



Evaluación de la homogeneidad de la muestra y estudio intralaboratorio de la precisión intermedia en la determinación de aflatoxinas en maní de exportación

Gustavo Delgado

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-LEÓN, Facultad de Ciencias y Tecnología, Departamento de Química, Laboratorio de Análisis de Trazas de Metales Pesados (LATMP), edificio de Ciencias Básicas, León, Nicaragua. Tel: 505 311 5013, ext: 1130. Fax: 505 311 4012.
e-mail: gusdel53@yahoo.es o nhernandez@seragro.com.ni

Norma Hernández, Cecilia Moreno, Sergio Grillo, Massiel Meza, Leticia Méndez y Abad Rojas
Laboratorio SER-AGRO S.A., Km 138 carretera Chinandega-Corinto,
Tel:2340 3493. (Acreditado por la ONA-MIFIC).

Recibido: 15 Diciembre, 2013

Aceptado: Marzo 28, 2014

RESUMEN

En el presente trabajo se ha aplicado el diseño experimental factorial piramidal para evaluar la homogeneidad en el contenido de aflatoxinas en muestras de maní de exportación, utilizando como técnica de medición analítica la cromatografía líquida de alto desempeño con detector de fluorescencia (HPLC-FLD).

Este diseño permitió evaluar la precisión del método de ensayo y se comparó con valores de referencia del Codex Alimentario. En primer lugar, la muestra del lote se dividió en 3 submuestras, las cuales fueron tratadas independientemente, tomando en cuenta el instrumento de medición, el analista, y diferentes porciones de ensayo.

Al aplicar el análisis de varianza de 4 factores, se demostró que el contenido de aflatoxinas en el lote de maní en estudio está distribuido en forma heterogénea. A cada submuestra, se aplicó un diseño ANOVA 3F y se evaluó la precisión del método mediante el cálculo de las desviaciones estándares relativas de repetibilidad (RSDr) y de reproducibilidad intralaboratorio (RSDLab), encontrándose que, a pesar de algunas diferencias en el análisis de varianza, los valores de RSD son menores que los establecidos en el Codex. Esto significa que el método de ensayo utilizado cumple con la conformidad de los parámetros de precisión establecidos en normas internacionales.

Palabras Claves: Homogeneidad, aflatoxinas en maní por HPLC, repetibilidad, precisión intermedia.



INTRODUCCION

Por su calidad, el maní producido en Nicaragua es uno de los productos que más se exporta a Latinoamérica, Estados Unidos y Europa. En los últimos años el ingreso de divisas debido a la exportación de maní ha venido incrementando significativamente. En el año 2007 el ingreso fue de 56.4 millones de dólares, en el 2012 llegó a 132.6 millones y en el año 2013 el incremento previsto de la exportación era del 20% con respecto al 2012^[1]. Uno de los parámetros que caracteriza la calidad del maní es el contenido de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), entre las cuales la B₁ es la más tóxica y produce cáncer en el hígado^[2-5]. Dependiendo del país, el nivel de exigencia del contenido de aflatoxinas (B₁ y totales) en mg/kg es muy variado: para Europa es 2 para B₁ y 4 para las aflatoxinas totales, para Estados Unidos y Latinoamérica debe ser menor de 15 para B₁ y totales.

Para lograr el éxito en la exportación a estos países, fue necesario garantizar la calidad del producto a través de la mejora continua de sus procesos y la evaluación de la conformidad del laboratorio de control de calidad, que tiene acreditado el ensayo de aflatoxinas por cromatografía líquida de alto desempeño con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) ante la Oficina Nacional de Acreditación ONA-MIFIC[1]. La competencia técnica del laboratorio SER-AGRO, S.A., está basada en la norma técnica nicaragüense NTN 04 001 05 o su equivalente a la norma internacional ISO/IEC 17025:05^[6].

En estudios anteriores^[7,8] se ha evaluado la incertidumbre en la determinación de la aflatoxina B₁ sin tomar en cuenta la precisión que caracteriza la homogeneidad de la muestra ni la precisión intermedia o reproducibilidad intralaboratorio. El gran dilema en las industrias está entre la representatividad en el muestreo y la exactitud del método de ensayo, el cual involucra las etapas que van desde la homogeneización de la muestra del lote que llega al laboratorio hasta la lectura final en el instrumento de medición. Con mucha frecuencia, el muestreo no es tomado en cuenta en los laboratorios de ensayos, ya que generalmente el muestreo del producto no está bajo el control del laboratorio, sino que la muestra es suministrada por el cliente. En este caso, el cliente asume la responsabilidad de la extrapolación de los resultados analíticos al lote original.

Una vez la muestra es entregada al laboratorio, ésta debe ser homogeneizada antes de dividirla en submuestras. Cada submuestra debe ser tratada garantizando su homogeneidad respectiva en cuanto al contenido de aflatoxinas. Es probable que se obtenga heterogeneidad entre submuestras pero no dentro de las submuestras. Esta heterogeneidad puede deberse al crecimiento irregular de hongos, dependiendo de las condiciones de almacenamiento o de transporte del lote y otros factores como humedad relativa, temperatura, etc^[9].

En el presente estudio se pretende aplicar un diseño experimental multifactorial de análisis de varianza^[10,11] para evaluar la homogeneidad de las muestras y estimar la precisión de repetibilidad y reproducibilidad interna en las determinaciones de aflatoxinas B₁ y totales en maní de exportación, utilizando un programa de análisis de varianza elaborado en el cálculo simbólico MAPLE 17^[12,13].

