



Determinación de la incertidumbre del método de análisis de aflatoxinas por HPLC en pasa de uva

Definition of the uncertainty of the aflatoxin analysis method by HPLC in raisins

Nora Dolores Martínez¹, Ana María Rodríguez², Aída Rosa Gutiérrez³,
Marina Daniela Di Carlo⁴, Analía de los Ángeles Durán⁵

Fecha de recepción: 18 de diciembre de 2017

Fecha de aceptación: 24 de mayo de 2018

Cómo citar: Martínez, N.D., Rodríguez, A.M., Gutiérrez, A.R., Di Carlo, M.D y Durán., A.Á. (2018). Determinación de la incertidumbre del método de análisis de aflatoxinas por HPLC en pasa de uva. *Tecnura*, 22(58), 25-36. DOI: <https://doi.org/10.14483/22487638.12896>

Resumen

Contexto: En este trabajo se presenta la determinación de las incertidumbres de los métodos de análisis de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en pasa de uva por HPLC-FLD. La incertidumbre de un método es uno de los parámetros requeridos por la norma IRAM 301-ISO/IEC 17025:2005, de aplicación en la República Argentina y acreditada por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA). Forma parte de la validación del método analítico. Es un requisito necesario para ampliar el alcance de acreditación del Laboratorio de Análisis de Productos Regionales de Ingeniería Química (LAPRIQ), perteneciente al Instituto de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de San Juan.

Metodología: El procedimiento utilizado es el denominado *bottom up*, basado en una sucesión de etapas de cálculo que tienen en cuenta los errores provenientes de cada una de las operaciones

analíticas descompuestas en actividades primarias. La etapa inicial consiste en la identificación de las fuentes de error que pueden afectar el resultado del análisis. Se tomó como base para la determinación de las fuentes de error, y su incidencia en la incertidumbre final del proceso, el procedimiento de espina de pescado de Ishikawa. Definidos los factores que suman al error en la medición, se realizaron todos los ensayos de calibración del HPLC, índice de recuperación y verificación del instrumental para la determinación de la incertidumbre estándar de los subcomponentes. Se calculó luego la incertidumbre combinada teniendo en cuenta los aportes individuales. Posteriormente se sumaron las incertidumbres combinadas, ponderadas según la importancia de su contribución a través del coeficiente de sensibilidad. Por último, se determinó la incertidumbre expandida usando un factor de cobertura $K = 2$, que implica un porcentaje de confianza del 95 %. Con

- 1 Ingeniera química, docente e investigadora. Directora del Laboratorio de Análisis de Productos Regionales de Ingeniería Química (LAPRIQ). Profesora titular, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan. San Juan, Argentina. Contacto: noramart@unsj.edu.ar
- 2 Ingeniera química, magíster en Ciencias de Superficie. Docente e investigadora. Profesora titular, responsable sección Análisis y Ensayos del Laboratorio de Análisis de Productos Regionales de Ingeniería Química (LAPRIQ), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan. San Juan, Argentina. Contacto: arodri@unsj.edu.ar
- 3 Ingeniera química, docente e investigadora. Jefe área técnica del Laboratorio de Análisis de Productos Regionales de Ingeniería Química (LAPRIQ). Profesora titular, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan. San Juan, Argentina. Contacto: agutierrez@unsj.edu.ar
- 4 Ingeniera química, especialista en Docencia Universitaria. Docente e investigadora. Analista Laboratorio de Análisis de Productos Regionales de Ingeniería Química (LAPRIQ). Jefe de trabajos prácticos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan. San Juan, Argentina. Contacto: marinadicarlo@gmail.com
- 5 Ayudante adscripta a investigación. Analista del Laboratorio de Análisis de Productos Regionales de Ingeniería Química (LAPRIQ), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan. San Juan, Argentina. Contacto: analiaduran-17@hotmail.com

este factor se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores atribuidos al mesurando.

Resultados: Se detectaron seis fuentes de error, correspondientes a las mediciones de: masa de la muestra, volúmenes de extracción, elución y alícuota para *clean up*, detección en HPLC e índice de recuperación del método. Las incertidumbres expandidas calculadas de las cuatro aflatoxinas son AFB1= 0,7mg/kg, AFB2= 0,2mg/kg, AFG1 = 0,9 mg/kg y AFG2 = 0,3 mg/kg.

Conclusiones: Los valores de las incertidumbres expandidas se informan en el certificado de análisis, junto con el resultado del ensayo por HPLC, como una de las pruebas de la validación del método.

Palabras clave: aflatoxinas, HPLC, incertidumbre combinada, incertidumbre estándar, incertidumbre expandida.

Abstract

Objective: This work presents the definition of uncertainties for the methods of analysis of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in raisins by HPLC-FLD. The uncertainty of a method is one of the parameters required by the norm IRAM 301-ISO/IEC 17025:2005 Standard, applicable in the Argentine Republic and accredited by the Argentine Accreditation Organism (OAA), and forms part of the validation of analytical methods. In addition, it is a necessary requirement to expand the scope of accreditation of the Laboratory of Analysis of Regional Products of Chemical Engineering (LAPRIQ, by the name in Spanish), belonging to the Institute of Chemical Engineering of the National University of San Juan.

