

Fuente : Diario Oficial de la Federación

Fecha de Publicación: 28 de Febrero de 1995

NOM-011-ZOO-1994

NORMA OFICIAL MEXICANA, DETERMINACION DE SULFONAMIDAS EN HIGADO Y MUSCULO DE BOVINOS, OVINOS, EQUINOS, PORCINOS Y AVES POR CROMATOGRAFIA CAPA FINA-DENSITOMETRIA.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, por conducto de la Dirección General Jurídica, con fundamento en los artículos 1o., 3o., 4o. fracción III, 12, 13, 21, 22, 31 y 32 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 10 fracción V del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, y

CONSIDERANDO

Que la determinación de sulfonamidas en hígado y músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves por cromatografía capa fina-densitometría, se establece con el fin de asegurar a los consumidores el suministro de alimentos que no rebasen los límites máximos permisibles de este tipo de productos.

Que el consumo de alimentos contaminados de origen animal implica diversos riesgos para la salud humana que dependen de la presencia de los residuos nocivos.

Que entre los beneficios que reporta el hecho de aplicar las pruebas que permiten la detección de este tipo de residuos, se encuentra el de participar con mayor confianza en el comercio internacional de alimentos, contando de esta forma con las bases suficientes para certificar la inocuidad de los productos alimenticios cárnicos, tanto importados como exportados.

Que para conseguir los propósitos enunciados, he tenido a bien expedir la NOM-011-ZOO-1994 DETERMINACION DE SULFONAMIDAS EN HIGADO Y MUSCULO DE BOVINOS, OVINOS, EQUINOS, PORCINOS Y AVES POR CROMATOGRAFIA CAPA FINA-DENSITOMETRIA.

INDICE

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
5. FUNDAMENTO
6. EQUIPO
7. REACTIVOS, SOLUCIONES Y MATERIALES
8. ESTANDARES
9. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION
10. PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACION
11. RESULTADOS
12. SANCIONES
13. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
14. BIBLIOGRAFIA
15. DISPOSICIONES TRANSITORIAS

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. Objetivo

Esta Norma es de observancia obligatoria en el territorio nacional y tiene por objeto establecer el método de prueba para la determinación de residuos de sulfadimetoxina, sulfapiridina, sulfametazina y sulfatiazol en hígado y músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves. La técnica también es aplicable a las siguientes sulfonamidas:

sulfadiazina, sulfametoxipiridazina, sulfamerazina, sulfaclopiridazina, sulfaquinoxaleína, sulfafenazol, sulfaetoxipiridazina, sulfatroxazol, sulfisoxazol y sulfadoxina.

1.2. Campo de aplicación

Esta Norma se aplica a los laboratorios de análisis de residuos tóxicos en tejidos alimenticios primarios de origen animal aprobados por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

1.3. La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, así como a los gobiernos de los estados, en el ámbito de su respectiva competencia y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

1.4. La aplicación de las disposiciones previstas en esta Norma compete a la Dirección General de Salud Animal, así como a las delegaciones estatales de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, en el ámbito de su respectiva competencia y circunscripciones territoriales.

2. Referencias

Para la correcta aplicación de esta Norma deben consultarse la siguientes normas oficiales mexicanas:

NOM-003-ZOO-1994 Criterios para la Operación de Laboratorios de Pruebas Aprobados en Materia Zoosanitaria.

NOM-004-ZOO-1993 Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos.

NOM-008-SCFI-1993 Norma Oficial Mexicana Sistema General de Unidades de Medida.

3. Definiciones

Para efectos de esta Norma, se entiende por:

3.1. Coeficiente de correlación: Es la relación nominal, teórica o de una unidad evidente entre una variable y otra que hace mínima a la suma de los cuadrados de las desviaciones de la primera con respecto a su proporcionalidad con la segunda.

Con proporcionalidad exacta, el coeficiente es 1, si no existe ninguna relación el coeficiente es cero. La proporcionalidad inversa completa proporciona un coeficiente de -1.

