



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, **03/MAYO/2011**

OFICIO NUM. DEP-CT-053/2011

C. EDNA ALEJANDRA MATUS CUNDAPÍ
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC.DRA. TERESA DEL ROSARIO AYORA TALAVERA, DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI, DR. JOAQUIN MONTES MOLINA, en el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

"DESARROLLO Y CERTIFICACIÓN DE UN MR PARA LA DETERMINACIÓN DE UN EVENTO DE MODIFICACIÓN GENÉTICA EN POLVO SECO DE MAÍZ"

Registrado mediante la opción:
I (TESIS PROFESIONAL)

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TECNOLOGIA CON SENTIDO HUMANO"

Vo. Bo.

Ing. Roberto Cifuentes Villafuerte
Jefe de la División de Estudios Profesionales

Ing. José Luis Herrera Martínez
Director

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I'RCV/L'ORC



Secretaría de Educ. Pública
Instituto Tecnológico
de Tuxtla Gutiérrez
División de Estudios Profesionales

Carretera Panamericana Km.1080. C.P. 29050, Apartado Postal 599
Teléfonos: (961) 61 5-03-80 (961) 61 5-04-61 Fax (961) 61 5-16-87
<http://www.itlg.edu.mx>



Alcance del Sistema: Proceso Educativo

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

EDNA ALEJANDRA MATUS CUNDAPI

CON EL TEMA:

**“DESARROLLO Y CERTIFICACIÓN DE UN MR
PARA LA DETERMINACIÓN DE UN EVENTO
DE MODIFICACIÓN GENÉTICA EN POLVO
SECO DE MAÍZ”**

MEDIANTE:

OPCION I

(TESIS PROFESIONAL)

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS

MAYO 2011

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Melina Pérez Urquiza y Dra. Teresa Ayora Talavera por su asesoramiento, así como los valiosos conocimientos y sugerencias aportados para lograr que concluyera este proyecto de tesis.

A todo el personal del área de materiales del Centro Nacional de metrología por el apoyo brindado durante el periodo de mi estadía, de la misma manera agradezco la oportunidad brindada al permitirme trabajar en sus instalaciones y hacer uso de sus equipos y material que hicieron posible el desarrollo de este proyecto y por haberme permitido ser parte del Sistema de Desarrollo Profesional (SIDEPRO).

Y sobre todo agradezco a mis padres que fueron constantes animadores y fuentes de apoyo en todo momento; agradezco a mis compañeros de escuela por su amistad y que creyeron en mí para sacar el proyecto adelante.

DEDICATORIAS

Con todo el cariño que se merecen a mis padres, que hasta ahora han logrado que los admire, que los ame y que han demostrado ser padres, maestros y sin lugar a duda amigos en todo momento.

En especial le dedico el presente escrito a mi hijo Carlos Matías que ha sido motor fundamental para lograr la culminación de este proyecto

RESUMEN

En las últimas décadas se ha introducido el término de organismo genéticamente modificado como aquel que tiene en su material genético alguna modificación que no se da en la naturaleza, generado por técnicas de ingeniería genética, con el fin de proporcionar un beneficio para el organismo hospedador, como es el mejoramiento del producto o la resistencia a ciertas plagas, con el fin de reducir costos de inversión. Debido a la importancia que se han generado alrededor de este tipo de organismos en especial a los alimentos modificados genéticamente, se ha desarrollado un material de referencia certificado para acreditar la cantidad de modificación del alimento transgénico. El cual servirá a los laboratorios federales para regular la entrada de alimentos modificados genéticamente y no estén debidamente etiquetados.

Un material de referencia es aquel que nos da un valor cercano al verdadero con una incertidumbre y tener de este modo un nivel de confianza al momento de las mediciones. El presente trabajo se enfoca en el desarrollo 6 candidatos a material de referencia para certificación a partir de maíz modificado genéticamente con los controles negativo (0% de modificación) y positivo (con 100% de modificación), en concentraciones de 1%, 5%, 10%, 11% con modificación, los cuales fueron preparados gravimétricamente, con la finalidad de encontrar la concentración real analíticamente y proporcionar la incertidumbre de la medición para proceder a la certificación de los materiales, que es el objetivo principal de este proyecto.

El método analítico para determinar la concentración real de cada material consiste en mediciones realizadas por medio del equipo de la PCR en tiempo real obteniendo un valor de Ct con los cuales se someten al análisis de varianza tener confianza en los resultados arrojados por el equipo obteniendo la Repetibilidad y reproducibilidad del método; mediante una curva estándar se obtienen las concentraciones de cada candidato a material de referencia y

mediante la ley de la propagación de las incertidumbres se estima la incertidumbre en cada nivel de concentración.

Las incertidumbres calculadas para este material serán consideradas para el laboratorio del CENAM, ya que la incertidumbre final será la que relacione los análisis de los otros laboratorios centrales participantes en el estudio colaborativo

Tabla de contenido

	<i>Página</i>
Lista de Figuras.....	ix
Lista de cuadros.....	x
CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	3
ANTECEDENTES	3
2.1 Organismo modificado genéticamente.....	3
2.1.1 Ventajas e inconvenientes de los OGMs.....	4
2.1.2 Legislación sobre los OGM	7
2.1.3 Técnicas bioquímicas y moleculares para detectar OGM	8
2.2 Materiales de referencia	13
2.2.1 Tipos de materiales de referencia.....	15
2.3 Validación del método e incertidumbre de la medición.....	15
2.3.1 Verificación del uso correcto de un método.....	16
2.3.1 Calibración.....	17
2.3.2 Control y aseguramiento de la calidad.....	17
2.4 Justificación	34
2.5 OBJETIVOS	35
2.5.1 Objetivo general.....	35
2.5.2 Objetivos específicos.....	35
CAPÍTULO III	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1 Preparación del candidato a material de referencia.....	36
3.1.1 Tratamiento del envase a utilizar para el candidato a MRC	36
3.1.2 Acondicionamiento de la materia prima.....	36
3.1.3 Preparación de los 6 lotes candidatos a MRC.....	37
3.2 Estudios de homogeneidad y estabilidad	38
3.2.1 Extracción de ADN.....	38
3.2.1 Amplificación de ADN.....	39
3.3 Validación.....	40

3.3.1 Límite de cuantificación (LOQ)	40
3.3.2 Límite de detección (LOD)	42
3.3.3 Repetibilidad y reproducibilidad	42
3.3.4 Eficiencia	42
3.3.5 Coeficiente R^2	43
3.3.6 Intervalo lineal y de trabajo	43
3.3.7 Recuperación.....	43
3.3.8 Incertidumbre.....	43
CAPITULO IV	45
RESULTADOS	45
4.1. Resultados de la preparación de los 6 lotes candidatos a MRC.....	45
4.2 Estudios de homogeneidad.....	46
4.3 Resultados de los parámetros de validación.....	47
4.4 Repetibilidad y reproducibilidad	49
4.5 Eficiencia	51
4.6 Coeficiente R^2	52
4.7 Intervalo lineal e Intervalo de trabajo.....	52
4.8 Recuperación.....	54
4.9 Incertidumbre.....	55
CAPITULO V	57
CONCLUSIONES	57
CAPITULO VI	58
BIBLIOGRAFIA	58
CAPITULO VII	61
ANEXOS	61

Lista de Figuras

Página

Figura 1. Ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA)	9
Figura 2. Fases de la amplificación por PCR.	12
Figura 3. Diseño de un estudio de homogeneidad entre botellas	22
Figura 4. Diseño alternativo de un estudio de homogeneidad entre botellas.	23
Figura 5. Diseño del estudio de homogeneidad dentro de botellas.	24
Figura 6. Diagrama de flujo para certificar un candidato a MRC	29
Figura 7. Curva de calibración, del logaritmo de la concentración en peso, contra los valores reportados por el equipo de PCR-rt (Ct).	48
Figura 8. Curva de calibración, del logaritmo del número de copias, contra los valores reportados por el equipo de PCR-rt (Ct).	48
Figura 9. Intervalo lineal.....	53

Lista de cuadros

	<i>Página</i>
Cuadro 1. Características del método de ELISA en la detección de OGM (Corona, B. 2006).	10
Cuadro 2. Características generales del PCR en la detección de OGM (Corona 2006).	12
Cuadro 3. Tabla de cantidades de lotes producidos	37
Cuadro 4. Primers y sondas utilizados.	39
Cuadro 5. Pesos de la preparación del DMR 451 IA-VIA	45
Cuadro 6. Número de frascos utilizados en los estudios de homogeneidad y validación	46
Cuadro 7. Resumen de valores de F calculada vs F teórica para la aceptación o rechazo de homogeneidad en los candidatos a MR.	47
Cuadro 8. Resultados de la interpolación de las diluciones	49
Cuadro 9. Repetibilidad y reproducibilidad del método	50
Cuadro 10. Límites de la repetibilidad y reproducibilidad del método.	51
Cuadro 11. Valores de Ct (números de ciclos) obtenidos de las concentraciones de cada lote.....	51
Cuadro 12. Eficiencia del método.	52
Cuadro 13. Valores del intervalo lineal con los cuales fue graficado.....	54
Cuadro 14. Resultados del porcentaje de recuperación,	54
Cuadro 15. Valores encontrados para la incertidumbre en función de la concentración	56
Cuadro 16. Valores encontrados para la incertidumbre en función del número de copias.	56

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El Centro Nacional de Metrología (CENAM) funge como laboratorio de referencia en materia de mediciones, elaborando materiales de referencia y los certifica con el fin de servir como patrones en otros laboratorios en un sistema trazable con unidades claramente establecidas.

Los materiales de referencia (MR) y los materiales de referencia certificados (MRC) hacen posible la transferencia de los valores medidos o asignados de magnitudes físicas, químicas, biológicas o tecnológicas entre un lugar y otro y son ampliamente usados para la calibración de instrumentos de medición, para evaluación de métodos de ensayo y para aseguramiento de calidad en las mediciones, y en el caso de ciertos MR biológicos para permitir expresar las propiedades en unidades arbitrarias (NMX-CH-164-IMNC-2006).

Todas las clases de MR están jugando un papel muy importante en el mundo actual, ya que día a día la tecnología moderna requiere un gran número de materiales de referencia certificados en amplios y diversos campos; sin embargo, la preparación de éstos es muy meticulosa, llevan tiempo y son costosos haciendo difícil satisfacer al consumidor en todos los tipos y cantidades de MRC (NMX-CH-163-IMNC-2006).

El desarrollo de este proyecto consistió en la elaboración de un MRC, en el cual se usó maíz genéticamente modificado, con el fin de detectar Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) en alimentos. El término de OGM se ha introducido para describir a los organismos cuyo material genético se ha modificado de una forma que no se da en la naturaleza en condiciones normales de hibridación o recombinación natural (Querci 2007).

En las últimas décadas nuestra propia relación con la naturaleza se ha visto trastornada por los avances tecnológicos que nos permiten no sólo determinar mejoras genéticas mediante la selección, sino también modificar organismos vivos y crear nuevas combinaciones genéticas en una búsqueda de plantas, animales y peces más resistentes y productivos. Como es comprensible esas novedades

suscitan invariablemente polémicas, y los argumentos a favor y en contra de su aplicación tienden a ser radicales y apasionados (FAO 2001).

Así pues, es necesario disponer de métodos no sólo para detectar la eventual presencia de un OGM en una matriz alimentaria, sino también para identificar el OGM en concreto y medir su cantidad en diferentes ingredientes y piensos. Pueden utilizarse métodos cualitativos de detección en un cribado inicial de los productos alimentarios, para investigar la presencia de compuestos específicos (ADN o proteínas) de OGM (Querci 2007).

El proceso de elaboración del material consiste en la preparación del mismo como: molienda, tamizado, secado y envasado, para después hacerle los estudios de homogeneidad y estabilidad en cada lote del material para determinar los eventos de modificación genética, los cuales se harán por medio de PCR-TR, donde el método de medición será validado para tener resultados confiables, y poder estimar la incertidumbre de las mediciones y obtener el certificado del material de referencia, consiguiendo de esta manera el desarrollo y certificación del material candidato a referencia que tiene por objetivo general del presente trabajo.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Organismo modificado genéticamente

Un organismo modificado genéticamente (abreviado OMG, OGM o GMO, este último del inglés *Genetically Modified Organism*) es aquel cuyo material genético es manipulado en laboratorios donde ha sido diseñado o alterado deliberadamente con el fin de otorgarle alguna característica específica. Comúnmente se les denomina transgénicos y son creados artificialmente en laboratorios por técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética que se usan consisten en aislar segmentos del ADN (material genético) para introducirlos en el genoma (material hereditario) de otro, ya sea utilizando como vector otro ser vivo capaz de inocular fragmentos de ADN (*Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria), ya sea bombardeando las células con micropartículas recubiertas del ADN que se pretenda introducir, u otros métodos físicos como descargas eléctricas que permitan penetrar los fragmentos de ADN hasta el interior del núcleo, a través de las membranas celulares.

Al ser la manipulación en el material genético, este es hereditario, puede transferirse a la siguiente generación salvo que la modificación esterilice al organismo transgénico (FAO 2001).

El OGM en sí debe ser una unidad biológica capaz de multiplicarse o transmitir material genético. Aplicado a los vegetales, el término se refiere a plantas en cuyo genoma (hospedador) se han introducido de forma estable uno o varios genes procedentes de otras especies, mediante técnicas de transferencia genética y cuando en la mayoría de los casos se ha comprobado que tales genes introducidos hacen que se obtenga un producto génico (una proteína). El proceso de introducir genes en especies no emparentadas y conseguir que funcionen se denomina transformación genética (Querci 2007).

2.1.1 Ventajas e inconvenientes de los OGMs

En cuanto a las aplicaciones en agronomía y mejora vegetal en sentido amplio, poseen tres ventajas esenciales:

- Una gran versatilidad en la ingeniería, puesto que los genes que se incorporan al organismo huésped pueden provenir de cualquier especie, incluyendo bacterias (Griffiths 2002)
- Se puede introducir un solo gen en el organismo sin que esto interfiera con el resto de los genes; de este modo, es ideal para mejorar los caracteres monogénicos, es decir, codificados por un sólo gen, como algunos tipos de resistencias a herbicidas (Agrios 2005).
- El proceso de modificación genética demora mucho menos que las técnicas tradicionales de mejoramiento por cruzamiento; la diferencia es de años, en frutales, a meses (Agrios 2005).

Para los consumidores presentan las ventajas que fundamentalmente afectan a la calidad del producto final, es decir, a la modificación de sus características, como lo es la producción de nuevos alimentos; posibilidad de incorporar características nutricionales distintas en los alimentos y vacunas indiscriminadas comestibles, por ejemplo: tomates con la vacuna de la hepatitis B (Xiao-Ming 2007).

Para los agricultores presentan las ventajas en las mejoras agronómicas relativas a la metodología de producción y su rendimiento, como el aumento de la productividad y la calidad aparente de los cultivos; resistencia a plagas y enfermedades conocidas; por ejemplo, por inclusión de toxinas bacterianas, como las de *Bacillus thuringiensis* específicas contra determinadas familias de insectos (Schnepfm 1998); tolerancia a herbicidas (como el glifosato o el glufosinato), salinidad, fitoextracción en suelos metalíferos contaminados con metales pesados, sequías y temperaturas extremas (Lasat 1998); y rapidez, es decir, el proceso de modificación genética demora mucho menos que las técnicas tradicionales de mejora por cruzamiento, que requiere varias generaciones para eliminar otros genes que se introdujeron en el mismo cruzamiento (FAO, 2001).

En el caso del ambiente presentan las ventajas de que algunas variedades transgénicas han permitido una simplificación en el uso de productos químicos, como en el caso del maíz *Bt* con modificación, donde el combate de plagas ya no requiere el uso de insecticidas químicos de mayor espectro y menor biodegradabilidad (Schnepfm 1998).

En lo referente a los inconvenientes, se tiene la resistencia a los antibióticos. Para localizar las células en que se ha incorporado y activado el gen introducido, un método común es la introducción de genes que determinan cierta resistencia a algunos antibióticos, de modo que al añadirlo sobreviven solo las células resistentes, es decir, solo aquellas que adquirieron el gen de resistencia y probablemente también el gen que se desea expresar. Dicho método se utiliza con el fin de verificar que el gen de interés haya sido efectivamente incorporado en el genoma del organismo huésped. Estos genes acompañantes son denominados *marcadores* y no son necesarios para el resultado final, solo simplifican el proceso para lograrlo. Existen otros marcadores que no tienen relación con la resistencia a quimioterápicos, como los de auxotrofia. Se teme que la inclusión de estos elementos en los alimentos transgénicos podría hacer que la resistencia a los antibióticos se transmitiera a las bacterias de la flora intestinal y de esta a organismos patógenos (Eede 2004).

