



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Agronomía
Departamento de Química y Tecnología



Validación del método analítico para la cuantificación de aflatoxinas totales en maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Autora: Br. Aisel A. Pérez S.
Tutor académico: Prof.^a Marleny Chavarri
Tutor Empresarial: Matute Willians

Maracay, Mayo de 2016



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Agronomía
Departamento de Química y Tecnología

Validación del método analítico para la cuantificación de aflatoxinas totales en maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Trabajo presentado como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniera Agrónoma que otorga la Universidad Central de Venezuela

Autora: Br. Aisel A. Pérez S.

Tutor académico: Prof.^a Marleny Chavarri

Tutor Empresarial: Matute Willians

Maracay, Mayo de 2016

ACTA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado examinador del trabajo de grado titulado “Validación del método analítico para la cuantificación de aflatoxinas totales en maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)”, cuyo autor(a) es la Br. Aisel A. Pérez S. cédula de identidad V- 17.800.694, certificamos que lo hemos leído y hemos presenciado su defensa pública y que en nuestra opinión reúne las condiciones necesarias de adecuada presentación y es enteramente satisfactorio en alcance y calidad como trabajo de grado para optar al Título de Ingeniera Agrónoma.

Prof.^a Marleny Chavarri

C.I.: 6.130.264

Tutora

Prof.^a Fanny Molina

C.I.: 5.688.216

Jurado Principal

Ing. Matute Willians

C.I.: 9.433.460

Tutor Empresarial

Prof.^a Rosaura Istúriz

C.I.: 5.265.044

Jurado Suplente

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme por el buen camino, darme la fortaleza, la salud y por estar conmigo en cada paso que doy, por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

A mis padres, Gisela y Jaime, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por sus consejos, amor y apoyo incondicional para alcanzar este logro, ¡los amo!

A mi hermana, Yissel por estar siempre presente. A mis sobrinos bellos Ema y Matias quien ha sido y son mi motivación, inspiración y felicidad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

A mis padres, por apoyarme en todo momento y en todo lo que necesitaba, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida.

A la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, por darme la oportunidad de estudiar y a quien debo mi formación académica.

A mi novio, Julio Cesar, quien me brindó su amor, su cariño, su estímulo y su apoyo constante ¡Gracias!

A mi tutora Profesora Marleny Chavarri, por aceptarme para realizar esta tesis, por su disponibilidad en todo momento, paciencia, apoyo y confianza, por la orientación y aporte para la redacción y corrección del presente trabajo de grado, muchas gracias.

A la Profesora Fanny Molina, por su tiempo, sus conocimientos y experiencia, por su aporte en los cálculos y análisis de los resultados, muchas gracias por la orientación y apoyo que me brindó.

Al laboratorio Sedicomvet, especialmente al Sr. Willians Matute y el Sr. José Riera, por permitirme realizar este estudio y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado.

No puedo olvidar a mis amigas, con las cuales he compartido en toda la carrera, gracias por su amistad incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Página de Título.....	I
Página de Respaldo.....	II
Acta de Aprobación de Trabajo de Grado.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimientos.....	V
Tabla de contenido.....	VI
Índice de cuadros.....	VIII
Índice de figuras.....	IX
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Objetivos.....	5
Antecedentes.....	6
Materiales y métodos.....	17
Resultados y discusión.....	25
Conclusiones.....	34
Recomendaciones.....	35
Referencias bibliográficas.....	36
Anexos.....	42
Anexo 1. Cálculo de la linealidad.....	43
Anexo 2. Cálculo límite de detección y límite de cuantificación.....	44
Anexo 3. Cálculo de la exactitud con 3 niveles de concentración.....	46

Anexo 4. Cálculos de la varianza de la repetibilidad (S_r^2), varianza intralaboratorio (S_L^2), varianza de reproducibilidad (S_R^2), desviación estándar de la repetibilidad (S_r) y reproducibilidad (SR) por día.....	48
Anexo 5. Cálculo de la precisión (R&R).....	54
Anexo 6. Cromatogramas de diferentes niveles de concentración.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro1. Resultados del estudio de linealidad en las concentraciones de aflatoxinas adicionada a muestras de maíz.....	25
Cuadro 2. Valores de desviaciones estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) para cada concentración de aflatoxinas adicionada a muestras de granos de maíz.....	27
Cuadro 3. Resultados de la desviación estándar (DS), Desviación estándar relativa (RSD), % de recuperación y la T-Student para tres niveles de concentración de aflatoxinas totales adicionadas a muestras de maíz.....	28
Cuadro 4. Resultados de la desviación estándar (DS) para tres niveles de concentración de aflatoxina totales adicionada a muestras de maíz.....	29
Cuadro 5. Resultados del contenido de aflatoxina totales y valores de la media obtenido por operador, para los cinco días, en muestra de maíz (<i>Zea mays</i> L.)	30
Cuadro 6. Valores de rango (r) para cada operador/día, rango promedio por operador para los 5 días y rango de ambos operadores por los 5 días.....	31
Cuadro 7. Valores de media general, desviación estándar de repetibilidad (Sr), desviación estándar de reproducibilidad (SR), porcentaje del coeficiente de variación de repetibilidad (%CVr) y porcentaje del coeficiente de variación de reproducibilidad (%CVR) de los resultados del contenido de aflatoxina total en muestras de maíz obtenidos por día.....	31
Cuadro 8. Resultados del %R&R mediante el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad, por la Universidad Tecnológica de Pereira (Scientia et Technica 2007) y por el método de la Ford (Measurement Systems Analysis, reference manual, 1995).....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Linealidad con cinco niveles de concentración de aflatoxina.....	26

Validación del método analítico para la cuantificación de aflatoxinas totales en maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Aisel A. Pérez S.

RESUMEN

Se validó la metodología analítica para la cuantificación de aflatoxinas totales en muestras de granos de maíz (*Zea mays* L.) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mediante el método AOAC (2000); Official Method 991.31. Se realizó una evaluación a los parámetros de desempeño de la técnica como son: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión utilizando la metodología descrita por Quattrocchi *et al.*, (1992); Scientia et Technica (2007) y Measurement Systems Analysis, reference manual Ford (1995). Los resultados de estos parámetros se sometieron análisis estadísticos experimentales, demostrando que la técnica analítica entra en los criterios de aceptación permitidos, indicando que el método validado es lineal, preciso, sensible y exacto para su aplicación en el control de calidad, para obtener resultados confiables, cuando se analiza muestras de maíz para determinar su inocuidad. La validación de esta metodología forma parte de las buenas prácticas de laboratorio. De esta forma, se establece que el método analítico empleado cumple con los requisitos necesarios para su aplicación en el laboratorio, siendo confiable para ser utilizado.

Palabras clave: HPLC, Validación, Maíz

Validation of the analytic method for the totals aflatoxin's quantification on corn with High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Aisel A. Pérez S.

ABSTRACT

It was validated the analytic methodology for the totals aflatoxin's quantification in samples of corn's grains (*Zea mays* L.) with High Performance Liquid Chromatography (HPLC), through the AOAC method (2000); Official Method 991.31. It was made an evaluation to the development parameters of the techniques like: linearity, detection limit, quantification limit, exactitude and precision using the methodology described by Quattrocchi *et al.*, (1992); Scientia et Technica (2007) and Measurements Systems Analysis, reference manual Ford (1995). The results of this parameters was exposed through experimental statistics analysis, proving that the analytic technique fit in the acceptance criterion allowed, indicating that the validated method is linear, precise, sensitive and exact for the application on the quality control, to obtain confidence results, when it analyzed corn's samples for determine its innocuousness. The validation of this methodology it's part of the good laboratory practices. In this way, it states that the analytic method used reach with the necessary requirements for the application at the laboratory, being confidence to be used.

Keywords: HPLC, Validation, Corn.

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son las micotoxinas más importantes en términos de seguridad alimentaria, por su frecuencia y toxicidad, se caracterizan por ser metabolitos secundarios sintetizados por hongos, además, son sustancias hepatotóxicas, carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas. Las especies fúngicas que las sintetizan son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* y *Aspergillus tamarii* (Gimeno, 2004; Abarca *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2010; Arroyo *et al.*, 2014; Chavarri, 2015).

Las aflatoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales, esencialmente, en el maíz, trigo, arroz y subproductos de cereales, frutos de oleaginosas y toda una serie de alimentos para humanos (Gimeno, 2004). El Codex Alimentarius, 2013, establece que la contaminación con aflatoxinas en maíz representa el 57,2% de las muestras analizadas en todo el mundo, mientras que el arroz, el sorgo y el trigo contribuyeron aproximadamente un 15,0% cada uno. Según Arroyo *et al.* (2014) elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos o crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de especies animales. En Venezuela son numerosas las investigaciones en las cuales se ha detectado la presencia de *A. flavus* y aflatoxinas contaminando los granos de maíz (Chavarri, 2015).

Dada la contaminación de los alimentos y materias primas con sustancias tóxicas, como las micotoxinas, es necesario desarrollar la instrumentación para análisis cuantitativo para establecer los niveles permisibles de las mismas (Luna, 2012).

La HPLC o Cromatografía Líquida de Alta Resolución, es una técnica que hoy en día representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, el análisis consiste en fraccionar la muestra entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria donde ocurre una separación de los

diferentes componentes de la misma (Pimentel, 2007; Guía de cromatografía, 2008).

En la actualidad el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que los métodos analíticos que emplean para sus análisis, proporcionan resultados confiables, los mismos que son resultado de una previa validación antes de ser utilizados rutinariamente. Según la norma ISO/IEC 17025 (2005), un laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto.

La validación de un método no implica que el método esté libre de errores, solo confirma que es conveniente para un propósito determinado y debe quedar claramente expresado en el manual de calidad, de forma tal que cualquier analista pueda utilizarlo sin dificultad (Rodríguez *et al.*, 2005).

Por ello, es imprescindible la validación del método analítico a emplear. En tal sentido el propósito de esta investigación, es la validación del método analítico para la cuantificación de aflatoxinas totales en maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), estimando de forma experimental los valores de los parámetros que permiten determinar: La Linealidad, Precisión (Respetabilidad y Reproducibilidad), Límite de Detección, Límite de Cuantificación y Exactitud, con la finalidad de garantizar la correcta implementación y el buen funcionamiento del método analítico.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Validar el método analítico para la cuantificación de aflatoxinas totales en maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Objetivos Específicos:

- Validar la metodología para la cuantificación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en muestras de granos de maíz (*Zea mays* L.).
- Estimar de forma experimental los valores de los parámetros que permiten determinar: la linealidad, precisión (respetabilidad y reproducibilidad), límite de detección, límite de cuantificación y exactitud, con la finalidad de garantizar la correcta implementación y el buen funcionamiento del método analítico.

ANTECEDENTES

Micotoxinas

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas, de los cuales contemplan las levaduras y hongos filamentosos (mohos). Los mohos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, la cual se asocia con la fase de rápido crecimiento. Cuando el moho termina su fase de crecimiento o cuando hay deficiencia de nutrientes esenciales, los procesos de síntesis del mismo se encaminan hacia la producción de metabolitos secundarios, los cuales, son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro, en este grupo se incluyen las micotoxinas, pigmentos y los antibióticos. Las micotoxinas son estructuralmente un grupo diverso de compuestos, se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación. Son moléculas relativamente pequeñas, la mayor parte de estos metabolitos secundarios se originan en la ruta policetónica (Gimeno y Martins, 2003; Soriano *et al.*, 2007; Urrego y Díaz, 2006).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos producidos por hongos, sintetizadas por varias especies fúngicas, tales como: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* y *Aspergillus tamarii* (Herrero, 2012).