3.2. Cromatografía: Es un método utilizado para la separación de mezclas, que puede ser por adsorción o por partición.

La adsorción se basa en la aplicación de adsorbentes sólidos que tienen afinidades específicas para las sustancias adsorbidas, los componentes son separados con uno o varios disolventes y detectados por medios químicos o físicos.

La partición cromatográfica aplica el principio de distribución a contracorriente en las columnas e implica el uso de dos sustancias disolventes inmiscibles.

3.3. Cromatografía capa fina: Es un tipo de cromatografía en la que los compuestos son separados por un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, en una capa fina de material adsorbente, depositado sobre una capa de cristal o aluminio.

3.4. Densitometría: Técnica de análisis basada en los principios ópticos de fluorescencia, absorbancia, transmitancia y reflectancia, que mide la cantidad de energía absorbida o reflejada de un haz de luz, que pasa de un medio a otro de diferente densidad. En cromatografía de capa fina, el haz de luz pasa sobre la mancha cromatográfica produciendo una señal que es captada en un fotómetro que hace la medición de dicha energía.

3.5. Muestra fortificada: Es un tejido blanco que ha sido adicionado de una concentración conocida del analito.

3.6. Recuperación (R): Es el porcentaje del elemento o compuesto de interés denominado analito que se obtiene en la muestra fortificada (MF), calculado en función de la cantidad real adicionada (C.A.).

$$R = \frac{MF \times 100}{CA}$$

3.7. Tejido blanco: Es una muestra de tejido, previamente analizada, que no contiene al analito o puede contenerlo en cantidades menores al LMR.

4. Símbolos y abreviaturas

CCF cromatografía capa fina
cm centímetro

g	gramo
GC	cromatografía de gases
G.R.	grado reactivo
HPLC	cromatografía de líquidos alta resolución
LMR	límite máximo de residuos
M	molar
mg	miligramo
min	minuto (s)
ml	mililitro
N	normal
nm	nanómetro
ppm	partes por millón
ppb	partes por billón
Rf	relación de frentes
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundo
sol.	solución
U.V.	ultravioleta
µg	microgramo
µl	microlitro
%	por ciento
°C	grados centígrados

5. Fundamento

El análisis de residuos de sulfonamidas se realiza por cromatografía capa fina, cuantificándolos en un densitómetro con detección fluorescente. Después de la adición de un estándar interno, el tejido es extraído con acetato de etilo. Las sulfonamidas son entonces separadas en un buffer de glicina. Después de ajustar el pH la fase acuosa es extraída con cloruro de metileno. La separación de las sulfonamidas se lleva a cabo en una placa de sílica gel conteniendo una capa preadsorbente, la visualización se realiza con luz ultravioleta después de la inmersión de la placa en una solución de la fluorescamina.

6. Equipo

6.1. Aparatos

- Licuadora
- Centrífuga con velocidad mínima de 3500 rpm, con rotor de capacidad para tubos de 50 ml.
- Agitador mecánico recíprocante
- Potenciómetro
- Aspersor
- Estufa con control de temperatura
- Evaporador de nitrógeno
- Baño de agua controlado a $40 \pm 2^\circ\text{C}$
- Vortex
- Caja de luz ultravioleta
- Bomba de vacío con trampa para líquidos
- Platina de calentamiento
- Calculadora con análisis de regresión lineal

6.2. Instrumentos

- Densitómetro CAMAG TLC Scanner II o equivalente.

7. Reactivos, soluciones y materiales

7.1. Reactivos

- Acetato de etilo grado HPLC o GC
- Cloruro de metileno grado HPLC o GC
- Cloroformo destilado en vidrio

- Tert-butanol GR
- Metanol grado HPLC o GC
- Acetona grado HPLC o GC
- Acido clorhídrico (HCL) concentrado grado reactivo
- Hidróxido de sodio G.R.
- Fluorescamina G.R.
- Glicina G.R.
- Fosfato dibásico de potasio G.R.
- Fosfato monobásico de potasio G.R.
- Hexano grado HPLC o GC

