad ($\%RSD_R$) menores a 3%, lo cual indica que el método es consistente y reproducible. Además, el método demostró ser robusto frente a ciertas variaciones, y la estimación de incertidumbre analítica se mantuvo dentro de los límites aceptados para este tipo de determinaciones.
- La aplicación del método para la determinación OTA en muestras de músculo de pollo procedentes de cinco mercados de Lima Metropolitana no identificó niveles detectables de OTA.
- Los resultados evidencian la utilidad del método para el monitoreo de la inocuidad del músculo de pollo.
- Se requiere de estudios adicionales con muestras representativas de mercados de Lima y de otras regiones del país para determinar de manera sistemática la presencia de OTA en músculo de pollo.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sistema Integrado de Estadística Agraria (SIEA). Boletín estadístico mensual de la producción y comercialización de productos avícolas 2025 [Internet]. Lima: MIDAGRI; 2025 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/informes-publicaciones/6617104-boletin-estadistico-mensual-del-sector-avicola-2025>
2. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). Sector avícola es responsable de proveer el 70% de la proteína animal para la población peruana [Internet]. Lima: MIDAGRI; 2023 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/863349-midagri-sector-avicola-es-responsable-de-proveer-el-70-de-la-proteina-animal-para-la-poblacion-peruana>
3. Ministerio del Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). MIDAGRI impulsa el sector avícola y la agricultura familiar en el Día del Pollo a la Brasa. [Internet]. Lima: MIDAGRI; 2025 [citado 13 de julio de 2026]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/1211671-midagri-impulsa-el-sector-avicola-y-la-agricultura-familiar-en-el-dia-del-pollo-a-la-brasa>
4. Ruiz, B. ¿Cómo va el consumo latinoamericano de pollo y huevo? [Internet]. Cátedra Avícola Latam; 2024. [citado 13 de julio de 2026]. Disponible en: <https://catedralatam.com/como-va-el-consumo-latinoamericano-de-pollo-y-huevo/>
5. Ruiz, B. Ranking de producción avícola latinoamericana en 2022 [Internet]. Cátedra Avícola Latam; 2023 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://catedralatam.com/ranking-de-produccion-avicola-latinoamericana-en-2022/>
6. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Programa Nacional de monitoreo de contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos. [Internet]. Lima: SENASA; 2019 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2019/07/PROGRAMA-NACIONAL-DE-MONITOREO.pdf>
7. Soriano del Castillo JM, y col. Micotoxinas en alimentos [Internet]. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2007 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479788087.pdf>
8. Fink-Gremmels J., van der Merwe D. Mycotoxins in the food chain: contamination of foods of animal origin [Internet]. In: Chemical hazards in foods of animal origin. Wageningen Academic Publishers; 2019 [citado 6 de abril de 2026]. p. 241–61. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/329326433_Mycotoxins_in_the_food_chain_contamination_of_foods_of_animal_origin

9. Serrano-Coll HA, Cardona-Castro N. Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Rev CES Med.* [Internet]. 2015 [citado 6 de abril de 2026]; 29(1):143-52. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052015000100012
10. Ravelo Abreu A, Rubio Armendáriz C, Gutiérrez Fernández AJ, Hardisson de la Torre A. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutr Hosp* [Internet]. 2011 [citado 6 de abril de 2026]; 26(6):1215-26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22411363/>
11. Castro J, Alvarado A, Koga Y, Tinoco R. Cuantificación de Micotoxinas en Ingredientes Alimenticios Utilizados en la Dieta de Aves Comerciales. *Rev Inv Vet Perú* [Internet]. 2015 [citado 13 de julio de 2026]; 26(4):558-564. Disponible en <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/11209/10280>
12. Guevara I, Rondon J, Mendoza Y, Fuentes N, Del Águila R, Maturrano A. Cuantificación de hongos y micotoxinas en alimento balanceado proveniente de granjas avícolas en Ucayali, Perú. *Rev Inv Vet Perú* [Internet]. 2025 [citado 13 de julio de 2026]; 36(1). Disponible en https://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172025000100022
13. Flores C, Hernandez L, Vazquez J. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Téc Pecu Méx* [Internet]. 2006 [citado 13 de julio de 2026]; 44(2):247-256. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/613/61344210.pdf>
14. Fareed G, Hassan S, Ashraf M, Ahmed N. Determination of Aflatoxin and Ochratoxin in poultry feed ingredients and finished feed in humid semi-tropical environment. *J. Adv. Vet. Anim. Res* [Internet]. 2014 [citado 13 de julio de 2026]; 1(4):201-207. Disponible en https://bdvets.org/JAVAR/V1I4/a38_pp201-207.pdf
15. Banahene JCM, Ofosu IW, Odai BT, Lutterodt HE, Agyemang PA, Ellis WO. Ochratoxin A in food commodities: A review of occurrence, toxicity, and management strategies. *Heliyon* [Internet]. 2024 [citado 6 de abril de 2026]; 10(20):e39313. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39640601/>

16. Streit B, Czabany T, Weingart G, Marchetti-Deschmann M, Prasad S. Toolbox for the Extraction and Quantification of Ochratoxin A and Ochratoxin Alpha Applicable for Different Pig and Poultry Matrices. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2022 [citado 6 de abril de 2026]; 14(7):432. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/7/432>
17. Alaboudi AR, Osaili TM, Otoum G. Quantification of mycotoxin residues in domestic and imported chicken muscle, liver and kidney in Jordan. *Food Control* [Internet]. 2022 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713521006496>
18. Tolosa J, Ruiz MJ, Ferrer E, Vila-Donat P. Ochratoxin A: Occurrence and carry-over in meat and meat by-products. A Review. *Rev. Toxicol* [Internet]. 2020 [citado 13 de julio de 2026]; 37:106-110. Disponible en: <https://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/2020/12/vol-37.2-42-46.pdf>
19. Sopel M, van den H, Grzetic J, Nijs M. Survey on Ochratoxin A Occurrence in Cured Meat Products in The Netherlands. *Toxins* [Internet]. 2026 [citado 13 de julio de 2026]; 18(6), 262. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/18/6/262>
20. Castro R. Detección de Ocratoxina A en hígados de gallinas comercializadas para consumo humano en mercados formales de Lima Norte [tesis de pregrado en Internet]. Lima (PE): Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2025 [citado el 13 de julio de 2026]. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/afba4402-b8d9-4d48-808c-7280bfc4d2ec/content>
21. Bonerba E, Manfredi A, Dimuccio MM, Lorusso P, Pandiscia A, Terio V, Di Pinto A, Panseri S, Ceci E, Bozzo G. Ochratoxin A in poultry supply chain: Overview of feed occurrence, carry-over, and pathognomonic lesions in target organs to promote food safety. *Toxins* [Internet]. 2024 [citado 6 de abril de 2026]; 16(11):487. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/16/11/487>
22. Martínez Torres C.C., Chaves Silva D.C. Ocratoxinas y su potencial nefrotóxico. *Rev. nefrol. dial. traspl.* [Internet]. 2019 [citado 6 de abril de 2026]; 39(1):73-81. Disponible en: https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2346-85482019000100009
23. Paoloni A, Solfrizzo M, Bibi R, Pecorelli I. Development and validation of LC-MS/MS method for the determination of ochratoxin A and its metabolite ochratoxin α in poultry tissues and eggs. *J Environ Sci Health B* [Internet]. 2018 [citado 6 de abril de 2026]; 53(5):327–333. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/322902481_Development_and_validation_of_LC-MSMS_method_for_the_determination_of_Ochratoxin_A_and_its_metabolite_Ochratoxin_a_in_poultry_tissues_and_eggs

24. Comisión Europea. Reglamento (UE) 2022/1370 de la Comisión de 5 de agosto de 2022 por el que se modifica el Reglamento (CE) N.º 1881/2006 en lo relativo a los niveles máximos de ocratoxina A en determinados productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* [Internet]. 2022 [citado 6 de abril de 2026]; L 206:11–14. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1370>
25. Zafar, S., Nisar, S., Asi, M., Jinap, S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control* [Internet]. 2014 [citado 6 de abril de 2026]; 43:98-103. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514001169>
26. Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA). Informe del monitoreo de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos, año 2021. [Internet]. Lima: SENASA; 2022 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/senasa/informes-publicaciones/2936134>
27. Resolución Directoral N° 0101-2022-MIDAGRI-SENASA-DIAIA. *El Peruano* [Internet]. Lima: El Peruano; 2022 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/4016027/Resoluci%C3%B3n%20Directoral%200101-2022-MIDAGRI-SENASA-DIAIA.pdf>
28. Biró K., Solti L., Barna-Vetró I., y col. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathol.* [Internet]. 2002 [citado 6 de abril de 2026]; 31(2):141-8. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03079450120118621>
29. Gaikwad P.V., Sawant S.D., Ghante M.R., Munot N.M. Ultra performance liquid chromatography: a recent novel development in HPLC. *Pharm Glob IJCP* [Internet]. 2010 [citado 6 de abril de 2026]; 1(9). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/267220646>
30. Eurachem. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 3rd ed. [Internet]. [S.l.]: Eurachem; 2024 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_3rd_ed_V1_EN.pdf