1. TEORÍA

El diseño experimental multifactorial es una herramienta estadística poderosa para evaluar la homogeneidad de las muestras de ensayos y la precisión intermedia^[14,15]. Lo esencial es la identificación de los factores que pueden afectar los resultados de los análisis, por ejemplo para el caso de 4 factores se pueden asignar errores sistemáticos denominados a, b, c y d. El diseño del estudio de homogeneidad de materiales de ensayos en diferentes condiciones experimentales está basado en el siguiente modelo matemático.

$$x_{ijkl} = m + a_h + b_i + c_j + d_k + e_{h,i,j,k,l}$$

Donde $x_{h,i,j,k,l}$ es el resultado de la medición, m es el valor promedio global del mesurando (o esperanza matemática), a_h, b_i, c_j, d_k son los errores sistemáticos debido a los efectos de los factores A, B, C y D a los niveles h, i, j, k ; e_{ijkl} es el error aleatorio asociado, l representa el nivel de réplicas de las mediciones.

Se sabe que el desarrollo de hongos (*Aspergillus flavus*) que producen las aflatoxinas en cereales no se realizan en forma homogénea^[9] y por tanto es de asumir que el principal factor que puede provocar errores sistemáticos en la determinación de estas micotoxinas es la no homogeneidad en las muestras. Para el caso del maní el Reglamento Técnico del Mercosur recomienda dividir la muestra del lote en tres o cuatro partes o submuestras^[16] y luego evaluar la homogeneidad. Es importante también tomar en cuenta otros factores propios del laboratorio y que puedan afectar el mesurando.

Si se toma como referencia el modelo anterior (ec. 1) se puede estudiar el efecto de esos factores en la precisión de repetibilidad y la precisión intermedia, basada en el diseño experimental piramidal de 4 factores controlados y con números iguales de réplicas ($l=1 \dots n$). La figura 1 representa el esquema del diseño con los factores A, B, C, D y sus modalidades: $h=1 \dots o, i=1 \dots p, j=1 \dots q, k=1 \dots r$.

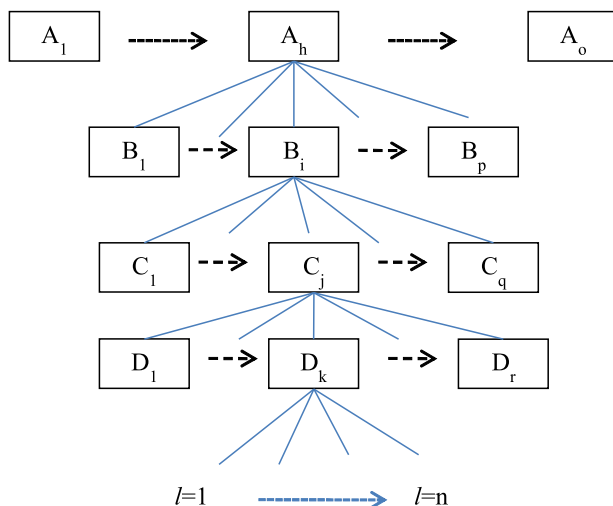


Figura 1. Diseño experimental piramidal de 4 factores controlados (A, B, C, D).



En este diseño se asume que los datos son homocedásticos y que los factores son independientes. El principio del análisis de varianza está basado en la suma de cuadrados de los factores y del componente aleatorio o errores residuales^[11,14]. El algoritmo utilizado para el cálculo de la suma de cuadrados con los grados de libertad (gl_i) se presenta en las siguientes ecuaciones:

$$SS_A = pqrn \sum_{h=1}^o (\bar{x}_h - \bar{x}_m)^2 \quad gl_A = o - 1 \quad (2)$$

$$SS_B = qrn \sum_h^o \sum_{i=1}^p (\bar{x}_{hi} - \bar{x}_i)^2 \quad gl_B = o(p - 1) \quad (3)$$

$$SS_C = rn \sum_h^o \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^q (\bar{x}_{hij} - \bar{x}_{hi})^2 \quad gl_C = op(q - 1) \quad (4)$$

$$SS_D = n \sum_h^o \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^q \sum_{k=1}^r (\bar{x}_{hijk} - \bar{x}_{hij})^2 \quad gl_D = opq(r - 1) \quad (5)$$

$$SS_e = \sum_h^o \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^q \sum_{k=1}^r \sum_{l=1}^n (x_{hijkl} - \bar{x}_{hijk})^2 \quad gl_r = opqr(n - 1) \quad (6)$$

Los resultados de la formulación anterior se pueden resumir en la tabla del análisis de varianzas de 4 factores, tal a como se detalla en la matriz de la tabla 1.

Tabla 1. Tabla ANOVA 4F.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrática Media
Factor A	SS _A	gl _A	CM _A =SS _A /gl _A
Factor B	SS _B	gl _B	CM _B =SS _B /gl _B
Factor C	SS _C	gl _C	CM _C =SS _C /gl _C
Factor D	SS _D	gl _D	CM _D =SS _D /gl _D
Residuales (r)	SS _e	gl _r	CM _r =SS _e /gl _r

El efecto de los factores es significativo si el estadístico Fc=CMi/CMr es mayor que el establecido en las tablas de la ley de Snedecor al 95% de nivel de confianza.