Methodology: The procedure used is called “Bottom up”, based on a succession of calculation that take into account errors from each of the analytical operations decomposed in primary activities. For the initial stage, sources of error that can affect the result of the analysis were identified. The Ishikawa’s fishbone procedure was used as a basis for determining the sources of error and their incidence in the final uncertainty of the process. Once the factors that add up to the error in the measurement were defined, all the HPLC calibration tests were performed. Second, the combined uncertainties were added, weighted according to the importance of their contribution through the sensitivity coefficient. Finally, the expanded uncertainty was determined using a coverage factor $K = 2$, which implies a confidence percentage of 95%. With this factor we can expect to include the largest fraction of the distribution of the values attributed to the measurand.

Results: Six sources of error were detected and correspond, on the one hand, to the mass measurements of the sample, extraction volumes, elution, and aliquot for “clean up” and, on the other, HPLC detection and recovery rate of the method. The calculated uncertainties for the four aflatoxins are AFB1= 0.7 mg/kg, AFB2= 0.2 mg/kg, AFG1 = 0.9 mg/kg y AFG2 = 0.3 mg/kg.

Conclusions: The values of the expanded uncertainties are reported in the certificate of analysis, along with the result of the HPLC test, as one of the tests of the validation of the method validation.

Keywords: aflatoxins, HPLC, combined uncertainty, standard uncertainty, expanded uncertainty.

INTRODUCCIÓN

La acreditación

El desarrollo económico de la provincia de San Juan, República Argentina, está muy ligado a la industria de la uva y sus derivados, siendo la

principal exportadora de pasas y mosto concentrado del país de acuerdo con lo informado por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, 2011). Los alimentos mencionados contienen principios bioactivos que resultan muy beneficiosos para la salud humana (Arias, Montaña, Velasco y Martínez, 2018). Los países importadores han aplicado

condiciones de calidad cada vez más estrictas para aceptar los productos mencionados, teniendo en cuenta la importancia del cuidado de la salud de la población. Esto hace necesario que el exportador cuente con certificados de análisis respaldados internacionalmente, para garantizar que el producto cumple con los niveles de calidad acordados.

Disponer de certificados de análisis con respaldo internacional implica que el laboratorio que realiza los análisis cuente con la acreditación de la norma ISO 17025, específica para laboratorios de ensayo y calibración, otorgada por un organismo autorizado por el gobierno de cada país. El Organismo Argentino de Acreditación (OAA) es el único ente autorizado para acreditar la norma IRAM 301-ISO/IEC 17025, establecida por el Instituto de Racionalización de Materiales (IRAM, 2005).

El Instituto de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de San Juan dispone del Laboratorio de Análisis de Productos Regionales de Ingeniería Química (LAPRIQ), acreditado por norma IRAM 301-ISO/IEC 17025 desde julio de 2013, con alcance en las técnicas de determinación de ocratoxina A para matriz pasa de uva (Rodríguez, Gutiérrez, Strazza y Giménez, 2008a) y matriz vino/mosto (Rodríguez, Gutiérrez, Strazza y Giménez, 2008b).

Es intención del grupo de trabajo solicitar al OAA la ampliación del alcance de acreditación para incluir la determinación de aflatoxinas en pasa de uva.

Las aflatoxinas

Uno de los requerimientos para el consumo de pasas de uva es la concentración de micotoxinas, sustancias consideradas el carcinógeno natural más potente conocido hasta el momento. Su producción está asociada al proceso de esporulación de hongos, a las condiciones ambientales y a la concentración de nutrientes en el medio (Bogantes-Ledezma, Bogantes-Ledezma y Bogantes-Ledezma, 2004).

Entre las micotoxinas vinculadas a la industria vitivinícola están las aflatoxinas, contaminantes orgánicos generados por hongos usualmente presentes en los viñedos de la región, especialmente en años donde las lluvias sobrepasan los valores normales promedio de precipitación (Martínez *et al.*, 2015). Estas toxinas aparecen en la uva en fresco y, por ende, en pasas, vinos y mostos producidos a partir de ella. Hay al menos 99 países que tienen reglamentaciones para micotoxinas, cifra que corresponde al 87 % de los habitantes del planeta (ONUAA, 2003).

En la vid naturalmente se encuentran hongos del tipo *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus*. Estos mohos toxigénicos se desarrollan en gran variedad de sustratos, y se pueden producir aflatoxinas como metabolitos secundarios. El nombre de *aflatoxina* deriva de la abreviación taxonómica de *Aspergillus* y de la especie *flavus*. De las 18 variedades de aflatoxinas conocidas, la más tóxica es la aflatoxina B1 (AFB1). Las otras de interés en la pasa de uva son B2, G1 y G2. Tienen actividad inmunosupresiva, teratogénica, cancerígena y mutagénica; además, producen síndrome hepatotóxico y problemas renales (Gimeno y Martins, 2003).

Un comité mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (ONUAA, 2003) ha definido a las aflatoxinas como *potentes carcinógenos humanos*, aunque no existe aún información suficiente para establecer una cifra fija sobre grados de exposición tolerable. La mayoría de las leyes internacionales establecen un máximo de 4 mg/kg para aflatoxinas totales (la suma de B1, B2, G1, G2) en pasas de uva, no pudiéndose superar el límite de 2 mg/kg para la variedad B1, la más agresiva. El Código Alimentario Argentino no reglamenta el contenido de toxinas en pasas de uva (ANMAT, 2010). El Protocolo de Calidad de Pasas de Uva para la denominación Alimentos Argentinos mantiene los valores internacionales mencionados, como límites máximos de concentración y

el resultado debe obtenerse por determinación en HPLC (SAGPyA, 2006).

En la figura 1 se muestra la representación de las moléculas de las cuatro aflatoxinas de interés. Pertenecen a la familia de las difurano-cumarinas, y son muy similares entre ellas, con diferencias en un enlace doble y en un anillo de 5 o 6 carbonos con inclusión de oxígeno. Químicamente, son estables y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales, y es muy difícil eliminarlas una vez que se producen.