Otro inconveniente que presentan los cultivos de OMG es el uso de pesticidas en mayores cantidades. Un estudio basado en los datos del Departamento de Agricultura de los EUA ha demostrado que, en 2008, los cultivos transgénicos han necesitado un 26% más de pesticidas por hectárea que las variedades convencionales (Benbrook 2009). La posibilidad de usar intensivamente insecticidas a los que son resistentes los transgénicos hace que se vean afectadas y dañadas las especies colindantes (no resistentes). No obstante, existen evidencias científicas de que los cultivos transgénicos resistentes a insecticidas permiten un menor uso de éstos en los campos, lo que redundaría en un menor impacto en el ecosistema que alberga al cultivo (Morse 2004).

También la técnica empleada, es otro inconveniente, ya que la precisión en la obtención de recombinantes, por ejemplo en su localización genómica, es muy dependiente de la técnica empleada: vectores, biobalística, etc.

Existe la posibilidad de la contaminación de variedades tradicionales, es decir, que el polen de las especies transgénicas fecunde a cultivos convencionales, obteniéndose híbridos y transformando a estos últimos en transgénicos. Este fenómeno ya ocurre con las variedades no transgénicas hoy en día.

La transferencia horizontal a bacterias de la rizosfera, aunque posible, se considera un riesgo remoto (Conner 2003).

La muerte de insectos o polinizadores empleando recombinantes que expresan toxinas de *Bacillus thuringiensis* es, por definición, un método específico, a diferencia de los plaguicidas convencionales, sin embargo, existe una demanda comercial que provoca el desarrollo de cepas que actúan conjuntamente contra lepidópteros, coleópteros y dípteros. Este hecho podría afectar a la fauna benéfica del cultivo (Querci 2007).

Algunos autores suponen que en las especies resistentes a herbicidas los agricultores emplean cantidades excesivas de estos pesticidas, con lo cual ocasionan un mayor impacto ambiental. Este posible riesgo ha sido desmentido para algunos OMG, como el maíz resistente a glifosato (Cerdeira 2006). Sin embargo, un estudio reciente, ha mostrado que las formulaciones y productos metabólicos de Roundup causan la muerte de embriones, placentas y células umbilicales humanas *in vitro* aún en bajas concentraciones (Benachour 2008).

La decisión de introducir alimentos transgénicos en la industria alimentaria ha sido totalmente contraria a todo proceso democrático, ocultando incluso la composición de los alimentos, es decir, obligando a su consumo. La industria de los OMG sigue estando consciente de que no cuenta con el apoyo de la población de ningún país del mundo, y ello se demuestra con el hecho de que no se revela la información en el envasado de alimentos transgénicos (FAO 2001).

Un último inconveniente de los OMG, es la monopolización del mercado, debido a que la misma empresa que produce y provee de los OMG también le proporciona al agricultor de insecticidas o herbicidas, las plantas están adaptadas a dichos productos químicos y viceversa, por lo que el productor pasa

a depender en exclusiva de una sola empresa proveedora. El monopolio en el suministro conlleva la imposición de precios y condiciones de explotación.

Como cada OMG está patentado por la multinacional a la que pertenece, el agricultor no puede guardar semillas de su plantación para la siguiente siembra, con lo cual las multinacionales de la biotecnología controlan el mercado de las semillas. Cada año, el agricultor debe hacer una fuerte inversión para obtenerlas (FAO 2001).

2.1.2 Legislación sobre los OGM

El uso de organismos genéticamente modificados (su liberación al medio ambiente, cultivo, importación y, en particular, su utilización como alimentos o ingredientes alimentarios) está reglamentado por la Unión Europea mediante un conjunto de procedimientos escritos. Los primeros instrumentos jurídicos de la comunidad se publicaron en 1990 con el propósito específico de proteger la salud humana, animal y medio ambiente. En dicho reglamento se establecen los requisitos específicos de etiquetado para que el consumidor final estuviera informado de cualquier cambio de las características o propiedades alimentarias, tales como la composición, el valor nutritivo o los efectos nutritivos, o el uso previsto del alimentos, responsable de que un nuevo alimento o ingrediente alimentario dejara ser equivalente a un alimento o ingrediente alimentario existente. El reglamento establecía que no se aplicarían a los alimentos los requisitos específicos adicionales de etiquetado, en caso de que la presencia en los ingredientes alimentarios de material obtenido de los OGM no superara la proporción del 1% en cada uno de los ingredientes alimentarios. Pero un último reglamento define nuevos umbrales mínimos para el etiquetado. Se ha reducido al 0.9% el umbral del 1% respecto a la presencia accidental de OGM autorizados. Por otra parte, se ha establecido un umbral del 0.5% respecto a la presencia accidental de OGM no autorizados, con carácter transitorio. La Unión Europea reconoce el derecho de los consumidores a la información y al etiquetado como instrumento para elegir con conocimiento de causa. También menciona que el solicitante a liberar un OGM, debe presentar un expediente completo donde se

indique un método de detección de la modificación genética concreta de que se trate. El expediente y, en particular sus partes sobre evaluación del riesgo para el medio ambiente y para la seguridad de los alimentos, han de ser evaluados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (Querci 2007).

En México siendo presidente Vicente Fox Quesada y con el Honorable Congreso de la Unión, se decretó y expidió la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), el 18 de Marzo 2005, teniendo como Objeto lo siguiente (CIBIOGEM 2005):

ARTÍCULO 1.- La presente Ley es de orden público y de interés social, y tiene por objeto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola (LBOGM 2005).

Pero aún no se tienen normas mexicanas que aprueben el tránsito comercial de OGM, y condiciones para su etiquetado.

2.1.3 Técnicas bioquímicas y moleculares para detectar OGM

La base de todas las técnicas de detección de OGM consiste en explotar la diferencia entre la variedad no modificada y la planta transgénica. Esto puede hacerse detectando el nuevo ADN transgénico que se ha insertado, o la nueva proteína expresada, o (si la proteína actúa de enzima) utilizando el análisis bioquímico para detectar el producto de la reacción enzimática. Hay dos planteamientos científicos que se utilizan generalmente en la actualidad para detectar modificaciones genéticas en plantas como la soya, el maíz, el algodón y otras. Uno es el ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática), con el que se estudia la presencia de proteínas específicas explotando la especificidad de la unión entre un antígeno expresado y un anticuerpo diana; el otro es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), basada en la detección de secuencias nuevas de ADN insertadas en el genoma de la planta. Estos métodos muestran la

ausencia o presencia del OGM en la muestra, pero a veces también pueden dar una indicación cuantitativa (porcentaje) sobre la muestra estudiada (Querci 2007).

2.1.3. Método de ELISA, (ensayo de inmunoabsorción enzimática).

La técnica ELISA detecta o mide la cantidad de proteína de interés en una muestra que puede contener otras muchas proteínas diferentes (Figura 1). Utiliza un anticuerpo para ligar la proteína específica, un segundo anticuerpo para amplificar la detección (fase optativa) y un conjugado de anticuerpo con una enzima, cuyo producto genera una reacción coloreada, que es fácil de observar y cuantificar comparando con una curva patrón de la proteína de interés (Querci 2007).

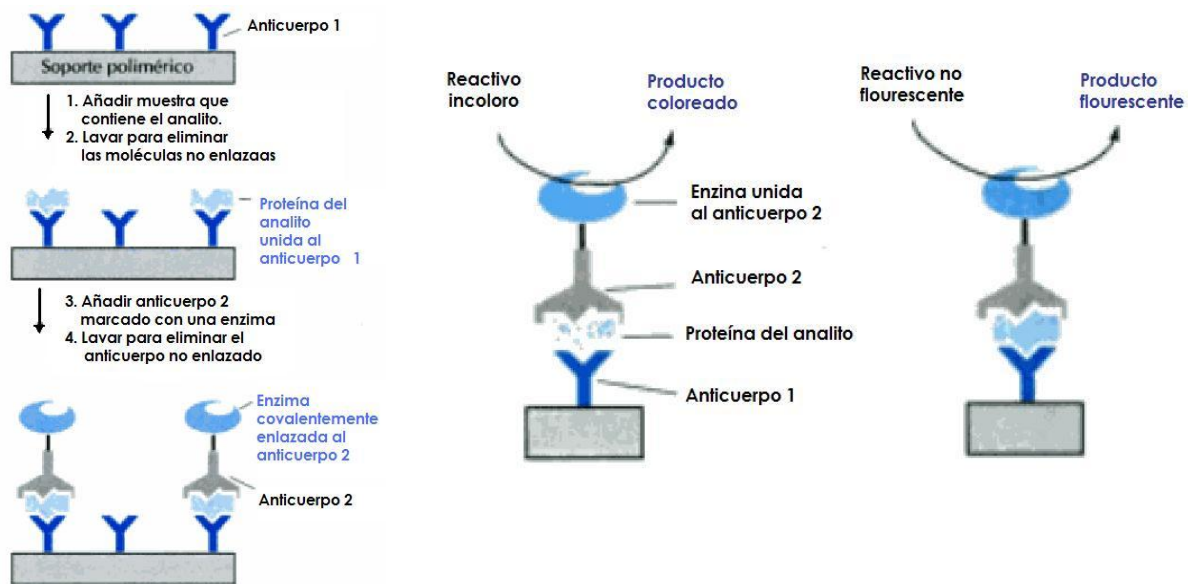


Figura 1. Ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA).

En el cuadro 1 se muestra un resumen del uso de ELISA para la detección de OGM, sus ventajas y desventajas de éste método.

Cuadro 1. Características del método de ELISA en la detección de OGM (Corona, B. 2006).

Propósito	Identificar y semicuantificar una proteína específica relacionada a un rasgo genéticamente modificado.
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Moderada preparación de la muestra. • Ensayo relativamente rápido (2-4 horas incluyendo la preparación de la muestra). • Cualitativo o semicuantitativo. • Costo relativamente bajo o medio. • Ensayo de formato robusto y simple. • Conveniente y rentable para el análisis de numerosas muestras. • Económicamente comparado con los métodos de detección de ADN. • Se requiere menos habilidad que para los métodos de detección de ADN. • Equipamiento más barato que para los métodos de detección de ADN.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Menos sensible que los métodos de detección de ADN. • Los juegos diagnósticos son almacenados a 4°C. • Costo moderado del equipamiento que requiere un lector de placas de ELISA. • Falta de disponibilidad de anticuerpos relevantes. • La cuantificación puede ser cuestionable, ya que puede estar influenciada por factores • externos como el clima, las condiciones del suelo y la disponibilidad de nutrientes. • El desarrollo de anticuerpos apropiados puede demorar de meses hasta años. • Pueden existir falsos positivos, debido a contaminaciones cruzadas con otros componentes de la muestra analizada.
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Las pruebas ELISA no son evento específico. • La sensibilidad es de ~ 0.5 a 1% de OGM. • Algunos OGMs no expresan niveles detectables de la proteína blanco y otros expresan la proteína de forma muy limitada o no la expresan en todas las partes de la planta. • Los juegos comerciales están disponibles para un número limitado de OGMs. • La producción de anticuerpos es lenta y difícil. • La mayoría de los ELISA detecta una sola proteína cada uno. • Más útil para material crudo o entero, no procesado. No siempre útil para material procesado, debido a la desnaturalización de las proteínas por el calor. • Conveniente para detectar el flujo del gen en cosechas convencionales de la misma especie, pero la proteína puede ser expresada en una forma modificada o no ser expresada en todos, si la construcción se realizó en una especie de planta diferente.

2.1.3. Método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis en los años ochenta. Al igual que la técnica de secuenciación del ácido desoxirribonucleico (DNA), la PCR ha revolucionado la genética molecular, haciendo posible el estudio y análisis de una amplia gama de genes, que incluso pueden obtenerse a partir de un genoma complejo, como es el de los mamíferos donde existen miles de genes (Torres 1995).

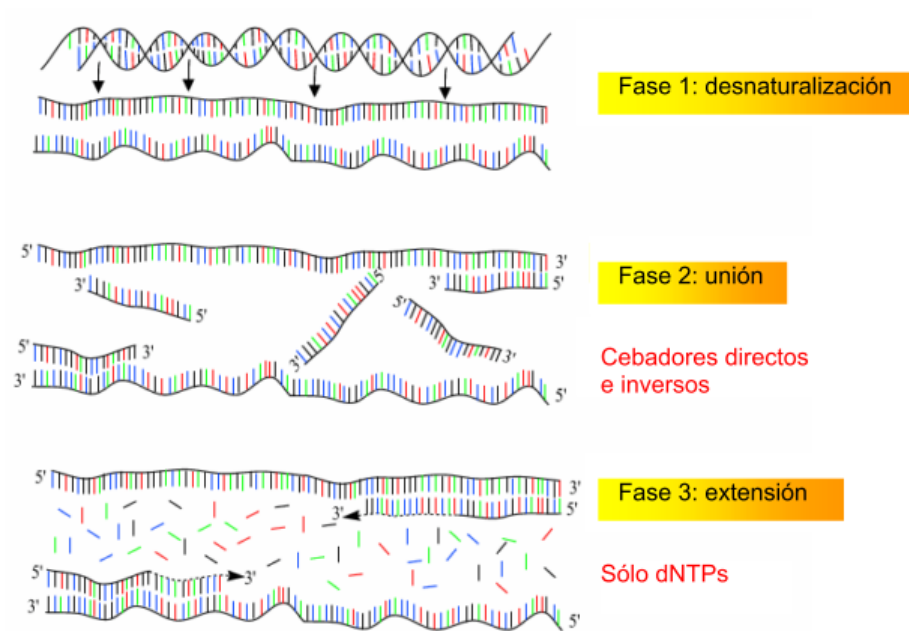
La PCR se basa en la capacidad de la ADN polimerasa para copiar una cadena de ADN por elongación de cadenas complementarias, iniciando la síntesis a partir de unos iniciadores o "primers" (oligonucleótidos sintetizados).

La técnica básica de PCR incluye ciclos repetidos de amplificación de secuencias seleccionadas de ácidos nucleicos. Cada ciclo consiste en tres pasos (Figura 2):

1. Desnaturalización del ADN, en el cual se separan las cadenas dobles del ADN blanco.
2. Unión de los primers o cebadores, en el cual a baja temperatura se unen a las secuencias complementarias del blanco.
3. Extensión, en la cual la enzima ADN polimerasa extiende las secuencias entre los primers.

Al final de cada ciclo (donde cada ciclo está compuesto por los tres pasos anteriores), la cantidad del producto se duplica. Todo el procedimiento se lleva a cabo en un termociclador programable. Después de 30-50 ciclos ocurre crecimiento exponencial en el número total de copias de ADN sintetizadas (Lizcano 2005).

Figura 2. Fases de la amplificación por PCR.



En el cuadro 2 se muestra un resumen del uso de la PCR para la detección de OGM, sus ventajas y desventajas de éste método.

Cuadro 2. Características generales del PCR en la detección de OGM (Corona 2006).

Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad. • Cualquier tipo de tejido puede ser analizado, pues todas las células de la planta poseen el mismo ADN. • Proporciona relativa cuantificación. • Los métodos se pueden diseñar en el laboratorio, siempre que la secuencia esté disponible.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo de tiempo en la preparación de las muestras. • El ensayo total consume de 1 a 2 días. • Más caros que los métodos de detección de proteínas. • Los costos del equipamiento resultan de moderados a caros: termociclador e insumos de electroforesis. • Los insumos de PCR deben ser almacenados a 4°C. • Susceptibilidad a inhibidores que pueden estar presentes en los alimentos. • Garantía de calidad requerida para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> • No hay método de PCR que detecte todo los OGM. • La utilidad para un rango de materiales debe tener asegurada la calidad y cantidad requerida. • Se requieren habilidades técnicas.

PCR-RT (Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa). Es una amplificación de ARN, y en particular del ARN mensajero, a través de la síntesis precisa del ADN complementario al ARNm (cDNA), que después se amplifica por una PCR estándar. En otras palabras, se obtienen copias del ADN, y no del ARN original. Es un método muy utilizado para medir expresión génica *in vitro*. También se lo ha aplicado al análisis de transcritos de genes expresados en grado mínimo. Es muy utilizado en el análisis cualitativo de virus (González 2006).