2.METODOLOGÍA

2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

Para la homogenización de la muestra del lote de maní se utilizaron dos equipos fabricados artesanalmente, un divisor de 14 salidas y un cuarteador. Para la reducción de las submuestras, se utilizaron 3 batidoras con tamaño de malla 14; para la corrida de los cromatogramas los instrumentos utilizados fueron dos cromatógrafos líquidos de alto desempeño con detector de fluorescencia (HPLC-FLD), marca Agilent, modelos 1100 (con columna de 25 cm) y 1260 (con columna de 15 cm). Ambos con la misma fase estacionaria C-18. Más detalles de los equipos y reactivos se encuentra en el procedimiento normalizado descrito en trabajos anteriores^[7].

2.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Los factores que representan las fuentes de variación que contribuyen a la variabilidad en la determinación de aflatoxina B1 en las condiciones rutinarias del laboratorio son: batidora donde la submuestra es reducida (A), instrumento HPLC (B), operador (C), toma de muestra de ensayo en 3 diferentes puntos (superficie, parte media, fondo) de la batidora (D). Cada analista realiza 3 repeticiones (Rep) de las mediciones. El diseño experimental se representa en la figura 2. Es necesario remarcar la independencia de los factores, por tanto no se toma en cuenta ninguna interacción.

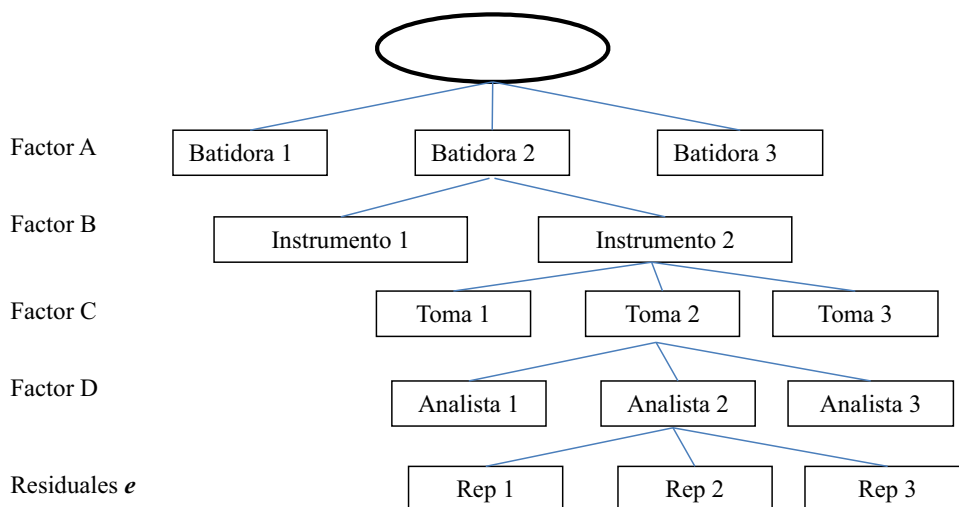


Figura 2. Diseño experimental de 4 factores en las condiciones del laboratorio.

2.3 PROCEDIMIENTO

De acuerdo al procedimiento para el análisis de aflatoxinas en maní^[7] las muestras se prepararon por homogenización del contenido del lote, utilizando el equipo divisor de 14 salidas y el cuarteador. Se recolectaron 3 porciones o submuestras de 10 kg, las cuales fueron reducidas respectivamente en 3 batidoras hasta obtener una pasta acuosa bien homogenizada. Las muestras de ensayo fueron tomadas de cada batidora a tres diferentes niveles: superficie, a la mitad y en el fondo. Por cada nivel se tomaron 3 porciones para ser distribuidas entre 3 analistas. Cada analista realizó el ensayo por triplicado, realizando las corridas de los cromatogramas en los 2 HPLC, el 1100 y el 1260.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 AFLATOXINA B₁

Los resultados del contenido de aflatoxina B₁ en las muestras de ensayos de maní en µg/kg se presentan la tabla 2, donde se pueden ver los distintos factores: batidora usada por submuestra; toma de muestra de ensayo a tres niveles de la batidora, uperficie(*T1*), parte media (*T2*) y en el fondo (*T3*); modelo de cromatógrafo (*I1* para HPLC 1260, *I2* para HPLC 1100); analistas (A1, A2, A3), realizando las mediciones en triplicado. Los resultados mostrados en la tabla no toman en cuenta el valor del recobrado.

Tabla 2. Valores de concentraciones de aflatoxina B₁ en µg/kg en muestra de maní de exportación distribuida en 3 batidoras, usando 2 HPLC y analizada por 3 analistas, en muestras de ensayos tomadas a tres niveles de profundidad de la batidora, con 3 réplicas por analista.