31. Al-Taher F., Cappozzo J., Zweigenbaum J., y col. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Food Control* [Internet]. 2017 [citado 6 de abril de 2026];72:27-35. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713516303917>
32. Hernández M., Juan-García A., Moltó JC., y col. Evaluation of mycotoxins in infant breast milk and infant food, reviewing the literature data. *Toxins* (Basel) [Internet]. 2021 [citado 6 de abril de 2026];13(8):535. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/8/535>
33. Tonon K.M., Savi G.D., Scussel V.M. Application of a LC–MS/MS method for multi-mycotoxin analysis in infant formula and milk-based products for young children commercialized in Southern Brazil. *J Environ Sci Health B* [Internet]. 2018 [citado 6 de abril de 2026]; 53(10):685-91. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03601234.2018.1474560>
34. Centro de Capacitación y Referencia FAO/OIEA para el Control de los Alimentos y los Plaguicidas. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas ISSN 75 1014-2916 [Internet]. 2003 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/Y1390S/y1390s00.htm>
35. Bignami M., Bodin L., Chipman J.K., y col. Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal* [Internet]. 2020 [citado 6 de abril de 2026]; 18(5):e06113. Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2020.6113>
36. Reyes, A. Evaluación ocratoxina A (OTA) por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en *Capsicum annum* L. “Páprika” procedente del mercado mayorista de Lima-Perú [tesis de pregrado en Internet]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2021 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://files.core.ac.uk/download/pdf/483813409.pdf>
37. Faisal Z., Derdák D., Lemli B., y col. Interaction of 2'R-ochratoxin A with serum albumins: binding site, effects of site markers, thermodynamics, species differences of albumin-binding, and influence of albumin on its toxicity in MDCK cells. *Toxins* [Internet]. 2018 [citado 6 de abril de 2026]; 10(9):E353. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30200461/>

38. Kőszegi T., Poór M. Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins* [Internet]. 2016 [citado 6 de abril de 2026]; 8(4):111. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/4/111>
39. International Agency for Research on Cancer (IARC). Chapter 2. Chemical and physical characteristics of the principal mycotoxins. In: Wild C.P., Miller J.D., Groopman J.D., y col., editors. Mycotoxin control in food. *IARC Sci Publ.* [Internet]. 2012 [citado 6 de abril de 2026]; (158):31-8.
40. González Salgado A. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A [tesis doctoral en Internet]. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2010 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://docta.ucm.es/entities/publication/cab26f48-ea9b-4dd0-89db-6863d69a808d>
41. El Khoury A., Atoui A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins* (Basel) [Internet]. 2010 [citado 6 de abril de 2026]; 2(12):461-93. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/2/4/461>
42. Pardo Haya E. Ecofisiología de cepas de *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum* productoras de ocratoxina A [tesis doctoral en Internet]. Lleida: Universidad de Lleida; 2005 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFichaConsulta.do?idFicha=134785>
43. Vartiainen S., Yiannikouris A., Apajalahti J., y col. Comprehensive evaluation of the efficiency of yeast cell wall extract to adsorb ochratoxin A and mitigate accumulation of the toxin in broiler chickens. *Toxins* (Basel) [Internet]. 2020 [citado 6 de abril de 2026]; 12(1):37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31936055/>
44. López de Cerain A., Jiménez A.M., Ezpeleta O., y col. Efectos tóxicos de la ocratoxina A. *Rev Toxicol.* [Internet]. 2024 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.adiveter.com/ftp_public/articulo804.pdf
45. Ali AE-MA, Refat NA, Mowafy RE, Gaheen SA. Experimental pathological studies on ochratoxicosis in broiler chickens. *Zagazig Vet J* [Internet]. 2019 [citado 13 de julio de 2026]; 45(1):155–64. Disponible en: https://zvzj.journals.ekb.eg/article_28660.html
46. Gholampour Azizi I., Rahimi K., Shateri S. Ochratoxin: contamination and toxicity (A review). *Global Veterinaria* [Internet]. 2012; [citado 6 de abril de 2026]; 8(5):519–524. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/267783733_Ochratoxin_Contamination_and_Toxicity_A_Review

47. Zhai S., Zhu Y., Feng P., y col. Ochratoxin A: its impact on poultry gut health and microbiota—an overview. *Poultry Sci.* [Internet]. 2021 [citado 6 de abril de 2026]; 100(5). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121000717>
48. Battacone G, Nudda A, Pulina G. Effects of Ochratoxin A on Livestock Production. *Toxins* [Internet]. 2010 [citado 13 de julio de 2026]; 8(2):1796-1824. Disponible en: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3153269/?utm_source=chatgpt.com
49. Menka J., Williams I., y col. Ochratoxin A in food commodities: a review of occurrence, toxicity, and management strategies. *Heliyon* [Internet]. 2024 [citado 6 de abril de 2026]; 10(20):e153443. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024153443>
50. O'Brien E., Dietrich D.R. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit Rev Toxicol.* [Internet]. 2005 [citado 6 de abril de 2026]; 35(1):33-60. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15742902/>
51. Mantle P, Upadhyay R, Herman D, Batuman V. Renal apoptosis in male rats induced by extensive dietary exposure to ochratoxins. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2025 [citado 13 de julio de 2026]; 26(10):4553. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/10/4553>
52. Abid S, Hassen W, Bacha H. Ochratoxin a and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic?. *Human & Experimental Toxicology* [Internet]. 2003 [citado 13 de julio de 2026]; 22:77-84. Disponible en <https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1191/0960327103ht328oa>
53. Wen-Chao, L., Pushparaj, K., Meyyazhagan, A. y col. Ochratoxin A as an alarming health threat for livestock and human: A review on molecular interactions, mechanism of toxicity, detection, detoxification, and dietary prophylaxis. *Toxicon* [Internet]. 2022 [citado 6 de abril de 2026]; 213:59-75. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35452686/>
54. Kuiper-Goodman T. Risk assessment of ochratoxin A residues in food. *IARC Sci Publ.* [Internet]. 1991 [citado 6 de abril de 2026]; (115):307-20. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1820347/>
55. Comisión Europea. Recomendación de la Comisión, de 17 de agosto de 2006, sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal (Texto pertinente a

- efectos del EEE) (2006/576/CE) [Internet]. 2006 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:32006H0576>
56. Vila-Donat P., Marín S., Sanchis V., Ramos AJ. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2018 [citado 6 de abril de 2026]; 114:246–59. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691518301182>
 57. Zaghini A., Simioli M., Roncada P., y col. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and esterified glucomannan on residues of ochratoxin A in kidney, muscle and blood of laying hens. *Ital J Anim Sci*. [Internet]. 2007 [citado 6 de abril de 2026]; 6(1):737-9. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4081/ijas.2007.1s.737>
 58. Rama, K. Introduction to poultry farming. In: Poultry farming [Internet]. 2020 [citado 6 de abril de 2026]:1-5. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/370471517_INTRODUCTION_TO_POULTRY_FARMING
 59. Erdaw M.M., Beyene W.T. Trends, prospects and the socio-economic contribution of poultry production in sub-Saharan Africa: a review. *World's Poultry Sci J*. [Internet]. 2022 [citado 6 de abril de 2026]; 78(3):835-52. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00439339.2022.2092437>
 60. Lau Goyoneche J.R. Plan de negocios para desarrollar el servicio integrado de crianza de pollos [tesis de posgrado en Internet]. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC); 2011 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://repositorioacademico.upc.edu.pe/handle/10757/315280>
 61. Mendoza JC. Análisis econométrico de la demanda de carne de pollo en el Perú y factores de resiliencia sectorial (2010-2020) [tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2021. Disponible en: Repositorio Institucional UNALM.
 62. Sherazi S.T.H., Shar Z.H., Sumbal G.A., y col. Occurrence of ochratoxin A in poultry feeds and feed ingredients from Pakistan. *Mycotoxin Res*. [Internet]. 2015 [citado 6 de abril de 2026]; 31(1):1-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25488508/>
 63. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Guía de Buenas Prácticas Avícolas en Reproducción y Engorde [Internet]. Lima: SENASA; 2014 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/GUIA-BPAV-reproduccion-y-engorde.pdf>