El método de análisis

El método de análisis de aflatoxinas para pasas por *high performance liquid chromatography* (HPLC) que se utiliza en el LAPRIQ sigue, en forma general, los lineamientos de la *European Standard* 14123:2008 (Aenor, 2008) con algunas modificaciones que responden al procedimiento sugerido por el proveedor de las columnas de inmunoafinidad (R-Biopharm, 2005a) y que requiere, por tanto, de una validación completa como método propio.

En la técnica hay tres pasos básicos: un proceso inicial de extracción con metanol, la posterior separación (*clean up*) en columna de inmunoafinidad (R-Biopharm, 2005b, 2006) y cuantificación por HPLC (Rodríguez y Gutiérrez, 2015). La columna de inmunoafinidad contiene anticuerpos monoclonales unidos a un soporte sólido que retiene las micotoxinas recuperadas luego con metanol. El HPLC tiene una columna cromatográfica donde las toxinas, según su afinidad con el soporte sólido, son retenidas con tiempos característicos diferentes para cada una. La toxina se somete posteriormente a la derivatización con bromo en una celda Kobracell® (R-Biopharm, 2005c), para otorgarle características que permitan su detección en el detector por fluorescencia (FLD) y su cuantificación.

La incertidumbre

Una de las exigencias de la norma consiste en la validación del método analítico acreditado, lo que supone un importante diseño experimental para la

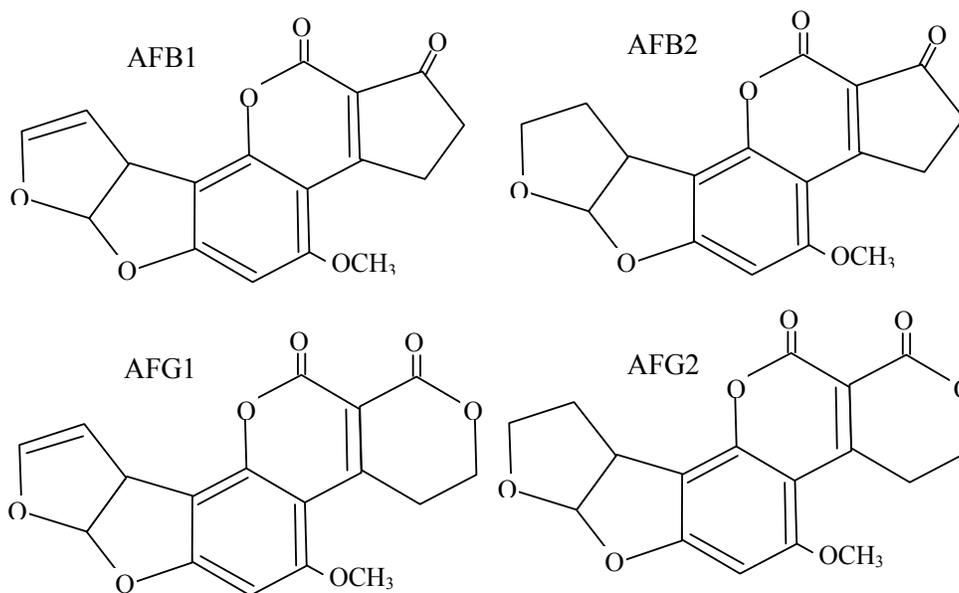


Figura 1. Estructura de las aflatoxinas

Fuente: elaboración propia.

determinación estadística de los parámetros que fundamentan el aseguramiento de la calidad de la técnica, especialmente si se acredita como método propio. La validación es un procedimiento para demostrar científicamente por medio de estudios de laboratorio, que un método posee las características de desempeño adecuadas para cumplir con los requerimientos de las aplicaciones analíticas establecidas. La incertidumbre del proceso es uno de los requisitos para la validar un método.

Para determinar la incertidumbre se ha tomado como guía lo descrito en EURACHEM/CITAC Guide (2000). En líneas generales, el método de cálculo de la incertidumbre expandida de un ensayo consta de cuatro etapas. La primera consiste en la identificación de las fuentes de error que pueden afectar el resultado del análisis (mediciones críticas). Se calculó, luego, la incertidumbre combinada de cada una de las fuentes identificadas, teniendo en cuenta los aportes de incertidumbres estándar individuales. Posteriormente se sumaron las incertidumbres combinadas, ponderadas según la importancia de su aporte, a través del coeficiente de sensibilidad. Por último, se determinó la incertidumbre expandida que depende del porcentaje de confianza establecido y en el cual se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores atribuidos al mesurando. En el certificado de análisis entregado al productor junto con el resultado obtenido, se informa el valor de la incertidumbre expandida.

METODOLOGÍA

Para la estimación de la incertidumbre de un proceso de análisis químico hay dos métodos generales denominados *top-down* y *bottom-up* (CAC/GL 59, 2006). El primero de ellos está basado en el procesamiento de datos registrados a largo plazo, derivados de resultados de ensayos de aptitud, muestras de control del laboratorio, datos bibliográficos publicados, etc. El LAPRIQ no cuenta todavía con información de largo plazo suficiente como para utilizar este método. El procedimiento

bottom up, utilizado en este trabajo, se basa en el estudio exhaustivo de los errores provenientes de cada una de las operaciones analíticas descompuestas en actividades primarias. Este método, en contraposición con el método *Top down*, exige mayor grado de detalle o alta resolución (Carmona Aparicio *et al.*, 2016).