7.2. Soluciones

- Hidróxido de sodio 10 N.- Pesar 400g de NaOH G.R., disolver en aproximadamente 700 ml de agua destilada y aforar a 1000 ml.
- Solución de fluorescamina.- Disolver 30 mg de fluorescamina en 250 ml de acetona. La solución es estable por un mes cuando se conserva a - 5°C.
- Sistema de solventes CCF.- Cloroformo:Tert-butanol:Acetona 36:6:4.
- Buffer de glicina 0.2 M.- Pesar 12.02g y llevar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar con NaOH 10 N a un pH de 12.25 + 0.05. Si la temperatura del laboratorio está por debajo de 20°C puede ser necesario calentar en baño de vapor a aproximadamente 40°C, antes de usar.
- Fosfato dibásico de potasio 2 M.- Pesar 348.36g de K_2HPO_4 y diluir a 1000 ml con agua destilada.
- Fosfato monobásico de potasio 2 M.- Pesar 272.18g de KH_2PO_4 y diluir a 1000 ml con agua destilada.
- Buffer de fosfatos 2 M.- Mezclar las soluciones de los fosfatos 2 M hasta alcanzar un pH de 5.25.
- HCl 1.7 M.- Medir 144.5 ml de ácido clorhídrico concentrado G.R. y diluir a 1000 ml con agua destilada.
- Solución de HCl 1.7 M/buffer de fosfatos 2 M.- Preparar 1:1 v/v y ajustar a pH 1.65.
- Buffer de fosfatos 0.2 M.- Pesar 45.646g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ y disolver en 1000 ml de agua destilada (sol. 1). Pesar 27.218g de KH_2PO_4 y disolver en 1000 ml de agua destilada (sol. 2). Ajustar sol. 1 con sol. 2 a pH 7.55+ 0.05. Aproximadamente 80 ml de sol. 1 más 20 ml de sol. 2 resultarán en 100 ml de sol. pH 7.6.

7.3. Materiales

- Matraces volumétricos de 100, 50 y 25 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 25 y 50 ml
- Frascos de polietileno
- Placas de sílica gel Whatman LK6D de 20 x 20 cm prelavadas en metanol antes de usarlas
- Tubos de centrífuga con tapón de rosca de 50 ml
- Tubos de centrífuga de vidrio con tapón esmerilado de 15 ml
- Cámara de desarrollo para CCF
- Termómetro de -10 a 110°C
- Jeringas de 10 a 50 μ l
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas
- Dosificador

8. Estándares

Las sulfonamidas estándares de referencia son las siguientes, las cuales deben ser de pureza certificada.

Sulfadimetoxina

Sulfapiridina

Sulfametazina

Sulfatiazol

8.1. Soluciones patrón 1 mg/ml

Todas las sulfonamidas estándares, incluyendo la sulfapiridina que se utiliza como estándar interno, se preparan de la siguiente manera: Pesar 100 ± 0.1 mg de cada sulfonamida en matraces volumétricos separados de 100 ml; disolver y llevar a volumen con acetona.

8.2. Estándares de trabajo utilizados para fortificar las muestras

Todas las soluciones estándares de trabajo se diluyen con buffer de fosfato 0.2 M.

8.2.1. Estándares 10 µg/ml

a) Solución de mezcla de estándares de sulfonamidas.

Pipetear 1 ml de solución patrón de cada sulfonamida en un matraz volumétrico de 100 ml. No adicionar el estándar interno, llevar a volumen.

b) Solución de estándar interno.

Pipetear 1 ml de solución de estándar interno en un matraz volumétrico de 100 ml llevar a volumen.

8.2.2. Solución D, 2.5 µg/ml estándar interno

Pipetear 25 ml de la solución estándar interno de 10 µg/ml en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar.

8.2.3. Solución C, 5.0 µg/ml de la(s) sulfonamida(s) de interés

Pipetear 50 ml de la sulfonamida estándar o de la mezcla de sulfonamidas de interés de 10 µg/ml en un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen.

8.2.4. Solución B, 2.5 µg/ml de la(s) sulfonamida(s) de interés

Pipetear 25 ml de solución C en un matraz volumétrico de 50 ml y aforar.