Hasta el momento existen 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales las más relevantes en términos de seguridad alimentaria son las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2 (los 2 últimos son productos metabólicos de las aflatoxinas B1 y B2 que son excretados en leche). De entre todas ellas, destaca desde el punto de vista de la seguridad alimentaria la aflatoxina B1, tanto por ser la más prevalente en alimentos como la más tóxica para los seres humanos (Deng *et al.*, 2010; Gimeno, 2004; Chavarri, 2010).

Aflatoxinas en los alimentos

Las aflatoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales (maíz, arroz y trigo), subproductos de cereales, frutos de oleaginosas (algodón, cacahuete, colza, coco, girasol y otros), mandioca, frutos secos, productos de salchichería, especias, vinos, leguminosas, frutas, leche y derivados (Gimeno, 2004).

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos o crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de especies animales, afectando a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario (Arroyo *et al.*, 2014).

Los efectos tóxicos de las micotoxinas sobre la salud humana y animal de efecto crónico, incluyen carcinogenicidad, inmunosupresión y disrupciones endocrinas; la principal vía de exposición es la oral a través del consumo de alimentos contaminados, aunque también se presentan casos de micotoxicosis por inhalación (Duarte y Villamil, 2006).

Los efectos biológicos producidos como respuesta al consumo de aflatoxinas, dependen de la variación entre especies, la edad, el sexo, el estado nutricional, los componentes de los alimentos en los que estén presentes y las interacciones con sustancias químicas. Adicionalmente, la dosis y el período de exposición del organismo a la toxina también son muy importantes. A este respecto debe tenerse en cuenta que aunque los alimentos en los que aparecen con una mayor prevalencia son los alimentos vegetales, las aflatoxinas pueden acumularse en los tejidos de los animales productores de alimentos tras su ingestión y alcanzar al ser humano a través del consumo de alimentos de origen animal en los que se halla presente o por los que se ha excretado como es el caso de la leche (Deng *et al.*, 2010).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado las aflatoxinas B y G en varias ocasiones desde 1987 (JECFA, 1987, 1997, 1999, 2002, 2007) y ha recomendado que, debido a su potencial carcinogénico, la exposición dietética a las aflatoxinas se reduzca al mínimo posible (Sáez *et al.*, 2010).

En Venezuela, la Norma Covenin 1935-87, correspondiente a maíz (*Zea Mays* L.), siendo este, un cereal y uno de los principales alimentos cultivados en el mundo, establece la cuantificación de la toxina, con un límite máximo permitido de 5 ppb de aflatoxina B1 para consumo humano.

El Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA), establece que el límite máximo permitido (LMP) para aflatoxinas totales en alimentos destinados al consumo humano es de 5 ppb (Instituto de Salud Pública de Chile, 2013).

Igualmente, la legislación de la Unión Europea, establece niveles máximos permitidos de 5 ppb para aflatoxina B1, de 10 ppb para aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2,) y de 0.05 ppb para aflatoxina M1 en leche (Durán y Castillo, 2006).

En los Estados Unidos, hay un límite general para las aflatoxinas de 20 ppb en todos los alimentos (USFDA, 2000). En Brasil, se establecieron niveles máximos de aflatoxinas para los cereales y sus productos (5 ppb, con la excepción del maíz), los alimentos elaborados a base de cereales y los preparados para lactantes (1 ppb) y para el maíz y sus productos (20 ppb) (ANVISA, 2011).

Métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas en alimentos

Los programas de control y protección de la salud pública frente a los contaminantes tóxicos presentes en los alimentos dependen principalmente de los análisis de laboratorios realizados. El proceso de determinación de micotoxinas en alimentos sólidos y líquidos se realiza en varias fases que en términos generales

incluyen preparación de la muestra (moler y homogeneizar en el caso de los alimentos sólidos y ultrasonicar en el caso de alimentos líquidos), extracción y posterior purificación para eliminar interferencias y finalmente determinación mediante técnicas instrumentales (Herrero, 2012).

En la actualidad, existen varios organismos internacionales que elaboran y publican métodos de análisis de micotoxinas en alimentos. Algunos de estos organismos son la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), CEN (Comité Europeo de Normalización) o la ISO (Organización Internacional de Normalización). En el caso de España, existe AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación), que adopta y convierte las normas ISO y CEN en normas españolas (UNE) (Herrero, 2012).

Las normas españolas (UNE), hoy en día, tienen vigentes métodos que regulan la determinación de aflatoxinas en alimentos, tales como el método por cromatografía líquida de alta resolución con transformación química postcolumna y purificación en columna de inmunoafinidad” (Herrero, 2012).

Las columnas de inmunoafinidad, se basan en la tecnología de anticuerpos monoclonales, que hacen que el ensayo sea altamente específico, sensible, rápido y simple de realizar. Las columnas especializadas para aflatoxinas contienen una suspensión en gel de anticuerpo monoclonal unido covalentemente a un soporte sólido. El anticuerpo es específico para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (R-Biopharm, 2005).

La utilización de la columna de inmunoafinidad procede, luego, de la extracción de las toxinas. Consiste en hacer pasar el extracto de muestra a través de la columna, donde, cualquier aflatoxina que esté presente en la muestra es retenida por el anticuerpo dentro de la suspensión de gel. La columna se lava con agua destilada para remover el material no unido. La toxina unida es liberada por el anticuerpo luego de la elusión de la columna con metanol o acetonitrilo. El

eluido se colecta en un vial para análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (R-Biopharm, 2005).

Métodos Instrumentales para la determinación de aflatoxinas.

El método más utilizado para detectar aflatoxinas se basa en técnicas cromatográficas, tales como: la cromatografía de capa fina (TLC, thin-layer chromatography), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, high-performance liquid chromatography) combinado con un detector de fluorescencia o con nuevos equipos, como el UPLC (Ultra Pressure Liquid Chromatography) que mejoran sus características. También existen técnicas inmunoquímicas como el ELISA que es un método que puede ser cualitativo o cuantitativo, sin embargo, aunque es rápido y sensible puede dar falsos positivos (Huang *et al.*, 2010).

La cromatografía es un método de separación de diferentes componentes de una muestra, este método logra la separación de los mismos a través del paso de una muestra por una fase estacionaria con la ayuda de la fase móvil (líquido o gas), cada componente de la muestra tiene propiedades particulares que permitirá su interacción en forma diferente entre la fase estacionaria y móvil, de esta forma cada componente se retrasa en forma particular y si el caudal, las características de la fase estacionaria y móvil y la longitud de la columna son las adecuadas se lograra la separación completa de todos los componentes de la muestra (Guía de cromatografía, 2008).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La HPLC es una técnica cromatográfica de reparto o posición, en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria (columna). Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. Debido a estas presiones el equipo para HPLC fue elaborado y es muy costoso (Pimentel, 2007).

Validación de método analítico

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos. El objetivo de la validación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado (Duffau *et al.*, 2010).

Cuándo deben validarse los métodos

Según, EURACHEM (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 diferente instrumentación.

Para la validación de métodos analíticos se debe cumplir una serie de parámetros, tales como: linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad) (EURACHEM, 2005).

PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN

Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o promedio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se busca una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado interpolación e interpretación (AEFI, 2001).

Sensibilidad

La sensibilidad de un método está definida como la habilidad para distinguir entre diferentes concentraciones. Para métodos donde la respuesta con respecto a la concentración es una función lineal, la sensibilidad es constante con respecto a la concentración y es igual a la pendiente de la curva de calibración. Contrariamente a las funciones lineales, la sensibilidad de métodos cuando su respuesta es no-lineal cambia con la concentración del analito (Rius *et al.*, 2000).

Límite de detección

El límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas (Verschae, 2005).

El límite de detección se define también como la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza (UNODC, 2010).

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de un método, corresponde a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud (Bustamante y Carrascal, 2010). El límite de cuantificación se establece a un nivel que corresponde a la señal que se corresponde al nivel de muestra contaminada que se puede distinguir del ruido más diez veces la desviación estándar de éste (Herrero, 2012).

Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. Se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza (Aguirre *et al.*, 2001).

Según la UNODC (2010), lo normal es estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo.

Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad)

La norma ISO 3534-1 (ISO, 1993) define la precisión como “el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas”. Estas condiciones dependen de los factores que se varíen entre cada uno de los ensayos. Por ejemplo, algunos de los factores que se pueden variar son: el laboratorio, el analista, el equipo, la calibración del equipo, los reactivos y el día en que se hace el ensayo.

La precisión mide el grado de acuerdo entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, según opinión general, en condiciones repetibles y condiciones reproducibles (UNODC, 2010).

La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento (por ejemplo, cromatógrafo en fase gaseosa) o los mismos materiales (por ejemplo, reactivos para pruebas visuales) y en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios) implica que las condiciones sólo serán reproducibles (UNODC, 2010).

A continuación se presenta una serie de investigaciones donde se ha aplicado el modo de análisis para la detección de las aflatoxinas.

Herrero (2012), realizó la validación de un método de análisis de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2), en frutos secos y cereales procedentes de una empresa de la Comunidad Autónoma de Aragón. La metodología proporcionó resultados satisfactorios cumpliendo con los parámetros de linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión establecidos por la normativa europea UNE-EN ISO 16050:2011. La metodología que optimizó consiste en una extracción de las aflatoxinas presentes en las muestras, por agitación en ultraturrax con una disolución metanólica, seguido de una filtración, dilución y purificación del extracto orgánico obtenido mediante columnas de inmunoafinidad y determinación final de las toxinas mediante cromatografía líquida UPLC Acquity Ultra Performance H-Class (Waters), con detector de fluorescencia (FLD), con una columna cromatográfica de fase reversa octadecil BEH C18 de 100 mm de longitud x 2,1 mm de diámetro y 1,7 µm de tamaño de partícula, con una fase móvil de: (metanol/agua/acetonitrilo) (30/55/15). Flujo de 0,4 mL/min, con una temperatura de la columna: 37°C y

temperatura del inyector: 10 °C, volumen de inyección 1 µL. Longitudes de onda fijadas en el detector: λ excitación: 365 nm y λ emisión: 435 nm para B1 y B2 (FLD) y λ excitación: 365 nm y λ emisión: 455 nm para G1 y G2 (FLD).

Morris (2011), determinó aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en muestras de maíz (*Zea mays* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) para consumo humano en cinco departamentos de la Costa Caribe Colombiana, mediante cromatografía de alta eficiencia, analizando 70 muestras. La determinación de las aflatoxinas se realizó empleando un método estandarizado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, utilizando como referencia los métodos oficiales 994.08 y 2005.08 de AOAC International. La técnica requirió de una extracción, purificación, separación y derivatización post-columna. La separación de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 se llevó a cabo mediante una columna cromatográfica de fase reversa (RP-18) de 12,5 cm x 4,6 mm, a temperatura de 50°C; un detector de fluorescencia (longitudes de onda de excitación y emisión de 360 y 450 nm). Fase móvil: agua/metanol/acetonitrilo (4:1:1). El límite de detección de la técnica es 1 ppb de cada micotoxina. Los resultados obtenidos mostraron que en las muestras de arroz ninguna obtuvo niveles detectables de aflatoxinas, pero en las muestras de maíz, de un total de veinticuatro muestras, 3 resultaron positivas para aflatoxinas B1, los valores se encontraron entre 2,4 y 12,5 ppb.