64. Herrera I., Carvacho D. Avicultura en el Perú. Observatorio Animal [Internet]. 2021 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://observatorioanimal.org/wp-content/uploads/2021/12/Avicultura-en-el-Peru.pdf>
65. Zain M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc.* [Internet]. 2011 [citado 6 de abril de 2026]; 15(2):129-44. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610310000827>
66. Rigo Bonnin R., Canalias Reverter F., Esteve Poblador S., y col. Desarrollo de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución. *Rev Lab Clin.* [Internet]. 2018 [citado 6 de abril de 2026]; 11(3):137-146. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-desarrollo-procedimientos-medida-basados-cromatografia-S1888400817300557>
67. Suarez, D., Morales, Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Rev Colomb Quím.* [Internet]. 2018 [citado 6 de abril de 2026]; 47(2):45-56. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/server/api/core/bitstreams/ca69b75f-d804-4528-904b-20b0725fb7e7/content>
68. Ali, AH. High-performance liquid chromatography (HPLC): a review. *Ann Adv Chem.* [Internet]. 2022 [citado 6 de abril de 2026]; 6(1):10-20. Disponible en: <https://www.advancechemjournal.com/journals/aac/aac-aid1026.php>
69. Moldoveanu SC., David V. Essentials in modern HPLC separations. Second Edition. [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2022 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316588525_Essentials_in_Modern_HPLC_Separations
70. Chrom academy. The theory of HPLC chromatographic parameters. [Internet]. 2020 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.inacom.nl/wp-content/uploads/2020/04/theory_of_hplc_chromatographic_parameters_1_.pdf
71. Altiero P. Gradient design and development. [Internet]. Santa Clara (CA): Agilent Technologies; 2020 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/gradient-design-and-developmentagilent-webinar-march122020.pdf>
72. Gupta, M.K., Ghuge, A., Khandare, A., y col. A comparative review on high-performance liquid chromatography (HPLC), ultra performance liquid chromatography (UPLC) & high-performance thin layer chromatography (HPTLC) with current updates. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* [Internet]. 2022 [citado 6 de abril de 2026];

https://www.researchgate.net/publication/366741036_A_comparative_review_on_High-Performance_Liquid_Chromatography_HPLC_Ultra_Performance_Liquid_Chromatography_UPLC_High-Performance_Thin_Layer_Chromatography_HPTLC_with_current_updates

73. Ahmed F., Eticha T., Hymete A., y col. Principles and applications of ultra-high-performance liquid chromatography. In: High Performance Liquid Chromatography - Recent Advances and Applications. [Internet]. Londres: IntechOpen eBooks; 2023 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/86704>
74. Waters Corporation. Columnas UPLC: columnas de menos de 2 µm. [Internet]. Milford (MA): Waters; 2020 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.waters.com/nextgen/mx/es/products/columns/uplc-columns-category.html>
75. Basharat R., Kotra V., Loong L.Y., y col. A Mini-review on Ultra Performance Liquid Chromatography. *Orient J Chem* [Internet]. 2021 [citado 6 de abril de 2026]; 37(4). Disponible en: <https://www.orientjchem.org/vol37no4/a-mini-review-on-ultra-performance-liquid-chromatography/>
76. Agilent Technologies. Espectrometría de masas: Fundamentos y teoría. [Internet]. Santa Clara (CA): Agilent Technologies; 2016 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/5991-5857_Agilent_MS_Theory_ES.pdf?srsId=AfmBOorFMyMRViDsXmicn0b1USXxoIkwg-OahgG9B018JriuuZF-WVkhE
77. Bhole R.P., Jagtap S.R., Chadar K.B., y col. Liquid chromatography-mass spectrometry technique: a review. *Res J Pharm Technol* [Internet]. 2020 [citado 6 de abril de 2026]; 13(1):505-16. Disponible en: <https://rjptonline.org/HTMLPaper.aspx?Journal=Research%20Journal%20of%20Pharmacy%20and%20Technology;PID=2020-13-1-97>
78. Zhang D, Sun B, Luan Y, Zhou X, Huang J, Sun Y, y col. Simultaneous broad-spectrum detection of over 50 mycotoxins in maize silage via liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Method development and application. *Food Control* [Internet]. 2025 [citado 6 de abril de 2026]; 172(111143):111143. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111143>

79. Duffau B., Rojas F., Guerrero I., y col. Guía técnica N.º 1: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. [Internet]. Santiago (CL): Instituto de Salud Pública de Chile; 2010 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf
80. Food and Drug Administration (FDA). Guidelines for Chemical Method Validation in FDA Foods Program. 3rd ed. [Internet]. Washington (DC): Food and Drug Administration; 2019 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/81810/download>
81. Jurado J.M. Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: Validación de métodos analíticos. [Internet]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2008 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://personal.us.es/jmjurado/docs/AQAEXCEL.pdf>
82. Instituto Nacional de Calidad (INACAL). Directriz para la validación de métodos de ensayo. Versión 00. Código: DA-acr-20D. [Internet]. Lima: INACAL; 2017 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: [https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentosespecificos/files/Directrices%20FDA-acr-20D-DIRECTRIZ.PARA.LA.VALIDACION.DE.METODOS.DE.ENSAYO\(1\).pdf](https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentosespecificos/files/Directrices%20FDA-acr-20D-DIRECTRIZ.PARA.LA.VALIDACION.DE.METODOS.DE.ENSAYO(1).pdf)
83. Ahumada D., Paredes C., Abella J., y col. Validación de métodos en análisis químico cuantitativo. 1.ª ed. [Internet]. Bogotá: Instituto Nacional de Metrología, Subdirección de Metrología Química y Biología; 2023 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://hub.unido.org/sites/default/files/publications/Validacion-de-metodos-en-analisisquimico-cuantitativo_compressed.pdf
84. Soto J.C. Desarrollo y validación de un método analítico por LC/MS/MS para la cuantificación de Leuprolide en plasma humano. Aplicación en un estudio de farmacocinética en voluntarios sanos [tesis de pregrado en Internet]. Guadalajara (MX): Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.; 2017 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/540>
85. Comisión de las Comunidades Europeas. Reglamento (CE) n.º 401/2006 de la Comisión, de 23 de febrero de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo

- y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L 70:12-34. [Internet]. Bruselas: UE; 2006 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2006-80439>
86. Council of International Pesticide Analysts (CIPAC). Guidelines on Method Validation to be Performed in Support of Analytical Methods for Agrochemical Formulations. [Internet]. [S.l.]: CIPAC; 2003 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.cipac.org/images/pdf/validat.pdf>
 87. Yang Y., He Z., Mu L., y col. Simultaneous determination of 23 mycotoxins in broiler tissues by solid phase extraction UHPLC-Q/Orbitrap high resolution mass spectrometry. Separations [Internet]. 2021 [citado 6 de abril de 2026]; 8(12):236. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2297-8739/8/12/236>
 88. Lešić T., Pleadin J., Kudumija N., y col. Mycotoxin residues in chicken breast muscle and liver. Foods [Internet]. 2025 [citado 6 de abril de 2026]; 14(12):2017. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/14/12/2017>
 89. Wang Q, Zhao Y, Chen P, Zeng R, Liang Y. Ochratoxin A and zearalenone in poultry feed samples from South China. J Food Saf. 2022;42(1):e12944. doi:10.1111/jfs.12944
 90. Jensen, O.B. Validación de métodos de análisis químico. [Internet]. NMKL Procedimiento N.º 4; 2009 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/405168043/INCERTIDUMBRE-EURACHEM>
 91. Bratinova S., Raffael B., Simoneau C. Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials [Internet]. Luxemburgo: Publications Office of the European Union; 2009 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/257611612_Guidelines_for_performance_criteria_and_validation_procedures_of_analytical_methods_used_in_controls_of_food_contact_materials
 92. Westgard, J.O. Validación de métodos químicos. Entrenamiento en gestión de la calidad analítica para laboratorios químicos. [Internet]. Madison (WI, EE.UU.): Westgard QC, Inc.; 2014 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/528811851/00-Libro-Validacion-de-Métodos>
 93. Tsiamyrtzis P., Meijer P. How to interpret the z-scores in survey reports (theory and practical examples). [Internet]. Leiden: ECAT; 2022 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.ecat.nl/wp-content/uploads/2022/10/Tsiarmyrtzis.pdf>

94. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. [Internet]. Madrid: AEFI; 2014 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/260069977/Validacion-de-Metodos-Analiticos-Asociacion-Espanola-de-Farmaceuticos-de-la-Industria-pdf>
95. Hurtado, N.E. Desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación de diez residuos de antibióticos veterinarios en *Oncorhynchus mykiss*, utilizando cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo [tesis de pregrado en Internet]. [Internet]. Lima (PE): Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/9609/Desarrollo_Hurta doGalindo_Nathaly.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/9609/Desarrollo_Hurta%20doGalindo_Nathaly.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
96. Vinagre J. Capítulo 13: Calidad de métodos analíticos. En: Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. [Internet]. Santiago (CL): FAO, Universidad de Chile; 1997 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/58296300-4a95-43ec-ae12-b38c0568b2ce/content/Ah833s15.htm>
97. Instituto Nacional de Metrología, Normalización y Calidad Industrial (INMETRO, Brasil). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Documento de carácter orientativo - DOQ-CGCRE-008. [Internet]. Brasil: INMETRO; 2020 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/13218567/DOQ-CGCRE-8-02-Orientacoes-Validacao-de-Metodos-Ensaio-Quimico>
98. Proffitt S. Determining Relevant Detection and Quantitation Limits. [Internet]. Mason (OH, EE.UU.): Teledyne Tekmar; 2024 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://blog.teledynetekmar.com/determining-relevant-detection-and-quantitation-limits>
99. Wisconsin Department of Natural Resources, Laboratory Certification Program. Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits. [Internet]. Madison (WI, EE.UU.): Wisconsin Department of Natural Resources; 1996 Apr. PUBL-TS-056-96 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <http://www.allaboutair.cn/uploads/soft/171120/DL.pdf>
100. Torralvo Martínez J.J. Validación de un método químico analítico de HPLC en R [tesis de pregrado en Internet]. Bogotá (CO): Fundación Universitaria Los Libertadores; 2017 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en:

<https://repository.libertadores.edu.co/server/api/core/bitstreams/cd8aa5ab-1174-4efd-ade2-8f7cbf09f7eb/content>

101. Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento (AEAS). Guía para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo de aguas. Parte II: Criterios para la verificación y validación de métodos físicoquímicos. [Internet]. España: AEAS; 2014 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.daquas.es/images/publicaciones/manuales/Guia_Laboratorio_Parte_II.pdf
102. Comisión Europea. Reglamento (UE) 2023/2783 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de diciembre de 2023, sobre importaciones de ciertos productos agrícolas originarios de terceros países y por el que se modifica el Reglamento (UE) 2016/2031. Diario Oficial de la Unión Europea L 2783:1-? [Internet]. 2023 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=OJ:L_202302783
103. AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International, Edición 22. [Internet]. Gaithersburg (US): AOAC International; 2023 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis/>
104. Hurtado A., Caldera A., Milano B., y col. Notas técnicas: Análisis de datos bajo condiciones de reproducibilidad. Arch Venez Farmacol Ter [Internet]. 2017 [citado 6 de abril de 2026]; 36(2):44-48. Disponible en: <https://ve.scielo.org/pdf/avft/v36n2/art03.pdf>
105. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Validación de métodos analíticos. [Internet]. La Habana (CU): CECMED; 2014 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/validacion_de_metodos_analiticos.pdf
106. INACAL. Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos y resultados de medición. Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad de un método de medición normalizado. [Internet]. Lima (PE): Instituto Nacional de Calidad; 2021 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/745647300/NTP-ISO-5725-2-2021-Antecedente-2019>
107. NordVal International. Protocol for the validation of chemical alternative (proprietary) methods against a reference method – Protocol No. 2. [Internet]. 2018

- [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.nmkl.org/wp-content/uploads/2022/06/NordVal-protocol-No-2_Chem_Oct-2018-1.pdf
108. Condori Castro W. Validación de un método para la determinación de cobre, cromo, manganeso y níquel en suelo por absorción atómica de flama [tesis de pregrado en Internet]. Lima (PE): Universidad Nacional Federico Villarreal; 2016 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://repositorio.unfv.edu.pe/items/d9ddf8d3-3e9c-49d6-a319-41e3fe205f35>
109. Eurachem / CITAC. Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas (Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement — QUAM:2012.P1-ES). [Internet]. [S.l.]: Eurachem; 2012 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_ES.pdf
110. Vega Cornelio R.A. Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de pesticidas benzoilureas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo en el CITEacuícola UPOCH [tesis de pregrado en Internet]. Callao (PE): Universidad Nacional del Callao; 2022 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://repositorio.unac.edu.pe/handle/20.500.12952/7182>
111. International Committee for Guides in Metrology (JCGM). Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections). [Internet]. [S.l.]: JCGM; 2008 Sep [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_100_2008_E.pdf
112. University of Tartu. 4.2. Calculating the combined standard uncertainty – Estimation of measurement uncertainty in chemical analysis. [Internet]. Tartu (EE.UU./Estonia): University of Tartu; 2025 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://sisu.ut.ee/measurement/42-combining-uncertainty-components-combined-standard-uncertainty/>
113. Tyrer S., Heyman B. Sampling in epidemiological research: issues, hazards and pitfalls. BJPsych Bull [Internet]. 2016 [citado 6 de abril de 2026]; 40(2):57-60. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27087985/>
114. Berkland, H. Compound optimization in LC-MS/MS—Why does it matter? Restek [Internet]. 2024 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://discover.restek.com/it/blog-it/compound-optimization-in-lc-ms-ms-why-does-it-matter/>

115. Johnson D., Boyes B., Orlando R. The use of ammonium formate as a mobile-phase modifier for LC-MS/MS analysis of tryptic digests. *J Biomol Tech* [Internet]. 2013 [citado 6 de abril de 2026]; 24(4):187–197. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24294112/>
116. Lauwers M., De Baere S., Letor B., y col. Multi LC-MS/MS and LC-HRMS methods for determination of 24 mycotoxins including major Phase I and II biomarker metabolites in biological matrices from pigs and broiler chickens. *Toxins* [Internet]. 2019 [citado 6 de abril de 2026]; 11(3):171. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/3/171>
117. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Perú: Compendio estadístico 2024 [Internet]. Lima: INEI; 2024 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/inei/informes-publicaciones/6284790-peru-compendio-estadistico-2024>
118. Ścigalski P., Kosobucki P. Recent Materials Developed for Dispersive Solid Phase Extraction. *Molecules* [Internet]. 2020 [citado 6 de abril de 2026]; 25(21):4869. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/21/4869>
119. Jettanajit A, Nhujak T. Determination of Mycotoxins in Brown Rice Using QuEChERS Sample Preparation and UHPLC-MS-MS. *J Chromatogr Sci* [Internet]. 2016 [citado 14 de julio de 2026]; 54(5):720-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26796964/>
120. Xie H y colaboradores. Mycotoxin Determination in Peaches and Peach Products with a Modified QuEChERS Extraction Procedure Coupled with UPLC-MS/MS Analysis. *Foods* [Internet]. 2023 [citado 14 de julio de 2026]; 12(17). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/17/3216>
121. Hu S, Ye B, Li H, Yan P, Chen D, Zhao M. Enhanced selectivity for convenient extraction of acidic mycotoxins using a miniaturized centrifugal integrated cold-induced phase separation: Determination of fumonisins and ochratoxins in cereals as a proof-of-concept study. *Food Chem* [Internet]. 2024 [citado 14 de julio de 2026]; 454(139715):139715. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814624013657?via%3Dihub>
122. Anastassiades M, Lehotay S. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *JOURNAL OF AOAC*

- INTERNATIONAL [Internet]; 2003 [citado 14 de julio de 2026]; 86(2). Disponible en: <https://sci-hub.box/storage/2024/8039/061dac0fe102010342855d524a452634/anastassiades2003.pdf>
123. Rezquellah W. Validación de procesos de limpieza en la industria farmacéutica: aplicación de técnicas analíticas avanzadas [tesis doctoral en Internet]. Barcelona: Universitat de Barcelona; 2015 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: <https://tesisenred.net/handle/10803/378640>
124. Lee HJ, Kim HD, Ryu D. Practical strategies to reduce ochratoxin A in foods. *Toxins* [Internet]. 2024 [citado 6 de abril de 2026]; 16(1):58. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38276534/>
125. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Método de ensayo: determinación de ocratoxina A en alimentos por cromatografía líquida con detector de fluorescencia (MET-UCCIRT-Res-50_2-Ocratoxina-LC-F) [Internet]. Lima: SENASA; 2016 [citado 6 de abril de 2026]. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/intranet/wp-content/uploads/2016/12/MET-UCCIRT-Res-50_2-Ocratoxina-LC-F.pdf
126. Malir F., Ostry V., Pfohl-Leszkowicz A., Novotna E. Ochratoxin A: 25 years of research. *Toxins* [Internet]. 2016 [citado 6 de abril de 2026]; 8(7):191. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27384585/>

ANEXOS

Anexo 1. Producción de carne de ave en el Perú por especie (enero 2024 – agosto 2025).