8.2.5. Solución A, 1.25 µg/ml de la(s) sulfonamida(s) de interés

Pipetear 25 ml de solución B en un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a volumen.

Todos los estándares se almacenarán en frascos de polietileno, refrigerados a 10°C, excepto la solución patrón que debe estar a -10°C.

Las soluciones patrón son estables durante seis meses y las de trabajo un mes.

9. Procedimiento de extracción

9.1. Preparación de las muestras

9.1.1. Pesar 2.5 ± 0.1 g de tejido que previamente ha sido molido y congelado en un tubo de centrifuga de 50 ml de polipropileno. Dejar descongelar.

9.1.2. Fortificación de muestras para la curva estándar. Pesar cuatro muestras de tejido blanco de 2.5 ± 0.1 g cada una, en tubos de centrifuga de 50 ml de polipropileno.

Una muestra se destinará como tejido blanco y tres tejidos para fortificarlos de la siguiente manera:

Muestra	Volumen agregado µl	Solución usada	µg adicionados	ppm(µg/g) *
1	100	A	0.125	0.05
2	100	B	0.250	0.10
3	100	C	0.500	0.20

* Las ppm se calculan usando 2.5 g de muestra.

Agregar 100 µl de solución estándar D (2.50 µg/ml) al blanco y a los tejidos fortificados; se tendrán 0.10 ppm de estándar interno.

9.1.3. Muestras

La curva de fortificación sirve para evaluar tanto niveles altos como bajos de analito en la muestra, variando únicamente el volumen de solución estándar D agregado.

- Para las muestras con niveles bajos, se agregarán 100 µl de solución estándar D (2.50 µg/ml) para tener 0.10 ppm de estándar interno.

- Para las muestras con niveles altos, se agregarán 25 µl de la solución patrón de estándar interno (1 mg/ml), para tener 10 ppm de estándar interno.

9.2. Extracción

9.2.1. Después de la adición del estándar interno, dejar reposar las muestras durante 15 min.

9.2.2. Adicionar 25 ± 1.0 ml de acetato de etilo con un dosificador.

9.2.3. Sellar los tubos con el tapón de rosca. Agitar una o dos veces para verificar fugas.

9.2.4. Agitar en agitador horizontal por 20 min aproximadamente a 250 ciclos por min.

9.2.5. Centrifugar a 2500 rpm.

9.2.6. Decantar el sobrenadante en un tubo de centrifuga de polipropileno y agregar 10 ml de buffer de glicina 0.20 M. Descartar el residuo del tejido y el tubo original.

9.2.7. Tapar el tubo y agitar en agitador mecánico por 5 min.

9.2.8. Centrifugar por 5 min a 2500 rpm.

9.2.9. Remover la fase orgánica (capa superior) con una pipeta Pasteur, adaptada a un aspirador de vacío. Tener cuidado de remover cualquier material sólido o emulsificado que permanezca en la interfase o esté adherido a las paredes del tubo.

9.2.10. Adicionar 2 ml de solución de 1.7 M HCl/buffer de fosfatos 2 M. Ajustar si es necesario a pH 5.9 ± 0.10 con buffer o solución NaOH 1.0 N o HCl 1.0 N.

9.2.11. Adicionar 10 ml de hexano. Tapar y agitar con agitador mecánico por 5 min.

9.2.12. Centrifugar 2500 rpm durante 5 min.

9.2.13. Remover la fase orgánica (capa superior) con pipeta Pasteur haciendo succión moderada, especialmente si hay sólidos presentes en la interfase.

9.2.14. Agregar 10 ml de cloruro de metileno. Tapar y agitar con agitador mecánico por 5 min.

9.2.15. Si no hay emulsión, centrifugar a 2500 rpm durante 5 min. Si hay emulsión, centrifugar 3500 rpm durante 10 min.

9.2.16. Remover la fase acuosa (capa superior) con pipeta Pasteur haciendo succión. La capa debe ser completamente removida, lo cual puede lograrse inclinando el tubo y colocando la pipeta aspiradora en la pared del tubo. Tenga cuidado de remover cualquier partícula grasosa o sólida en la interfase. Si existiera algún tapón gelatinoso entre las fases orgánicas y acuosa no lo remueva o lo aspire; puede obtenerse una pobre recuperación.