Equipo	Analista	Batidora 1			Batidora 2			Batidora 3		
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
I1	A1	7.142	8.160	7.222	48.039	48.361	61.196	33.686	40.140	33.045
		7.147	8.127	7.603	51.224	47.556	50.740	34.387	38.198	33.871
		7.410	8.141	7.616	51.738	49.726	51.742	36.990	41.106	34.028
	A2	6.870	7.369	7.102	46.284	47.204	48.575	31.749	40.358	31.946
		7.187	7.854	7.126	46.664	47.873	45.374	31.794	36.890	37.587
		7.266	7.340	7.469	47.881	48.210	47.555	32.268	37.315	33.138
	A3	6.823	6.976	6.804	50.866	44.737	46.705	33.763	34.914	34.173
		6.621	6.692	7.332	44.786	44.946	45.460	31.239	35.559	32.639
		8.392	7.035	7.206	44.743	42.992	49.238	32.860	36.253	34.569
I2	A1	7.403	9.048	7.813	48.728	50.200	63.712	35.212	41.093	36.688
		7.942	8.769	8.327	52.631	49.648	52.910	35.960	39.311	37.688
		7.247	9.038	8.203	52.047	52.702	53.400	39.404	42.285	37.653
	A2	6.937	7.229	7.650	47.506	47.568	49.971	33.378	41.654	34.861
		7.574	8.752	7.387	48.577	49.977	45.553	33.675	38.107	40.530
		7.812	7.028	7.985	49.200	50.096	49.439	32.867	38.815	36.901
	A3	6.837	7.045	6.809	53.176	45.736	49.055	34.703	36.307	35.300
		6.529	7.203	7.668	46.392	46.492	47.639	32.062	37.229	33.612
		9.387	7.691	7.715	46.783	44.551	50.596	33.877	37.518	35.452



En primer lugar, se efectuó una exploración de los datos para investigar la existencia de valores “outliers”, aplicando el test de Dixon generalizado^[10] y se comprobó que todos los valores de Qc calculados para cada grupo de datos (3 réplicas) son menores que el valor establecido en la tabla de Dixon 0.94 al 95% de probabilidad y por tanto todos los valores son aceptados. Luego, se demostró la homocedasticidad de los datos, aplicando la prueba de Hartley^[10]. Finalmente se aplicó la prueba ANOVA 4F^[12] obteniéndose los resultados del análisis de varianza de la tabla 3.

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza de 4 factores independientes.

FUENTE	SS	gl	CM	Fc	F095	Significativo
Batidora	48443.91	2	24221.96	7292.503	3.080	SI
Instrumento	79.98	3	26.66	8.026	2.689	SI
Analista	333.03	12	27.75	8.355	1.843	SI
Nivel de toma muestra	411.19	36	11.42	3.439	1.526	SI
Residual	358.72	108	3.32			

Analizando los resultados anteriores, puede observarse que las diferencias entre el Fc y el F0.95 son significativas en todos los factores. Y se puede ver claramente que la mayor diferencia está entre las batidoras, pese a que todas las batidoras funcionaron en condiciones de repetibilidad, es decir, la misma velocidad y el mismo tiempo de agitación. Si se grafican los valores de concentración de la aflatoxina B1 entre las batidoras a los diferentes niveles de profundidad, se obtiene la gráfica de la figura 3.

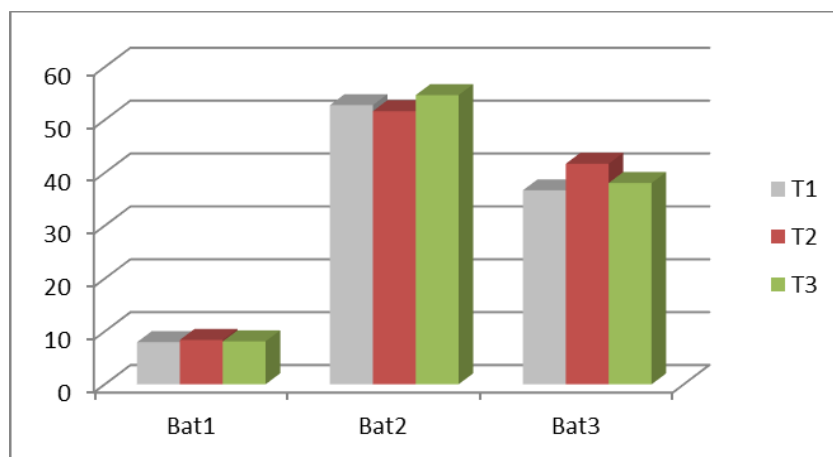


Figura 3. Concentraciones de aflatoxina B1 para una muestra de un lote de maní dividida en 3 submuestras y distribuidas en 3 batidoras 1, 2 y 3. Las muestras de ensayo son tomadas a 3 diferentes niveles de profundidad: superficie (T1), parte media (T2) y fondo (T3).



Como puede notarse, existen grandes diferencias de concentraciones en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxina B₁ entre las submuestras del lote de maní en las batidoras 1, 2 y 3, cuyas concentraciones promedios son respectivamente: 7.5, 49.0 y 35.9 . Mientras que las diferencias son mucho menores dentro de las submuestras o dentro de las batidoras. Esto sugiere que el contenido de aflatoxinas en la muestra del lote de maní no es homogéneo, lo cual es coherente con la heterogeneidad del desarrollo de los hongos^[3,9] debido a los diferentes factores ambientales en el manejo del producto desde la cosecha hasta el proceso de industrialización y embalaje para la exportación.

Para comprobar si existe diferencia dentro de cada submuestra , es importante realizar el estudio por cada submuestra contenida en las batidoras con el fin de estudiar con mayor precisión el efecto de los 3 factores restantes tales como: modelo del cromatógrafo utilizado, analistas y los puntos de toma de la muestra de ensayo en la batidora. Esto permitió evaluar la repetibilidad del método y la precisión intermedia dentro del laboratorio a los niveles de concentración de aflatoxina B₁ correspondiente a cada submuestra.