Determinar la concentración final de un analito en una matriz implica calcular una función, la cual depende de las variables de cálculo (por ejemplo, volumen de extracción, respuesta del equipo, etc.). Para el cálculo de la concentración para cualquier aflatoxina, de acuerdo con el protocolo del método (Rodríguez y Gutiérrez, 2015), se utiliza la ecuación (1). La definición de todos los términos de esta y su valor se presentan en la sección "Resultados". Un análisis de aflatoxina implica determinar el valor de C_{HPLC} que es la respuesta del cromatógrafo. Todos los demás términos son constantes porque son mediciones establecidas con valor único.

$$\text{Concentración en } \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} = C_x = C_{HPLC} \frac{V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot M} \cdot \frac{1}{R} \quad (1)$$

Todas las fuentes posibles de error identificadas y definidas a partir de la ecuación (1) se representaron en el diagrama de Ishikawa, también llamado *espina de pescado*.

Para cada uno de los componentes (v_i) que aportan a la incertidumbre del proceso, se determinó la desviación estándar según ecuación (2) en la que u_{mi} es la incertidumbre individual de cada factor que interviene en una medición específica (linealidad, temperatura, sensibilidad, etc.), de acuerdo con la ley de propagación de incertidumbres.

$$u_i = \sqrt{\sum u_{mi}^2} \quad (2)$$

Se realizaron todos los ensayos necesarios para determinar las incertidumbres estándar de cada medición, ya sea análisis químicos o verificación de medidas de masa o volumen. Cabe aclarar que todos los equipos e instrumentos utilizados en el LAPRIQ están calibrados y verificados según lo

establecido en sus respectivos procedimientos de uso, los cuales regulan el procedimiento de trabajo y su frecuencia. Las calibraciones son externas y solo se realizan en organismos acreditados bajo norma IRAM 301-ISO/IEC 17025 para laboratorios de calibración.

Para calcular la incertidumbre combinada, se utilizó la ecuación (3), en la que cada incertidumbre estándar se multiplicó por un coeficiente de sensibilidad c_i para ponderar su aporte a la incertidumbre global.

$$u_c = \sqrt{\sum_i (c_i \cdot u_i)^2} \quad (3)$$

Los coeficientes de sensibilidad se determinaron con la ecuación (4), derivándose la función C_x definida en la ecuación (1), respecto a la componente (v_i) cuyo coeficiente se quiere calcular.

$$c_i = \frac{dC_x}{dv_i} \quad (4)$$

La incertidumbre del método, denominada incertidumbre expandida, es el intervalo dentro del cual se asegura que se encuentra el resultado de la medición del mensurando C_x con un grado de confianza especificado. Este valor aparece en el

certificado de análisis y se calcula como la incertidumbre combinada multiplicada por el factor de cobertura K según la ecuación (5). Se tomó $K = 2$ asegurándose un 0,9545 % de confianza en la medición. Este valor es común en la determinación de incertidumbres en otros ámbitos tales como la evaluación del error en las pérdidas eléctricas (Valencia y Avendaño, 2015).

$$U_{C_x} = K \cdot u_c \quad (5)$$

Finalmente se determinó la contribución de cada variable a la incertidumbre total del proceso a través del índice de contribución de cada una de ellas (ecuación (6)); así se establecieron los puntos críticos que pueden mejorarse para disminuir la incertidumbre del método.

$$Ind\% = \frac{(c_i \cdot u_i)}{\sum_i (c_i \cdot u_i)} \cdot 100 \quad (6)$$

RESULTADOS

En la tabla 1 se define cada uno de los términos de la ecuación (1). A partir de dicha ecuación, se definieron los componentes (v_i) identificados como

Tabla 1. Variables de la expresión de cálculo de la concentración final

Símbolo	Descripción	Valor	
M	Cantidad de fruta analizada	42 g	
V_1	Volumen de elución (1,5 ml de metanol HPLC + 1,5 ml de agua HPLC)	3 ml	
V_2	Volumen de extracción (200 ml de metanol p.a. + 50 ml de agua HPLC)	250 ml	
V_3	Alícuota del volumen de elución analizado	10 ml	
R	Índice de recuperación	AFB1	0,9350
		AFB2	0,9529
		AFG1	0,9320
		AFG2	0,9630
C_{HPLC}	Concentración medida en el HPLC para el valor de máximo coeficiente de variación.	AFB1	$1,6 \cdot 10^{-9}$ g/ml
		AFB2	$2 \cdot 10^{-10}$ g/ml
		AFG1	$1,6 \cdot 10^{-9}$ g/ml
		AFG2	$2 \cdot 10^{-10}$ g/ml

Fuente: elaboración propia.

aportes a la incertidumbre del proceso: M , V_1 , V_2 , V_3 , R y C_{HPLC} . En la misma tabla se informan, además, los valores de los componentes utilizados más adelante para el cálculo de los coeficientes de sensibilidad. En la figura 2 se presenta el diagrama *espina de pescado* definido para este proceso. Todas las medidas dimensionales, se presentan en ml y g.

De este modo quedan definidas las incertidumbres estándar que aportan a la incertidumbre combinada. Ellas son: u_M , u_{V1} , u_{V2} , u_{V3} , u_R y u_{HPLC} . Las cuatro primeras son comunes a todas las aflatoxinas. En este trabajo no se detalla, por su extensión, el cálculo de los aportes a las incertidumbres estándar. Se presentan solamente las ecuaciones y el resultado.