Sandoval (2013), evaluó aflatoxinas totales, en matriz de cereales: maíz y cebada, recolectando 10 muestras de cada cereal, tomando 5 muestras de cada variedad de maíz y 5 muestras de cada variedad de cebada. Utilizando el equipo de HPLC, por el método de fluorescencia. Utilizó la técnica "Determinación de Aflatoxinas B1-B2-G1-G2". Método HPLC con columna de inmunoafinidad descrita por el SAG de Chile basado en el método "AOAC Official Method 994.08 Aflatoxins in Corn, Almonds, Brazil Nuts, Peanuts, and Pistachio Nuts" Multifunctional Column (Mycosep) Method. La técnica requirió de una extracción, purificación, separación y derivatización. Las condiciones cromatográficas: columna: RP-18, 5 mm, flujo de 1 mL/min., longitudes de: excitación: 365 nm y emisión: 435 nm, a

una temperatura de columna: 40 °C, con un vol. de inyección: 50 µL. En los análisis obtenidos encontró la presencia de aflatoxinas en las matrices de cereales: maíz y cebada, utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de alta Resolución.

Arrieta (2013), determinó las aflatoxinas totales y B1 en muestras de granos de maíz blanco de cosecha, proveniente de los Estados Guárico, Cojedes y Anzoátegui, en el centro de recepción seleccionado ubicado en el Estado Aragua, para ciclos de cultivo 2009-2010 y 2010-2011. La cuantificación de las aflatoxinas se realizó por HPLC, resultando que, solo el 21,5 % de las muestras presentaron valores positivos en aflatoxinas totales; de igual manera, no se detectaron aflatoxinas G1 y G2 y solo el 44.83% de las muestras positivas cumplen con lo establecido en la norma covenin 1935-87 (máximo 5 ppb de B1).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio Sedicomvet C.A. Localizado en la Urb. Mario Briceño Iragorri, en la ciudad de Maracay Estado Aragua.

Toma de muestra

Se analizaron tres muestras de granos de maíz (*Zea mays L*), proporcionadas por el laboratorio antes mencionado. Las muestras se cuartearon manualmente.

Parámetros instrumentales

Balanza analítica marca OHAUS, modelo Scout, con precisión ± 0.1 mg. Licuadora marca oster, Micropipeta de 1000 μ L, marca Socorex, modelo Acura 825. Plancha de calentamiento. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC), Hewlett Packard, serie 1100, Bomba G1311A, Inyector Automático Reodyne, Integrador ChemStation, con detector de fluorescencia (FLD) modelo G1321A, acoplada a un detector electroquímico (Cobra -cell). Columna cromatográfica Thermo ODS hypersil, 250 x 4.6 mm, (5 μ m).

Reactivos

- Bromuro de potasio (KBr) 99.8% pureza.
- Acetonitrilo (CH_3CN) grado HPLC, 99.8% pureza (Merck).
- Metanol (CH_3OH) grado HPLC, 99.95% pureza (Fermont).
- Agua grado HPLC.
- Acido nítrico, 65% de pureza (Fluka).
- Patrón de aflatoxina (solución madre) certificado por Agrobiotec de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acetonitrilo. según recomendaciones del laboratorio que los suministra, este patrón se mantiene en condiciones de refrigeración a 8 °C.

Aanálisis de las aflatoxinas

Para la determinación de las aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2), se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mediante la metodología establecida por la AOAC (2000); Método 49.2.18 “AOAC Official Method 991.31 Aflatoxins in Corn, Raw peanuts, and Peanut Butter.

El método consiste en la extracción de una muestra con metanol: agua (CH₃OH-H₂O) (7/3), La extracción es filtrada y diluida con agua, haciéndola pasar por una columna de inmunoafinidad conteniendo anticuerpos monoclonal específico para aflatoxina totales (B1, B2, G1 y G2). Las aflatoxinas son aisladas, purificadas y concentradas en columnas y removidas de anticuerpos con metanol (CH₃OH). El total de aflatoxina es cuantificada por medidas de fluorescencias después de una reacción con bromuro de potasio (KBr). Las aflatoxinas son cuantificadas por HPLC, acoplada a un detector fluorescencia y un detector electroquímico (Cobra -cell).

Adición de analito en las muestras de maíz

Para la adición del analito en las muestras de maíz libres de aflatoxinas, en los diferentes niveles de concentración, se utilizó un patrón de aflatoxina certificado por Agrobiotec de concentración 5 ppm.

Preparación del patrón de aflatoxina de 50 ppb: en un balón de 25 mL, se adicionó mediante una micropipeta 250 µL del patrón original (5 ppm) y se llevó a volumen con acetonitrilo (grado HPLC).

Las concentraciones seleccionadas y agregadas a las muestras de maíz libres de aflatoxinas fueron menores a 2 ppb, debido a que las mismas, representan un peligro latente tanto para la salud humana como animal y no deben estar presente en los alimentos ni en las materias primas. Las alícuotas se tomaron a partir de un patrón de 50 ppb.

- 0.10 ppb: se adicionó en la muestra 50 µL.
- 0.15 ppb: se adicionó en la muestra 75 µL.

- 0.25 ppb: se adicionó en la muestra 125 μL
- 0.5 ppb: se adicionó en la muestra 250 μL .
- 1.0 ppb: se adicionó en la muestra 500 μL .
- 1.5 ppb: se adiciono en la muestra 750 μL
- 2 ppb: se adiciono en la muestra 1000 μL .

Condicionamiento del equipo HPLC

Antes de la utilización de equipo HPLC, se procedió acondicionar el sistema, por recomendaciones de Qualltrocchi *et al.* (1992).

- La fase móvil se filtró para la eliminación de las posibles impurezas y desgasificada para la eliminación de los gases disueltos en ella y así prevenir la formación de burbujas en el sistema que puede provocar pérdida de eficacia en el análisis, debido a fluctuaciones en la presión.
- La columna cromatográfica, se dejó pasar la fase móvil por aproximadamente 20 minutos, para estabilizar el sistema y remover posibles sustancias retenidas por la misma.

Preparación de la muestra y acondicionamiento de la columna de inmunoafinidad marca Aflaprep

La columna de inmunoafinidad, se dejó a temperatura ambiente, luego en un miliflor con la ayuda de una bomba, se eliminó el buffer que contiene, seguidamente, se agregó 10 mL de agua bidestilada (gota a gota) a través de una jeringa, sin dejar secar la columna de inmunoafinidad, descartando el eluyente.

Procedimiento del análisis de aflatoxinas por HPLC

Los pasos fueron los siguientes:

1. Se pesó a pesar 25 g de la muestra de maíz y posteriormente se adicionó el analito (aflatoxinas totales).
2. La muestra se homogenizó, a través de una licuadora, por un lapso de 1 minuto aproximadamente.
3. Una vez homogenizada la muestra, se agregaron 5 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 125 mL de solvente de extracción Metanol: Agua CH₃OH-H₂O (7/3) y se licuó por 3 minutos a alta velocidad (sin dejar calentar la muestra).
4. A través de un papel Watman N° 2, se filtró la muestra y se tomó del extracto una alícuota de 15 mL.
5. En una fiola de 125 mL, se adicionaron los 15 mL del extracto y 30 mL de agua bidestilada para obtener una dilución de 45 mL, dejándolo reposar por 30 min.
6. Una porción de la dilución obtenida, se hizo pasar por la columna de inunoafinidad previamente acondicionada:
 - 6.1. Mediante un miliflor, se tomó 15 mL de la muestra diluida, dejándola pasar por la columna (gota a gota) por medio de una jeringa de 20 mL, hasta pasar todo el contenido de la muestra por la columna y posteriormente se lavó con 10 mL de agua bidestilada (se debe eliminar todo el contenido de agua presente en la columna de inunoafinidad).
 - 6.2. Se pasaron 2 mL de metanol por la columna, recolectando el contenido en un tubo de ensayo (colocando la columna en una mano y el tubo de ensayo en la otra y lentamente se presiona la columna dentro del tubo de ensayo, hasta obtener el extracto purificado).
7. Con el extracto obtenido en el tubo de ensayo, se procedió a secar en una plancha de calentamiento a una temperatura de 70 °C, hasta que este se encuentre seco y luego se dejó reposar hasta temperatura ambiente.
8. Se reconstituyó con 200 µL de la fase móvil (600 mL de agua HPLC, 50 mL de acetonitrilo grado HPLC, 350 mL metanol grado HPLC, 119 mg bromuro de potasio (KBr) y 100 µL de ácido nítrico).

9. Los 200 μL reconstituidos anteriormente se transfirieron en un vial, con un inserto y se inyectó en el cromatografo líquido de alta resolución (HPLC), marca Hewlett Packard, serie 1100, con Inyector Automático.

Las condiciones para la utilización del equipo HPLC fueron las siguientes: columna Thermo ODS Hypersil, tamaño de partícula 5 μm ; dimensión 250 x 4.6 mm, longitud de onda (Ex 365; Em 428 nm), temperatura de la columna 40 °C; volumen de inyección 20 μL , con detector fluorescencia, acoplada a un detector electroquímico (Cobra -cell).

Validación del método para control de calidad

Método de análisis para los parámetros: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud, se realizó utilizando el capítulo 12. Validación de métodos (Qualttrocchi *et al.*, 1992).

Linealidad

Se estudió a 5 niveles de concentración, cada uno de los cuales con cinco réplicas. Se prepararon muestras con concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2 ppb.

Con los resultados obtenidos se determinó la curva de regresión $Y=bx+a$ por el método de los cuadrados mínimos, así mismo se evaluó los estimadores de regresión lineal (coeficiente de regresión lineal (r) y el coeficiente de determinación (r^2)) con un 95% de confianza.

Se empleó la prueba estadística de la t de Student, con el fin de calcular el valor de t_r para $n-1$ grados de libertad y se comparo con el valor t_{tabulado} con un nivel de confianza de $p=0.05$.

Se determinó la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV) para cada nivel de concentración, mediante el programa Microsoft Office Excel 2007.

Criterios de aceptación

- Ecuación de la recta: $y = bx + a$
- $r \geq 0,990$ y $r^2 > 0.980$ (Duffau *et al.*, 2010).
- Si $t_r > t_{\text{tabla}}$ la correlación lineal es significativa, la cual existe correlación entre X e Y (Qualttrocchi *et al.*, 1992).

Exactitud

Se estudió a tres niveles de concentración, cada uno de los cuales con cinco réplicas. Se prepararon muestras con concentraciones de 1, 1.5 y 2 ppb. Con los resultados obtenidos se determinaron para los tres niveles por series individuales: la desviación estándar (DS) mediante el programa Microsoft Office Excel 2007, desviación estándar relativa o coeficiente de variación (RSD), porcentaje de recuperación (R) y se empleó la prueba estadística de la t de Student calculando un t experimental (T_{bo}) y se comparó con el t de la tabla para n-1 grados de libertad, en un nivel de confianza de $p=0.05$.

Criterios de aceptación

- % de recuperación: para concentraciones ≤ 10 ppb debe estar entre 70%-125%, AOAC (2002).
- Si $T_{bo} < T_{\text{tabla}}$, el método tiene la exactitud requerida para ese ámbito de confianza y no existe diferencia significativa con el 100 % de recuperación, si $T_{bo} > T_{\text{tabla}}$, el método tiene un error sistemático para ese ámbito de confianza (Qualttrocchi *et al.*, 1992).