3.1.1 SUBMUESTRA 1

A partir de los datos de la batidora 1 reflejados en la tabla 3 y aplicando el ANOVA 3F^[12], se obtienen los resultados del análisis de varianza de la tabla 4.

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza ANOVA 3F de la batidora 1

<i>Fuente</i>	SS	gl	CM	F _{calculado}	F _{0.95}	Significativo
Instrumento	2.240	1	2.240	3.639	4.414	NO
Analista	4.192	4	1.048	1.702	2.928	NO
Nivel de toma muestra	5.094	6	0.849	1.379	2.661	NO
Residual	11.081	18	0.616			

De acuerdo a los resultados de la tabla anterior no existen diferencias significativas entre los diferentes factores. La evaluación de la precisión de la repetibilidad y la precisión intralaboratorio en la batidora 1 puede obtenerse de la cuadrática media esperada de cada factor como se observa en la tercera columna de la tabla 5^[14].

Tabla 5. Cuadráticas medias y varianzas de los factores.

<i>Fuente Variación</i>	<i>CM</i>	<i>CM esperada</i>	<i>Varianza</i>
Instrumento (I)	2.240	$\sigma_r^2 + 3\sigma_T^2 + 9\sigma_A^2 + 27\sigma_I^2$	s_I^2
Analista (A)	1.048	$\sigma_r^2 + 3\sigma_T^2 + 9\sigma_A^2$	s_A^2
Nivel de toma muestra (T)	0.849	$\sigma_r^2 + 3\sigma_T^2$	s_T^2
Residual (r)	0.616	σ_r^2	s_r^2



Por tanto, la desviación estándar estimada de cada factor puede calcularse igualando las ecuaciones de la cuadrática media esperada con los valores de la cuadrática media calculada de cada uno de los factores de la tabla. La desviación estándar de repetibilidad (S_r) será la raíz cuadrada de la cuadrática media residual y la desviación estándar del laboratorio (S_{lab}) será la raíz cuadrada de la suma de las varianzas de cada uno de los factores (última columna de la tabla 5) más la de repetibilidad. Los valores de las desviaciones estándares calculadas de esta manera son: $S_r = 0.78$, $S_{lab} = 0.87$. Expresadas como porcentajes con respecto a la media total ($\bar{x} = 7.54$) se tiene que los valores de desviaciones estándares relativas de repetibilidad del método y la de reproducibilidad intralaboratorio son respectivamente $RSD_r = 10.4\%$ y $RSD_{Lab} = 11.6\%$. Para concentraciones menores que 0.100 mg/kg los valores de RSD_r deben ser menores que el 66% del valor establecido por Horwitz - Thompson ^[17,18] ($RSD_{HT} = 22\%$) es decir menor que 14.5%; y los valores de la precisión de reproducibilidad intralaboratorio RSD_{Lab} deben ser menores que $2 RSD_{HT} (=44\%)$. en los dos casos los valores de precisión, la repetibilidad y la de intralaboratorio, cumplen con la conformidad del método.

3.1.2 SUBMUESTRA 2

Los resultados del análisis de varianza ANOVA 3F para los datos obtenidos de las submuestra de la batidora 2, se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza ANOVA 3F de la batidora 2

<i>Ŷ</i>	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>Fc</i>	<i>F095</i>	<i>Significativo</i>
instrumento	35.637	1	35.637	2.469	4.414	NO
Analista	259.739	4	64.935	4.498	2.928	SI
Nivel de toma muestra	162.118	6	27.020	1.872	2.661	NO
Residual	259.853	18	14.436			

Se puede observar que hubo diferencias significativas en el promedio de los resultados de los analistas. Esas diferencias pueden verse en los intervalos de confianza de la figura 4. La diferencia está claramente en el analista 1. Sin embargo, es necesario evaluar si estas diferencias influyen en la precisión requerida del método.

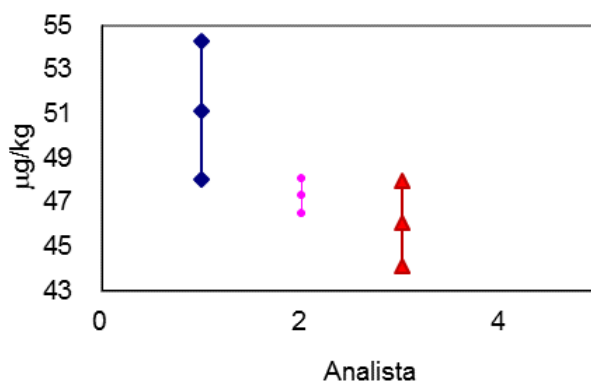


Figura 4. Intervalos de confianza de los resultados entre analistas.



Aplicando las mismas fórmulas de la tabla 5 pero tomando los valores de la cuadrática media de la tabla 6 y la media global de la concentración de aflatoxina B1 (48.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$), se tiene que los valores de desviación estándar relativa de repetibilidad (RSD_r) y reproducibilidad intralaboratorio (RSD_{Lab}) son 7.76% y 9.78%, los cuales son menores que 14.52% y 44%. Por lo tanto, la precisión del método cumple con los requisitos establecidos por la Comunidad Europea^[18] y el Codex Alimentario^[17].

3.1.3 SUBMUESTRA 3

La submuestra contenida en el lote 3 presenta diferencias significativas en los 3 factores. Si observamos los valores de Fcalculado son mayores que el F0.95 de la tabla de Snedecor.