2.2 Materiales de referencia

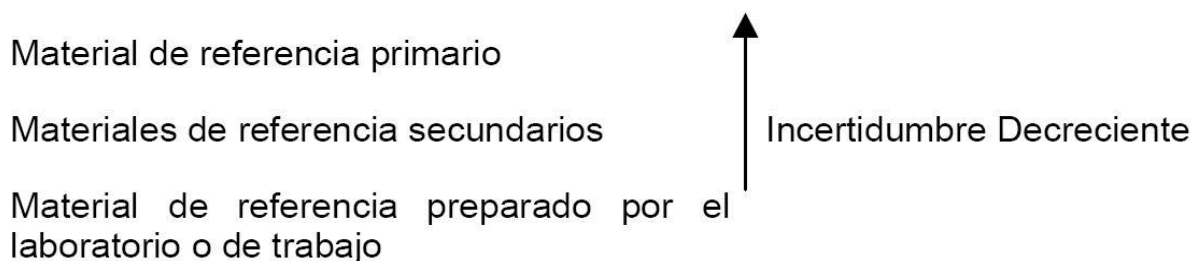
Los materiales de referencia hacen posible la transferencia de los valores medidos o asignados de magnitudes (físicas, químicas, biológicas o tecnológicas) entre un lugar y otro. Ellos son ampliamente usados para la calibración de instrumentos de medición, para la evaluación de métodos de análisis de ensayo y para el aseguramiento de la calidad a largo plazo de las mediciones y, en el caso de ciertos materiales de referencia biológicos y tecnológicos, para permitir expresar convenientemente las propiedades en unidades arbitrarias. Todas las clases de materiales de referencia están jugando un papel cada vez más importante en actividades de Normalización Nacional e Internacional, en ensayos de aptitud, y en la acreditación de laboratorios (NMX-CH-160-IMNC-2006).

Dos clases de materiales son reconocidas por ISO, denominados "materiales de referencia certificados" (MRC) y "materiales de referencia" (MR). Los MRC deben por definición ser trazables a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad. Cada valor de la propiedad debe estar acompañado por una incertidumbre a un nivel de confianza definido. Los MR son materiales cuyos valores de la propiedad son suficientemente homogéneos y bien establecidos para ser usados para la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medición o para asignar valores a los materiales.

Para la mayoría de los materiales de referencia químicos, producidos antes de los últimos años de la década de los 1990s, es poco probable que los valores de incertidumbre de la medición dados por los productores hayan sido estimados por el procedimiento ISO ahora recomendado (GUM, 1995/Guía Eurachem/CITAC,

2000). Puede esperarse que la incertidumbre real sea más grande que la declarada por un factor de 2-3, cuando sólo se usan dentro de las mediciones de precisión del laboratorio y por un factor más pequeño cuando la certificación incluyó un rango de métodos validados y varios laboratorios.

Algunos materiales vendidos como MRC no tienen evidencia de trazabilidad declarada y, en tales casos, el usuario debería hacer un juicio sobre la posible trazabilidad del valor asignado al MRC. Se pueden encontrar las siguientes clases de materiales de referencia (ILAC-G9:2005):



Dependiendo del tipo de material de referencia la incertidumbre descende.

2.2.1 Tipos de materiales de referencia

Se usan los MR para apoyar las mediciones relacionadas con composición química, propiedades biológicas, clínicas, físicas y de ingeniería así como áreas mixtas tales como sabor y olor. Ellos pueden caracterizarse para "identidad" (por ejemplo: estructura química, tipo de fibra, especies microbiológicas, etc.) o para "valores de propiedad" (por ejemplo, cantidad de entidad química especificada, dureza, etc.). Algunos tipos de materiales de referencia normalmente disponibles son los siguientes:

1. **Sustancias puras** caracterizadas para pureza química y/o impurezas trazas (ILAC-G9:2005).
2. **Soluciones normalizadas** y mezclas de gas, a menudo preparadas gravimétricamente a partir de sustancias puras y usadas para propósitos de calibración (ILAC-G9:2005).
3. **Materiales de referencia matrices**, caracterizados por la composición del constituyente químico especificado mayor, menor o traza. Dichos materiales se pueden preparar de matrices que contienen los componentes de interés o preparando mezclas sintéticas (ILAC-G9:2005).
4. **Materiales de referencia físico-químicos** caracterizados para propiedades tales como punto de fusión, viscosidad y densidad óptica (ILAC-G9:2005).
5. **Objetos o artefactos de referencia** caracterizados para propiedades funcionales como sabor, olor, número de octano, punto de inflamación y dureza. Este tipo también incluye especímenes de microscopía caracterizados para propiedades que van desde tipo de fibra a especímenes microbiológicos (ILAC-G9:2005).

2.3 Validación del método e incertidumbre de la medición

La estimación del sesgo (la diferencia entre el valor medido y el valor verdadero) es uno de los elementos más difíciles de la validación del método, pero empleando el MR apropiado pueden proporcionar valiosa información, dentro de los límites de la incertidumbre de los valores certificados de los MR y la

incertidumbre del método que está siendo validado. Aunque valores certificados trazables son altamente deseables, la estimación de diferencias de sesgo entre dos o más métodos puede ser establecida con el uso de MR certificados con menor rigor. Claramente los MR deben estar dentro del alcance del método en términos del tipo de matriz, concentración del analito, etc. e idealmente deberían ensayarse varios MR que cubran el rango completo del método. Cuando se están evaluando modificaciones menores a un método bien establecido entonces pueden emplearse estudios de sesgo menos rigurosos.

Mediciones replicadas del MR que cubran el rango completo de variables permitidas por el método que se está validando pueden usarse para estimar la incertidumbre asociada con cualquier sesgo, el cual debería normalmente ser corregido. La incertidumbre asociada a un MR debería ser no mayor de un tercio de lo que corresponde a la muestra de medición (ILAC-G9:2005).

2.3.1 Verificación del uso correcto de un método

La aplicación exitosa de un método válido depende de su uso correcto, tanto con respecto a la habilidad del operador como si el equipo, reactivos y patrones son apropiados. Los MR pueden usarse para capacitación, para verificar métodos usados con poca frecuencia y para resolver problemas que aparecen cuando se obtienen resultados inesperados (ILAC-G9:2005).

2.3.2 Calibración

Normalmente un MR de una sustancia pura se usa para la calibración de la fase de la medición de un método. Otros componentes del método de ensayo, tales como la digestión de la muestra, la separación y derivación, por supuesto, no están cubiertas y la pérdida del analito, contaminación, interferencias y sus incertidumbres asociadas se deben tratar como parte de la validación del método. La incertidumbre asociada con la pureza del MR contribuirá a la incertidumbre total de la medición. Por ejemplo, un MR certificado como 99.9% puro, con una incertidumbre expandida U ($k=2$) de 0.1% contribuirá con un componente de 0.1 % al presupuesto total de incertidumbre de medición. En el caso de análisis de trazas, este nivel de incertidumbre será raramente importante pero para trabajos de ensayo puede esperarse que sea significativo.

Algunos otros métodos, como análisis de Fluorescencia por rayos X (XRF), usan MR matrices para la calibración del proceso analítico completo. Además, en una comparación cercana de matriz, la forma del analito debe ser la misma en las muestras y el MR, y las concentraciones analíticas de los MR deben comprender las de las muestras (ILAC-G9:2005).

2.3.3 Control y aseguramiento de la calidad

Los MR deberían ser caracterizados con respecto a la homogeneidad, estabilidad, y el valor de la propiedad certificado, para un control de calidad interno, sin embargo el último requisito puede flexibilizarse, pero la homogeneidad y la estabilidad adecuadas son esenciales. Requisitos similares se aplican a las muestras usadas para establecer cuanto coinciden o no las mediciones realizadas en laboratorios diferentes. En el caso de ensayos de aptitud, la homogeneidad es esencial y la estabilidad de la muestra dentro de la escala del tiempo del ejercicio debe evaluarse y controlarse. Aunque es deseable el costo de asignar los valores de propiedad a muestras de ensayos de aptitud a menudo es prohibitivo y se usan en cambio y con frecuencia valores promedio de consenso. Como consecuencia, a menudo permanece alguna duda acerca de la confiabilidad de los valores asignados usados en los programas de ensayo de

aptitud. Esto se debe a que, a pesar de que el promedio de consenso de un conjunto de datos tiene valor, "la mayoría" no necesariamente es correcto y en consecuencia los valores tienen algún elemento no declarado de incertidumbre. La interpretación de los datos de ensayos de aptitud necesita por lo tanto efectuarse con cautela (ILAC-G9:2005).

2.3.3.1 Contenido del certificado y etiqueta de un MRC

A continuación se señalan las diversas categorías de información a ser consideradas en la elaboración de un certificado, con las cuales se pretende cubrir la información requerida para la variedad más amplia posible de MRC.

Subcláusula contenido en el certificado	Descripción
Nombre y domicilio del organismo	El nombre generalmente debe ir en el encabezado del certificado con tipografía sobresaliente, el cual es el organismo u organización que acepta la responsabilidad de la información en el certificado, acompañado de la dirección postal completa, números de teléfono y fax, en dado caso dirección de correo electrónico.
Título del documento	Se debe especificar qué tipo de certificado se trata, ejemplo: <i>Certificado de Análisis</i> o <i>Certificado de Medición</i>
Nombre del Material	El nombre del material deberá describir el tipo de material de referencia con suficiente detalle para distinguirlo de otros materiales similares.
Código y número de lote del material de referencia	Cada MRC deberá tener un código alfanumérico único por el cual sea distinguible de cualquier otro MRC por el mismo o algún otro productor.
Descripción del MRC	Deberá ser más detallada que el nombre del material, como fuente del material, composición química y en algunos casos de ser necesaria la descripción física del material, tamaño de partícula, dimensiones, etc.
Propósitos de uso	Deberá declararse el propósito principal para el cual un MRC es preparado por un productor.
Instrucciones para el uso correcto del MR	Es esencial que el material de referencia sea usado bajo las condiciones prescritas en el certificado. Es decir las condiciones a las cuales debe utilizarse.
Situación de riesgo	Si se dispone de información de seguridad de un MRFC, ésta debería incluirse tanto en la etiqueta como en el certificado.

Fuente: (NMX-CH-161-IMNC-2006)

Sin embargo, esta es únicamente la información contenida en un certificado, y el orden o el nombre de las subcláusulas pueden cambiarse de acuerdo a la preferencia del productor (NMX-CH-161-IMNC-2006).

2.3.3.2 Principios generales para la certificación de los materiales de referencia

La producción de un MRC requiere de una buena planeación antes de emprender cualquier actividad en el proyecto. Una parte substancial de la planeación se ocupa de la cantidad del material requerido, así como del diseño de estudios de homogeneidad, estabilidad y caracterización. El diseño también incluye la selección de métodos apropiados de medición para estos estudios. El número de las muestras a ser producidas es una variable muy importante en el proceso de planeación. El número de muestras y la cantidad de materia prima dependen de todos estos factores (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.3.3.3 Definición del proyecto

La planeación de un proyecto comienza con la definición de cuál MRC se va a producir, es decir, que en todos los casos es importante especificar lo que va a ser producido. Ya que los MRC se utilizan primordialmente para hacer la últimas mediciones trazables, la selección de las referencias apropiadas es crucial para el valor del MRC producido, tanto metrológica como comercialmente (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.3.3.4 Adquisición de los materiales de partida

La primer tarea en un proyecto de certificación es obtener una cantidad suficiente de material(es) de partida con la(s) características deseadas. Para los materiales que conforman la matriz, debe observarse que puede haber restricciones respecto a sus propiedades. Algunas combinaciones entre material/propiedad son raras, o pueden ser poco frecuentes en combinación con otras propiedades. En algunos casos, técnicas de mezclado de y/o de adición pueden resolver este problema (NMX-CH-165-IMNC-2008).

La cantidad necesaria de material es definida por lo siguiente:

- ✓ Número necesario de muestras del MR(C)
- ✓ La necesidad de un estudio de factibilidad
- ✓ El número necesario de muestras para el estudio de homogeneidad
- ✓ El número necesario de muestras para el estudio de estabilidad
- ✓ El número necesario de muestras para la caracterización del candidato a MRC
- ✓ La cantidad necesaria de material para una medición

2.3.3.5 Estudio de factibilidad

Se debe considerar un estudio de factibilidad cuando haya preocupación por la factibilidad de producir y caracterizar un MRC lo suficientemente homogéneo y estable. Un estudio de factibilidad se organiza a veces para permitir a los laboratorios que probablemente participaran en la caracterización, se recomienda tener un lote del material ligeramente diferente del material usado para el candidato a MRC (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.3.3.6 El tiempo y la vida de anaquel requeridos

Otro parámetro relevante con respecto a la estabilidad es la vida de anaquel del MRC. El tiempo de vida previsto de un material de referencia es una variable importante en la planeación del proyecto de certificación. Dependiendo de la naturaleza de los mecanismos que afectan la estabilidad del material, varias acciones pueden tomarse para mejorar la vida de anaquel y/o el periodo de vigencia. El ajuste de la actividad de agua es una de las primeras opciones a considerarse, dado que la sequedad excesiva o un contenido demasiado alto de agua puede desestabilizar el material. En muchos casos, la humedad juega un papel importante en los mecanismos que conducen a la inestabilidad de la matriz y/o de los parámetros. Se debe considerar en otros casos, la esterilización o pasteurización del material para detener la actividad microbiana; sin embargo, estas medidas también pueden tener un efecto negativo en la estabilidad. La vida de anaquel de un material es una función de las condiciones de

almacenaje. Este determina en qué medida los resultados pueden ser extrapolados (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.3.3.7 Preparación del material

El material muestreado experimenta generalmente varios pasos en la preparación antes de que se convierta en un material de referencia. Los pasos necesarios en este proceso pueden incluir el secado, la reducción de tamaño de partícula, tamizado, la estabilidad y subdivisión/embotellado. En la etapa del diseño del proyecto, debería ser establecido hasta qué punto debe extenderse la preparación de la muestra. Por ejemplo, es posible preparar un material muestreado de una manera tal que pueda ser medido directamente como extracto. En muchos casos, sin embargo, es preferible que la muestra deje el material muestreado en su estado original, aun cuando la heterogeneidad sería disminuida y la estabilidad sería aumentada como resultado del proceso de la preparación de la muestra (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.3.3.8 Estudio de homogeneidad de un material de referencia

Un estudio de homogeneidad es necesario en los proyectos de certificación por lote, para demostrar que el lote de muestras (unidades) es suficientemente homogéneo. Los aspectos para asegurar la calidad son tan importantes como la determinación de la variación remanente entre botellas del lote, lo cual es un componente de la incertidumbre que le incluirá en la estimación de la incertidumbre del valor de la propiedad del MRC. El número de muestras adicionales requeridas depende principalmente del estudio de homogeneidad entre botellas. El número mínimo de las botellas seleccionadas al azar es entre 10 y 30, pero no debe ser menos de 10 (NMX-CH-165-IMNC-2008).

El número óptimo de muestras para un estudio de homogeneidad se puede determinar mediante técnicas de diseño apoyadas estadísticamente. Además, el número de botellas depende del tamaño del lote, de manera que el número de las muestras escogidas pueda considerarse "representativo" del lote entero. Este requisito se debe balancear con la incertidumbre de las mediciones que es (bajo

condiciones de repetibilidad) una función de la desviación estándar de repetibilidad de la medición y número de réplicas (NMX-CH-165-IMNC-2008).

El plan de muestreo utilizado para seleccionar las botellas (unidades) para el estudio de homogeneidad puede ser aleatorio, aleatorio estratificado o en algunos casos, sistemático. El plan de muestreo debería tomar en consideración la potencial debilidad del método de preparación de las muestras, permitiendo así una revisión crítica del lote preparado. La estratificación es recomendada en muchas situaciones, ya que esto garantiza que las botellas seleccionadas para el estudio de homogeneidad estén distribuidas equivalentemente en todo el lote (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.3.3.9 Estudio de homogeneidad entre botellas

Un estudio de homogeneidad entre botellas ayuda a determinar la variación entre las mismas. Los "grupos", representan las botellas (unidades). Dos escenarios experimentales típicos, para un estudio de homogeneidad entre botellas se visualizan en las figuras 3 y 4 (NMX-CH-165-IMNC-2008).

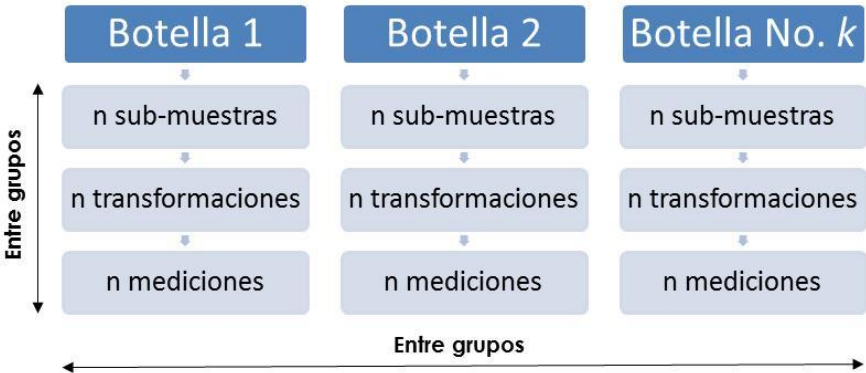


Figura 3. Diseño de un estudio de homogeneidad entre botellas

En este diseño, ya que múltiples porciones se han tomado de cada muestra del lote y transformado individualmente, la varianza "entre botellas" solo incluye la heterogeneidad entre botellas, mientras que la varianza "dentro de botellas" incluye incertidumbre debida a la medición, la transformación del sub-muestreo.