Límite de detección y límite de cuantificación

Para determinar el límite de detección y límite de cuantificación, se evaluaron tres niveles de concentración de aflatoxina (0.10, 0.15 y 0.20 ppb), con cinco réplicas en cada nivel. Con los resultados obtenidos se realizó una curva de regresión, considerando las concentraciones bajas, por extrapolación a concentración cero, donde se:

- Determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado (b), tomando la curva de calibración de la linealidad.
- Obtiene otra curva de calibración, inyectando muestras con concentraciones menores a 0.25 ppb, determinando una nueva ecuación de la recta y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniendo un resultado de la respuesta del blanco (Y_{bl}).
- Determina la desviación estándar (DS) correspondiente a cada concentración del punto anterior, calculando la nueva recta correspondiente a concentración vs DS y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniendo un estimado de S_{bl} , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Las ecuaciones utilizadas fueron:

- Límite de detección: $Y_{bl} + 3 \times S_{bl} / b$
- Límite de cuantificación: $Y_{bl} + 10 S_{bl} / b$

Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

El método de análisis de la precisión (R&R), se realizó mediante dos métodos: método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad, por la Universidad Tecnológica de Pereira (Scientia et Technica, 2007) y el método Ford Motor Company (Measurement Systems Analysis, reference manual, 1995). Los métodos contienen el mismo fundamento teórico en la metodología empleada por (Bissell, 1994).

Se realizó el análisis estadístico de la muestra de maíz preparada con la adición de 2 ppb de aflatoxinas, el procedimiento fue ejecutado con dos operarios distintos, cada uno realizó ocho repeticiones por día, durante cinco días de la semana (Lunes, Martes, Miércoles, Jueves y Viernes), obteniéndose cuarenta repeticiones por cada operador y un total de ochenta observaciones.

A la serie de datos obtenidos se determinó: la media general, mediante el programa Microsoft Office Excel 2007, para los cálculos de la varianza de la repetibilidad (S_r^2), varianza de la reproducibilidad (S_R^2), utilizando las fórmulas referidas en la norma Covenin 2972-2:1997, en su Anexo B.1.6. El cálculo de la desviación estándar de la repetibilidad (S_r) y la desviación estándar de reproducibilidad (S_R) se obtuvo mediante la raíz cuadrada de las varianzas. También, se determinó el porcentaje del coeficiente de variación de la repetibilidad (%CVr) y reproducibilidad (%CVR).

Criterios de aceptación

- El %CVr $\leq 15\%$ y el %CVR $\leq 32\%$ para concentraciones de 10 ppb (AOAC, 2002). Según el Codex Alimentarius (2002), el %CVr y %CVR debe ser $\leq 30\%$ para concentraciones ≤ 1 ppb.

Los resultados del cálculo %G (R&R), se analizaron de acuerdo a los siguientes indicadores según la metodología descrita por (Bissell, 1994; Scientia et Technica, 2007).

- Si él %GR & R es menor de 10% representa un buen sistema de medición.
- Si él %GR& R está entre 10 a 30% puede ser aceptable dependiendo de la aplicación y los costos.
- Si él %GR & R es mayor que 30% el sistema de medición es inaceptable.
- Si la repetibilidad es mayor a la reproducibilidad las posibles causas son: el instrumento necesita mantenimiento, el equipo requiere ser rediseñado para ser más rígido, el montaje o ubicación donde se efectúan las mediciones necesita ser mejorado y/o, existe una variabilidad excesiva entre las partes.
- Si la reproducibilidad es mayor que la repetibilidad, las causas pueden ser: el operador necesita mejor entrenamiento en cómo utilizar y leer el instrumento, la indicación del instrumento no es clara. No se han mantenido condiciones de reproducibilidad (ambientales, montaje y ruidos) y/o el instrumento de medición presenta deriva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar el estudio estadístico de los datos obtenidos se obtuvo los siguientes resultados:

Estudio de la linealidad

El cuadro 1, se presentan los resultados del estudio de la linealidad en las concentraciones comprendidas entre 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppb de aflatoxinas. Al aplicar la regresión lineal a los datos se obtuvo la ecuación de la recta $y=148.1995X+0.4933$ (Anexo 1). La regresión lineal obtenida es el diseño del modelo matemático representado como una ecuación, que permite establecer o simular el comportamiento de la variable dependiente con respecto a la variable independiente. El coeficiente de regresión lineal fue de $r=1.00$, existiendo correlación entre X e Y, indicando una recta con tendencia lineal. El coeficiente de determinación fue $r^2=0.9998$. Los resultados del t-student fueron de $T_r= 54.84$ y el valor de $T_{\text{tabulado}}=2.1318$ donde $T_r > T_{\text{tabulado}}$, confirmando que la correlación lineal es mejor que $p=0.05$, siendo significativa con la probabilidad calculada, por lo cual, los resultados obtenidos entran en los criterios de aceptación (Duffau *et al.*, 2010; Qualttrocchi *et al.*, 1992).

Cuadro 1. Resultados del estudio de linealidad en las concentraciones de aflatoxinas adicionada a muestras de maíz.

Parámetros	Resultados	Limites
Ecuación de la recta	$Y= 148.1995X+0.4933$	$Y=bx+a$
Coeficiente de regresión lineal.	$r= 1.00$	$r \geq 0,990$.
Coeficiente de determinación.	$r^2=0.9998$	$r^2 > 0.980$.
T-Student con n-1 grados de libertad, ($p=005$).	$T_r= 54.84$	$T_r > t_{\text{tab}}$; $T_r > 2.1318$

En la Figura 1, se representa la curva de linealidad obtenida en el análisis.

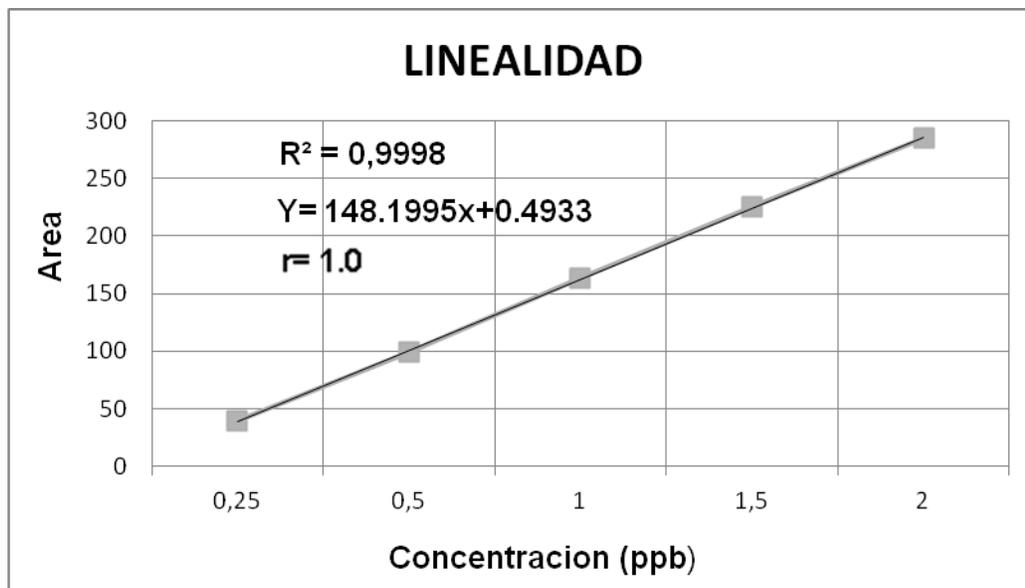


Figura 1. Linealidad con cinco niveles de concentración de aflatoxinas. R^2 : coeficiente de correlación, r = coeficiente de determinación, Y : ecuación de la recta.

El cuadro 2, presenta las desviaciones estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV) para cada nivel de concentración de aflatoxina analizado, obteniendo resultados más altos para la concentración de 1 ppb (0.064), seguidamente de 1.5 ppb (0.032) y 0.5 (0.019) ppb. Estos resultados se pueden atribuir al momento de adición de muestra, como el uso incorrecto de la micropipeta, al igual, en la selección del área bajo la curva de cada aflatoxina (G2, G1, B2 y B1), ya que los errores más comunes en una integración manual, se refieren al trazado y medición de la línea base (Qualttrocchi *et al.*, 1992).

Cuadro 2. Valores de desviaciones estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) para cada concentración de aflatoxinas adicionada a muestras de granos de maíz.

Concentración (ppb)	DS	CV
0.25	0.001	0.006
0.5	0.019	0.029
1.0	0.064	0.058
1.5	0.032	0.021
2	0.006	0.003

Estudio de exactitud

En el cuadro 3, se muestran los resultados obtenidos en los tres niveles de concentración 1, 1.5 y 2 ppb de aflatoxinas adicionada, donde se obtuvo para la concentración de 1 ppb valores altos, en todos los parámetros, teniendo una diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% de recuperación en comparación a los niveles de concentración 1,5 y 2 ppb (Anexo 3). Sin embargo, los valores arrojados entran en el rango de los criterios de aceptación, donde el porcentaje de recuperación para concentraciones iguales o menores a 10 ppb, se encuentran en 70%-125%, al igual, para la prueba de t-student el valor de t_{ob} supera el valor tabulado ($4.1431 > 2.1318$), lo que refleja que no tiene la exactitud requerida para ese nivel de concentración (AOAC, 2002; Qualltrocchi *et al.*, 1992).

Los resultados de recuperación son similares a los obtenidos por otros autores (Sook *et al.*, 2007; Otta *et al.*, 2000 y Herrero, 2012) para concentraciones menores a 10 ppb de aflatoxinas. En el mismo orden de ideas, dichos autores obtuvieron un % de recuperación para aflatoxina B₂ (84.8%, 103.9% y 105.7%) y para aflatoxina B₁ (102.0%, 98.8% y 108.7%).

Para las concentraciones de 1.5 y 2 ppb, los resultados obtenidos para t_{ob} fueron de 0.3794 y 0.4495, siendo el valor menor al t tabulado: 2.1318, para n -1 grados de libertad, con un nivel de confianza de $p=0.05$, lo que significa que para

estas concentraciones el método tiene la exactitud requerida para ese ámbito de confianza.

En cuanto a la desviación estándar (DS) y la desviación estándar relativa (RSD), a medida que disminuye la concentración de aflatoxina, mayor es la desviación obtenida. Según Qualttrocchi *et al.* (1992), explica que en el análisis de trazas (ppb), las mediciones de áreas son poco precisas, cuando no se puede definir exactamente la línea base, dificultando así, la medición del analito, afectando los resultados estadístico.

Cuadro 3. Resultados de la desviación estándar (DS), Desviación estándar relativa (RSD), % de recuperación y la T-Student para tres niveles de concentración de aflatoxinas totales adicionadas a muestras de maíz.

Parámetros	Resultados		
	1 ppb	1.5 ppb	2 ppb
Concentración			
Desviación estándar (DS)	6.38	2.13	1.30
Desviación estándar relativa (RSD)	5.77	2.12	1.30
%Recuperación media (R)	110.67	100.36	100.26
T-Student con n-1 grados de libertad, nivel de confianza (p=005)	<u>4.1431>2.1318</u>	<u>0.3794<2.1318</u>	<u>0.4495<2.1318</u>

Estudio de límite de detección y límite de cuantificación

A partir del análisis cuantitativo, se determinó que el límite de detección se encuentra en la concentración de 0.0456 ppb para la aflatoxinas totales (G2, G1, B2 y B1). Esta es la cantidad mínima de aflatoxinas totales en muestras de maíz que puede ser detectado, aunque no necesariamente cuantificado, en las condiciones experimentales indicadas. El método es capaz de detectar cantidades mínimas de aflatoxinas en una muestra, siempre que estén por encima de la concentración de 0.0456 ppb.

Para el límite de cuantificación se encontró en la concentración de 0.0770 ppb de aflatoxinas totales, la cual es la cantidad mínima de aflatoxinas totales en

muestras de maíz que puede cuantificarse en las condiciones experimentales indicadas. Por lo tanto, se determina que el método es capaz de cuantificar cantidades mínimas de aflatoxinas en muestras de maíz, siempre que tengan una concentración igual o mayor a 0.0770 ppb (Anexo 2).