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza ANOVA 3F de la batidora 3

Factor	SS	gl	CM	Fc	F095	Significativo
instrumento	42.099	1	42.099	8.632	4.414	SI
Analista	69.098	4	17.274	3.542	2.928	SI
Nivel de toma Muestra	243.978	6	40.663	8.338	2.661	SI
Residual	87.786	18	4.877			

Al graficar en un diagrama de estrella (figura 5) se observan que las mayores diferencias están en la concentración a los tres niveles de la toma de la muestra en la batidora 3 (S, M, F). Las concentraciones más altas están en la parte media de la batidora. Aparentemente hay heterogeneidad en la submuestra 3, esto significa que probablemente la agitación no fue la misma en el momento de la toma de la muestra de ensayo.

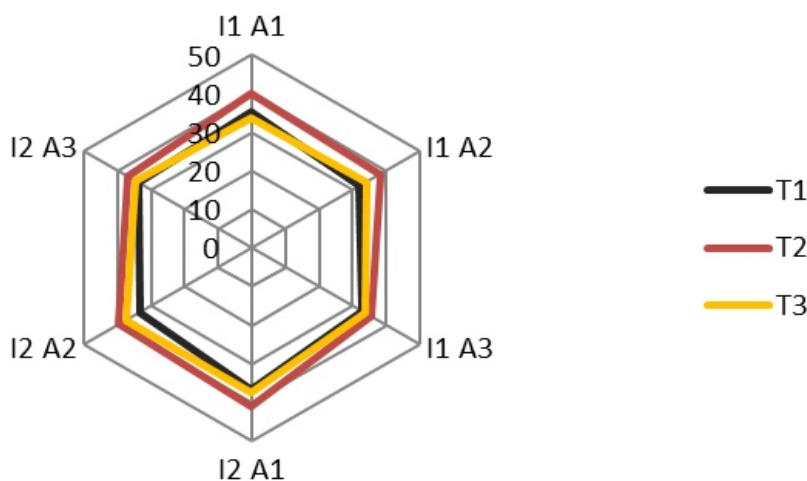


Figura 5. Diagrama de estrella mostrando el perfil de los resultados entre instrumentos, analistas y niveles de toma de la muestra en la batidora 3.

Es importante ahora ver si esas diferencias repercuten en la precisión requerida por Horwitz-Thompson. Los resultados de la precisión de repetibilidad (RSD_r) y la de reproducibilidad interna (RSD_{Lab}) son 6.2 % y 11.7 %, calculados a partir de las fórmulas de la tabla 5, tomando los valores de CM de la tabla 7. Estos valores son menores que 14.5% y 44%. Por lo tanto, las diferencias no son significativas con respecto a los requisitos del método

Los resultados de las 3 submuestras se resumen en la tabla 8. Donde puede verse que el método cumple con los requisitos de precisión para la evaluación de la aflatoxina B1 para los niveles de concentración encontrados en las tres submuestras.

Tabla 8. Valores experimentales y de referencia de desviación estándar relativa de repetibilidad y de reproducibilidad intralaboratorio para las tres submuestras de un lote de maní.

<i>Bat/Submuestra</i>	$\mu\text{g/kg}$	<i>RSD_r</i>	<i>Referencia</i>	<i>RSD_{Lab}%</i>	<i>Referencia</i>	<i>Conformidad</i>
1	7.54	10.4	14.5 %	11.6%	44%	Si
2	48.98	7.76	14.5 %	9.78%	44%	Si
3	35.86	6.2	14.5%	11.7%	44%	Si

3.2 AFLATOXINAS TOTALES ($B_1+B_2+G_1+G_2$)

Las aflatoxinas totales es la suma de concentraciones de los 4 tipos de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) y en una sola corrida se obtiene el cromatograma con los picos correspondientes, tal a como se puede ver en los diferentes tiempos de retención del siguiente cromatograma para una mezcla de patrones de aflatoxinas certificados (figura 6).

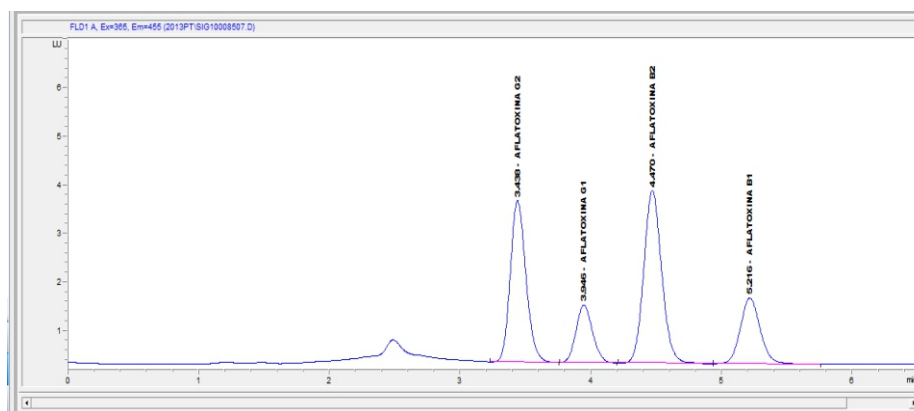


Figura 6. Cromatograma de una solución de patrones certificados de aflatoxinas en concentración 5 $\mu\text{g/kg}$, obtenido en HPLC Agilent 1260. La elución de los picos están en el intervalo de tiempo de retención de 3.2 a 5.6 minutos y el orden de elución es: G_2 , G_1 , B_2 , B_1 . El pico que se observa en 2.5 min es debido a impurezas.