Esto es la situación ideal, desde una perspectiva de obtener un estimado no sesgado de la heterogeneidad del material (NMX-CH-165-IMNC-2008).

En la figura 4, se muestra un diseño para el caso en donde el sub-muestreo de las unidades es imposible o solo no llevado a cabo, por ejemplo, por razones económicas. En este diseño el efecto de la homogeneidad entre botellas es incluida en la varianza “entre grupos”, como son cualquiera de los efectos que surgen en la transformación de la muestra. La varianza “dentro de grupos” cubre solo la repetibilidad de la medición. Con las piezas o las muestras de “un solo intento”, con frecuencia solo una prueba es posible, así que es este caso, n , el número de réplicas es igual a 1. En estos casos, no hay efectos de homogeneidad dentro de las botellas a considerarse. En aquellos casos en donde la muestra permite múltiples mediciones después de la transformación n , generalmente será más grande. En aquellos casos donde $n > 1$, los datos pueden tratarse con un análisis de varianza (NMX-CH-165-IMNC-2008).

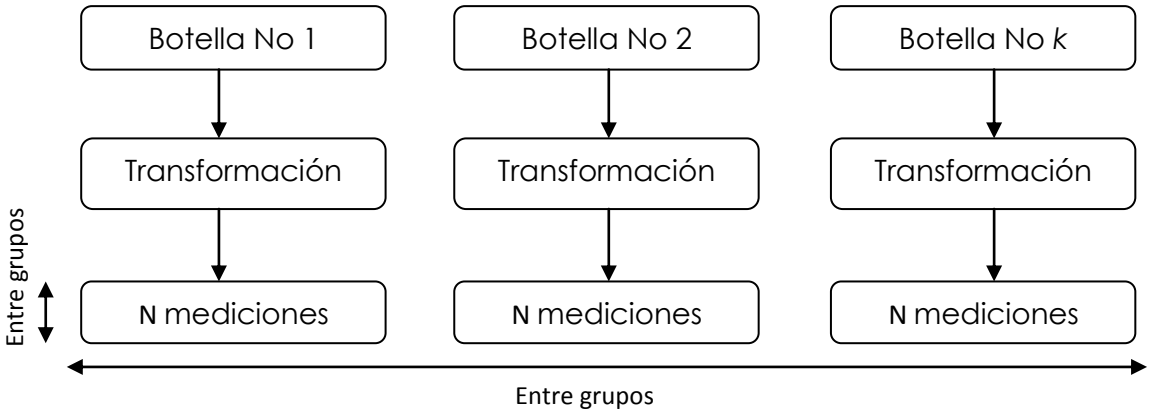


Figura 4. Diseño alternativo de un estudio de homogeneidad entre botellas.

2.3.3.10 Estudio de homogeneidad dentro de botellas

La homogeneidad entre botellas es una cuestión que solo surgen cuando las botellas (unidades) del candidato a MR puede ser sub-muestreadas. En muchos casos, no es posible obtener una estimación exacta de la varianza debido a la heterogeneidad dentro de botellas. La repetibilidad de los métodos de prueba se

prolongará siempre y cuando sean contenidas en la estimación para la homogeneidad dentro de botellas.

En la figura 5, se muestran múltiples porciones de prueba de una muestra cuando usualmente se puede transformar solo una vez. Sin embargo, hay notables excepciones (por ejemplo el uso de fluorescencia de rayos X) donde es posible realizar múltiples mediciones sobre la misma porción de la muestra. En estos casos, la aproximación de ANOVA de una vía puede considerarse, tal como es el caso de la homogeneidad entre botellas. La desviación estándar relevante es la desviación estándar entre grupos donde un grupo representa una sub-muestra (NMX-CH-165-IMNC-2008).

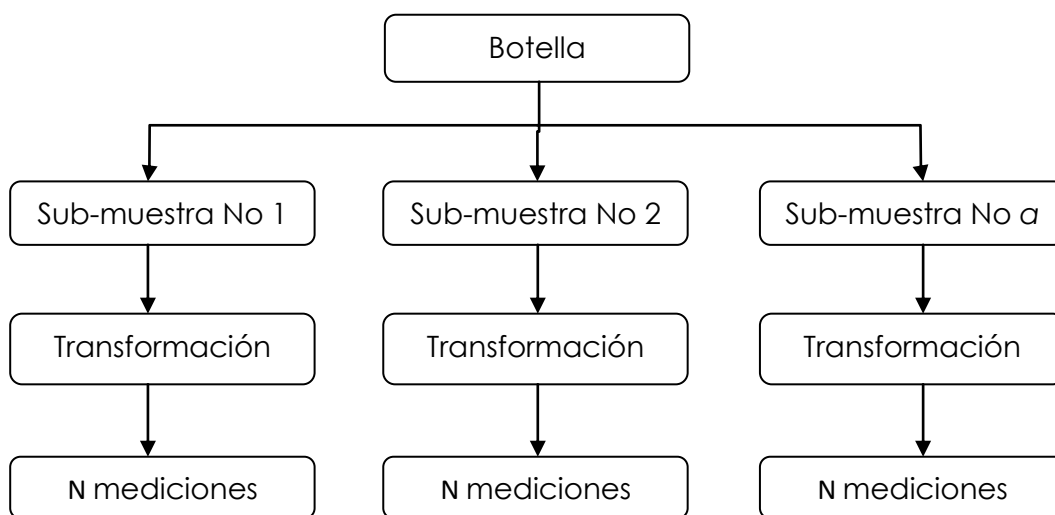


Figura 5. Diseño del estudio de homogeneidad dentro de botellas.

La toma mínima de muestra se determina llevando a cabo el estudio de homogeneidad dentro de botellas para diferentes porciones de prueba. Como en la homogeneidad dentro de botellas la desviación estándar depende del número de partículas que contienen cierta propiedad, siendo posible determinar el número mínimo de partículas (con mínima porción de prueba). Este mínimo es la cantidad de muestra más pequeña tomada, para la cual la desviación estándar de la porción de prueba es igual a la desviación estándar de la repetibilidad del método de medición (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.3.3.11 Estudio de la estabilidad de un material de referencia

La prueba de estabilidad tiene como objetivo determinar el grado de inestabilidad del candidato a MR después de su preparación o para confirmar la estabilidad del material. Incluso los materiales “estables” pueden demostrar inestabilidad para uno o más valores de sus propiedades. Se puede hacer una distinción entre la estabilidad bajo condiciones especificadas:

- Las condiciones de almacenamiento (estabilidad a largo plazo), y
- Condiciones de transporte.

Como en el caso del estudio de homogeneidad, los aspectos del aseguramiento de la calidad son tan importantes como determinar las contribuciones a la incertidumbre debido a los efectos de la inestabilidad. La estabilidad a largo plazo se refiere a la inestabilidad remanente de los valores de la propiedad del MRC bajo las condiciones de almacenamiento especificadas. Por lo tanto, es importante especificar estas condiciones adecuadamente para estudiar la estabilidad del material bajo las mismas condiciones. Una temperatura de referencia debe ser elegida de tal manera que es prácticamente cierto que el material es estable a esa temperatura. Muchos materiales de referencia biológicos y ambientales, muestran un cierto grado de inestabilidad, a pesar del esfuerzo puesto en definir y/o determinar las condiciones de almacenamiento óptimas (NMX-CH-165-IMNC-2008).

El estudio de estabilidad a corto plazo se lleva a cabo típicamente a diferentes temperaturas, para estudiar el efecto de diferentes temperaturas entre las propiedades del material. Las temperaturas de las muestras pueden variar durante el transporte entre -50 °C hasta + 70 °C, dependiendo del tipo de modalidad del empaque y del transporte (NMX-CH-165-IMNC-2008).

El estudio de estabilidad requiere un número considerable de botellas (unidades). Para cada punto en tiempo, es preferible tener disponible más de una botella, Dado que la mayoría de los estudios de estabilidad a largo plazo duran entre 24 y 36 meses, con típicamente 5 o 6 puntos en tiempo, son necesarias por lo menos 10 a 12 botellas por cada temperatura. Siguiendo el mismo razonamiento que para un estudio de estabilidad a largo plazo, el número de botellas sería entre 5 y 10

para un estudio de estabilidad a corto plazo de la estabilidad a cada temperatura (NMX-CH-165-IMNC-2008).

El método preferido para conducir un estudio de estabilidad en la certificación de un lote es trabajar bajo condiciones de repetibilidad. De otra manera, la incertidumbre estimada debido a la inestabilidad crecería innecesariamente por los efectos de la reproducibilidad en los resultados durante el ensayo de estabilidad (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.3.3.12 Evaluación de la incertidumbre del valor de propiedad de un MRC

El valor de la propiedad se define generalmente como un cierto tipo de valor medio, el cual puede ser ponderado usando algún esquema de ponderación predefinido, en caso de necesidad. Cuando los modelos de incertidumbre están disponibles, entonces la expresión para la incertidumbre estándar combinada asociada al valor de la propiedad, se puede obtener directamente las ecuaciones de propagación de incertidumbre estándar (NMX-CH-165-IMNC-2008).

El establecimiento de un modelo apropiado para un valor de una propiedad de un candidato específico a MRC es una tarea compleja que debería realizarse con gran cuidado para tomar en cuenta todos los detalles relevantes de los procedimientos seguidos para producir y certificar el material. Uno de los requisitos básicos del modelo es que sean incluidos todos los factores que podrían contribuir significativamente a la incertidumbre asociada con los valores de la propiedad del MRC, con el fin que sea completa, la incertidumbre estándar combinada de un material de referencia debería reconocer que la homogeneidad y la estabilidad a largo y corto plazo también desempeñan un papel importante además de la caracterización del lote. Por lo tanto, la incertidumbre de un material de referencia puede ser expresada de la siguiente manera:

- a) Incertidumbre del valor certificado según lo obtenido para el lote (caracterización)
- b) Transferencia a un solo paquete (homogeneidad)

- c) Como es entregado al cliente (estabilidad a corto plazo)
- d) A momento de la venta (estabilidad a largo plazo)

Esta definición de la incertidumbre asociada a un valor de una propiedad de un MRC considera los factores siguientes:

- e) La cuidadosa caracterización del material es acompañada por una incertidumbre
- f) El usuario (como una regla) usará solamente una muestra a la vez
- g) El material será almacenado por un largo período por el productor/distribuidor
- h) El material debería ser transportado al usuario

Todos estos factores pueden contribuir significativamente a la incertidumbre asociada al valor asignado al mensurando (es decir el valor a certificar) para un MRC. La evaluación de la incertidumbre no está dirigida y no debería utilizarse para tomar en cuenta los accidentes, errores, uso incorrecto, transporte inadecuado, etc., del MRC.

El modelo puede ser expresado como sigue

$$x_{MRC} = x_{char} + \delta x_{bb} + \delta x_{lts} + \delta x_{sts}$$

Donde:

x_{MRC} : El valor de la propiedad de interés

x_{char} : El valor de la propiedad obtenida de la caracterización del lote, o en el caso de la caracterización de un solo artículo, el valor de la propiedad obtenido para este artículo

δx_{bb} : un término de error debido a la variación entre botellas

δx_{lts} y δx_{sts} : Términos de error debidos a la inestabilidad a largo y corto plazos

Generalmente, los estudios de estabilidad y homogeneidad se diseñan de tal manera que los valores de estos sean cero, pero sus incertidumbres no lo son.

Asumiendo la independencia de las variables, la incertidumbre asociada al valor de la propiedad de un MRC se puede expresar como:

$$U_{MRC} = \sqrt{U_{char}^2 + U_{bb}^2 + U_{lts}^2 + U_{sts}^2}$$

Usando la ecuación de propagación de error, los componentes de la incertidumbre U_{bb} (incertidumbre estándar entre botellas), U_{lts} (incertidumbre estándar de la estabilidad a largo plazo) y U_{sts} (incertidumbre estándar de la estabilidad a corto plazo), corresponden a los términos del error en el modelo. La incertidumbre estándar combinada asociada al valor de la propiedad del MRC puede estar relacionada con la vida útil del material (NMX-CH-165-IMNC-2008). Cuando se requiere una declaración de incertidumbre junto con los resultados, es conveniente expresar una incertidumbre expandida aplicando un factor de cobertura apropiada. Por ejemplo, un factor de 2, se aproxima a un nivel de confianza del 95% (EURACHEM: 2005).

2.3.3.13 Certificación de un material de referencia

El concepto de MRC se presenta como una clase especial de MR. Un MRC está acompañado por un certificado que proporciona entre otras cosas la siguiente información:

- ✓ Las propiedades de interés
- ✓ Sus valores
- ✓ Sus incertidumbres
- ✓ Una declaración de trazabilidad metrológica con relación a los valores de propiedad

El certificado del MRC es un resumen de un extenso programa de trabajo que involucra la selección del material, la evaluación idónea y la medición de las propiedades a certificar. En la figura 6 se esquematiza el procedimiento general para llevar a cabo la certificación de un candidato a material de referencia (NMX-CH-165-IMNC-2008).

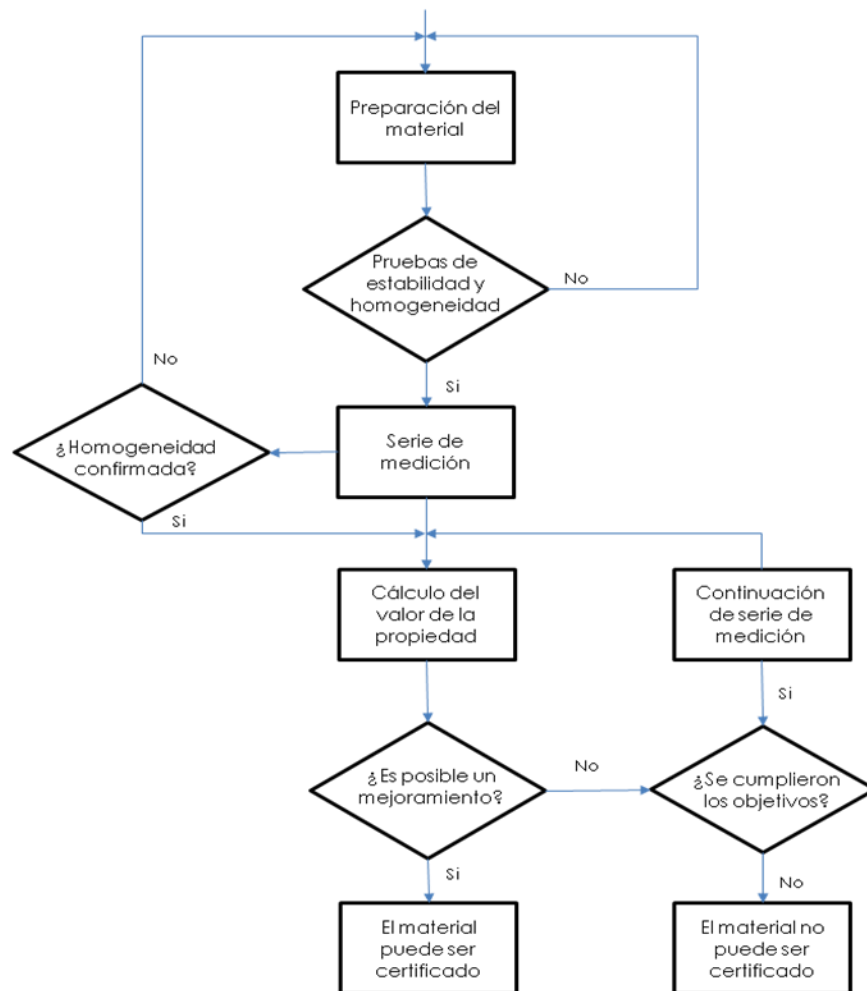


Figura 6. Diagrama de flujo para certificar un candidato a MRC

2.3.3.14 Validación de un método

La validación examina las características de desempeño de un método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse del mismo cuando se aplique a un tipo específico de muestras.