C3. PERÚ: PRODUCCIÓN DE CARNE DE AVE POR ESPECIE SEGÚN MES, ENERO 2024 - AGOSTO 2025															
(Miles de toneladas)															
Mes	Ave			Pollo			Pavo			Gallina Postura			Otras aves ¹		
	2024 ^P	2025 ^P	Var. %	2024 ^P	2025 ^P	Var. %	2024 ^P	2025 ^P	Var. %	2024 ^P	2025 ^P	Var. %	2024 ^P	2025 ^P	Var. %
Ene	152.9	158.5	3.7	143.2	148.7	3.8	2.7	2.9	6.3	3.2	3.2	-0.2	3.6	3.6	0.2
Feb	133.4	138.6	3.9	124.6	129.5	3.9	2.2	2.4	11.0	3.0	3.1	0.9	3.6	3.7	0.6
Mar	146.2	151.2	3.4	137.4	142.1	3.5	1.8	2.1	12.8	3.1	3.1	-0.3	3.9	3.9	0.4
Abr	146.8	151.3	3.1	138.0	142.0	2.9	2.3	2.8	22.9	3.0	3.0	-0.5	3.6	3.6	0.5
May	157.2	165.4	5.2	148.3	156.1	5.3	2.1	2.5	16.9	2.9	2.8	-0.7	3.9	3.9	0.7
Jun	155.1	160.0	3.2	146.2	150.7	3.1	2.0	2.4	18.9	3.0	3.0	0.4	3.9	3.9	0.3
Jul	161.5	166.7	3.2	151.7	156.7	3.3	2.1	2.2	8.5	3.1	3.1	0.3	4.5	4.6	0.6
Ago	160.8	163.9	1.9	150.5	153.2	1.8	2.8	3.2	12.7	3.1	3.2	0.4	4.3	4.4	0.4
Set	160.1			148.5			3.9			3.4			4.4		
Oct	166.0			153.9			4.7			3.6			3.8		
Nov	160.9			149.6			3.9			3.4			3.9		
Dic	172.3			161.1			3.5			3.4			4.2		
Ene-Ago	1,213.9	1,255.6	3.4	1,139.9	1,179.1	3.4	18.0	20.5	13.5	24.5	24.5	0.0	31.4	31.6	0.5
^P Preliminar															
¹ Incluye reproductores, gallinas, gallos y patos de traspatio.															
Fuente: SIEA.															

Fuente: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). Sistema Integrado de Estadística Agraria (SIEA), 2025. (3)

Anexo 2. Procedencia del estándar de Ocratoxina A.

Parámetro	Descripción
Marca	Sigma-Aldrich (Merck)
Nombre del producto	Ochratoxin A proveniente de <i>Petromyces albertensis</i> , ≥98% (HPLC)
Número de producto	O1877-5MG
Número de lote	0000274158

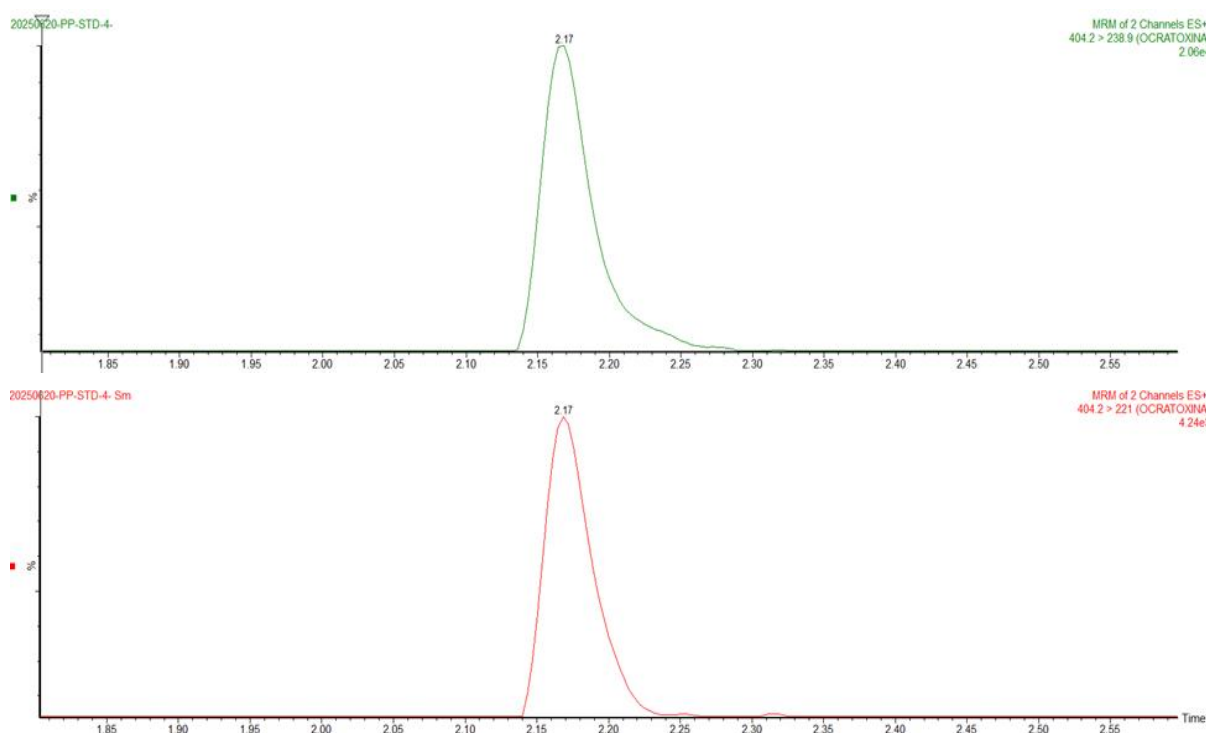
Fuente: Certificado de análisis de Sigma-Aldrich (Merck). 2023.

Anexo 3. Equipo de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-XS (Waters®).



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LaCCSA) del Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Privado Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CITEacuícola UPCH). 2026.

Anexo 4. Cromatograma de los fragmentos de ocratoxina A (Cuantificación y confirmación).



Fuente: Datos obtenidos del equipo UPLC-MS/MS. 2026.

Anexo 5. Fórmulas utilizadas para el cálculo de RSD_r y RSD_R .

Estas fórmulas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Calidad – INACAL (Perú) (106), y permiten calcular la precisión del método analítico, específicamente la repetibilidad (RSD_r) y la reproducibilidad (RSD_R).

Sumatorias empleadas

$$T_1 = \sum n_i Y_i$$

$$T_2 = \sum n_i Y_i^2$$

$$T_3 = \sum n_i$$

$$T_4 = \sum n_i^2$$

$$T_5 = \sum (n_i - 1) S_i^2$$

Donde:

- n_i = número de datos por analista en el nivel de concentración evaluado.
- Y_i = media de los resultados obtenidos por cada analista en ese nivel
- S_i^2 = varianza dentro del nivel, calculada para cada analista

Cálculo de los componentes de varianza

1. Varianza de repetibilidad (S_r^2):

$$S_r^2 = \frac{T_5}{T_3 - p}$$

2. Varianza entre analistas (S_L^2):

$$S_L^2 = \left[\frac{T_2 T_3 - T_I^2}{T_3(p - 1)} - S_r^2 \right] \times \left[\frac{T_3(p - 1)}{T_3^2 - T_4} \right]$$

3. Varianza de reproducibilidad (S_R^2):

$$S_R^2 = S_r^2 + S_L^2$$

Donde:

- p = número total de analistas

Anexo 6. Resultados y análisis de Z-Score para detección de valores atípicos.