La concentración de aflatoxinas totales en las tres submuestras del lote de maní estudiado se estimaron a partir del modelo matemático de la función de calibración inversa, que está dado por el modelo representado en la ecuación 7.

$$C = KA \quad (7)$$

Donde C es la matriz que representa las concentraciones en $\mu\text{g}/\text{kg}$, K es la matriz de coeficientes del modelo y A es la matriz de las mediciones de las áreas de los picos en LU-min. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de concentraciones de aflatoxinas totales ($B_1+B_2+G_1+G_2$) en $\mu\text{g}/\text{kg}$ en muestra de maní de exportación distribuida en 3 batidoras, usando 2 HPLC (I1, I2) y analizada por 3 analistas, en muestras de ensayos tomadas a tres niveles de la batidora (T1, T2, T3), con 3 réplicas por analista.

Equipo	Analista	Batidora 1			Batidora 2			Batidora 3		
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
I1	A1	8.150	9.333	8.254	55.429	55.782	70.741	40.275	47.990	39.705
		8.187	9.246	8.650	59.136	54.889	58.668	41.274	45.590	40.754
		8.457	9.324	8.678	59.621	57.348	59.820	44.265	49.176	40.907
	A2	7.875	8.347	8.057	53.229	54.537	55.828	37.927	47.946	38.431
		8.199	8.955	8.110	53.753	55.227	52.241	38.046	43.995	44.757
		8.260	8.326	8.479	55.114	55.663	54.778	38.609	44.447	39.797
	A3	7.760	8.029	7.699	58.682	51.775	53.861	40.381	41.889	41.024
		7.543	7.624	8.300	51.628	52.089	52.415	37.419	42.670	39.250
		9.523	8.013	8.247	51.542	49.806	56.805	39.359	43.218	41.525
I2	A1	8.537	10.264	8.803	55.737	57.203	72.939	41.409	48.473	43.014
		8.979	9.976	9.347	60.238	56.626	60.456	42.399	46.264	44.203
		8.500	10.122	9.276	59.691	59.988	61.108	46.286	49.726	44.055
	A2	7.936	8.263	8.707	54.016	54.614	57.043	39.292	48.609	40.975
		8.616	9.813	8.345	55.430	57.177	52.182	39.530	44.673	47.321
		8.903	7.929	9.046	56.093	57.220	56.473	38.808	45.454	43.357
	A3	7.757	8.039	7.717	60.763	52.388	56.193	40.787	42.939	41.677
		7.362	8.240	8.650	52.919	53.273	54.449	37.806	43.772	39.792
		10.627	8.529	8.710	53.365	51.003	57.869	40.000	44.148	41.969

El análisis de varianza de 4 factores muestra los mismos resultados que para la aflatoxina B1. Confirmando de esta manera la heterogeneidad de la muestra del lote en estudio. Por tanto, los datos de las tres submuestras de las batidoras 1, 2 y 3 fueron tratados independientemente aplicando el programa de análisis de varianza de 3 factores. Estos resultados se resumen en la tabla 10.



Tabla 10. Resultados del ANOVA 3F para aflatoxinas totales en $\mu\text{g}/\text{kg}$ en cada batidora

Batidora	Fuente	CM	Fcalculado	F095	Significativo	Media $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	instrumentto	2.324	3.078	4.414	NO	8.564
	Analista	1.412	1.870	2.928	NO	
	Toma muestra	1.000	1.325	2.661	NO	
	Residual	0.755				
2	instrumentto	23.827	1.248	4.414	NO	56.235
	Analista	85.982	4.503	2.928	SI	
	Toma muestra	36.117	1.891	2.661	NO	
	Residual	19.095				
3	instrumentto	24.153	3.8025	4.414	NO	42.544
	Analista	22.935	3.611	2.928	SI	
	Toma muestra	54.879	8.640	2.661	SI	
	Residual	6.352				

Puede observarse que el efecto del factor analista en la batidora 2 es significativo. Mientras que en la batidora 3 los efectos de los factores analista y los puntos de la toma de la muestra son significativos. Pero al igual que en los resultados de la aflatoxina B_1 , estas diferencias no repercuten significativamente en los requisitos del método utilizado, tal a como se muestra con los valores de desviación estándar relativa de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio y que se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Desviaciones estándares relativas de repetibilidad, reproducibilidad y valores de referencia.

Bat/Submuestra	$\mu\text{g}/\text{kg}$	RSDr	Referencia*	RSD _{Lab} %	Referencia*	Conformidad
1	7.54	10.1	14.5 %	11.2%	44%	Si
2	48.98	7.8	14.5 %	9.9%	44%	Si
3	35.86	5.9	14.5%	11.2%	44%	Si

*) Según Horwitz-Thomson^[18]

Como puede verificarse al comparar con los resultados de la tabla 8, la precisión del método es la misma que para la aflatoxina B_1 . Demostrándose que el método para la determinación de aflatoxinas totales mediante la técnica HPLC-FLD tiene la conformidad con las normas internacionales. Este hecho es de esperarse, ya que la mezcla de aflatoxinas se obtiene en un solo extracto, aplicando los mismos procedimientos normalizados en la preparación de la muestra del lote y de las submuestras, así como el mismo procedimiento para el tratamiento de las porciones de ensayos y el proceso de medición analítica^[7].