Primero hay que definir bien ¿Qué es la validación de un método?, si bien, es el proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden modificar esas características y hasta qué punto. ¿Qué analitos puede determinar el método, en qué matrices, en presencia de qué interferencias? ¿En esas condiciones, qué niveles de precisión y de exactitud pueden alcanzarse? (EURACHEM 2005).

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. El proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico particular; para llevar a cabo la validación de un método deben realizarse una serie de repeticiones del mismo, esto para garantizar que los resultados obtenidos sean repetibles y se tenga confiabilidad en los mismos (Guía de Trazabilidad e Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que emplean la Técnica de Gravimetría de Masa, 2005)

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico. Por ejemplo:

- Un nuevo método desarrollado para un problema específico
- Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema
- Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia

El alcance de la validación o la revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos al aplicar un método a diferentes laboratorios, instrumentación, operadores y circunstancias en las cuales el método va a ser utilizado. Siempre es apropiado algún grado de validación, aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados (EURACHEM: 2005).

Existen parámetros recomendados para la validación de un método de ensayo (prueba) que incluye mediciones analíticas; los parámetros de validación para el método de detección de los organismos genéticamente modificados son: Límite de detección, límite de cuantificación, intervalo lineal, intervalo de trabajo, repetibilidad, reproducibilidad, eficiencia, recuperación, coeficiente R^2 , incertidumbre.

2.3.3.15 Descripción de los parámetros de validación

Límite de cuantificación estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad, para ello se calcula con una serie de repeticiones con base en la desviación estándar y comprobar la repetibilidad donde se obtiene una medida de precisión (EURACHEM: 2005).

Criterio de aceptación, debe ser proporcionado en términos de la desviación estándar de la repetibilidad y debe ser $RSD_r \leq 27\%$ (JRC, 2010).

Límite de detección (LOD), es el valor mínimo detectable de la variable de estado definida" el cual en química se traduce como la "concentración neta mínima detectable (EURACHEM: 2005). El límite de cuantificación (LOQ) es la más baja concentración de analito que puede ser cuantificada en un ensayo con un nivel aceptado de exactitud (JRC 2010).

Criterio de aceptación: experimentalmente los métodos cuantitativos para detectar la presencia del analito en cuestión debe ser de al menos al 95% en el límite de detección para garantizar que sea menor o igual al 5% de los resultados de falsos negativos (JRC 2010).

Intervalo de trabajo e Intervalo lineal. Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar los intervalos de concentraciones del analitos o lo valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal; dentro de éste la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito o del valor de la propiedad relacionada. La extensión de este intervalo puede establecerse durante la evaluación del intervalo de trabajo (EURACHEM 2005).

Repetibilidad. Será expresada en términos de desviación estándar, σ_r o S_r , del cual es útil calcular el límite de repetibilidad "r", el cual permite al analista decidir

si es significativa la diferencia entre el análisis duplicado de una muestra determinado bajo condiciones de repetibilidad. Estas condiciones pueden ser (EURACHEM: 2005):

- El mismo procedimiento de medición
- El mismo observador
- El mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones
- El mismo lugar
- La repetición dentro de un periodo corto tiempo

Criterio de aceptación: la desviación estándar de la repetibilidad relativa debe ser inferior al 25% en todo el rango dinámico del método. Para estimar la repetibilidad debe ser obtenida de un número significativo de muestras, en la ISO 5723-3 (1994) dice que deben ser al menos 15 datos por ensayo (JRC 2010).

Reproducibilidad, el cual también se expresa en términos de desviación estándar, σ_r , o S_r , del cual es útil calcular el límite de reproducibilidad "R" y será evaluado por el analista en cuanto los resultados que obtendrá en variación de algún factor en su método notando que sus resultados no varíen siendo éstos reproducibles (EURACHEM: 2005). Para que un método sea reproducible pueden variarse cualquiera de las siguientes condiciones:

- El principio de medición
- El método de medición
- El observador
- El instrumento de medición
- El patrón de referencia
- El lugar
- Las condiciones de uso
- El tiempo

Criterio de aceptación: Para la desviación estándar de la reproducibilidad debe ser menor al 35% del objeto de concentración. Una desviación estándar de la

reproducibilidad < 50% es aceptable para concentraciones menores al 0.2% (JRC 2010).

Eficiencia de amplificación, es la tasa de amplificación que conduce a una pendiente teórica de -3.2 con una eficiencia del 100% en cada ciclo. La eficiencia de cada reacción puede ser calculada siguiendo la siguiente ecuación (JRC 2010):

$$eficiencia = \left[10^{\left(\frac{1}{pendiente} \right)} \right] - 1$$

Coefficiente R² es la correlación del coeficiente de una curva estándar obtenida de un análisis por una regresión lineal.

El criterio de aceptación para este parámetro es que el valor de R² debería ser ≥ 0.98 (JRC 2010).

Recuperación es la proporción de la cantidad de analito presente en la porción de la muestra y se obtienen datos a partir de cuanto analito se recupera, en general es aplicado a los materiales de referencia, y es expresado en % de recuperación (EURACHEM: 2005). Puede ser calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Valor medido}}{\text{Valor de referencia}} \times 100$$

Incertidumbre de la medición es un parámetro único (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición. Una estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado.

2.4 Justificación

Debido al uso de organismos genéticamente modificados en actividades como su liberación al medio ambiente, cultivo, importación y en particular, su utilización en alimentos o ingredientes alimentarios se ha desarrollado la manera de ser reglamentado por el gobierno mexicano, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas acciones pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola. Siendo así que, todo OGM liberado comercialmente debe ser previamente sometido a pruebas satisfactorias conforme a los estudios de riesgo, la evaluación de riesgo y reporte de resultados aplicables en la realización de actividades de liberación experimental (barreras químicas, físicas o biológicas) y de liberación en programa piloto (etapa previa a la liberación comercial).

Con la entrada en vigor del Protocolo de Cartagena de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados firmado por México y en el cual se refiere a la regulación del comercio y transparencia de productos transgénicos a través de las fronteras internacionales, es importante que México cuente con la capacidad y el fortalecimiento de recursos humanos y técnicos especializados para poder cumplir con los compromisos internacionales y nacionales en material de bioseguridad. En este aspecto, el Gobierno de México comparte con varias dependencias gubernamentales la necesidad de contar con técnicas certificadas en detección, cuantificación e identificación de OGMs.

De acuerdo a la invitación e iniciativa de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), el CENAM aceptó la propuesta de fungir como el laboratorio central de referencia y coordinar las acciones necesarias para el desarrollo y certificación de materiales de referencia así como organizar estudios colaborativos con los laboratorios sectoriales como el Instituto Nacional de Ecología Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (INE-CENICA), Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), La Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC), con el propósito de armonizar la metodología de medición, diseminar su trazabilidad a los laboratorios de

medición y monitoreo de cada sector, sentar las bases que den origen al desarrollo de las normas mexicanas en materia de medición.

Debido a que los MR son una condicionante para obtener los permisos de liberación al ambiente de maíces biotecnológicos; por su carácter de laboratorio nacional de metrología y por su experiencia internacional en el tema de bioanálisis, el CENAM fue propuesto por la CIBIOGEM como laboratorio de metrología de referencia para su red de laboratorios, con las funciones de proporcionar referencias metrológicas y desarrollar métodos de medición, con el fin de asegurar la calidad de las mediciones de los laboratorios.

2.5 OBJETIVOS

2.5.1 Objetivo general

Desarrollar y certificar MR para la determinación de un evento de modificación genética en polvo seco de maíz.

2.5.2 Objetivos específicos

- Realizar la estandarización del Material de Referencia.
- Desarrollar el material de referencia.
- Validar la metodología de medición usando PCR-RT.
- Llevar a cabo estudios de homogeneidad y estabilidad, necesarios para la certificación.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación del candidato a material de referencia

El diseño experimental consiste en la preparación de 6 lotes de Mon 863 candidatos a material de referencia con 100 botellas de 1g aproximadamente cada uno; con las siguientes concentraciones 0%, 1%, 5%, 10%, 11% y 100% del evento de modificación.

3.1.1 Tratamiento del envase a utilizar para el candidato a MRC

Se utilizaron alrededor de 600 frascos de 5 ml color ámbar, los cuales fueron lavados con agua tipo I y rociados con una solución de alcohol al 70%. Después de secos los frascos fueron cerrados con sus respectivas tapas, para su etiquetado y envasar el material de referencia. (Diagrama 4.1.1.Anexos)

3.1.2 Acondicionamiento de la materia prima

El candidato a material de referencia MON 0863 (control positivo: con modificación genética y negativo: sin modificación), se le redujo el tamaño de partícula con un molino de discos oscilantes de piedra de Agatha marca *FRITSCH pulverisette*.

Se hizo pasar la harina obtenida en un tamiz de malla 40 a 425 micrómetros para la obtener el tamaño de partícula deseado. Después el material fue secado en la estufa para reducir la humedad del material a 60°C durante 24hr aproximadamente.

La humedad fue determinada al día siguiente del secado en una termobalanza; la cual debe estar entre el 2% y 3% de humedad en ambos de materiales. (Ver diagrama de flujo 3.1.2)

3.1.3 Preparación de los 6 lotes candidatos a MRC

Después de que ambos materiales (positivo y negativo) cumplieron adecuadamente el % de humedad; se procedió a la preparación gravimétrica.

El material fue pesado en la balanza analítica SARTOURIOS mod. 2355, en las siguientes cantidades.

- a. 110gr del control positivo (maíz modificado)
- b. 110gr del control negativo (maíz no modificado)
- c. 108.9gr del control negativo y 1.1gr del control positivo (1% m/m)
- d. 104.5gr del control negativo y 5.5gr del control positivo (5% m/m)
- e. 99gr del control negativo y 11gr del control positivo (10% m/m)
- f. 89gr del control negativo y 11 gr del control positivo (11% m/m)

Los frascos se colocaron en un agitador rotatorio para homogenizar las mezclas; para su posterior envasado de los candidatos en una cámara de guantes en atmosfera de nitrógeno, con un micro-Rifling dispensando aproximadamente 1 gr de muestra en cada frasco.

Cada candidato a MRC tiene un folio de control con el que será identificado y el cual es especificado en la etiqueta del frasco; cómo se explica en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Tabla de cantidades de lotes producidos

Nivel	Concentración	No. De Identificación del MRC.	Cantidad producida por lote. (frascos)
1	0	DMR Ia	1-100
2	100%	DMR IIa	1-100
3	1%	DMR IIIa	1-100
4	5%	DMR IVa	1-100
5	10%	DMR Va	1-100
6	11%	DMR VIa	1-97

3.2 Estudios de homogeneidad y estabilidad

Para la realización del estudio de homogeneidad, se tomaron 10 frascos de los lotes del DMR 451 IIIa-Va y 9 del VIa para el respectivo análisis. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Los lotes Ia y IIa fueron usados como controles para la realización de la curva estándar del análisis; usando 2 frascos por análisis. La toma de muestras se realizó de manera aleatoria de tal manera que se cubriera todo el lote de cada material.

Para la homogeneidad los datos obtenidos por el equipo de PCR en tiempo real (PCR-rt), se evaluaron mediante un análisis de varianza por medio de una hoja de cálculo en Excel.

La estabilidad del material, es un proceso a largo plazo en donde se seguirá evaluando la vida útil del material candidato a MRC.

3.2.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN de las muestras se llevó a cabo mediante un kit comercial de Fast ID DNA Extracción Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Del ADN extraído se tomaron 3 muestras con sus duplicados para verificar cuanto ADN se obtuvo de la extracción. Para ello se procedió de la siguiente manera.

- a) El equipo fue calibrado con agua grado biología molecular a una longitud de onda de 260 y 280nm;
- b) De cada lote se juntaron las 2 extracciones de un mismo frasco, y se colocó en la celda.
- c) Se procedió a 3 lecturas por del lote IIIa al VIa.
- d) En el caso del lote Ia y IIa (control negativo y positivo), solo se realizó una lectura.

Considerando que el ADN de referencia es ADN bicatenario, con una $A_{260}=1$ a $50\mu\text{g/ml}$, en una cubeta cuyo paso de luz es de 10mm; con esta conversión se hacen los cálculos para conocer la concentración total de ADN obtenida. (Diagrama 3.2.1.)

3.2.2 Amplificación de ADN

Para la amplificación del ADN se prepara un coctel para las muestras a analizar por PCR-rt, el cual consiste de 5 µL de la mezcla Universal Master, 1 µL del forward primer MON863, 1 µL del reverse primer MON863 (Cuadro 4), 1 µL de la sonda MON863 y 1 µL de agua destilada grado biología molecular. En el caso del primer adh1863, se utilizaron los mismos volúmenes solo sustituyendo los primers y la sonda.

Cuadro 4. Primers y sondas utilizados.

Nombre	Oligonucleótido de DNA secuencia (5' to 3')
<i>Secuencias del OGM</i>	
MON863 primer F	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC
MON863 primer R	TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT
MON863 sonda	6-FAM-TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA-TAMRA
<i>secuencias del Gen de referencia</i>	
Adh1 primer F	CCAGCCTCATGGCCAAAG
Adh1 primer R	CCTTCTTGGCGGCTTATCTG
Adh1 sonda	6-FAM-CTTAGGGGCAGACTCCCGTGTCCCT-TAMRA

Fuente: Event-specific method for the quantitation of maize line MON 863 using real-time PCR, Protocolo. JRC.2005

Para la amplificación de las muestras a los 9µL del coctel se le adicionó 1µL del ADN (muestra problema a analizar) y se colocaron en una placa de 96 pocillos. Se empieza agregando del pocillo B1. (Ya que en los pocillos del A1 al A12, se ha visto que las muestras no llegan a amplificar). Ya lista la placa se somete al equipo de PCR-rt, con el siguiente programa de temperatura-tiempo: 50°C a 2 min, 95°C a 10 min, 45 ciclos 95°C a 15 s y 60°C; 1 min. (Ver diagrama 3.2.2)

Las muestras contenidas en la placa se anotan en un formato como este.

Fecha:						Descripción:						
Realizó:						Nombre del archivo:						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

3.3 Validación

El método a validar es la determinación de organismos genéticamente modificados en harina de maíz para el evento específico de MON 863 usando PCR en tiempo real.

3.3.1 Límite de cuantificación (LOQ)

Límite de cuantificación fue calculado mediante una curva de calibración calculada a partir de los diferentes niveles de concentración de los candidatos a material de referencia y los valores reportados por el equipo de PCR-rt (Ct), obteniendo así la curva que relaciona los pesos de cada nivel preparado y que es candidato a MRC.

También se hicieron análisis en el equipo de PCR-rt, con diluciones de ADN hechas con las extracción de ADN del control positivo a las mismas concentraciones con las que se prepararon los candidatos a material de referencia y a concentraciones más bajas con el fin de cuantificar cuantos números de copias se obtienen a una determinada concentración.

Las diluciones preparadas fueron a 11%, 10%, 5%, y 1%; las cuales fueron preparadas con ADN con evento de modificación MON 863, diluidas en ADN sin modificación y diluciones con 0.1%, 0.05% y 0.01% de MON 863, para el límite de cuantificación y detección.

La concentración y el número de copias en peso de cada nivel es obtenido a partir de las mediciones de absorbancia, siguiendo la relación a una $\lambda=260$ y una absorbancia de igual a 1, la concentración de ADN es de 50 $\mu\text{g/ml}$ en una celda cuyo paso de luz es de 10 mm, pero la celda usada es de 1mm, así que se ajustan para el paso de luz, según la teoría de Lambert-Beer, así que se divide 1mm de la celda usada entre 10 mm y se obtiene un factor de 0.1 para el ajuste de los datos obtenidos. De las lecturas de ADN del espectro se multiplicó por la concentración de ADN de 50 $\mu\text{g/ml}$ entre el paso de luz de 0.1, obteniendo así la concentración total de ADN presente en cada muestra. De la concentración total de ADN obtenida del control positivo, como se encuentra en ($\mu\text{g/ml}$) los μg se pasan a pg para poder obtener el número de copias totales contenidas en la muestra a través del valor de $1C=2.725$ pg, que corresponde al peso del genoma haploide de la secuencia del maíz (*Zea mays*) (Arumuganathan & Earle, 1991); obteniendo el número de copias totales por mL, a partir de esa concentración se calculan el número de copias en cada dilución preparada.

Se elabora una curva de calibración con el logaritmo de base 10 de la concentración preparada gravimétricamente, contra los valores de Ct reportados por el equipo de PCR-rt de la dilución de ADN; mediante esta curva se obtiene la concentración en peso para cada nivel de concentración. También se elabora una segunda curva con el logaritmo de base 10 del número de copias, y los valores de Ct, para reportar en número de copias en cada nivel.

Las diluciones realizadas a las más bajas concentraciones son para estimar hasta qué punto se puede cuantificar en peso y en número de copias y reportar un valor confiable.