Los resultados obtenidos del análisis cuantitativo del límite de detección y límite de cuantificación, se muestran a continuación con más detalles:

- Ecuación de la recta (linealidad): $Y=148.1995X+0.4933$, donde $b= 148.1995$.
- Ecuación de la recta (concentraciones menores): $Y= 116.62X+4.76$, donde $Y_{bl}= 4.76$.
- Ecuación de la recta (concentración vs desviación estándar (DS)): $Y= -2.09X+0.66$, donde $S_{bl}= 0.66$.

En el cuadro 4, se muestran los datos del análisis estadístico, los resultados obtenidos de la desviación estándar para la concentración de 0.15 y 0.10 ppb de aflatoxinas totales son superiores a los obtenidos en 0.20 ppb.

Cuadro 4. Resultados de la desviación estándar (DS) para tres niveles de concentración de aflatoxina totales adicionada a muestras de maíz.

Concentración	DS
0.20	0.17
0.15	0.47
0.10	0.37

Estudio de la precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)

El cuadro 5, resume los resultados obtenidos por operador (1 y 2), en cada ensayo ejecutado durante los 5 días (lunes, martes, miércoles, jueves y viernes) y se presentan los valores de la media, para analizar el comportamiento de cada operador por día, calculadas a partir de los resultados obtenidos en las muestras de maíz. El operador 1, las concentraciones de aflatoxinas son menores en comparación con el operador 2, para los días: lunes, miércoles, jueves y viernes.

Los resultados obtenidos por el operador 2, son relativamente más cercanos al valor esperado de 2 ppb.

Cuadro 5. Resultados del contenido de aflatoxina totales y valores de la media obtenido por operador, para los cinco días en muestra de maíz (*Zea mays* L.).

Contenido de aflatoxina (ppb)					
Operador	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
1	1.9623	2.0162	1.9555	1.9450	1.9662
	1.9720	1.9631	1.9550	1.9434	1.9678
	1.9610	1.9686	1.9547	1.9450	1.9662
	1.9672	2.0230	1.9535	1.9413	1.9690
	1.9588	2.0110	1.9572	1.9415	1.9617
	1.9318	1.9613	1.9516	1.9496	1.9627
	1.9269	1.9617	1.9675	1.9491	1.9676
	1.9278	1.9980	1.9716	1.9425	1.9701
	Media	1.9510	1.9879	1.9583	1.9447
2	2.0254	2.0231	1.9992	1.9679	1.9936
	2.0075	2.0388	2.0271	1.9758	2.0042
	1.9983	1.9781	2.0034	1.9741	2.0068
	2.0031	1.9738	1.9999	1.9676	2.0059
	2.0012	1.9809	2.0005	1.9833	2.0710
	2.0007	1.9757	2.0063	1.9702	2.0081
	1.9891	1.9806	1.9987	1.9723	1.9994
	1.9873	1.9788	2.0074	1.9793	1.9989
	Media	2.0016	1.9912	2.0053	1.9738

En el cuadro 6, se encuentran los valores de rango (r) para cada operador/día, el rango promedio por operador para los 5 días y el rango de ambos operadores por los 5 días. Los resultados para el intervalo entre el valor máximo y el valor mínimo para el operador 1 por día, es menor a los obtenidos por el operador 2, con excepción del día lunes, donde el rango de datos del operador 1 (0.045) fue superior al operador 2 (0.038).

Para el rango promedio por operador para los cinco días, se observa una diferencia de 0.01, siendo el operador 2 quien presentó el mayor valor de aflatoxina totales, sin embargo, no representa una diferencia significativa entre

ambos operadores.

Cuadro 6. Valores de rango (r) para cada operador/día, rango promedio por operador para los 5 días y rango de ambos operadores por los 5 días.

Op	Lunes(r)	Martes(r)	Miércoles(r)	Jueves(r)	Viernes(r)	Promedio(\bar{r})
1	0.045	0.062	0.020	0.008	0.007	0.03
2	0.038	0.065	0.028	0.016	0.077	0.04
\bar{R} (1 y2)	0.03668					

El cuadro 7, se presentan los resultados de la media general, la desviación estándar de la repetibilidad (Sr), porcentaje del coeficiente de variación de la repetibilidad (%CVr), y la desviación estándar (SR) y porcentaje del coeficiente de variación (%CVR) de la reproducibilidad.

Tanto la Sr como el %CVr, son menores a la obtenida en la reproducibilidad para los 5 días (Anexo 4). Para el día martes el %CV de ambos operarios presentan mayor variabilidad de los datos con respecto a la media, en comparación con los demás días de la semana. Sin embargo, los resultados obtenidos entran en los criterios de aceptación descritos por la AOAC (2002) y el Codex Alimentarius (2002), donde el %CVr debe ser ($\leq 15\%$ y $\leq 30\%$) y el %CVR debe ser ($\leq 32\%$ y $\leq 30\%$) para concentraciones ≤ 10 ppb y ≤ 1 ppb.

Cuadro 7. Valores de media general, desviación estándar de repetibilidad (Sr), desviación estándar de reproducibilidad (SR), porcentaje del coeficiente de variación de repetibilidad (%CVr) y porcentaje del coeficiente de variación de reproducibilidad (%CVR) de los resultados del contenido de aflatoxina total en muestras de maíz obtenidos por día.

Día	Media	Sr	%CVr	SR	%CVR
Lunes	1.976	0.016	0.8	0.038	1.9
Martes	1.990	0.026	1.3	0.088	4.0
Miércoles	1.982	0.008	0.4	0.026	1.3
Jueves	1.959	0.004	0.2	0.029	1.4
Viernes	1.989	0.018	0.2	0.035	1.7

Cálculo (R&R)

En el cuadro 8, se presentan los porcentajes de R&R. El %R&R calculados para la metodología Scientia et Technica, 2007, fue de 1.48% y por el método de Ford Motor Company (Measurement Systems Analysis, reference manual, 1995) 1.43% (Anexo 5), por lo cual, no existen diferencias significativas entre los métodos empleados en el análisis, por lo tanto, presenta un buen sistema de medición, ya que el % R&R es menor al 10% y según Bissell, 1994 y Scientia et Technica, 2007, si el % R&R es menor de 10% representa un buen sistema de medición. Sin embargo, el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración (Scientia et Technica, 2007) indica lo siguiente:

Si la reproducibilidad es mayor que la repetibilidad, las causas pueden ser: El operador necesita mejor entrenamiento en cómo utilizar y leer los resultados en el instrumento, la indicación del instrumento no es clara, no se han mantenido condiciones de reproducibilidad (ambientales, montaje y ruidos) y/o el instrumento de medición presenta deriva.

El porcentaje (%) de reproducibilidad para ambos métodos fue mayor que el % de repetibilidad, por lo cual, se infiere en el método de análisis ocurrió una falla en la reproducibilidad, la misma, según Qualltrocchi *et al.*, (1992) pudo deberse a:

- Integración deficiente: integración de ruidos en la línea base, lo que nos permite tener errores en la cuantificación del analito, ya que dificulta la definición de la base del pico.
- Error en el momento de adición del analito (falla en la utilización de la micropipeta).
- Errores instrumentales del equipo.
- Analito inestable.
- Variación de presión del sistema: puede ser originado por defectos en la

desgasificación o presencia de impurezas en la fase móvil, lo que produce derivas en la línea base.

- Deficiencia de la bomba cuaternaria, la cual afecta la presión del sistema y por lo tanto variación en la presión del sistema.

Cuadro 8. Resultados del %R&R mediante el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad, por la Universidad Tecnológica de Pereira (Scientia et Technica 2007) y por el método de la Ford (Measurement Systems Analysis, reference manual, 1995).

Método	N	% Repetibilidad	% Reproducibilidad	%R&R
Método de la universidad tecnológica de Pereira (Scientia et Technica, 2007).	80	0.81	1.24	1.48%
Metodo de la Ford (Measurement Systems Analysis, reference manual, 1995).	80	0.07	0.13	1.43%

CONCLUSIONES

La metodología analítica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), permitió la cuantificación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) en las muestras de maíz, a las cuales, se les adicionó las mismas. Cumpliendo con los parámetros estadísticos que permiten validar el método de ensayo.

El método analítico utilizado presenta linealidad, alta sensibilidad a los límites de detección y cuantificación, así como precisión y exactitud (repetibilidad y reproducibilidad), cumpliendo con los criterios estadísticos de cada prueba, lo que conduce a obtener resultados seguros.

RECOMENDACIONES

Se debe garantizar el adiestramiento de los analistas, para efectuar la integración manual de los picos y poder cuantificar de forma correcta el analito de interés por HPLC, así como también, en el uso de la micropipeta.

Para análisis que requieran alta sensibilidad y selectividad es preferible el uso de detector electroquímico (Cobra -cell).

Se debe realizar una confirmación del método analítico empleado anualmente, para verificar su funcionamiento, instrumentos y analistas del equipo, y así asegurar que los resultados obtenidos en el análisis sigan respondiendo a los fines previstos.

Es necesaria la capacitación de los analistas en los métodos y cálculos estadísticos, para la determinación de los parámetros de desempeño en la validación de un método de análisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abarca, L.; Bragulat, R.; Castellá, G.; Accensi, F.; Cabañes, J. 2000. Hongos productores de micotoxinas Emergentes. Rev Iberoam Micol. 17: 63-68.
2. AEFI. 2001. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos. Monografía. Comisión de normas de Buena fabricación y control de calidad. Barcelona; 332p.
3. Aguirre, O.; Pérez, J.; Pujol, M. 2001. Validación de métodos analíticos, ed. A.E.F. Industria. Monografías de AEFI. Barcelona, España. 23-134p.
4. ANVISA. 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brazilian Sanitary Surveillance Agency: Resolução (Brazil) 11:3.
5. Arrieta, A. D. 2013. Relación entre contenidos de aflatoxinas totales y aflatoxinas B1 en maíz de cosecha en Venezuela. Trabajo de Maestría. Sc. Universidad Simón Bolívar. 59p.
6. Arroyo, N.; Manzanares, J.; Pérez, H.; Gracia, L.; Campaña, A. 2014. Control de micotoxinas en alimentos. Granada, España; Universidad de Granada. Boletín Nro. 7:17.
7. Association Official Analytical Chemistry (AOAC). 2000. Método 49.2.18. Official Method 991.31 Aflatoxins in Corn, Raw peanuts, and Peanut Butter. 22-24.
8. Association Official Analytical Chemistry (AOAC). 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.12-19.
9. Bissell, D.1994. Statistical Methods for Spc And Tqm (Text In Statistical Science) Primera Edición. Editorial Shapman Shall.371 p.