Para las muestras con niveles altos de sulfas que se fortificarán de acuerdo al punto 9.2.2., eliminar los pasos del 9.2.17. al 9.2.20. y continuar con el proceso analítico.

9.2.17. Evaporar la fase orgánica restante bajo atmósfera de nitrógeno con un evaporador con nitrógeno a 40°C. Cuando el nivel haya bajado a 5 ml, lavar los lados de los tubos con una alcuota de aproximadamente 2 ml de cloruro de metileno. Repetir el lavado cuando el volumen decline a cerca de 2.5 ml y nuevamente a aproximadamente 1.0 - 1.5 ml.

9.2.18. Evaporar casi a sequedad. No dejar que el residuo seque completamente.

9.2.19. Disolver el residuo en 100 µl de metanol y agitar en un vortex por 30 seg. Dejar reposar por 5 min, para que los aceites insolubles sedimenten en el fondo del tubo.

9.2.20. Conservar los tubos herméticamente cerrados, por si se requiere un análisis adicional.

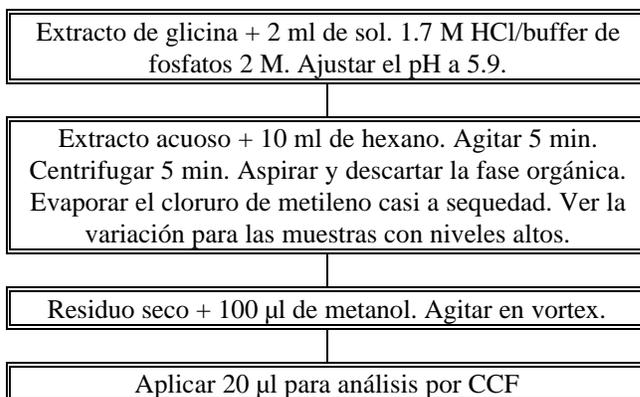
Puntos de interrupción dentro del día.- Cualquier paso puede ser usado como punto de interrupción de la técnica, durante el curso del día con dos excepciones. No es aconsejable dejar que las sulfonamidas permanezcan en el buffer de glicina fuertemente básico por más de una hora. Asimismo no debe desatenderse el paso de concentración a sequedad. Se pueden presentar pérdidas significativas si el residuo es evaporado a completa sequedad y se continúa calentando por un periodo largo de tiempo.

9.3. Resumen del método

El método anteriormente descrito se resume de la siguiente manera:

2.5g de muestra + estándar interno + 25 ml de acetato de etilo. Agitar 20 min. Centrifugar 5 min. Transferir el sobrenadante a un tubo de 50 ml. Descartar el tejido.

Sobrenadante + 10 ml de buffer de glicina 0.2 M. Agitar 5 min. Centrifugar 5 min. Aspirar y descartar la fase orgánica.



10. Procedimiento de cuantificación

10.1. Cromatografía Capa Fina

10.1.1. Utilizando una micropipeta, aplicar 20 µl de cada muestra control fortificada, el tejido blanco y las muestras necesarias para completar 13, sobre la capa preadsorbente de la placa LK6D con la zona preadsorbente calentada a 85°C sobre una platina caliente.

Tener cuidado de no aplicar alguna fracción aceitosa insoluble, que puede alterar el cromatograma.

Aplicar a aproximadamente 1.0 - 1.5 cm de la interfase con el preadsorbente. No aplicar en las líneas más alejadas de la placa como los bordes, ya que pueden distorsionar las manchas y el Rf.

10.1.2. Desarrollar la placa a 1 cm de la interfase en metanol. Remover y secar la placa por un minuto en una estufa a 100°C.

10.1.3. Desarrollar la placa a 6 cm de la interfase en cloroformo: tert-butanol: acetona 36:6:4 en una cámara de desarrollo saturada, colocada en una estufa a 25 - 30°C. Sacar la placa y secarla por un minuto en una estufa a 100°C.