3.3.2 Límite de detección (LOD)

Se obtuvo a través de las mediciones hechas con las concentraciones más bajas para corroborar con que sensibilidad el equipo puede detectar un valor de Ct, para ellos se usaron las diluciones preparadas al 0.1%, 0.05% y 0.01%.

3.3.3 Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad y reproducibilidad del método fueron evaluadas mediante los datos obtenidos del equipo de PCR-rt (Ct) de cada nivel. La fórmula para calcularlas es la siguiente:

$$\% R = z \sqrt{\frac{MS_{among}}{\bar{X}_{among}}} \times 100$$

Donde:

MS_{among} = Mínimos cuadrados entre botellas.

\bar{X}_{among} = Promedio entre botellas

El límite de la repetibilidad es calculado mediante la fórmula

$$R_{lim} = t_{\infty} \cdot \sqrt{2} \cdot S_r$$

Donde t_{∞} es el valor de Student en dos sentidos para $v = \infty$ a una confianza dada (para un nivel de confianza del 95% con $n=10$ $t= 1.812$, y para $n=9$, $t=1.833$) y S_r es la desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad.

El límite de la reproducibilidad es calculada de la misma manera que la el límite de la Repetibilidad mediante la misma fórmula. Ambos parámetros deben cumplir con el criterio de aceptación establecido.

3.3.4 Eficiencia

La eficiencia se estimó a través de la curva de calibración obtenida de los diferentes niveles de concentración preparados para cada lote contra los valores reportados por el equipo de PCR-RT, mediante la ecuación de la recta se obtiene

la pendiente el cual es útil para estimar al eficiencia mediante la siguiente formula, siempre y cuando cumpla con el criterio de aceptación.

$$\% \text{ de eficiencia} = \left[10^{\left(\frac{1}{\text{pendiente}} \right)} - 1 \right] * 100$$

Se calculó tanto para la curva de peso, como para la de número de copias.

3.3.5 Coeficiente R²

Es obtenido mediante las curvas de calibración, descritas en el punto 4.3.1 que se obtiene de la ecuación de la recta, de la regresión lineal.

Según el criterio de aceptación debe ser mayor a 0.98 para verificar la linealidad de la curva.

3.3.6 Intervalo lineal y de trabajo

Estos parámetros fue obtenido a partir de las concentraciones más bajas de contenido de de GM para su análisis, por medio de la curva de calibración.

3.3.7 Recuperación

El porcentaje de la recuperación fue estimado a partir del valor de referencia para obtener la concentración de ADN total extraído por medio de espectrofotometría a una ABS = 1 le corresponde 50 µg/ml de ADN total en una celda con un paso de luz de 10mm, como nuestra celda es de 1mm, la ABS correspondiente sería de 0.1, usando la siguiente formula.

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Valor medido}}{\text{Valor de referencia}} * 100$$

3.3.8 Incertidumbre

La incertidumbre se estimó mediante la ley de la propagación de incertidumbre, con un factor de cobertura k=2 correspondiente al 95% del nivel de confianza. El modelo matemático usado es el siguiente:

$$U = K^2 \sqrt{S_r^2 + S_{dif}^2}$$

Donde:

U: Incertidumbre expandida.

k= Factor de cobertura

S_r^2 = Desviación estándar de la Repetibilidad del método en %

S_{dif}^2 = Desviación estándar de la diferencia del valor real y el encontrado en %

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Resultados de la preparación de los 6 lotes candidatos a MRC

Se obtuvieron 6 lotes del material candidato a MRC con el evento de modificación MON 863, cada lote fue etiquetado con un número de identificación asignado por la coordinación del programa de MRTC (Materiales de referencia trazable y certificado).

Cada lote de material le corresponde una concentración del evento de modificación, en el cuadro 5 se ilustra las cantidades correspondientes que fueron pesadas para la preparación gravimétrica del material, así como la concentración porcentual de peso/peso calculada de acuerdo a los pesos reportados por la balanza.

Cuadro 5. Pesos de la preparación del DMR 451 IA-VIA

Muestra	No. asignación	P frasco (g)	P frasco + C Negativo(g)	P frasco + C Positivo(g)	Con. % (g/g)
C. Negativo	DMR 451 Ia	103.08951	213.08487		0
C. Positivo	DMR 451 IIa	105.26865		215.54719	100
NIVEL 1	DMR 451 IIIa	103.16835	212.0459	1.10486	1.00
NIVEL 2	DMR 451 IVa	103.61031	208.23947	5.51817	5.01
NIVEL 3	DMR 451 Va	103.55671	202.55835	11.02154	10.02
Nivel 4	DMR 451 VIa	94.64884	183.81495	11.04704	11.02

En el cuadro 6 se muestran las cantidades de frascos envasados por cada lote, de los cuales están enumerados a partir del 1, y para los estudios de homogeneidad y validación del método se usaron los números de frascos reportados en el mismo cuadro.

Cuadro 6. Número de frascos utilizados en los estudios de homogeneidad y validación

Lote	Cant. De frascos	Frascos analizados
DMR 451 Ia	1-100	010,004,091,021,079,086
DMR 451 Ila	1-100	015,080,004,098,085,028
DMR 451 IIIa	1-100	004, 021,036, 038,040, 061, 075, 084, 052, 014
DMR 451 IVa	1-100	004, 016, 021, 038, 045, 046, 055, 067, 069, 100
DMR 451 Va	1-100	007,015, 022, 030,042, 053, 062, 076, 082, 088
DMR 451 VIa	1-97	004, 019, 034, 042, 054, 060, 074, 085, 096

4.2 Estudios de homogeneidad

La homogeneidad nos permite conocer si el material es homogéneo en cuanto a las mezclas realizadas entre maíz modificado y no modificado en cada lote. Para la evaluación de este parámetro se hacen análisis de varianza por medio de la anova (anova es análisis de varianza) donde nos muestra si hay diferencia significativa entre las muestras tomadas de acuerdo a la ISO GUIDE 35. En el análisis de varianza las filas representan el estudio de la homogeneidad dentro de botellas y en las columnas el estudio entre botellas.

Para cada nivel de concentración se realizó un análisis con la anova; los datos que se usaron para este análisis fueron los valores de Ct obtenidos por el equipo de PCR-rt.

El resumen del análisis de varianza para cada nivel se muestra en el cuadro 7 de donde obtuvimos 5 materiales que son homogéneos tanto como dentro de las botellas como entre las botellas, es decir que el valor de F en las filas no supera el valor crítico para F, sucediendo lo mismo para las columnas. De acuerdo a la norma ISO 35, el estudio de homogeneidad se acepta siempre y cuando el valor de F calculada no sea mayor que el valor reportado para la F crítica el cual es obtenido del análisis de varianza de los datos de acuerdo a la distribución de los valores.

En el caso del material 451 la correspondiente al control negativo, se analizaron 6 muestras realizando la amplificación de los frascos 010, 004, 091, 021, 079 y 086,

por cuadruplicados, usando los primers y sondas específicos para el MON 863, donde los resultados fueron "Undetermined", que significa que no hubo amplificación para este evento de modificación, es decir, que el maíz amplificado no está modificado genéticamente al menos no para este evento en específico como es el MON 863, por lo tanto puede usarse como blanco.

Cuadro 7. Resumen de valores de F calculada vs F teórica para la aceptación o rechazo de homogeneidad en los candidatos a MR.

DMR	Entre	F calc.	F Tablas	Criterio	Homogeneidad
451 IIIa	Filas	0.61835934	2.25013148	Se Acepta	Sí
	Columnas	0.18635325	2.96035132		
451 IVa	Filas	1.5527	2.3550	Se Acepta	Sí
	Columnas	1.9048	3.00879		
451 Va	Filas	1.7030112	2.25013148	Se Acepta	Sí
	Columnas	1.23166308	2.96035132		
451 VIa	Filas	1.81104828	3.43810123	Se Acepta	Sí
	Columnas	0.4906838	5.31765506		
451 IIa	Filas	0.63349469	3.25916673	Se Acepta	Sí
	Columnas	1.79862342	3.49029482		

4.3 Resultados de los parámetros de validación

Límite de cuantificación (LOQ) y límite de detección (LOD).

El límite de cuantificación nos permite conocer las concentraciones en las que se puede encontrar al analito y puede ser cuantificado por el equipo de PCR-rt; en cambio el límite de detección nos revela cual es la sensibilidad del equipo es decir cuáles son las cantidades mínimas con las que puede ser detectado mostrando un valor no necesariamente que pueda ser cuantificado. Es importante delimitar estos parámetros dentro de una validación ya que marcan los márgenes en los que se puede trabajar el analito y servir como referencia en los posteriores análisis.

Para determinar estos parámetros se establecieron curvas de calibración, una para el peso (Figura 7) y otra para el número de copias (Figura 8)

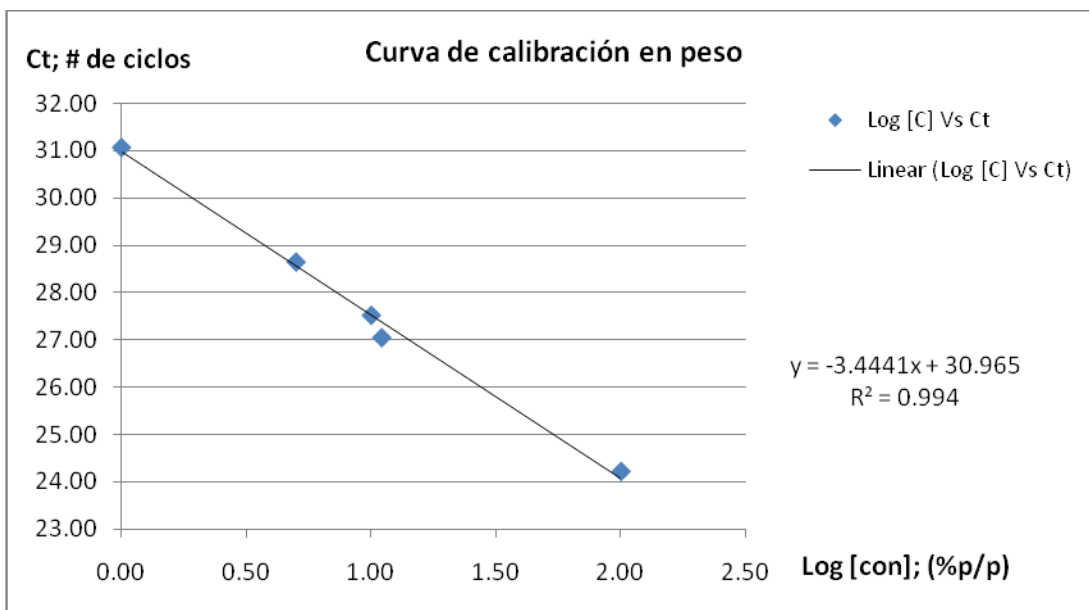


Figura 7. Curva de calibración, del logaritmo de la concentración en peso, contra los valores reportados por el equipo de PCR-rt (Ct).

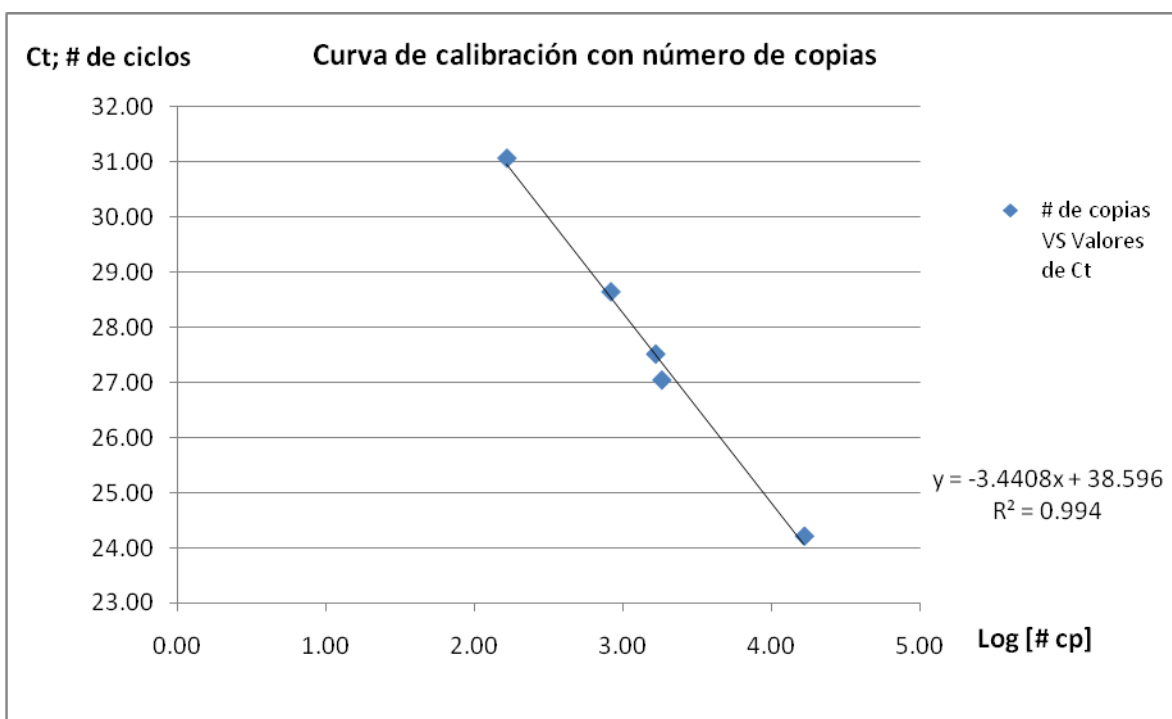


Figura 8. Curva de calibración, del logaritmo del número de copias, contra los valores reportados por el equipo de PCR-rt (Ct).

De acuerdo a las curvas de calibración establecidas (Figuras 7 y 8) con su respectiva ecuación, se interpolaron las diluciones preparadas a 0.01, 0.05 y 0.1% de ADN para estimar la concentración analítica encontrada en peso y en número de copias, los resultados se presentan en la tabla 8.

Cuadro 8. Resultados de la interpolación de las diluciones.

Dilución (% peso)	Conc. Obtenidas (% peso)	Promedio (% en peso)	*CV (%)
0.01	0.01		
0.01	0.01	0.01	1.8
0.05	0.08		
0.05	0.12	0.10	22.1
0.1	0.10		
0.1	0.09	0.09	4.8

*CV: coeficiente de variación, dado en porcentaje.

Como se observa en el cuadro 8, el límite de cuantificación se encuentra a partir de la concentración de 0.1% ya que para la concentración 0.05% el coeficiente de variación es muy grande y la concentración encontrada tiende a ser igual a la del 0.1% y es en este punto donde se observa que el coeficiente de variación es mucho menor correspondiente al 4.8% que es menor del 25% del criterio de aceptación.

Para el límite de detección se estima que se encuentra en 0.01% ya que el equipo aun reporta un valor de Ct con el cual se pudo estimar la concentración analítica.

4.4 Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad del método nos indica la confiabilidad de los datos de una serie de muestras bajo las mismas condiciones de trabajo, en cambio la reproducibilidad nos muestra la confiabilidad de los datos variando alguna condición, este puede ser el tiempo, el método, el instrumento de trabajo, etc.

La repetibilidad y reproducibilidad del método se calculó con la fórmula ya descrita, los datos fueron tomados de cada análisis de varianza correspondiente a cada lote, los resultados se presentan en el cuadro 9.

Cuadro 9. Repetibilidad y reproducibilidad del método

DMR 451	*MS_{bb}	Promedio entre grupos	**R&R del método (%)
Ila	0,096170774	24,0724145	1,3
IIla	0,031232719	31,19692673	0,6
IVa	0,324074205	28,66453854	2,0
Va	0,900817992	29,48739008	3,2
VIa	0,140446378	28,62954286	1,3

*MS_{bb}, es el mínimo cuadrado entre botellas o grupos del análisis de varianza.

*R&R, es la repetibilidad y reproducibilidad del método.

El valor de R&R se considera el mismo para la reproducibilidad y repetibilidad ya que para la reproducibilidad la variable que cambió fue el tiempo pero en condiciones de repetibilidad se consideraron los mismos datos ya que se efectuaron bajo las mismas condiciones y el cálculo es el mismo.

La repetibilidad como el nombre del parámetro nos dice que los datos entre uno y otra o en un grupo de muestras debe ser repetible es decir que deben de ser similares para un mismo punto en la medición, para la reproducibilidad sucede lo mismo pero la diferencia entre los datos puede ampliarse ya que uno de los factores de medición cambiara, como bien puede ser el método de medición, un periodo de tiempo, o el instrumento de medición.