CONCLUSIONES

El diseño experimental factorial piramidal de 4 factores, ha sido la herramienta fundamental para la evaluación de la homogeneidad de la muestra. Del estudio se deduce claramente que las aflatoxinas se encuentran heterogéneamente distribuidas en los granos de maní. El análisis de tres submuestras de un mismo lote presenta concentraciones muy diferentes. Por ejemplo, los valores de concentración de aflatoxina B₁ encontrados en el presente estudio oscilan entre 7.5 y 50 µg/kg, niveles que exceden los requisitos de los compradores. No obstante, el análisis de varianza aplicado a cada submuestra, tomando los factores tales como el instrumento de medición, el analista y los puntos de la toma de porciones de ensayo en la batidora, demuestra la homogeneidad del contenido de aflatoxinas dentro de cada una de las submuestras, lo cual es coherente con las condiciones experimentales de repetibilidad en el proceso de reducción.

Aprovechando los valores de las cuadráticas medias del análisis de varianza de tres factores se evaluó la precisión del método a nivel de la repetibilidad y de la precisión intermedia, demostrándose que los resultados de desviación estándar relativa cumplen con la conformidad de Codex Alimentario y con el reglamento de la UE. Lo que demuestra que el método de ensayo tiene la aptitud para el uso previsto.

RECONOCIMIENTO

Vaya el agradecimiento de los autores para el Laboratorio SER AGRO, S.A. por permitirnos la difusión del presente estudio, dentro del contexto de la mejora continua que anualmente lleva a cabo este organismo evaluador de la conformidad con el fin de mantener la competencia técnica y la acreditación del ensayo de aflatoxinas ante la Oficina Nacional de Acreditación (ONAMIFIC).



BIBLIOGRAFÍA

1. END, (2013), "Nicaragua venderá más maní", *El Nuevo Diario*, medio de prensa publicado en Nicaragua, 25 marzo.
2. QUISPE, S., y REVOLLO S., (2001), "Estudios de contaminación con aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* en la castaña y el maní", Investigadores Asociados. Unidad Biología Molecular - Inst. SELADIS - Univ. Mayor de San Andrés, Bolivia. Disponible en: http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=438&AREA=MYC. Acceso el 07/2013.
3. FAO, (1993), "Sampling plans for aflatoxyn analysis in peanuts and corn, Rome, Pag.7.
4. URREGO NOVOA J.R. y Díaz, G.J., (2006), "Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la fitología del cáncer hepático celular", *Rev. Fac. Med. Univ. Colomb.*, Vol. 54, 2, 116;
5. BODEY, G. P. y VARTIVARIAN S., (1989), Aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8:413–437.
6. a) ISO/IEC 17025(ES) (2005). "Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración", *Norma Internacional*, Ginebra, Segunda Edición. b) NTN 01 004 05, "Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración", Comisión Nacional de Normalización Técnica y Calidad, MIFIC, Managua, Nicaragua.
7. DELGADO G y HERNÁNDEZ N., (2009) "Evaluación de la incertidumbre en la determinación de aflatoxina B1 en maní de exportación por HPLC-FD", *Universitas UNAN-León*, Vol 3, I, 5-15. (Parte I)
8. DELGADO G y HERNÁNDEZ N., (2009) "Cálculo de la incertidumbre por simulación de Monte Carlo en la determinación de aflatoxina B1 en maní de exportación por HPLC-FD. Aplicación a la evaluación de la conformidad", *Universitas UNAN-León*, Vol 3, I, 16-26. (Parte II)
9. ABADÍA B, AFANADOR G, CÉSPEDES A, DÍAZ G., (1997), "Ocurrencia Natural de Aflatoxinas en sorgos híbridos, cultivados en Altos Magdalena, Colombia", *Revista Corpoica*, Vol 2, 1, 22-26.
10. NEUILLY y CETAMA, (1998), "Modelisation et estimation des erreurs de mesure", editorial TEC-DOC, Paris, pag 260.
11. MASSART D.L., VANDEGINSTE B.G.M., BUYDENS L.M.C., DEJONG S., LEWI P.J., SMETERS-VERBEKE J., (1998), "Handbook of chemometrics and qualymetrics", Parte A, Elsevier, Amsterdam, pag 137.
12. G. DELGADO, (2013), "Programa ANOVA 4F", elaborado en MAPLE 17, Facultad de Ciencias y Tecnologías, UNAN-León.
13. a) CHAR B. W. (1992), *Manual Maple V*, Springer-Verlag, New York; b) Maple 17.01 (2013), Tutorial, software.
14. ISO/5725-3, (1994), "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results", Parte 3, Primera Edición.
15. KUTTATHARMMAKUL S, MASSART D, SEMEYERS-VERBEKE J, (1999) "Comparison of alternative measurement methods" *Anal. Chim. Acta*, 391, 203-225
16. MERCOSUL/GMC/RES N° 56/94, Reglamento Técnico sobre límites máximos de aflatoxinas.
17. CODEX ALIMENTARIUS, (2011), "Principios para el establecimiento de métodos de análisis", OMS-FAO, Roma.
18. REGLAMENTO (CE) N° 401, (2006), "Métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios", Diario Oficial de la Unión Europea.