Desarrollar nuevamente la placa en cloroformo: tert-butanol: acetona a 12 cm a una temperatura de 25 - 30°C para mantener los valores de Rf consistentes.

10.1.4. Secar la placa en un horno a 100°C por un min; sumergir la placa en la solución de fluorescamina. Conservar la placa en solución de 1 a 2 segundos después de que esté completamente sumergido. Reemplazar la solución de fluorescamina cada 8 a 9 placas sumergidas.

No sumergir las placas desarrolladas en fluorescamina a menos que el barrido se haga el mismo día. Una disminución inaceptable de fluorescencia se presentará durante la noche en las placas sumergidas que están a temperatura ambiente. Esto puede evitarse conservando durante la noche, las placas derivatizadas en una bolsa de plástico sellada y congelada a - 10°C. La cuantificación de las placas almacenadas de esta manera es aceptable. Puede aplicarse un día y desarrollar el próximo o desarrollar un día y sumergir al siguiente.

10.1.5. Dejar desarrollar en la oscuridad, a temperatura ambiente por 15-30 min y revelar bajo luz U.V. Observar las recuperaciones y las sulfas con niveles altos.

10.2. Densitometría

10.2.1. Conectar el instrumento y dejar calentar de 10 a 15 min.

10.2.2. Programar el equipo para:

- Inicio de la variable X
- Inicio de la variable Y
- Longitud de barrido
- Distancia entre cada aplicación
- Número de aplicaciones a leer
- Ajuste a cero automático
- Longitud de onda y
- Sensibilidad

10.2.3. Seleccionar el modo fluorescencia.

10.2.4. Realizar un barrido de 412 a 405 nm para seleccionar las longitudes de onda de máxima excitación y emisión aproximadamente 407 nm.

10.2.5. Correr una línea no utilizada para determinar el ruido de la placa y hacer la corrección de la línea base.

11. Resultados

11.1. Cálculos

11.1.1. Por cada placa desarrollada, construir una curva estándar, con las muestras fortificadas de la siguiente manera:

- Medir la altura de los picos de las sulfonamidas de interés y del estándar interno de cada muestra fortificada y calcular la relación de altura de picos.

$$\text{Relación de altura de pico} = \frac{\text{altura del pico de la sulfonamida}}{\text{altura del pico del estándar interno}}$$

- Usando regresión lineal, construir una curva estándar graficando concentración de sulfonamida contra relación de altura de pico.

La ecuación es $Y = mx + b$

Donde:

Y = relación de altura de pico de la sulfonamida entre altura de pico del estándar interno.

X = concentración de la sulfonamida (ppm)

m = pendiente

b = intercepto y

El coeficiente de correlación deberá ser mayor o igual a 0.995.

11.1.2. Usando la pendiente de regresión y el intercepto, calcular la concentración de la sulfonamida (X) para cada muestra de la relación de altura de pico encontrada.

11.1.3. Para muestras con niveles altos, multiplicar el resultado anterior por 100.

11.2. Informe de resultados

Estos se reportarán en ppm($\mu\text{g/g}$) o ppb(ng/g) de la sulfonamida encontrada.

12. Sanciones

El incumplimiento a las disposiciones contenidas en la presente Norma, será sancionado conforme a lo establecido en la Ley Federal de Sanidad Animal.

13. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con ninguna norma internacional.

14. Bibliografía

Determinación de residuos de sulfonamidas en tejidos animales por cromatografía capa fina. Manual de procedimientos del laboratorio de Residuos Tóxicos y Contaminantes. Revisión 1992. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal SARH.

Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists, 14 th Edition USA.

Sulfonamides. Chemistry Laboratory Guidebook. July 1991 - Revisión. Food Safety and Inspection Service, Science. USDA.

T.L.C. Densitometric Procedure for Sulfonamide Residues in Animal Tissues (S.T.L.C. - F). 5.018. Chemistry Laboratory Guidebook. June 1987-Revisión. Food Safety and Inspection Service. Science. USDA.

15. Disposiciones transitorias

Esta Norma entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 7 de febrero de 1995.- El Director General Jurídico, Roberto Zavala Echavarría.- Rúbrica.