Para cada lote se cumple el criterio de aceptación que es de 25% para la repetibilidad y del 35% para la reproducibilidad.

El límite de la repetibilidad y la reproducibilidad para cada lote se reporta en el cuadro 10, estos valores fueron calculados para referencia ya que aun no se cuenta con un valor de referencia comparable y es una propuesta de cálculo que posteriormente será considerado dentro de la validación.

Cuadro 10. Límites de la repetibilidad y reproducibilidad del método.

DMR 451	*Sr (%)	n	**t	% R_{lim}
Ila	1,3	10	1.821462	3.34871714
Illa	0,6	9	1.833114	1.55544881
IVa	2,0	10	1.821462	5.15187253
Va	3,2	9	1.833114	8.29572698
VIa	1,3	5	2.015049	3.70462251

*Sr; Repetibilidad del método

**t; valor de tablas de la t de Student con un nivel del 95% de confianza.

4.5 Eficiencia

La eficiencia se traduce como la confiabilidad del método y comprobar que tan efectivos es para la valoración del método, es por ello que se toma en cuenta a la pendiente de la recta de la curva de calibración la cual se obtiene automáticamente de la hoja de cálculo.

Las curvas de calibración fueron graficadas con el logaritmo de la concentración y el promedio del Ct; en el caso de la grafica del número de copias se hizo con el logaritmo del número de copias contra el promedio del Ct,

La eficiencia fue calculada mediante la ecuación de la recta obtenida de los puntos graficados que se muestran en la cuadro 11:

Cuadro 11. Valores de Ct (números de ciclos) obtenidos de las concentraciones de cada lote

Conc (%)	Log(Conc)	# de Cp.	Log(cp.)	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Promedio de Ct
1	0.00	78	2.22	30.779694	31.256182	31.14614	31.060672
5	0.70	126	2.92	28.638407	28.566216	28.72261	28.642411
10	1.00	376	3.22	27.566736	27.463873	27.515804	27.515471
11	1.04	543	3.26	27.25914	27.405243	26.471483	27.0452887
100	2.00	16575	4.22	24.4956635	23.873217	24.2892275	24.2193693

Los resultados reportados para la eficiencia se encuentran en el cuadro 12 para cada curva de calibración las cuales cumplen con los criterios de aceptación mostrando que no existe diferencia significativa entre estas, ya que los datos reportados en la tabla así lo indican.

Cuadro 12. Eficiencia del método.

	Pendiente de la recta	% de eficiencia
C.C. de la concentración	-3.4441029	95.1422785
C.C. del número de copias	-3.44082945	95.2664356

4.6 Coeficiente R²

Este parámetro es considerado en la validación de organismos genéticamente modificados ya que hace una relación lineal entre las dos variables, cuando el valor se acerca a 1 la recta es más lineal; el criterio de aceptación para este parámetro es el valor de R² debe ser mayor a 0.98.

Este parámetro se obtiene de la linealidad de la recta que se calcula mediante la hoja de cálculo, como se tienen 2 curvas de calibración, los resultados para cada curva son los siguientes:

	R²
C.C. de la concentración	0.99404963
C.C. del número de copias	0.99404108

Para ambos casos el coeficiente cumple satisfactoriamente el criterio de aceptación mayor a 0.98, ambas graficas tienen linealidad entre sus datos, demostrando que hay precisión entre los resultados obtenidos en el análisis.

4.7 Intervalo lineal e Intervalo de trabajo

El intervalo lineal contempla los valores desde el límite de detección hasta la máxima concentración en la que el método se comporta linealmente.

Con este parámetro se demuestra que las concentraciones utilizadas para realizar la curva de calibración con la que se trabajó a lo largo de la validación tiene un comportamiento lineal (figura 9 y cuadro 13).

El intervalo lineal comprende desde la concentración de 0.01% obtenida de la dilución hasta el 100% del ADN con evento de modificación MON863

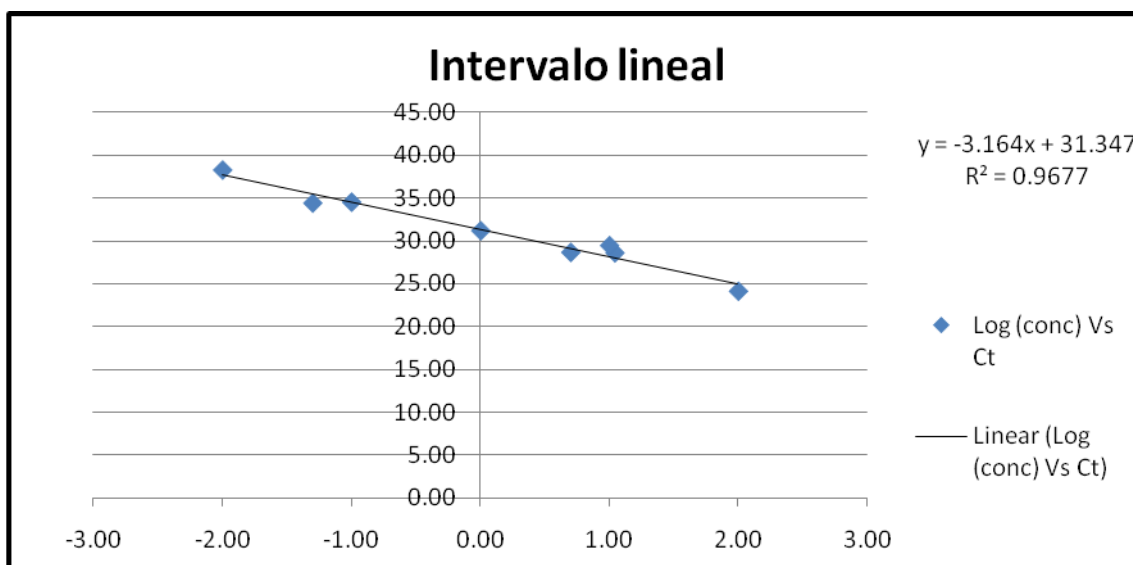


Figura 9. Intervalo lineal

El intervalo de trabajo es menor al intervalo lineal ya que este lo contiene, es decir se refiere a los valores con los que se trabajaron las muestras para este caso es cada punto de concentración de los candidatos a material de referencia el cual se limita a partir del 1% al 11% y con las que se trabajaron las curvas de calibración. No se toman en cuenta las concentraciones inferiores al 1% ya que esas solo fueron hechas con diluciones y no se preparó un lote a esa concentración.

Cada intervalo es necesario determinarlo ya que para posteriores análisis si se desea realizarlos en distintas concentraciones dentro del intervalo lineal se garantiza el comportamiento de lineal, si los resultados no tuvieran ese comportamiento se debería a que las concentraciones no corresponden a cada lote del material con las que fueron preparadas o hubo problemas a la hora de la medición.

Cuadro 13. Valores del intervalo lineal con los cuales fue graficado.

Con %	Log (Conc)	Ct
100	2.00	24.15
11	1.04	28.63
10	1.00	29.48
5	0.70	28.68
1.002	0.00	31.21
0.1	-1	34.54
0.05	-1.3	34.42
0.01	-2	38.27

4.8 Recuperación

El porcentaje de recuperación se refiere la eficiencia de extracción del método; para este caso las lecturas de absorbancia nos sirvieron para calcular la concentración del ADN en $\mu\text{g/ml}$ y así estimar el porcentaje de recuperación (cuadro 14). Los resultados que se obtuvieron fueron muy variables para cada lote esto quiere decir que no se obtuvo la misma cantidad de ADN, esto pudo deberse a que al momento de realizar las extracciones no se tuvieron los cuidados necesarios con los tiempos de incubación, realizar correctamente los lavados de alcohol o un mal manejo de las pipetas analíticas.

Cuadro 14. Resultados del porcentaje de recuperación,

DMR	Promedio de la C total del ADN $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
Ila	42.60	85.21
IIla	30.78	61.55
IVa	30	60.00
Va	12	23.55
VIa	25	49.28

El porcentaje de recuperación se ve afectado por la extracción de ADN, en el cuadro 14 se observa que la mayor recuperación se obtiene en el lote Ila el cual corresponde a la concentración del 100% del ADN en modificación, sin embargo este porcentaje nos sirve para hacer los ajustes necesarios en cuanto a los valores que reporta el equipo del PCR-rt que pueden variar.

4.9 Incertidumbre

Para la determinación de la incertidumbre de la medición es necesario englobar todos los errores que se cometieron a la hora de efectuar el análisis para ello el cual se ve reflejado en él % del coeficiente de variación (%CV) que corresponde a la repetibilidad y reproducibilidad del método al igual que la desviación estándar.

La incertidumbre combinada calculada para cada lote nos revela un nivel de confianza del 68% es por ello que se requiere de un factor de cobertura, en este caso es $k=2$ para un nivel de confianza del 95% de esta manera aunque la incertidumbre aumenta, se vuelve más certera para dar un resultado confiable, es decir que la concentración que se está calculando es más precisa con esta incertidumbre y se acerca más al valor real de la concentración.

En el cuadro 15, en la columna marcada con $C\pm$ corresponde a la incertidumbre expandida en términos de concentración porcentual la cual de ser la real es colocada en el documento que avala al material como certificado por ejemplo del lote IIIa la concentración encontrada real fue de 1.2 ± 0.5 , respectivamente sucedería lo mismo para cada lote.

Cuadro 15. Valores encontrados para la incertidumbre en función de la concentración

Tabla de valores encontrados para la incertidumbre en función de la concentración							
DMR	\bar{X} de C (analítica %)	% CV	S_r	S_{dif}	*U_c %	U_{exp}(K=2) %	C ±
IIIa	1.2	9.4	0.60	20.2	20.2	40.5	0.5
IVa	6.2	11.6	2.0	24.2	24.3	48.6	3.0
Va	10.8	18.2	3.2	8.3	8.9	17.8	1.9
VIa	9.4	15.8	1.3	14.3	14.4	28.8	2.7

Los valores que se encuentran en el %CV, S_r y S_{dif} son colocados como referencia para el cálculo de la incertidumbre combinada y la expandida. El cuadro 16 muestra las mismas columnas que en el cuadro 15 pero en términos de números de copias, ya que en el certificado del material se especificara en ambos términos; por ejemplo para el lote IIIa el número de copias encontradas fueron de 198±78.

Cuadro 16. Valores encontrados para la incertidumbre en función del número de copias.

Tabla de valores encontrados para la incertidumbre en función del número de copias							
DMR	\bar{X} del Núm. de Cp.	%CV	S_r	S_{dif}	*U_c %	U_{exp}(K=2) %	Cp. ±
IIIa	198	9.4	0.6	19.7	19.7	39.5	78
IVa	1027	11.6	2.0	23.9	24.0	47.9	492
Va	1789	18.2	3.2	7.9	8.6	17.1	306
VIa	1558	15.8	1.3	14.6	14.6	29.3	456

*U_c, corresponde a la incertidumbre combinada, que multiplicada por el factor de k, nos da la incertidumbre expandida de U_{exp}.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Se desarrollaron y estandarizaron 6 candidatos a material de referencia aptos para ser certificados los cuales corresponden al 451 en series I, II, III, IV, V y VI. De acuerdo con los resultados obtenidos a través del análisis de varianza se concluye que son homogéneos y se pueden certificar ya que cumplen satisfactoriamente los criterios de aceptación para cada parámetro de la validación del método.

Para la validación del método cubrieron parámetros del método para los que se contaba con un valor de referencia como lo son la Repetibilidad, Reproducibilidad, Eficiencia y Coeficiente R^2 que fueron cumplidos satisfactoriamente; en el caso de los Límites de Cuantificación y Detección, los intervalos lineal y de trabajo, así como la recuperación, son datos únicos que no se comparan con alguno de referencia si no sirven para dar información acerca de las características con las que se comporta el material en el método.

Debido a que la certificación se llevara a cabo de acuerdo a un estudio colaborativo con una red de organismos calificados de acuerdo a la ISO GUIDE 35, la incertidumbre presentada en este trabajo corresponde a la obtenida por el laboratorio central CENAM, que será comparable y vinculada posteriormente con la de los demás laboratorios participantes en el estudio colaborativo.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- Agrios GN (2005). Plant Pathology. USA. Elsevier Academic Press. Manual
- Aguilar M, Becerril S, Bonilla L (2004). Guía Técnica sobre la trazabilidad Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que emplean la Técnica de Gravimetría de Masa. México: CENAM.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991). Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. Plant Molecular Biology Reporter 9-3.
- Benachour N, Gulles ES (2008). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placentals cells. Chemicals Research in Toxicology.
- Benbrook C (2009): Impacts of genetically engineered crops on pesticide use: The first thirteen years, The Organic Center. Recuperado en mayo 21,2010, proviene de http://www.organic-center.org/reportfiles/13Years20091126_FullReport.pdf
- Cerdeiraa AL & Dukeb SO (2006). The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops. Journal of environmental quality 35:1633-1658.
- Conner AJ, Travis R (2003). The release of genetically modified crops into the environment. Plant Journal 33-1:19-46.
- Corona B, Uffo O, Martínez S (2006). Detección de organismos genéticamente modificados en la cadena alimenticia. Revista de Salud Animal 28-2: 69-78.
- Eede G, Aarts H, Buhk HJ, Corthier G, Flint HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T. (2004). The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM). Food and Chemical Toxicology 42-7: 1127-1156, Recuperado en Febrero, 18 de 2010, de <http://www.botanischergarten.ch/Bt/vandenEede-Relevance-Transfer-2004.pdf>.
- EURACHEM (2005). The fitness for purpose of Analytical Methods. Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
- European Commission, Joint Research Centre (2005). Event-specific method for the quantitation of maize line MON 863 using real-time PCR. Recuperado en Mayo, 21 de 2010 de <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON863-WEB-Protocol-Validation.pdf>

- European Commission, Joint Research Centre (2010). Validation report maize MON 88017. Recuperado en Mayo, 21 de 2010, proviene de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON88017_val_report_correctedVersion1.pdf
- FAO (2001). Los organismos modificados genéticamente, los consumidores, la inocuidad de los alimentos y el medio ambiente. Recuperado en mayo 25 de 2010, proviene de <http://www.fao.org/docrep/003/x9602s/x9602s00.htm>
- Griffiths JF (2002). Genética. España: McGraw-Hill Interamericana
- González AF (2006). Ensayos médicos sobre genética: La Genética Molecular en la medicina ecuatoriana. Ecuador: Noción.
- Guía Eurachem/CITAC (2000). Cuantificación de la Incertidumbre en la Medición Analítica. Reino Unido: LGC.
- GUM (1995). Guía para la expresión de incertidumbre en medición. Reino Unido: ISO
- Harris DC (2001). Análisis químico cuantitativo. España: Revertè
- ILAC-G9 (2005). Guía para la selección y uso de materiales de referencia (traducción). Australia: IAAC (Inter American accreditation cooperation).
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2006). NMX-CH-160-IMNC-2006. Materiales de Referencia-Términos y definiciones. ISO Guide 30.
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2006). NMX-CH-161-IMNC-2006. Materiales de Referencia-Contenido de certificados y etiquetas. ISO Guide 31.
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2006). NMX-CH-163-IMNC-2006. Materiales de referencia-Uso de los materiales de referencia certificados. ISO Guide 33.
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2006). NMX-CH-164-IMNC-2006. Materiales de Referencia-Requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia. ISO Guide 34.
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2008). NMX-CH-165-IMNC-2008. Materiales de Referencia- Principios generales y estadísticos para certificación- ISO Guide 35.
- Lizcano LF (2005). Fundamentos moleculares en medicina. Colombia: Manual moderno.

- Mitch ML (1998). Phytoextraction of toxic metals. *Journal of Environmental Quality*: 3-1.
- Morse S, Bennett R, Ismael Y (2004). Why Bt cotton pays for small-scale producers in South Africa. *Nature Biotechnology*: 22-4: 379–380, Recuperado en mayo, 28, 2010, proviene de http://www.nature.com/login/scidev_login.taf?ref=/nbt/journal/v22/n4/full/nbt0404-379b.html.
- Puerta B, Concepción J, Ureña CP (2005). *Prácticas de Biología molecular*. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Querci M, Jermini M, Van Den EG (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Italia: Comunidades europeas.
- Schnepfm E (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 32-3.
- Torres TG, Baca BE (1995). *Reacción en cadena de la polimerasa*. Centro de Investigaciones Microbiológicas, Universidad Autónoma de Puebla: 23-3.
- Xiao-Ming L (2007). Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clinical and Vaccine Immunology*: 14-4.
- Zavala CJ (2005). *Manual de técnicas Básicas de Biología molecular*. México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.