Todos los aportes individuales de error que se mencionan están definidos en procedimientos del

LAPRIQ que conforman el Sistema de Gestión de la Calidad. Las pruebas realizadas y los correspondientes cálculos descritos en los procedimientos están debidamente registrados y guardados en el laboratorio.

Los resultados de las incertidumbres estándar obtenidas se presentan en la tabla 2.

Determinación de u_m

La balanza analítica utilizada es marca Mettler Toledo modelo AL204.

Su incertidumbre estándar (ecuación (7)), informada en gramos, se calcula como la suma de las incertidumbres aportadas por el patrón, la linealidad, la sensibilidad y el estudio de R y R.

$$u_m = \sqrt{u_{sen}^2 + u_{lin}^2 + u_{RyR}^2 + u_{pat}^2}$$

(7)

$$u_m = \sqrt{(2,88675 \cdot 10^{-5})^2 + (1,73205 \cdot 10^{-4})^2 + (8,57321 \cdot 10^{-5})^2 + (3 \cdot 10^{-5})^2}$$

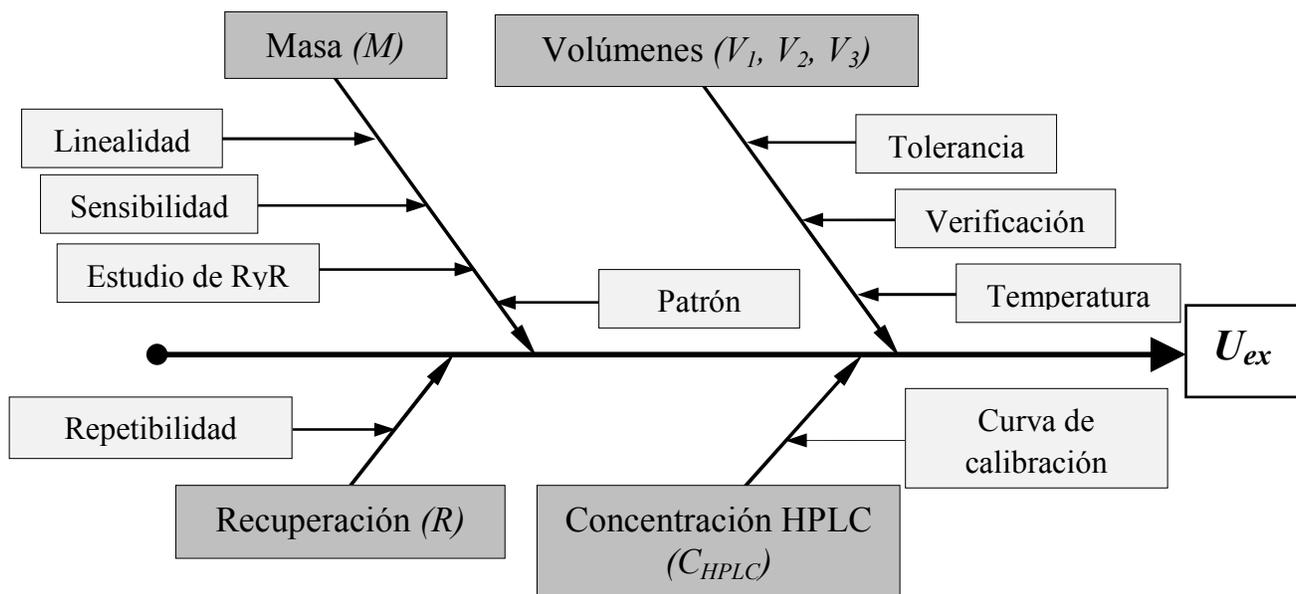


Figura 2. Diagrama de Ishikawa para el proceso de análisis

Fuente: elaboración propia.

Determinación de uV1

El volumen de elución V_1 se mide con una micropipeta Transferpette de 1,0 ml. Se utiliza cuatro veces para tener la medición total de 3 ml requerida, dos veces con metanol y dos veces con agua. La incertidumbre de cada medición está conformada por tres subcomponentes: tolerancia, variación en la temperatura (metanol y agua) y desviación por verificación, según la ecuación (8). Estos aportes se repiten en todas las mediciones de volumen con pipeta o micropipeta medidas en ml.

$$u_{V1} = \sqrt{4u_{tol}^2 + 2u_{Tmetanol}^2 + 2u_{Tagua}^2 + 4u_{ver}^2} \quad (8)$$

El aporte debido a la tolerancia se calculó de acuerdo con la ecuación (9).

$$u_{tol} = \frac{\text{Tolerancia del fabricante (ml)}}{\sqrt{3}} \quad (9)$$

La incertidumbre por variación de temperatura se calculó según la ecuación (10), donde a es el coeficiente de dilatación volumétrica correspondiente al fluido que se mide en K^{-1} . Por razones de extensión no se detalla su cálculo.

$$u_{Tmetanol} = \frac{\text{Variación de volumen (ml)}}{\sqrt{3}} = \frac{V_{nominal} \alpha \Delta T}{\sqrt{3}} \quad (10)$$

Para la incertidumbre por verificación se adoptó para el cálculo la ecuación (11), método de evaluación tipo A (Delgado y Hernández, 2009).

$$u_{ver} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (11)$$

Donde s es la desviación estándar de las mediciones realizadas en la verificación del instrumental y n es el número de mediciones.

$$u_{V1} = \sqrt{4(3,46410 \cdot 10^{-3})^2 + 2(3,91010 \cdot 10^{-3})^2 + 2(6,36528 \cdot 10^{-4})^2 + 4(5,48800 \cdot 10^{-5})^2}$$