10. Bustamante, J.; Carrascal, L. 2010. Estandarización de la técnica espectrofotométrica (uv-vis) para la cuantificación de antraquinonas presentes en productos a base de aloe vera. Trabajo de Grado. Pereira, Colombia; Universidad Tecnológica de Pereira. 61p.
11. Chavarri, M. 2010. Contribución al conocimiento de los mohos toxigenicos y micotoxinas en maíz en Venezuela. Trabajo de Ascenso. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 22p.
12. Chavarri., M. 2015. Incidencia de mohos y aflatoxinas en algunas especies de Fabáceas, Poáceas y sus derivados. Trabajo de Ascenso a Agregado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 40 p.
13. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) 1987. Norma 1935-87. Maíz para uso industrial. Caracas. Venezuela. 13p.
14. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) 1997. Norma 2972-2. Exactitud (Veracidad y Precisión) métodos de medición y resultados. Parte 2: método básico para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad de un método estándar de medición. Fondonorma. Caracas, Venezuela. 41p.
15. Codex Alimentarius. 2013. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del codex sobre contaminantes de los alimentos. documento de debate sobre las aflatoxinas en los cereales. Séptima reunión Moscú, Federación Rusa. 18p.
16. Codex Alimentarius. 2002. Programa conjunto FAO/OMS. Revisión de los criterios basados en el rendimiento de los métodos de análisis para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Comité del codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Decimacuarta sesión, Washington D.C., EE.UU. 13p.
17. Deng, S.; Tian, L.; Liu, F.; Jin, S.; Liang, G.; Yang, H.; Du, Z.; Liu, Y. 2010. Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in Tilapia (*Oreochromis niloticus* x

- O. aureus) during long-term dietary exposure. *Aquaculture*. Atlanta, Georgia. 307p.
18. Durán, C.; Castillo, P. 2006. Las micotoxinas: metabolitos secundarios de los hongos filamentosos. *Educación Química*. 128p.
 19. Duffau, B.; Rojas, F.; Guerrero, I.; Roa, L.; Rodríguez, R.; Soto, M.; Aguilera, M.; Sandoval, S. 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Santiago, Chile. 66p.
 20. Duarte, S.; Villamil, L. 2006. Micotoxinas en la Salud Pública; *Rev. salud pública (Colombia)* 8:129-135.
 21. EURACHEM. 2005. Guía de laboratorio para la validación de métodos. Los Cués. México. 67p.
 22. Ford Motor Company. 1995. Measurement systems analysis. Reference Manual. Second Edition.
 23. Gimeno, A. 2004. Aflatoxina M1 en leche. Riesgo para la salud pública prevención y control. Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA), Alimentação Animal. 49: 32-44.
 24. Gimeno, A.; Martins, M. 2003. Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Talleres gráficos del SRL, Buenos Aires (Argentina) 1:160p.
 25. Guía de Cromatografía. 2008. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 11p.
 26. Herrero, L. 2012. Puesta a punto y validación de un método de análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales. Trabajo de máster. Universidad Zaragoza. 56 p.

27. Huang, B., Han, Z., Cai, Z., Wu, Y., Ren, Y. 2010. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 662, 62-68.
28. Instituto de Salud Pública. 2013. Informe de Resultados de Vigilancia de Laboratorio Micotoxinas en Alimentos. Chile. 5p.
29. ISO 3534-1. 1993. Statistics - Vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms. ISO, Ginebra. 54p.
30. ISO/IEC 17025. 2005. Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayos y calibración.
31. Luna, L. 2012. Estandarización de los parámetros de validación de un método analítico para cuantificar la concentración de metanol en bebidas alcohólicas utilizando cromatografía de gases. Trabajo de grado. Universidad Técnica Ambato. Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos. 83p.
32. Morris, L. 2011. Determinación de aflatoxinas en muestras de maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*) para consumo humano en cinco departamentos de la Costa Caribe Colombiana mediante cromatografía de alta eficiencia durante seis meses en 2011. Tesis de Grado. Bogotá, Colombia; Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina. 50p.
33. Otta, K.; Papp, E.; Bagócsi, B. (2000). Determination of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 882, 11–16.
34. Pimentel, M. 2007. Conceptos básicos de cromatografía líquida de alta resolución. Trabajo de grado. Veracruz, México; Universidad Veracruzana. 62p.

35. Qualttrocchi, O.; S. Andrizzi; R. Laba. 1992. Introduccion a la HPLC. Aplicación y práctica. Argentina, Buenos Aires. 407p.
36. R-Biopharm. 2005. Aflaprep. Aplicación de columnas de inmunoafinidad para la preparacion de muestras previo al análisis de aflatoxinas por HPLC. 6p.
37. Rodríguez, A.; B. Luna; L. Chávez; J. Mosquera; M. Zaldívar. 2005. Validación de un método de determinación de Na, K, Cd, Pb y Hg por Espectrometría de Absorción Atómica en policosanol y extracto purificado de cera de caña. Cenic. 36:9-14.
38. Rius, X.; G. Keric.; E. Parra.; J. Crespo.; F. Blondeau. 2000. La validación de métodos analíticos. Revista Técnicas de Laboratorio, ISSN: 0371-9936. 252:382-385.
39. Saez, A.; Camean, A.; Herrera, A.; Martinez, R.; Paseiro, P.; Biesa, P. 2010. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos. Revista del comité científico de la AESAN, ISSN 1885-6586. 14:29.
40. Sandoval, G. 2013. Determinación de aflatoxinas totales, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en matriz de cereales: maíz y cebada. Trabajo de grado. Ecuador; Universidad Central del Ecuador. 76p.
41. Scientia et Technica, 2007. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica ntc- iso/iec 17025. Universidad Tecnológica de Pereira. 35p.
42. Soriano, J.; J. Molto.; V. Manes.; A. López.; J. García.; F. Pérez.; C. Gregori, E. 2007. Micotoxinas en alimentos. Madrid, España. Diez de

Santos. 393p.

43. Sook, H.; Kim, H.; Hwang, J.; Chung, D. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102, 385–391.
44. UNODC. 2010. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Nueva York. 65p.
45. Urrego J.; Díaz, G. 2006. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev. Farmacéutica (Colombia)* 54:109-110.
46. USFDA, 2000. Food and Drug Administration-Guidance for Industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. 4p.
47. Verschae, M. 2005. Detección y cuantificación de efedrina en orina por HPLC. Santiago, Chile; Universidad de Chile. 66p.

ANEXOS

Anexo 1. Cálculo de linealidad.

Concentración	Área (AFT)	Ppb
2	284.7502	1.9219
1.5	224.9898	1.5055
1	163.3246	1.1067
0.5	98.9212	0.6604
0.25	39.6499	0.2655
media	162.3271	1.0920

Dato	Xi	Yi	Xi.Yi	Xi ²	Yi ²
1	1.92	284.75	547.26	3.69	81,082.68
2	1.51	224.99	338.72	2.27	50,620.41
3	1.11	163.32	180.75	1.22	26,674.92
4	0.66	98.92	65.33	0.44	9,785.40
5	0.27	39.65	10.53	0.07	1,572.11
Σ	5.46	811.64	1,142.59	7.69	169,735.53

Formulas

$$a = \frac{\sum Xi.Yi - (\sum Xi . \sum Yi / n)}{\sum Xi^2 - (\sum Xi)^2 / n} \qquad b = \frac{\sum Yi - a . \sum Xi}{n}$$

$$a = \frac{1142,49 - (5.46 \times 811.64)/5}{7.69 - 5.46^2/5} = \frac{256.2833126}{1.72931316} = 148.1994$$

$$b = \frac{811.64 - (148.1995 \times 5.46)}{5} = 0.4933$$

Ecuación de la Recta: $Y = 148.1995X + 0.4933$

$$r = \frac{\sum Xi.Yi - (\sum Xi . \sum Yi / n)}{((\sum Xi^2 - (\sum Xi)^2 / n) (\sum Yi^2 - (\sum Yi)^2 / n))^{1/2}}$$

$$r = \frac{1142.59 - (5.46 \times 811.64)/5}{((7.69 - 5.46^2/5) (169735.53 - 811.64^2/5))^{1/2}} = 1.0004.$$

Anexo 2. Cálculo límite de detección y límite de cuantificación.

Concentración	Área (AFT)
0.2	30.7862
0.15	22.6357
0.1	16.0484

Cálculo de respuesta a concentración cero (concentraciones menores).

Dato	X_i	Y_i	$X_i \cdot Y_i$	X_i^2	Y_i^2
1	0.21	30.79	6.45	0.04	947.79
2	0.15	22.64	3.50	0.02	512.38
3	0.11	16.05	1.75	0.01	257.55
Σ	0.47	69.47	11.70	0.08	1,717.72

$$a = \frac{\Sigma X_i \cdot Y_i - (\Sigma X_i \cdot \Sigma Y_i / n)}{\Sigma X_i^2 - (\Sigma X_i)^2 / n}$$

$$b = \frac{\Sigma Y_i - a \cdot \Sigma X_i}{n}$$

$$a = 116.62$$

$$b = 4.76$$

Ecuación de la Recta concentraciones menores: $Y = 116.62X + 4.76$

Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero.

X	DS
0.21	0.17
0.15	0.47
0.11	0.37

Dato	Xi	Yi	Xi.Yi	Xi ²	Yi ²
1	0.21	0.17	0.04	0.04	0.03
2	0.15	0.47	0.07	0.02	0.22
3	0.11	0.37	0.04	0.01	0.14
Σ	0.47	1.01	0.15	0.08	0.39

$$a = \frac{\sum X_i \cdot Y_i - (\sum X_i \cdot \sum Y_i / n)}{\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2 / n}$$

$$b = \frac{\sum Y_i - a \cdot \sum X_i}{n}$$

$$a = -2.09$$

$$b = 0.66$$

Ecuación de la Recta (concentración vs desviación estándar):

$$Y = -2.09X + 0.66$$

Y_{bl}: estimación de respuesta a concentración cero (respuesta del blanco)

S_{bl}: estimación a la desviación estándar del blanco.

$$b = 148.1995$$

$$Y_{bl} = 4.76$$

$$S_{bl} = 0.66$$

Formulas:

Límite de detección: $(Y_{bl} + 3 S_{bl}) / b = 0.0456$

Límite de Cuantificación: $(Y_{bl} + 10 S_{bl}) / b = 0.0770$

Anexo 3. Cálculo de la exactitud con 3 niveles de concentración.

Agregado 1 ppb.

G2	G1	B2	B1	AFT (Área)	Dilución	FR	ppb
7.9183	35.7201	42.4372	84.8352	170.9108	0.10096	0.11692	1.1581
7.9578	30.5898	37.7536	87.8199	164.1211	0.10096	0.11228	1.1121
7.7791	32.8150	39.5752	92.3638	172.5331	0.10096	0.11803	1.1691
7.3532	29.5821	35.0448	87.9051	159.8852	0.10096	0.10938	1.0834
7.7454	28.7532	31.8752	80.7992	149.1730	0.10096	0.10205	1.0108
7.7507	31.4920	37.3372	86.7446	163.3246	0.1010	0.1117	1.1067

Agregado 1.5 ppb

nº	G2	G1	B2	B1	AFT (Área)	Dilución	FR	ppb
1	9.64835	44.2502	52.8688	121.66	228.4274	0.10224	0.1562	1.5285
2	9.62064	44.1683	51.3643	121.355	226.5082	0.10224	0.1549	1.5156
3	9.73533	42.5113	45.9393	118.362	216.5479	0.10224	0.1481	1.4490
4	10.487	44.0543	51.4922	120.635	226.6685	0.10224	0.1551	1.5167
5	9.23003	44.4537	52.0031	121.11	226.7968	0.10224	0.1552	1.5176
X	9.7443	43.8876	50.7335	120.6244	224.9898	0.10224	0.153919	1.5055

Agregado 2 ppb

f	G2	G1	B2	B1	AFT (Área)	Dilución	FR	ppb
	3.8661	56.4335	67.0476	153.388	290.7352	0.10136	0.1989	1.9623
	3.6843	57.0407	64.6173	153.7620	289.1043	0.10004	0.2026	2.0252
	3.8939	58.4273	67.8336	154.3710	294.5258	0.10004	0.2017	2.0161
	3.7609	58.9850	65.6791	154.6000	293.025	0.10028	0.2028	2.0227
	3.2989	56.5586	62.0013	152.9720	284.8308	0.10008	0.2001	1.9995
	3.7008	57.4890	65.4358	153.8186	290.4442	0.10036	0.2012	2.0052

Formulas

Desviación: $B = X - \bar{X}$

Desviación Relativa: $B\% = B/X \cdot 100$

Recuperación: $R = X/\bar{X} \cdot 100$

Donde: X= valor medio y \bar{X} = valor verdadero

Agregado	% Recuperación					DS
2	98.11	101.26	100.81	101.13	99.97	1.30
1.5	101.90	101.04	96.60	101.11	101.17	2.13
1	115.81	111.21	116.91	108.34	101.08	6.38

Formulas

$$s = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$$

$$RSD = s \cdot 100 / \bar{X}$$

$$T_{ob} = 100 - R \cdot (n)^{1/2} / RSD$$

Grados de libertad: $n - 1 = 5 - 1 = 4$ Ttabla: 2.1318

Para 2 ppb

R(n=5)	100.26
DS:	1.299
RSD	1.296

$$T_{ob} < T_{tabla} \quad 0.4495 < 2.1318$$

Para 1.5 ppb

R(n=5)	100.36
DS:	2.133
RSD	2.125

$$T_{ob} < T_{tabla} \quad 0.3794 < 2.1318$$

Para 1 ppb

R(n=5)	110.67
DS:	6.38
RSD	5.77

$$T_{ob} < T_{tabla} \quad 4.1431 < 2.1318$$

Anexo 4. Cálculos de la varianza de la repetibilidad (Sr^2), varianza intralaboratorio (SL^2), varianza de reproducibilidad (SR^2), desviación estándar de la repetibilidad (Sr) y reproducibilidad (SR) por día.