CAPITULO VII

ANEXOS

ANEXO A. GLOSARIO

Caracterización: Para un material de referencia, es la determinación de uno o más valores de las propiedades físicas, químicas, biológicas o tecnológicas que son relevantes para su uso final previsto.

Certificado de un material de referencia: Documento que acompaña a un material de referencia certificado, donde se declaran uno o varios valores de la propiedad y sus incertidumbres y confirma que se llevaron a cabo los procedimientos necesarios para asegurar su validez y su trazabilidad.

Estabilidad: Capacidad de un material de referencia, cuando se almacena bajo condiciones especificadas, para mantener un valor de una propiedad declarado dentro de los límites especificados por un periodo de tiempo especificado.

Homogeneidad: Condición de tener una estructura o una composición uniforme con respecto a una o más propiedades especificadas. Se dice que un material de referencia es homogéneo con respecto a una propiedad especificada si el valor de la propiedad, determinado por ensayos en muestras de tamaño especificado, se encuentra dentro de los límites de incertidumbre definidos, aunque las muestras sean tomadas de diferentes unidades de abastecimiento (botellas, paquetes, etc.) o de una sola unidad de abastecimiento.

Incertidumbre: Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando.

Nota: El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo dado de ella), o la mitad de un intervalo de confianza. La incertidumbre de la medición comprende en general muchos componentes.

Algunos de estos componentes pueden evaluarse a partir de la distribución estadística de los resultados de una serie de mediciones y pueden caracterizarse por medio de desviaciones estándar experimentales. Los otros componentes, que también pueden ser caracterizados por desviaciones estándar, son evaluados a partir de distribuciones de probabilidad supuestas basadas en la experiencia u otra información. Se entiende que el resultado de la medición es la mejor estimación del valor del mensurando y que todos los componentes de la incertidumbre, incluyendo aquéllos provenientes de efectos sistemáticos, tales como los componentes asociados con correcciones y patrones de referencia, contribuyen a la dispersión.

Informe de certificación: Documento que proporciona información detallada, complementaria a la contenida en un certificado, por ejemplo, la preparación de un material, los métodos de medición, los factores que afectan la exactitud, el tratamiento estadístico de los resultados y la forma en la cual se estableció la trazabilidad

Intervalo de trabajo: Conjunto de valores del mensurando para los cuales se pretende que el error de un instrumento de medición caiga dentro de límites especificados.

Límite de cuantificación: La menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (Repetibilidad) y una exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba. Los límites de cuantificación son característicos de desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición química para cuantificar adecuadamente un analito.

Límite de Repetibilidad (r): Valor menor o igual a la diferencia absoluta entre dos resultados de pruebas individuales obtenidos bajo condiciones de Repetibilidad la cual se espera tenga una probabilidad del 95%.

Límite de la Reproducibilidad (R): Condiciones para las cuales los resultados de ensayo son obtenidos con el mismo método sobre un material idéntico, en laboratorios diferentes por operadores diferentes que utilizan equipo diferente.

Linealidad: Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

Nota: Se deduce que el intervalo lineal es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual los resultados de prueba obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito.

Lote (de producción): Una cantidad definida de un producto elaborado por un proveedor de una sola vez bajo condiciones que se presumen son uniformes.

Material de referencia (MR): Material o sustancia para el cual el valor de una o de varias de sus propiedades es lo suficientemente homogéneo y bien establecido para ser usado en la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición o para la asignación de valores a los materiales.

Material de referencia certificado (MRC): Material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.

Mensurando: Magnitud particular sujeta a medición.

Nota: La especificación de un mensurando puede requerir indicaciones acerca de magnitudes tales como tiempo, temperatura y presión.

Muestra: Cantidad representativa de un material extraído de un lote de un material de referencia.

Organismo de certificación: Organismo técnicamente competente (organización o compañía, pública o privada) que expide un certificado de un material de referencia.

Recuperación: La fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada o adicionada) previa al análisis que es determinada efectivamente por el método.

Repetibilidad: Precisión en condiciones de Repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.

Reproducibilidad: Precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos.

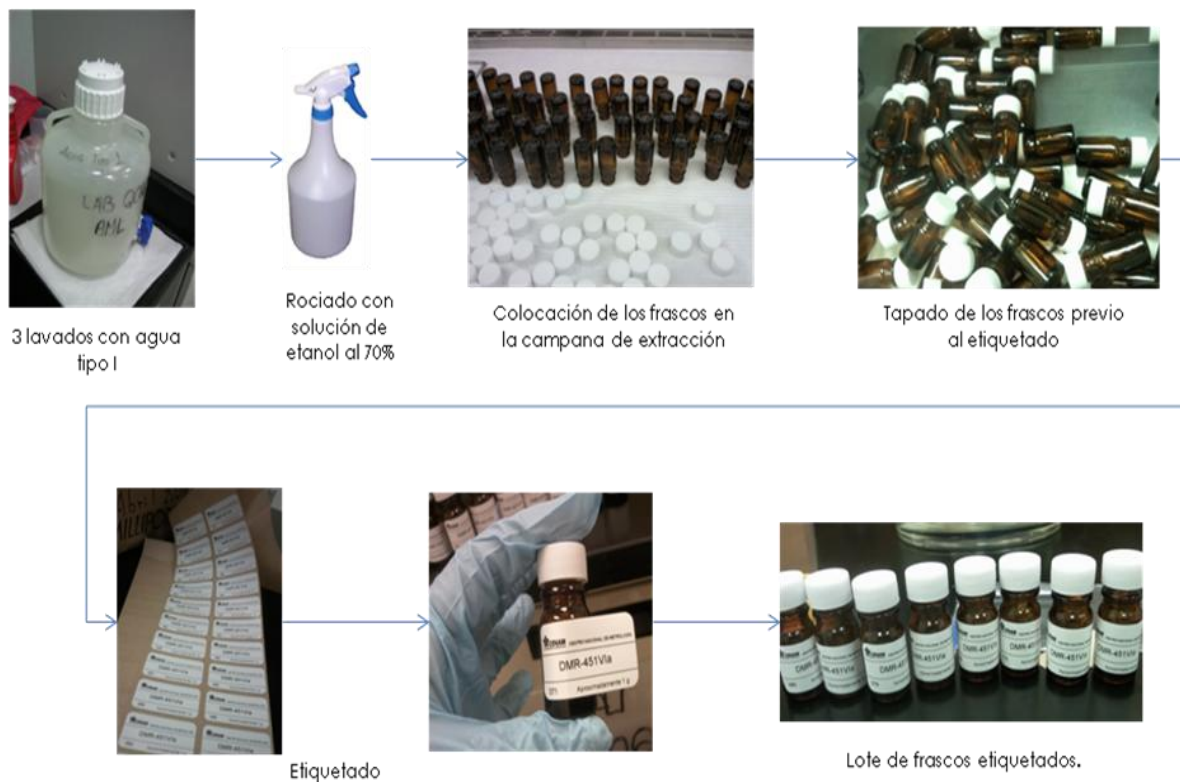
Nota: Una definición válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen las condiciones de prueba modificadas. La reproducibilidad puede expresarse cuantitativamente en términos de la dispersión de los resultados.

Trazabilidad: Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por medio de la cual éstos pueden ser relacionados, con una incertidumbre determinada, a referencias establecidas, generalmente patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones.

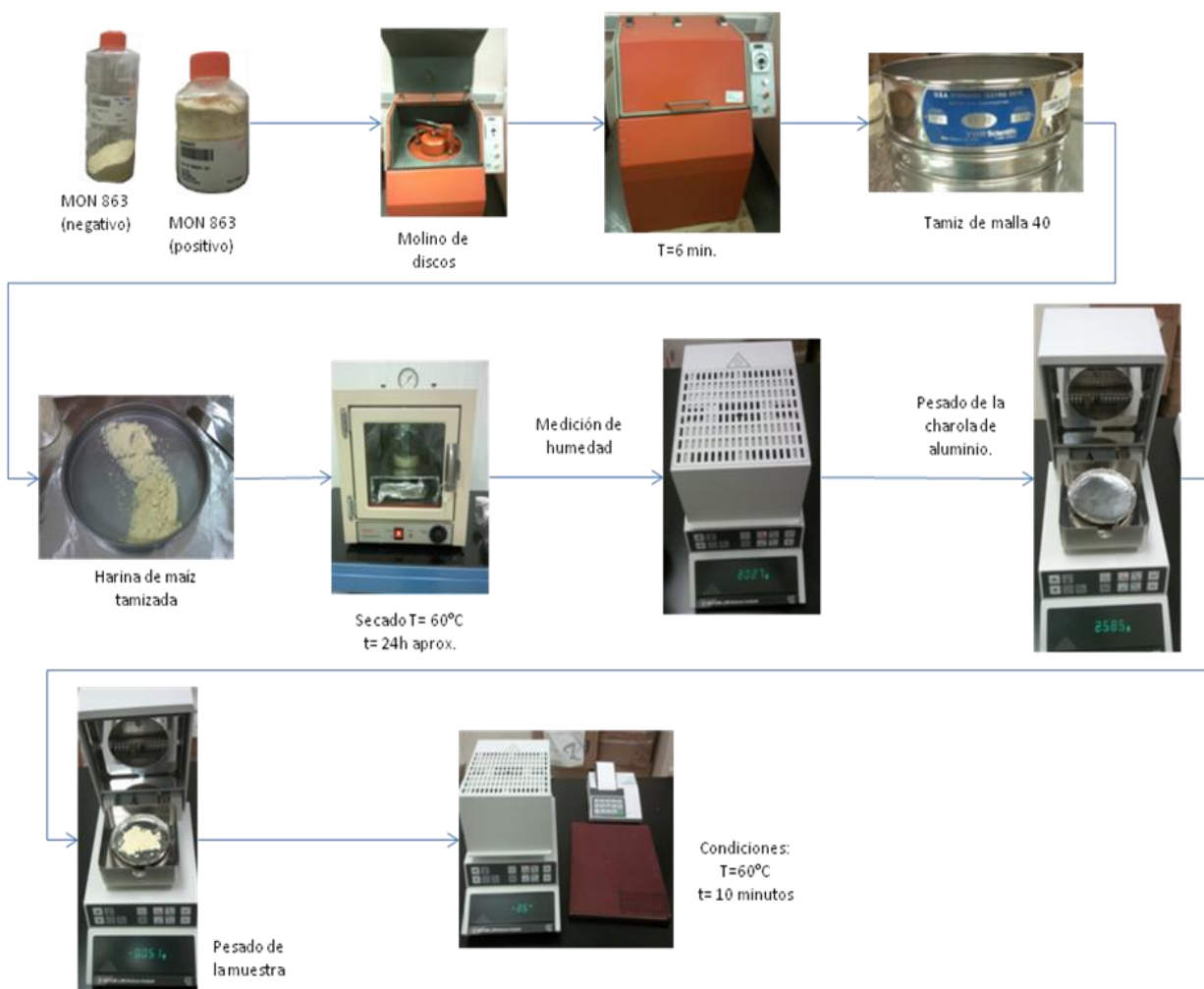
Validación: Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

ANEXO B. DIAGRAMAS DE FLUJO

3.1.1. Diagrama de tratamiento de los envases.



3.1.2. Diagrama de flujo. Acondicionamiento de la materia prima.



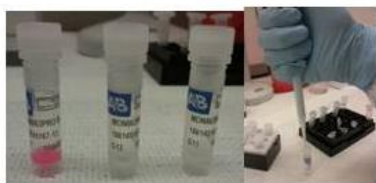
3.1.3. Diagrama de Preparación de los lotes candidatos a MRC.



3.2.1. Extracción de ADN



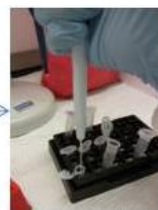
3.2.2. Amplificación de ADN



Preparación de la sondas y de los primers



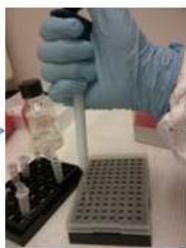
Preparación del coctel mix



Se toman 9µl del coctel mix



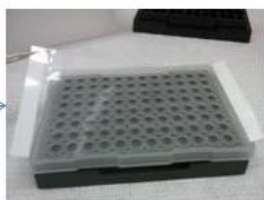
Se colocan en el pocillo



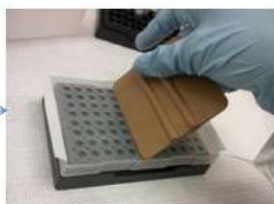
Se toma 1µl de muestra problema y se coloca en el pocillo.

Fecha:	Descripción:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													

Conforme se van colocando las muestras son anotadas en un formato de acuerdo a la placa de 96 pocillos.



Al finalizar la adición de muestras la placa se sella con un papel adherible



Se trata de pegar bien el papel para que no sea desprendido por el calentamiento.



La placa es colocada dentro del aparato de PCR-rt, para su amplificación.

Anexo C. Cálculos de las concentraciones obtenidas a partir de las lecturas de absorbancia.

La fórmula utilizada es:
$$C = \frac{\lambda_{260} * 50 \left(\frac{\mu g}{mL}\right)}{0.1}$$

DMR IIa	$\lambda=260nm$	C $\mu g/mL$
4	0.090	45.17
80	0.080	39.75
98	0.086	43
15	0.085	42.5
Promedio=		42.60

DMR IVa	$\lambda=260nm$	C $\mu g/mL$
16	0.062	30.75
100	0.044	22.00
46	0.041	20.50
38	0.058	29.00
45	0.052	26.00
4	0.060	30.00
55	0.058	29.00
21	0.078	39.00
67	0.078	39.00
69	0.070	34.75
Promedio=		30.00

DMR IIIa	$\lambda=260nm$	C $\mu g/mL$
75	0.063	31.50
38	0.051	25.50
84	0.057	28.25
40	0.067	33.50
14	0.052	26.00
52	0.059	29.50
4	0.056	27.75
36	0.066	33.00
21	0.062	30.75
61	0.084	42.00
Promedio=		30.78

DMR VIa	$\lambda=260nm$	C $\mu g/mL$
60	0.04233333	21.17
74	0.029	14.50
4	0.05066667	25.33
19	0.058	29.00
85	0.036	18.00
96	0.0575	28.75
54	0.037	18.50
34	0.06	30.00
42	0.073	36.50
Promedio=		24.64

DMR Va	$\lambda=260\text{nm}$	C $\mu\text{g/mL}$
15	0.01	6.50
30	0.02	8.50
53	0.02	12.00
82	0.03	16.25
42	0.02	12.25
88	0.02	12.00
22	0.03	15.50
62	0.02	10.00
7	0.02	11.75
76	0.03	13.00
Promedio=		11.78

Anexo D. Concentraciones analíticas de cada lote encontradas mediante las curvas de calibración.

DMR 451 IIIa		
No. Muestra	Con. Encontrada (%)	Conc. Corregida (%)
14	0.8	1.4
21	0.9	1.3
36	0.9	1.2
38	0.7	1.2
4	0.8	1.3
40	1.0	1.3
52	0.8	1.1
61	1.0	1.0
75	0.8	1.1
84	0.8	1.2
Promedio		1.2

DMR 451 Va		
No. Muestra	Con. Encontrada (%)	Conc. Corregida (%)
15	1.9	12.8
22	4.4	12.1
42	2.3	8.0
53	3.1	11.1
62	2.0	8.7
7	3.6	12.9
82	3.9	10.2
88	2.5	8.9
Promedio		10.6

DMR 451 VIa		
No. Muestra	Con. Encontrada (%)	Conc. Corregida (%)
19	5.45417944	8.01278517
34	7.71765131	10.9601368
42	7.91471041	9.23834634
54	3.3394272	11.8561261
60	4.98459618	10.0329716
74	3.22544636	9.47706582
85	3.46779767	8.20792388
96	5.12302071	7.59172272
Promedio		9.4

DMR 451 IVa		
No. Muestra	Con. Encontrada (%)	Conc. Corregida (%)
16	5.1	7.0
21	6.0	6.6
38	4.7	6.9
4	4.6	6.5
45	3.8	6.3
46	3.4	4.8
67	5.4	5.9
69	4.7	5.7
Promedio		6.2

Anexo E. Formato de las etiquetas del material de referencia.

 CENAM CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA	
DMR-451 Ia	
001	Aproximadamente 1g

 CENAM CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA	
DMR-451 IIa	
001	Aproximadamente 1g

 CENAM CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA	
DMR-451 IIIa	
001	Aproximadamente 1g



CENAM
CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA

CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA

DMR-451 IVa

001

Aproximadamente 1g



CENAM
CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA

CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA

DMR-451 Va

001

Aproximadamente 1g



CENAM
CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA

CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA

DMR-451 VIa

001

Aproximadamente 1g