Determinación de uV2

El volumen V_2 , mezcla de metanol y agua, se mide con dos matraces calibrados de 200 y 50 ml respectivamente. La incertidumbre de esta medida se calcula según la ecuación (12). A su vez, las incertidumbres individuales de la medida de metanol y agua se determinaron según las ecuaciones (13) y (14).

$$u_{V2} = \sqrt{u_{metanol}^2 + u_{agua}^2} \quad (12)$$

$$u_{metanol} = \sqrt{u_{tol}^2 + u_{Tmetanol}^2 + u_{ver}^2} \quad (13)$$

$$u_{agua} = \sqrt{u_{tol}^2 + u_{Tagua}^2 + u_{ver}^2} \quad (14)$$

La incertidumbre por tolerancia del matraz se determinó mediante la ecuación (15):

$$u_{tol} = \sqrt{\left(\frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{6}}\right)^2} \quad (15)$$

De acuerdo con lo expuesto, la determinación de la incertidumbre correspondiente a la medición del volumen V_2 es:

$$u_{metanol} = \sqrt{(0,1)^2 + (1,04269)^2 + (0,06)^2}$$

$$u_{agua} = \sqrt{(0,0358547)^2 + (0,0424352)^2 + (9,80306 \cdot 10^{-3})^2}$$

$$u_{V2} = \sqrt{1,04920 + 5,64129 \cdot 10^{-2}}$$

Determinación de uV3

V_3 es el volumen de alícuota que se toma luego del centrifugado para iniciar la etapa de *clean up*. Se miden 10 ml de mezcla, medidos con pipeta calibrada. El cálculo se realizó de acuerdo con la ecuación (16).

$$u_{metanol} = \sqrt{u_{tol}^2 + u_{Tmezcla}^2 + u_{ver}^2} \quad (16)$$

$$u_{agua} = \sqrt{(0,011547)^2 + (0,029705)^2 + (3,65813 \cdot 10^{-4})^2}$$

Determinación de u_R

Para el cálculo de la incertidumbre de la exactitud del método se utilizó la ecuación (17), lo que requirió la realización de 24 determinaciones (n) con pasas fortificadas a concentraciones conocidas. Se tomó la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (s) usando la evaluación de incertidumbre tipo A según la ecuación (11). La u_R para cada toxina se muestra en la tabla 1.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (17)$$

Determinación de u_{HPLC}

La curva de calibración correspondiente a cada toxina requirió de cinco ensayos con tres analistas

diferentes en días diversos, usando soluciones calibrantes de 2; 4; 8 y 10 mg/l de aflatoxinas totales. Se utilizó un patrón Trilogy® con concentración de 5.000 mg/l totales y relación AFB1:AFB2:AFG1:AFG2=4:1:4:1 respectivamente. A partir de las rectas de calibración obtenidas se determinó la incertidumbre individual en g/ml de acuerdo con la ecuación (18), donde S_c es la desviación estándar que depende de cada aflatoxina:

$$u_{HPLC} = \frac{S_c}{\sqrt{3}} \quad (18)$$

Definidas las incertidumbres individuales, se calcularon los coeficientes de sensibilidad correspondientes. En la tabla 3 se muestran las ecuaciones derivadas para su cálculo y los resultados obtenidos teniendo en cuenta los valores dados en la tabla 1.

Tabla 2. Incertidumbres estándar calculadas

$u_M = 1,9769498 \cdot 10^{-4}$ g	$u_{RB1} = 2,4924023 \cdot 10^{-2}$	$u_{HPLCB1} = 1,87583 \cdot 10^{-10}$
$u_{V1} = 8,9106802 \cdot 10^{-3}$ ml	$u_{RB2} = 2,0295416 \cdot 10^{-2}$	$u_{HPLCB2} = 4,0683473 \cdot 10^{-11}$
$u_{V2} = 1,1056087775$ ml	$u_{RC1} = 2,9487976 \cdot 10^{-2}$	$u_{HPLCG1} = 2,402630 \cdot 10^{-10}$
$u_{V3} = 0,032088134$ ml	$u_{RC2} = 2,908972 \cdot 10^{-2}$	$u_{HPLCG2} = 1,1351565 \cdot 10^{-10}$

Fuente: elaboración propia.