Formulas:

$$T1 = \sum x_i y_i \bar{y}_i$$

$$T2 = \sum x_i (\bar{y}_i)^2$$

$$T3 = \sum n_i$$

$$T4 = \sum n_i^2$$

$$T5 = \sum (n_i - 1) s_i^2$$

Donde:

n_i = es el número de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j . \bar{y}_i = es la media de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j .

S_i = es la desviación estándar de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j .

$T1$ = es la sumatoria por día de el numero de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j multiplicado por la media de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j .

T2 = es la sumatoria por día de el numero de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j multiplicado por la media de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j elevado al cuadrado.

T3 = es al sumatoria por día de el número de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j.

T4 = es al sumatoria por día de el número de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j elevado al cuadrado.

T5 = es al sumatoria por día de el número de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j menos uno (1) multiplicado por la desviación estándar de resultados de ensayo en la celda del operador i al nivel j.

Calculo de varianza: $Sr^2 = T5/T3-p$

Donde: p es el número de operadores.

$$\text{La varianza intra laboratorio: } SL^2 = \left[\frac{T2 - T3 - T1^2 - SR^2}{T3(p-1)} \right] \left[\frac{T3(p-1)}{T3^2 - T4} \right]$$

varianza de reproducibilidad : $SR^2 = Sr^2 + SL^2$

La desviación estándar de repetibilidad y la desviación estándar de reproducibilidad se calculo a través de la raíz cuadrada de las varianzas

Dia 1: lunes

$$T1 = (8 \times 1,95) + (8 \times 2,00)$$

$$T1 = 31,6$$

$$T2 = [8 \times (1,95)^2] + [8 \times (2)^2]$$

$$T2 = 62,42$$

$$T3 = 8 + 8$$

$$T3 = 16$$

$$T4 = (8^2 + 8^2)$$

$$T4 = 128$$

$$T5 = [(8 - 1) \times (0,019)^2] + [(8 - 1) \times (0,012)^2]$$

$$T5 = 3,535 \times 10^{-03}$$

$Sr^2 = \text{Varianza de Repetibilidad}$

$n = 2 \text{ operadores}$

$$Sr^2 = \frac{3,535 \times 10^{-03}}{16 - 2} = 2,525 \times 10^{-04} \Rightarrow 0,000525$$

$Sr = 0,0158$ (*Desviación estandar de la repetibilidad*)

Varianza Intralaboratorio

$$SL^2 = \left[\frac{62,42 \times 16 - (31,6)^2}{16(2-1)} - 2,525 \times 10^{-4} \right] \left[\frac{16(2-1)}{16^2 - 128} \right]$$

$$SL^2 = (9,7475 \times 10^{-3}) (0,125)$$

$$SL^2 = 1,218 \times 10^{-3}$$

$$SR^2 = Sr^2 + SL^2$$

$$SR^2 = 1,210 \times 10^{-3} + 2,525 \times 10^{-4} \quad \text{Varianza de Reproducibilidad}$$

$SR = 0,038$ *DS Reproducibilidad* \rightarrow Raíz cuadrada de la varianza

Día 2: martes

$$T1 = (8 \times 1,998) + (8 \times 1,9788)$$

$$T1 = 31,8$$

$$T2 = [8 \times (1,998)^2] + [8 \times (1,9788)^2]$$

$$T2 = 63,26$$

$$T3 = 8 + 8$$

$$T3 = 16$$

$$T4 = (8^2 + 8^2)$$

$$T4 = 128$$

$$T5 = [(8 - 1) \times (0,027)^2] + [(8 - 1) \times (0,025)^2]$$

$$T5 = 9,478 \times 10^{-03}$$

$$Sr^2 = \frac{9,478 \times 10^{-03}}{16 - 2} = 6,77 \times 10^{-04} \text{ Varianza de Repetibilidad}$$

$$Sr = 0,026 \text{ (Desviación Estandar de la Repetibilidad)}$$

Varianza Intralaboratorio

$$SL^2 = \left[\frac{63,26 \times 16 - (31,8)^2}{16(2-1)} - 6,77 \times 10^{-4} \right] \left[\frac{16(2-1)}{16^2 - 128} \right]$$

$$SL^2 = (0,0568) (0,125)$$

$$SL^2 = 7,1 \times 10^{-3}$$

$$SR^2 = Sr^2 + SL^2$$

$$SR^2 = 6,77 \times 10^{-4} + 7,1 \times 10^{-3} \text{ Varianza de Reproducibilidad}$$

$$SR = 0,088 \text{ DS Reproducibilidad} \rightarrow \text{Raíz cuadrada de la varianza}$$

Día 3: miercoles

$$T1 = (8 \times 1,9583) + (8 \times 2,0053)$$

$$T1 = 31,71$$

$$T2 = 62,85$$

$$T3 = 8 + 8$$

$$T3 = 16$$

$$T4 = (8^2 + 8^2)$$

$$T4 = 128$$

$$T5 = [(8 - 1)x (0,00717)^2] + [(8 - 1)x (0,009)^2]$$

$$T5 = 9,268x10^{-04}$$

$$Sr^2 = 6,62x10^{-05} \text{ Varianza de Repetibilidad}$$

$$Sr = 0,008136 \text{ (Desviación Estandar de la Repetibilidad)}$$

Varianza Intralaboratorio

$$SL^2 = \left[\frac{62,85 \times 16 - (31,71)^2}{16(2-1)} - 6,62x10^{-5} \right] \left[\frac{16}{128} \right]$$

$$SL^2 = 5,846x10^{-4}$$

$$SR^2 = Sr^2 + SL^2$$

$$SR^2 = 6,5089x10^{-4} \text{ Varianza de Reproducibilidad}$$

$$SR = 0,026 \text{ DS Reproducibilidad} \rightarrow \text{Raíz cuadrada de la varianza}$$

Día 4: jueves

$$T1 = (8 \times 1,9447) + (8 \times 1,9738)$$

$$T1 = 31,35$$

$$T2 = 61,42$$

$$T3 = 8 + 8$$

$$T3 = 16$$

$$T4 = (8^2 + 8^2)$$

$$T4 = 128$$

$$T5 = [(8 - 1)x (0,003)^2] + [(8 - 1)x (0,006)^2]$$

$$T5 = 3,15 \times 10^{-04}$$

$$Sr^2 = 2,25 \times 10^{-05} \text{ Varianza de Repetibilidad}$$

$$Sr = 0,004743 \text{ (Desviación Estandar de la Repetibilidad)}$$

Varianza Intralaboratorio

$$SL^2 = \left[\frac{61,42 \times 16 - (31,35)^2}{16(2-1)} - 2,25 \times 10^{-5} \right] \left[\frac{16}{128} \right]$$

$$SL^2 = 8,035 \times 10^{-4}$$

$$SR^2 = Sr^2 + SL^2$$

$$SR^2 = 8,26 \times 10^{-4} \text{ Varianza de Reproducibilidad}$$

$$SR = 0,029 \text{ DS Reproducibilidad} \rightarrow \text{Raíz cuadrada de la varianza}$$

Día 5: viernes

$$T1 = (8 \times 1,9664) + (8 \times 2,01)$$

$$T1 = 31,81$$

$$T2 = 63,25$$

$$T3 = 8 + 8$$

$$T3 = 16$$

$$T4 = (8^2 + 8^2)$$

$$T4 = 128$$

$$T5 = [(8-1) \times (0,003)^2] + [(8-1) \times (0,025)^2]$$

$$T5 = 4,438 \times 10^{-03}$$

$$Sr^2 = 3,17 \times 10^{-04} \text{ Varianza de Repetibilidad}$$

$$Sr = 0,018 \text{ (Desviación Estandar de la Repetibilidad)}$$

Varianza Intralaboratorio

$$SL^2 = \left[\frac{62,25 \times 16 - (31,81)^2}{16(2-1)} - 3,17 \times 10^{-4} \right]$$

$$SL^2 = 9,283 \times 10^{-4}$$

$$SR^2 = Sr^2 + SL^2$$

$$SR^2 = 1,2453 \times 10^{-4} \quad \text{Varianza de Reproducibilidad}$$

$$SR = 0,035 \quad \text{DS Reproducibilidad} \rightarrow \text{Raíz cuadrada de la varianza}$$

Anexo 5. Cálculo de precisión (R&R).

- **Metodo de ford**

Repetibilidad

$$\sigma_e = \bar{R}/d_2$$

d₂: 2.86 para 2 operadores; σ_e : desviación estándar de la repetibilidad;

Rango promedio para ambos operadores (\bar{R}) = 0.0366.

$$\sigma_e = 0.01279.$$

Repetibilidad: 5.15 $\sigma_e = 0.0658$.

5.15 representa el 99% para una distribución normal.

Reproducibilidad

$$R_o = \bar{R}_{op1} - \bar{R}_{op2} \quad R_o: \text{diferencia de media de ambos operadores.}$$

$$R_o = 1.997 - 1.962.$$

$$R_o = 0.035.$$

Desviación estándar de la reproducibilidad:

$$\sigma_o = R_o/d_2 \quad \text{donde, } d_2: 1.41$$

$$\sigma_o = 0.0248.$$

Reproducibilidad: 5.15. $R_o/d_2 = 0.1278$.

Reproducibilidad ajustada: $\sqrt{(5.15 \cdot Ro/d)^2 - ((5.15 \sigma_e)^2 / nr)} = 0.1273$.

Desviación estándar del sistema de medición.

$$\sigma_m = \sqrt{\sigma_e^2 + \sigma_o^2} = 0.0278.$$

Variación del sistema de medición R&R = 5,15 σ_m

Gage R&R = 0.1432.

%GR&R = $\sigma_m / \text{tolerancia} \times 100 = 1.43\%$

- **Método promedios y rangos (Scientia et Technica 2007).**

Rango de cada operador

$$r = X_{\max} - X_{\min}$$

Rango promedio de cada operador

$\bar{R} = 1/n \sum_{i=1}^n r$ donde, n: es el número de mediciones realizadas por cada operador.

Rango promedio de todos los rangos

$$\bar{\bar{R}} = 1/m \sum_{i=1}^m \bar{R} = 0.037$$

Donde

m: es el número de operadores y \bar{R} es el rango promedio de cada operador.

Operador	Días					R
	r1	r2	r3	r4	r5	
1	0.045	0.062	0.020	0.008	0.007	0.028
2	0.038	0.065	0.028	0.016	0.077	0.045

Cálculo del porcentaje de la repetibilidad de las mediciones.

$$\% \text{ Repetibilidad: } K1 \times \bar{\bar{R}} / T \times 100$$

Donde:

K1: es una constante que depende del número de mediciones realizadas por cada operador y proporciona un intervalo de confianza del 99% para estas características.