NIVEL I: 2,5 µg/Kg				
Analista	Resultados	Z -Score	Z- Score	Calificación
A1	2,558	-1,004131192	1,00413	SATISFACTORIO
A1	2,708	0,9301968745	0,9302	SATISFACTORIO
A1	2,578	-0,7462207829	0,74622	SATISFACTORIO
A1	2,72	1,08494312	1,08494	SATISFACTORIO
A1	2,686	0,6464954248	0,6465	SATISFACTORIO
A1	2,686	0,6464954248	0,6465	SATISFACTORIO
A1	2,545	-1,171772957	1,17177	SATISFACTORIO
A1	2,506	-1,674698255	1,6747	SATISFACTORIO
A1	2,658	0,2854208524	0,28542	SATISFACTORIO
A1	2,497	-1,790757939	1,79076	SATISFACTORIO

A1	2,551	-1,094399835	1,0944	SATISFACTORIO
A1	2,689	0,6851819861	0,68518	SATISFACTORIO
A1	2,657	0,272525332	0,27253	SATISFACTORIO
A1	2,609	-0,3464596492	0,34646	SATISFACTORIO
A1	2,499	-1,764966898	1,76497	SATISFACTORIO
A2	2,597	-0,5012058945	0,50121	SATISFACTORIO
A2	2,588	-0,6172655784	0,61727	SATISFACTORIO
A2	2,646	0,1306746071	0,13067	SATISFACTORIO
A2	2,755	1,536286335	1,53629	SATISFACTORIO
A2	2,675	0,5046446999	0,50464	SATISFACTORIO
A2	2,566	-0,9009670282	0,90097	SATISFACTORIO
A2	2,704	0,8786147927	0,87861	SATISFACTORIO
A2	2,639	0,04040596405	0,04041	SATISFACTORIO
A2	2,632	-0,04986267904	0,04986	SATISFACTORIO
A2	2,65	0,1822566889	0,18226	SATISFACTORIO
A2	2,645	0,1177790867	0,11778	SATISFACTORIO
A2	2,59	-0,5914745376	0,59147	SATISFACTORIO
A2	2,789	1,97473403	1,97473	SATISFACTORIO
A2	2,753	1,510495294	1,5105	SATISFACTORIO
A2	2,7	0,827032711	0,82703	SATISFACTORIO
NIVEL II: 10 µg/Kg				
Analista	Resultados	Z -Score	 Z- Score 	Calificación
A1	10,066	-1,201975684	1,20198	SATISFACTORIO
A1	10,348	1,323785441	1,32379	SATISFACTORIO
A1	10,375	1,565613633	1,56561	SATISFACTORIO
A1	10,045	-1,390064279	1,39006	SATISFACTORIO
A1	10,075	-1,121366287	1,12137	SATISFACTORIO
A1	10,264	0,571431063	0,57143	SATISFACTORIO
A1	10,406	1,843268225	1,84327	SATISFACTORIO
A1	10,044	-1,399020878	1,39902	SATISFACTORIO
A1	10,049	-1,35423788	1,35424	SATISFACTORIO

A1	10,148	-0,4675345061	0,46753	SATISFACTORIO
A1	10,135	-0,5839703026	0,58397	SATISFACTORIO
A1	10,284	0,7505630577	0,75056	SATISFACTORIO
A1	10,228	0,2489934726	0,24899	SATISFACTORIO
A1	10,142	-0,5212741045	0,52127	SATISFACTORIO
A1	10,036	-1,470673676	1,47067	SATISFACTORIO
A2	10,296	0,8580422545	0,85804	SATISFACTORIO
A2	10,314	1,01926105	1,01926	SATISFACTORIO
A2	10,076	-1,112409687	1,11241	SATISFACTORIO
A2	10,324	1,108827047	1,10883	SATISFACTORIO
A2	10,329	1,153610046	1,15361	SATISFACTORIO
A2	10,233	0,2937764713	0,29378	SATISFACTORIO
A2	10,286	0,7684762571	0,76848	SATISFACTORIO
A2	10,148	-0,4675345061	0,46753	SATISFACTORIO
A2	10,083	-1,049713489	1,04971	SATISFACTORIO
A2	10,297	0,8669988542	0,867	SATISFACTORIO
A2	10,176	-0,2167497136	0,21675	SATISFACTORIO
A2	10,212	0,1056878769	0,10569	SATISFACTORIO
A2	10,125	-0,6735363	0,67354	SATISFACTORIO
A2	10,215	0,1325576761	0,13256	SATISFACTORIO
A2	10,247	0,4191688675	0,41917	SATISFACTORIO
NIVEL III: 50 µg/Kg				
Analista	Resultados	Z -Score	 Z- Score 	Calificación
A1	53,745	-1,362512451	1,36251	SATISFACTORIO
A1	54,095	-0,8159040862	0,8159	SATISFACTORIO
A1	54,015	-0,9408431411	0,94084	SATISFACTORIO
A1	54,559	-0,09125756799	0,09126	SATISFACTORIO
A1	54,426	-0,2989687467	0,29897	SATISFACTORIO
A1	54,423	-0,3036539613	0,30365	SATISFACTORIO
A1	53,689	-1,44996979	1,44997	SATISFACTORIO
A1	54,636	0,02899627232	0,029	SATISFACTORIO

A1	54,785	0,261695262	0,2617	SATISFACTORIO
A1	55,103	0,7583280051	0,75833	SATISFACTORIO
A1	55,211	0,9269957292	0,927	SATISFACTORIO
A1	54,619	0,002446723158	0,00245	SATISFACTORIO
A1	55,456	1,309621585	1,30962	SATISFACTORIO
A1	54,856	0,3725786732	0,37258	SATISFACTORIO
A1	54,821	0,3179178367	0,31792	SATISFACTORIO
A2	53,98	-0,9955039776	0,9955	SATISFACTORIO
A2	54,016	-0,9392814029	0,93928	SATISFACTORIO
A2	54,383	-0,3661234887	0,36612	SATISFACTORIO
A2	53,861	-1,181350822	1,18135	SATISFACTORIO
A2	53,435	-1,846651289	1,84665	SATISFACTORIO
A2	53,646	-1,517124532	1,51712	SATISFACTORIO
A2	54,816	0,3101091458	0,31011	SATISFACTORIO
A2	55,575	1,495468429	1,49547	SATISFACTORIO
A2	54,327	-0,4535808271	0,45358	SATISFACTORIO
A2	55,051	0,6771176195	0,67712	SATISFACTORIO
A2	55,208	0,9223105146	0,92231	SATISFACTORIO
A2	55,226	0,950421802	0,95042	SATISFACTORIO
A2	55,534	1,431437163	1,43144	SATISFACTORIO
A2	55,458	1,312745061	1,31275	SATISFACTORIO
A2	55,568	1,484536262	1,48454	SATISFACTORIO

**Anexo 7. Datos experimentales de linealidad: curvas de calibración de OTA
obtenidas durante tres días de análisis.**

Día 1: Curva de Calibración			
Estándar	Concentración (µg/L)	Área	Área Ajustada
STD - 1	0,2450	1633,582000	1631,634274
STD - 2	0,5060	3735,967000	3735,586799
STD - 3	1,0320	7975,735000	7975,736333
STD - 4	1,9290	15202,446000	15206,561679

STD - 5	4,0310	32152,766000	32151,037574
STD - 6	5,0060	40010,691000	40010,630341
Coefficiente de correlación (r)	0,999999990		
Coefficiente de determinación (r²)	0,999999981		
Día 2: Curva de Calibración			
Estándar	Concentración (µg/L)	Área	Área Ajustada
STD - 1	0,2480	1859,8790000	1834,2750709
STD - 2	0,5010	3872,0820000	3909,1661741
STD - 3	1,0230	8015,3430000	8090,7474778
STD - 4	1,9430	15331,4030000	15221,6950624
STD - 5	4,0560	32130,6990000	31932,1207286
STD - 6	4,9790	39469,6990000	39683,1507118
Coefficiente de correlación (r)	0,99999999		
Coefficiente de determinación (r²)	0,99999998		
Día 3: Curva de Calibración			
Estándar	Concentración	Área	Área Ajustada
STD - 1	0,2320	1876,2700000	1980,7780904
STD - 2	0,5310	4286,6790000	4085,7153607
STD - 3	1,0530	8494,8960000	8327,8494761
STD - 4	1,9040	15364,1070000	15562,0591749
STD - 5	3,9860	32150,6740000	32514,4658493
STD - 6	5,0450	40692,1090000	40377,7372610
Coefficiente de correlación (r)	0,999999992		
Coefficiente de determinación (r²)	0,999999984		

Anexo 8. Datos experimentales del rango de trabajo: concentración teórica y experimental de Ocratoxina A y porcentaje de recuperación.