Tabla 3. Valor de los coeficientes de sensibilidad

Variable	Ecuación correspondiente	c_i	
M	$c_M = \frac{\partial C_x}{\partial M} = \frac{C_{HPLC} \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot M^2} \cdot \frac{1}{R}$	AFB1	$7,2756 \cdot 10^{-11}$
		AFB2	$8,9237 \cdot 10^{-12}$
		AFG1	$7,2991 \cdot 10^{-11}$
		AFG2	$8,8301 \cdot 10^{-12}$
		AFB1	$1,0186 \cdot 10^{-09}$
V_1	$c_{V1} = \frac{\partial C_x}{\partial V_1} = \frac{C_{HPLC} \cdot V_2}{V_3 \cdot M} \cdot \frac{1}{R}$	AFB2	$1,2493 \cdot 10^{-10}$
		AFG1	$1,0219 \cdot 10^{-09}$
		AFG2	$1,2362 \cdot 10^{-10}$
		AFB1	$1,2223 \cdot 10^{-11}$
		AFB2	$1,4992 \cdot 10^{-12}$
V_2	$c_{V2} = \frac{\partial C_x}{\partial V_2} = \frac{C_{HPLC} \cdot V_1}{V_3 \cdot M} \cdot \frac{1}{R}$	AFG1	$1,2262 \cdot 10^{-11}$
		AFG2	$1,4835 \cdot 10^{-12}$
		AFB1	$3,0558 \cdot 10^{-10}$
		AFB2	$3,7480 \cdot 10^{-11}$
		AFG1	$3,0656 \cdot 10^{-10}$
V_3	$c_{V3} = \frac{\partial C_x}{\partial V_3} = \frac{C_{HPLC} \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3^2 \cdot M} \cdot \frac{1}{R}$	AFG2	$3,7086 \cdot 10^{-11}$
		AFB1	$3,2682 \cdot 10^{-09}$
		AFB2	$3,9332 \cdot 10^{-10}$
		AFG1	$3,2893 \cdot 10^{-09}$
		AFG2	$3,8511 \cdot 10^{-10}$
R	$c_R = \frac{\partial C_x}{\partial R} = \frac{C_{HPLC} \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot M} \cdot \frac{1}{R^2}$	AFB1	1,90985
		AFB2	1,87398
		AFG1	1,91600
		AFG2	1,85432
		AFB1	1,90985
C_{HPLC}	$c_{C_{HPLC}} = \frac{\partial C_x}{\partial C_{HPLC}} = \frac{V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot M} \cdot \frac{1}{R}$	AFB2	1,87398
		AFG1	1,91600
		AFG2	1,85432
		AFB1	1,90985
		AFB2	1,87398

Fuente: elaboración propia.

La incertidumbre estándar combinada calculada con la ecuación (3) y la incertidumbre expandida U_{Cx} determinada con la ecuación (5) para cada toxina se presentan en la tabla 4.

En la tabla 5 se muestra el resultado del cálculo del índice porcentual de contribución de las

incertidumbres a la incertidumbre total, y en la figura 3 se muestra el diagrama de barras de aportes individuales para las cuatro toxinas. Según estos resultados, el aporte principal a la incertidumbre combinada para todas las toxinas radica en la obtención de la curva de calibración en el HPLC.

Tabla 4. Incertidumbres combinada y expandida

Toxina	Incertidumbre combinada	Incertidumbre expandida
AFB1	$u_{cB1} = 0,367643 \mu\text{g/kg}$	$U_{CxB1} = 0,7 \mu\text{g/kg}$
AFB2	$u_{cB2} = 0,076692 \mu\text{g/kg}$	$U_{CxB2} = 0,2 \mu\text{g/kg}$
AFG1	$u_{cG1} = 0,470838 \mu\text{g/kg}$	$U_{CxG1} = 0,9 \mu\text{g/kg}$
AFG2	$u_{cG2} = 0,210805 \mu\text{g/kg}$	$U_{CxG2} = 0,4 \mu\text{g/kg}$

Fuente: elaboración propia.

Tabla 5. Cálculo del índice porcentual de contribución a las incertidumbres

Variable	Índice %			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
C_{HPLC}	75,8820	86,4421	78,0439	93,2916
R	17,2533	9,0508	16,4438	4,9651
V_2	1,9224	1,2622	1,5437	0,4882
V_3	2,8624	1,8793	2,2984	0,7269
V_1	2,0769	1,3636	1,6677	0,5274
M	0,0030	0,0020	0,0024	0,0008

Fuente: elaboración propia.

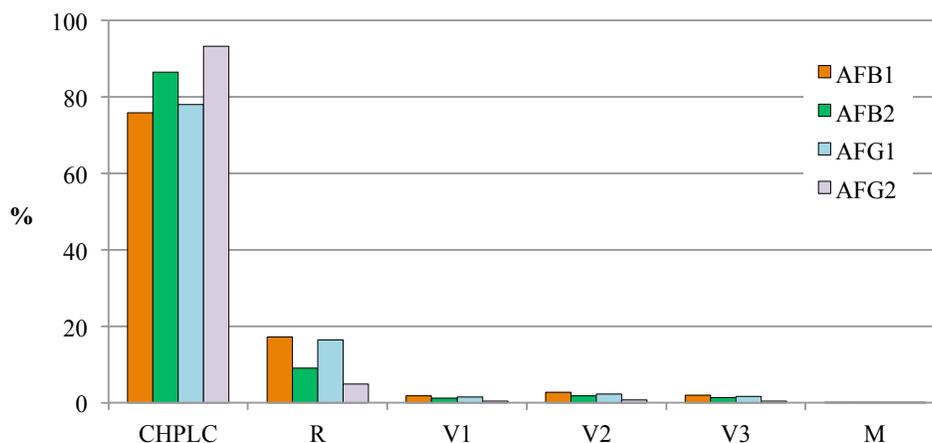


Figura 3. Representación de los aportes individuales a la incertidumbre combinada para todas las toxinas

Fuente: elaboración propia.

CONCLUSIONES

En este trabajo se determinaron las incertidumbres expandidas de los procesos de determinación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en matriz pasa de uva. Los valores encontrados para cada una de ellas respectivamente son: 0,7 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,9 mg/kg y 0,4 mg/kg. Los resultados están de acuerdo con los esperados según otros métodos de determinación de toxinas que se realizan en el laboratorio. La determinación de las curvas de calibración en el HPLC es la actividad primaria que más aporta a la incertidumbre total, seguida por el índice de recuperación. De hecho, para simplificar el cálculo podrían despreciarse los aportes de las medidas de volumen y de masa, este último definitivamente insignificante, y considerar solo los dos de mayor contribución. Cabe aclarar que la determinación de las incertidumbres de la curva de calibración y del índice de recuperación, conllevan un arduo trabajo tanto experimental como estadístico, que no se ha descrito aquí por razones de extensión. Si bien no son tan laboriosas, las determinaciones de las demás incertidumbres estándar tampoco se han detallado en esta presentación por su longitud. Toda la información está disponible en el LAPRIQ.