$\bar{\bar{R}}$: es el rango promedio de todos los rangos.

T: es la tolerancia del equipo.

donde, T: 10 y K1: 2.21

Valores de constantes K1 y K2.

Número de ensayos	2	3	4	5
K1	4.56	3.05	2.50	2.21
Número de operadores	2	3	4	5
K2	3.65	2.70	2.30	2.08

%Repetibilidad= 0.8.

Calculo de la medición promedio de cada operador.

$$\bar{X}_i = 1/nr \sum_{i=1}^n x_i$$

Donde:

n : es el número de ensayos por operador.

r: es el número de partes.

x: es cada una de las medidas del operador.

$X_{i_{op1}} = 1.9616$; $X_{i_{op2}} = 1.9966$.

Calculo de la diferencia entre el promedio mayor y el promedio menor de los operadores.

$\overline{XD} = X_{max} - X_{min} = 0.0349$.

Calculo del porcentaje de la repetibilidad.

$$\% \text{Reproducibilidad} = \frac{\sqrt{(K2 \cdot \overline{XD})^2 - (K1 \cdot \overline{R})^2 / nr}}{T} \times 100$$

Donde:

K2: es una constante que depende del número de operadores y proporciona un intervalo de confianza del 99% para estas características.

\overline{XD} : es la diferencia entre el promedio mayor y promedio menor de los operadores.

n: es el número de ensayos por operador.

r : es el número de partes medidas.

T : es la tolerancia del equipo.

donde, T: 10 y K2: 3.65

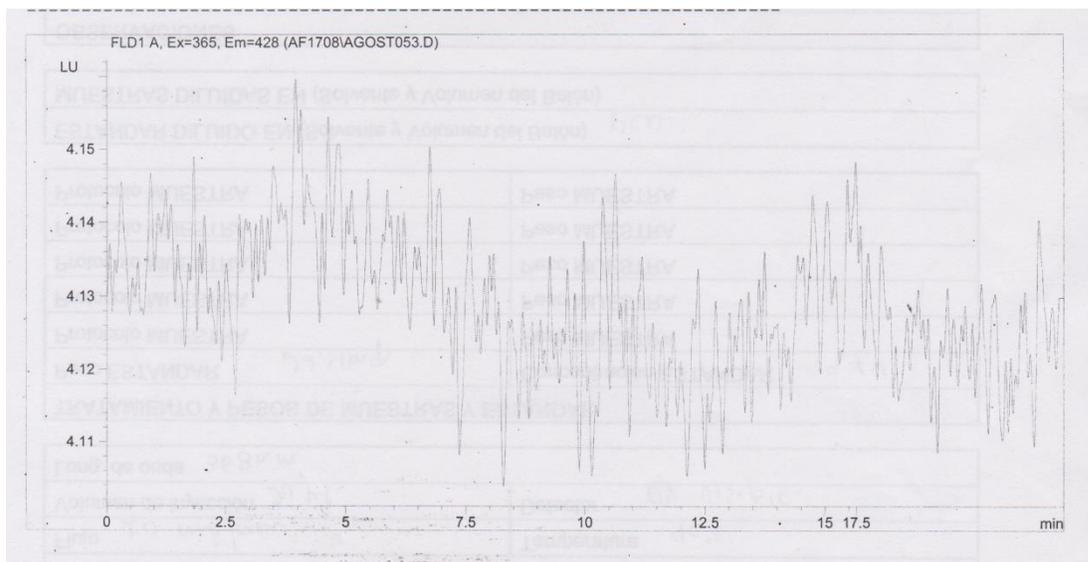
%Reproducibilidad= 1.24.

$$\%R\&R = \sqrt{(\text{Repetibilidad})^2 + (\text{Reproducibilidad})^2}$$

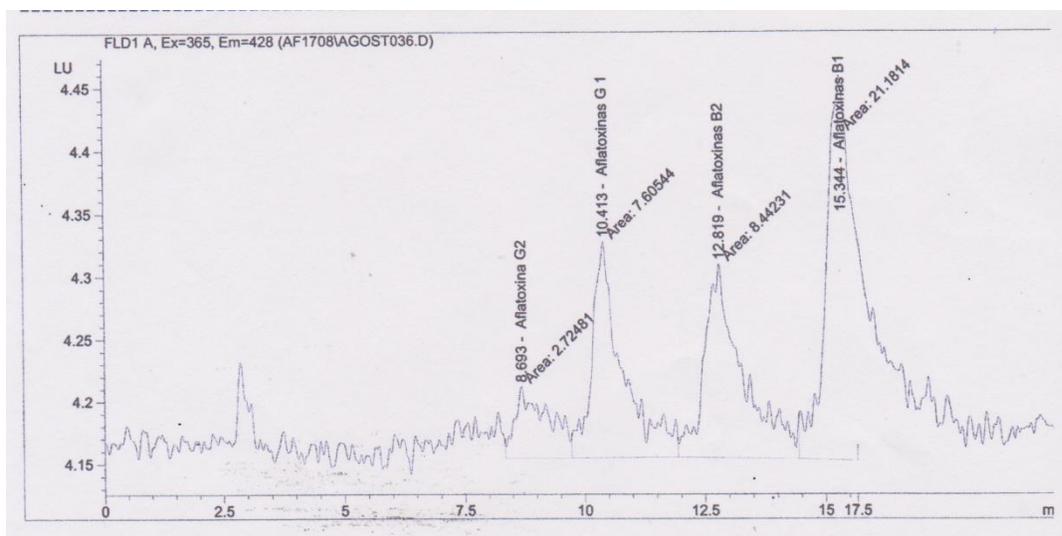
%R&R= 1.48%

Anexo 6. Cromatogramas de diferentes niveles de concentración.

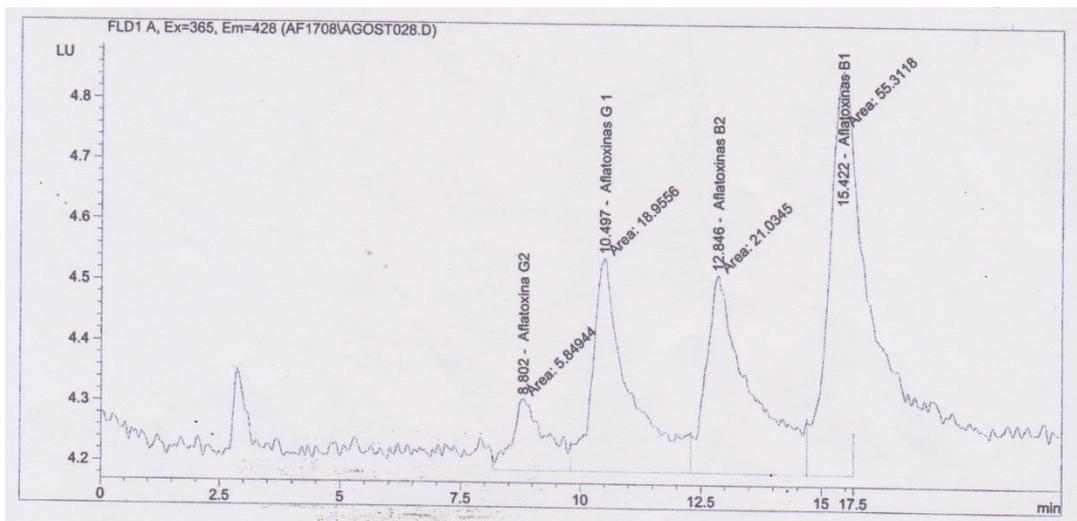
Cromatograma: concentración 0 ppb.



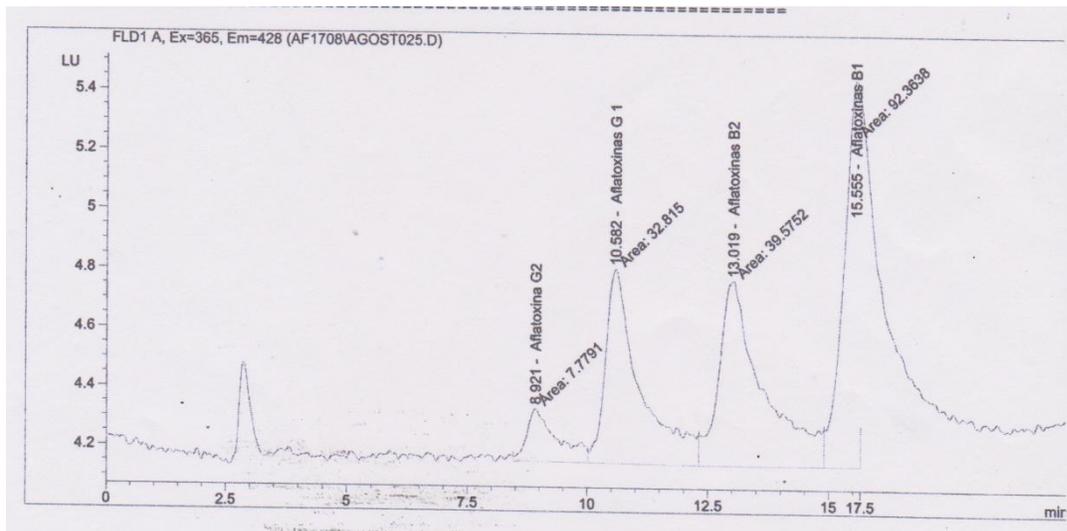
Cromatograma: concentración 0.25 ppb.



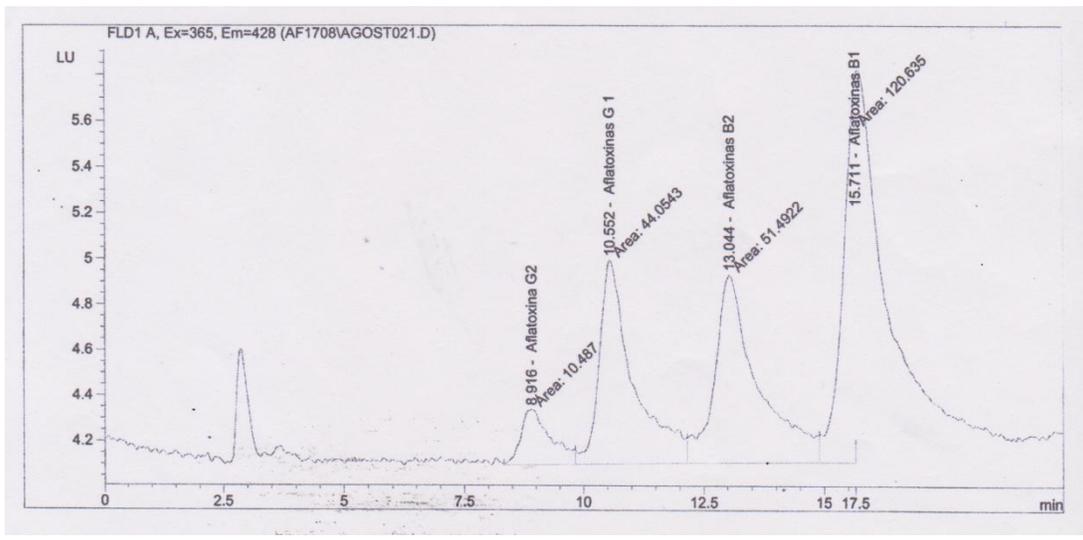
Cromatograma: concentración 0.5 ppb.



Cromatograma: concentración 1 ppb.



Cromatograma: concentración 1.5 ppb.



Cromatograma: concentración 2.0 ppb.