NIVEL I: 0,95 µg/Kg		NIVEL II: 10 µg/Kg		NIVEL III: 50 µg/Kg	
Concentración experimental OTA (µg/Kg)	% Recuperación	Concentración experimental OTA (µg/Kg)	% Recuperación	Concentración experimental OTA (µg/Kg)	% Recuperación
0,95	100	10,832	108,32	53,745	107,49
0,971	102,21	10,357	103,57	54,095	108,19
0,953	100,32	10,938	109,38	54,015	108,03
0,962	101,26	10,738	107,38	54,559	109,12
0,945	99,47	10,761	107,61	54,426	108,85
0,939	98,84	10,652	106,52	53,98	107,96
0,956	100,63	10,671	106,71	54,016	108,03
0,966	101,68	10,969	109,69	55,599	111,2
0,963	101,37	10,817	108,17	55,741	111,48
0,965	101,58	10,927	109,27	55,321	110,64

Anexo 9. Datos experimentales de veracidad: porcentaje de recuperación relativa (%).

NIVEL I: 2,5 µg/Kg		
Prueba	Concentración obtenida (ug/kg)	Porcentaje de Recuperación (%)
1	2,558	102,32
2	2,708	108,32
3	2,578	103,12
4	2,72	108,8
5	2,686	107,44
6	2,686	107,44
7	2,545	101,8
8	2,506	100,24
9	2,658	106,32
10	2,497	99,88
11	2,551	102,04
12	2,689	107,56

13	2,657	106,28
14	2,609	104,36
15	2,499	99,96
16	2,597	103,88
17	2,588	103,52
18	2,646	105,84
19	2,755	110,2
20	2,675	107
21	2,566	102,64
22	2,704	108,16
23	2,639	105,56
24	2,632	105,28
25	2,65	106
26	2,645	105,8
27	2,59	103,6
28	2,789	111,56
29	2,753	110,12
30	2,7	108
NIVEL II: 10 µg/Kg		
Prueba	Concentración obtenida (ug/kg)	Porcentaje de Recuperación (%)
1	10,066	100,66
2	10,348	103,48
3	10,375	103,75
4	10,045	100,45
5	10,075	100,75
6	10,264	102,64
7	10,406	104,06
8	10,044	100,44
9	10,049	100,49
10	10,148	101,48

11	10,135	101,35
12	10,284	102,84
13	10,228	102,28
14	10,142	101,42
15	10,036	100,36
16	10,296	102,96
17	10,314	103,14
18	10,076	100,76
19	10,324	103,24
20	10,329	103,29
21	10,233	102,33
22	10,286	102,86
23	10,148	101,48
24	10,083	100,83
25	10,297	102,97
26	10,176	101,76
27	10,212	102,12
28	10,125	101,25
29	10,215	102,15
30	10,247	102,47
NIVEL III: 50 µg/Kg		
Prueba	Concentración obtenida (ug/kg)	Porcentaje de Recuperación (%)
1	53,745	107,49
2	54,095	108,19
3	54,015	108,03
4	54,559	109,12
5	54,426	108,85
6	54,423	108,85
7	53,689	107,38
8	54,636	109,27

9	54,785	109,57
10	55,103	110,21
11	55,211	110,42
12	54,619	109,24
13	55,456	110,91
14	54,856	109,71
15	54,821	109,64
16	53,98	107,96
17	54,016	108,03
18	54,383	108,77
19	53,861	107,72
20	53,435	106,87
21	53,646	107,29
22	54,816	109,63
23	55,575	111,15
24	54,327	108,65
25	55,051	110,1
26	55,208	110,42
27	55,226	110,45
28	55,534	111,07
29	55,458	110,92
30	55,568	111,14

Anexo 10. Datos experimentales de precisión: promedio, varianza y desviación estándar.

NIVEL I: 2,5 µg/Kg		
Prueba	Analistas	
	A1 (µg/Kg)	A2 (µg/Kg)
1	2,558	2,597
2	2,708	2,588
3	2,578	2,646

4	2,72	2,755
5	2,686	2,675
6	2,686	2,566
7	2,545	2,704
8	2,506	2,639
9	2,658	2,632
10	2,497	2,65
11	2,551	2,645
12	2,689	2,59
13	2,657	2,789
14	2,609	2,753
15	2,499	2,7
Promedio	2,61	2,662
Varianza	0,007	0,004
Desviación estándar	0,081	0,067
NIVEL II: 10 µg/Kg		
Prueba	Analistas	
	A1 (µg/Kg)	A2 (µg/Kg)
1	10,066	10,296
2	10,348	10,314
3	10,375	10,076
4	10,045	10,324
5	10,075	10,329
6	10,264	10,233
7	10,406	10,286
8	10,044	10,148
9	10,049	10,083
10	10,148	10,297
11	10,135	10,176
12	10,284	10,212
13	10,228	10,125

14	10,142	10,215
15	10,036	10,247
Promedio	10,176	10,224
Varianza	0,017	0,007
Desviación estándar	0,131	0,086
NIVEL III: 50 µg/Kg		
Prueba	Analistas	
	A1 (µg/Kg)	A2 (µg/Kg)
1	53,745	53,98
2	54,095	54,016
3	54,015	54,383
4	54,559	53,861
5	54,426	53,435
6	54,423	53,646
7	53,689	54,816
8	54,636	55,575
9	54,785	54,327
10	55,103	55,051
11	55,211	55,208
12	54,619	55,226
13	55,456	55,534
14	54,856	55,458
15	54,821	55,568
Promedio	54,563	54,672
Varianza	0,265	0,578
Desviación estándar	0,515	0,76

Anexo 11. Resultados del análisis estadístico de precisión: varianza de repetibilidad, entre analistas y reproducibilidad.

NIVEL I: 2,5 µg/Kg	
T1	79,076

T2	208,454
T3	30
T4	450
T5	0,154
Varianza de repetibilidad	0,0055
Varianza entre analistas	0,000626
Varianza de reproducibilidad	0,006126
NIVEL II: 10 µg/Kg	
T1	306,006
T2	3121,339
T3	30
T4	450
T5	0,3444
Varianza de repetibilidad	0,012301
Varianza entre analistas	0,000501
Varianza de reproducibilidad	0,012801
NIVEL III: 50 µg/Kg	
T1	1638,523
T2	89492,011
T3	30
T4	450
T5	11,7998
Varianza de repetibilidad	0,421421
Varianza entre analistas	0,050176
Varianza de reproducibilidad	0,471597

Anexo 12. Hoja de cálculo de Evaluación de la Incertidumbre de factores - Determinación de Ocratoxina A por LC-MS/MS

EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE FACTORES - DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A POR LC-MS/MS

ANÁLISIS DE REGRESIÓN

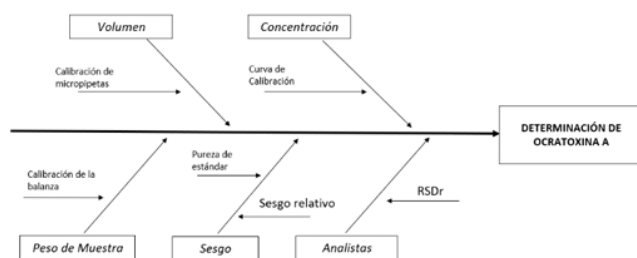
Ocratoxina A	
Concentración (µg/L)	Área
0.25	1633.5820
0.50	3735.9670
1.00	7975.7350
2.00	15202.4460
4.00	32152.7660
5.00	40010.6910
Intercepto	-387.317904
Pendiente	8081.183876
$(y_i - \hat{y}_i)^2$	0.364737435
	6838.126602
	79450.14874
	327875.1676
	46374.93268
$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	62.57566296
$\sum (y_i - \bar{y})^2$	480601.3161
CME	115150.329

$$U(c_{obs}) = \sqrt{\frac{CME}{b^2} \times \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(c_{obs} - \bar{c})^2}{ms_c^2} \right)}$$

n	6
m	2
S_c^2	3.84375

Donde :
 CME : Es el cuadrado medio del error
 n : Es el número de puntos de la calibración
 m : Es el número de réplicas de cada punto de calibración
 S_c^2 : Es la varianza de las concentraciones de la curva de calibración
 b : Es la pendiente de la curva de calibración

IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE



$$\text{Concentración}(\mu\text{g/Kg}) = \left[\frac{y - b}{a} \right] \cdot \frac{V_f(\text{mL})}{V_i(\text{mL})} \cdot \frac{V_e(\text{mL})}{W(g)} \times D$$

DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES QUE APORTAN A LA INCERTIDUMBRE

A. INCERTIDUMBRE COMBINADA DE LA METODOLOGÍA

1. Concentración obtenida a partir de la curva de calibración (Co) en ng/mL

De la ecuación de regresión se tiene: Area Ratio = a x Concentración + b

Analito	Ocratoxina A
Area de la Muestra	15000
Intercepto (a)	-387.3179
Pendiente (b)	8081.1839
Concentración en la muestra (ng/mL)	1.90
(C _{cal} - C) ²	0.05
C _{MET} (μg /Kg)	19.04
u _{Co}	0.034

2. Volumen de extracción (Ve) en mL.

u _{Ve}	0.003150
Ve(mL)	10

Factores de Variabilidad del Ve

Micropipeta automática de 0.5 mL - 5 mL - LaCCSA-59
Incertidumbre de la micropipeta 0.5 mL - 5 mL*

Fecha de calibración: 10/2/2025

Fecha de expiración del certificado: 10/2/2030

Cod. Certificado: N° E040-L1-0044C-2025 - 4
Estado: **VIGENTE**

u _{Ve}	0.0032
-----------------	--------

0.0063

*Utilizar el mayor valor de la incertidumbre asociado al rango de medición de las micropipetas, expresados en los certificados de calibración.

Ingresar Código de distribución

Distribución de la micropipeta

Distribución -->
Código -->

Normal	Rectangular	Triangular
1	2	3

Factor de Cobertura al 95% de Confianza

1

2.00000

3. Factor de concentracion (fc) (Volumen final / Volumen inicial)

Factores de Variabilidad del fc

Micropipeta automática de 100 - 1000 uL - LaCCSA-31

Incertidumbre de la micropipeta 100 uL - 1000 uL*

Fecha de calibración: 12/4/2024

Fecha de expiración del certificado: 12/4/2027

Cod. Certificado: N° E132-L0-199A-2024 - 3

Estado: **VIGENTE**

Distribución de la micropipeta

Distribución -->
Código -->

Normal	Rectangular	Triangular
1	2	3

Factor de Cobertura al 95% de Confianza

u_{fc}	0.00055
V_i (mL)	1.0
V_f (mL)	1.0
F.....	1.00

u_{fc}	0.0006
----------	--------

0.0011

Ingresar Código de distribución

1

2.0000

4. Peso (W) en g.

Factores de Variabilidad de W

a Balanza

Incertidumbres

1 Incertidumbre expndida de la balanza Ohaus [U balaz.] Cod.N° LaCCSA-09

Fecha de calibración: 20/12/2023

Fecha de expiración de la calibración: 20/12/2030

Cod. Certificado: 079-CMM-2023

Estado: **VIGENTE**

Distribución de las Balanzas

Distribución -->
Código -->

Normal	Rectangular	Triangular
1	2	3

Factor de Cobertura al 95% de Confianza

2 Incertidumbre de la balanza Ohaus [U balaz.] Cod.N° LaCCSA-09

u_W	4.76015E-09
W (g)	1.00000

u_W	4.76015E-09
-------	-------------

9.5203E-09

Ingresar código de distribución

1

2

4.76015E-09

5. Factor de Dilución (fd)

Factores de Variabilidad de fd

u_{fd}	0.000000
fd	1

INCERTIDUMBRE COMBINADA DE METODOLOGÍA

$$= \sqrt{\left[\frac{u_{C_o} \times V_e \times f_c \times f_d}{W} \right]^2 + \left[\frac{u_{V_e} \times C_o \times f_c \times f_d}{W} \right]^2 + \left[\frac{u_{f_c} \times C_o \times V_e \times f_d}{W} \right]^2 + \left[\frac{u_{f_d} \times C_o \times V_e \times f_c}{W} \right]^2 + \left[\frac{u_W \times C_o \times V_e \times f_c \times f_d}{W^2} \right]^2}$$

Analito	Ocratoxina A
U comb.met.	0.344

B. INCERTIDUMBRE COMBINADA DEL SESGO

$$U_{Comb.sesgo}^2 = U_{std.verac.}^2 + U_{Sesgo}^2$$

1. Determinación de la incertidumbre del estándar de veracidad ($U_{std.verac.}^2$)

Analito	Ocratoxina A
Pureza %	0.988
Incertidumbre expandida del analito %	0.002
Distribución	2.449493743
U estándar	0.0008965
U std. proce. verac.	0.29658
U std. verac.	0.29658

$$U_{std.verac.}^2 = U_{estandar}^2 + U_{std.proce.verac.}^2$$

$$U_{std.proce.verac.}^2 = \frac{5r}{\sqrt{n}} \quad Sr: \text{Desviación estándar de las mediciones.}$$

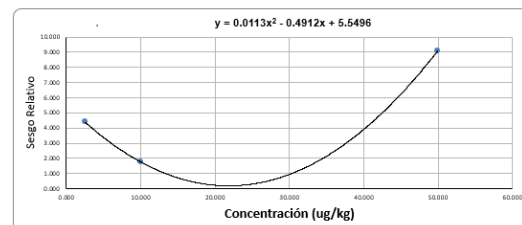
n = Número de réplicas o datos.

2. Determinación de la incertidumbre del Sesgo

Nivel	ANALITO	Ocratoxina A			
	C_{MET} (ug/kg)	19.04			
	Concentración (ug/kg)	Analista 1	Analista 2	Sesgo relativo 1	Sesgo relativo 2
1	2.500	2.610	2.662	4.392	6.477
2	10.000	10.18	10.22	1.763	2.241
3	50.000	54.58	54.67	9.125	9.345

$$U_{Sesgo}^2 = \frac{C \times \text{Sesgo relativo}(\%)}{100}$$

$$\text{Sesgo Relativo}(\%) = \frac{C - x}{C} \times 100$$



Analito	Ocratoxina A
U Sesgo	0.0029359

3. Determinación de la Incertidumbre Combinada del Sesgo

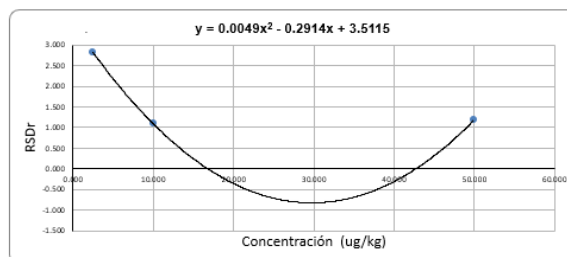
Analito	Ocratoxina A
U comb.sesgo	0.29660

C. INCERTIDUMBRE DEL ANALISTA*

* Utilizar los datos de los analistas que participaron en la implementación o validación del método.

$$U_{Analista} = \frac{C_{MET} \times RSD_r}{100}$$

ANALITO	Ocratoxina A	
Concentración Reportada	19.04	
Nivel	Concentración	RSDr
1	2.500	2.814
2	10.000	1.087
3	50.000	1.189
U Analista	0.002604966	



D. INCERTIDUMBRE GLOBAL

$$U_{global} = \sqrt{U_{metodología}^2 + U_{analista}^2 + U_{Comb.sesgo}^2}$$

Analito	Ocratoxina A
Uglobal	0.45

E. INCERTIDUMBRE EXPANDIDA AL 95% DE CONF. Y K=2

Analito	Ocratoxina A
UE	0.91

$$U_E = k \times U_{global}$$

F. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Micotoxina	Ocratoxina A
Concentración (ug /kg)	19.04
UE	0.91

FACTORES DE INCERTIDUMBRE OCRATOXINA A					
	Valores	Incertid.	Coef. Sens.	Aporte	
Factores	Xi	U _{xi}	C _{xi}	(C _{xi} U _{xi}) ²	%Partic.
Concentración (ug/kg)	19.04	0.03434	10	0.117923461	53.4885%
Volumen de extracción (mL)	10	0.003150	19.04092041	0.003597468	1.6318%
Factor de concentración	1.00	0.00055	190.4092041	0.010967339	4.9746%
Peso	1.00000	4.76015E-09	-190.4092041	8.21518E-13	0.0000%
Factor de dilución	1	0	190.4092041	0	0.0000%
Sesgo		0.29660	1	0.087969919	39.9020%
Analista	2	0.00260	1	6.78585E-06	0.0031%