El resultado de este trabajo aparece en el certificado de análisis que se entrega al productor, como prueba de la validación del método analítico.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto "Validación de los métodos de análisis para la cuantificación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en matriz pasa de uva y matriz vino/mosto por HPLC", financiado por el Consejo de Investigaciones Científicas, Técnicas y de Creación Artística (CICITCA) de la Universidad Nacional de San Juan.

REFERENCIAS

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) (1971). *Código Alimentario Argentino*. Decreto No. 2126/71 Reglamentario de la Ley Nacional No. 18.284. Buenos Aires, Argentina.
- Arias L., D., Montaña D., L.N., Velasco S., M.A. y Martínez G., J. (2018). Alimentos funcionales: avances de aplicación en agroindustria. *Revista Tecnura*, 22(57), 55-68. DOI: <https://doi.org/10.14483/22487638.12178>
- Asociación Española de Normalización y Certificación (Aenor) (2008). *European Standard 14123:2008*. Madrid, España.
- Bogantes-Ledezma, P., Bogantes-Ledezma, D. y Bogantes-Ledezma, S. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46(4), 174-178.
- Carmona Aparicio, L.G., Rincón Pérez, M.A., Castillo Robles, A.M., Galvis Remolina, B.R., Sáenz Pulido, H.E., Manrique Forero, R.A. y Pachón Quinche, J.E. (2016). Conciliación de inventarios *top-down* y *bottom-up* de emisiones de fuentes móviles en Bogotá, Colombia. *Revista Tecnura*, 20(49), 59-74. DOI: 10.14483/udistrital.jour.tecnura.2016.3.a04
- Delgado, G. y Hernández, N. (2009). Evaluación de la incertidumbre en la determinación de aflatoxina B1 en maní de exportación por HPLC-FD. Parte I. *Universitas*, 3(1), 5-15.
- EURACHEM/CITAC Guide CG 4 QUAM:2000.1 (2000). *Quantifying uncertainty in Analytical Measurement*. 2a. ed. Reino Unido – Suiza.
- Gimeno, A. y Martins, M.L. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. 3a. ed. Miami, EE. UU.: Special Nutrients Inc.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) (2011). *Las pasas de uva en el mundo y en Argentina*. Mendoza, Argentina: Departamento de Estadística y Estudios de Mercado, Subgerencia de Estadística y Asuntos Técnicos Internacionales.

- Instituto de Racionalización de Materiales (IRAM) (2005). *Norma IRAM 301-ISO/IEC 17025:2005*. 4a. ed., Buenos Aires, Argentina: Editorial IRAM.
- Martínez, N.D., Rodríguez, A.M., Venturini, R.B., Gutiérrez, A.R. y Granados, D.L. (2015). Abatement of Ochratoxin A from Contaminated Wine and Grape Juice by Activated Carbon Adsorption. *Latin American Applied Research*, 45, 33-38.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (ONUAA) (2003). *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s07.htm>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (ONUAA) (2006). *CAC/GL 59-2006: Directrices sobre la Estimación de la Incertidumbre de los Resultados*. Recuperado de <http://www.fao.org/input/download/standards/10692/cxg059s.pdf>.
- R-Biopharm (2005a). *Sultanas: Método de extracción para aflatoxinas*. Buenos Aires, Argentina: R-Biopharm Rhône Ltd. – R-Biopharm Latinoamérica.
- R-Biopharm (2005b). *Easy-Extract® Aflatoxin para la detección de aflatoxinas totales por HPLC*. Buenos Aires, Argentina: R-Biopharm Rhône Ltd. – R-Biopharm Latinoamérica.
- R-Biopharm (2005c). *KOBRA CELL Celda electroquímica para la derivatización de aflatoxinas*. Buenos Aires, Argentina: R-Biopharm Rhône Ltd. – R-Biopharm Latinoamérica.
- R-Biopharm (2006). *Aflatoxin clean up columns: Aplicación de columnas de clean up para la preparación de muestras previo al análisis de aflatoxinas por HPLC*. Buenos Aires, Argentina: R-Biopharm Rhône Ltd. – R-Biopharm Latinoamérica.
- Rodríguez, A.M. y Gutiérrez, A.R. (2015). *Análisis de aflatoxinas por HPLC en frutas desecadas*. Documento interno PO-01-V4. LAPRIQ. San Juan, Argentina.
- Rodríguez, A. M., Gutiérrez, A. R., Strazza, E. R. y Giménez, M. (2008a). *Análisis de OTA por HPLC en Frutas Desecadas*. Documento interno PO-03-V6. LAPRIQ. San Juan, Argentina.
- Rodríguez, A. M., Gutiérrez, A. R., Strazza, E. R. y Giménez, M. (2008b). *Análisis de OTA por HPLC en Vino y Mosto de Uva*. Documento interno PO-08-V3. LAPRIQ. San Juan, Argentina.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la República Argentina (SAGPyA) (2006). Resolución No. 146 de 2006, *Protocolo de Calidad para Pajas de Uva*. Buenos Aires, Argentina.
- Valencia, R. y Avendaño, C. (2015). Metodología para determinar la incertidumbre en la medición de pérdidas eléctricas para transformadores de distribución serie 15 kV. *Revista Tecnura*, 19(CITIE), 33-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.14483/udistrital.jour.tecnura.2015.ICE.a03>.

