



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA OCRATOXINA A EN
CAFÉ VERDE, UTILIZANDO COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD Y
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

CLAUDIO EZEQUIEL QUEZADA ARAUJO

RIOBAMBA – ECUADOR

2009

DEDICATORIA

A mi Dios Jehová, por ser mi guía y el único amigo en tiempos difíciles.

A mis padres Carlos Quezada y Gloria Araujo, por su apoyo incondicional, su amor y su esfuerzo para hacer de mi una persona de bien para la sociedad.

A mis hermanos Iraida, Carlos, Karina, Valeria, Mario y Catalina por su comprensión, y por ser la voz de aliento para llevar a cabo la culminación de mi carrera.

Gracias de todo corazón

Claudio Ezequiel

AGRADECIMIENTO

A mi Dios Jehová por la sabiduría, el entendimiento y por ser el Consolador de mi existencia.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por la formación profesional recibida.

Al Departamento de Nutrición y Calidad del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), por permitirme llevar a cabo el presente trabajo. A todos quienes conforman el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA), en especial a la Dra. Susana Espín por brindarme todo su apoyo y confianza para llevar a cabo el presente trabajo. De igual manera quiero agradecer al Dr. Iván Samaniego, quien fue la persona que me orientó en la parte experimental de este trabajo de tesis y, sin el cual no se hubiera podido concretar el mismo.

A mi director de tesis Dr. Carlos Pilamunga y a la Dra. Mayra Espinoza por la colaboración para la realización del presente trabajo. Mi agradecimiento muy especial a la Dra. Lourdes Cuadrado por todo su apoyo incondicional, la ayuda brindada en forma desinteresada, que Dios la bendiga.

A mis padres y hermanos, a quienes les debo el ser la persona que ahora soy, tanto en lo personal como en lo profesional.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA OCRATOXINA A EN CAFÉ VERDE, UTILIZANDO COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD Y CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN”** de responsabilidad del señor egresado Claudio Ezequiel Quezada Araujo, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Edmundo Caluña DECANO DE LA FACULTAD	_____	_____
Dr. Luis Guevara DIRECTOR DE ESCUELA	_____	_____
Dr. Carlos Pilamunga DIRECTOR DE TESIS (ESPOCH)	_____	_____
Dr. Iván Samaniego DIRECTOR DE TESIS (INIAP)	_____	_____
Dra. Mayra Espinoza MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Sr. Carlos Rodríguez DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	_____

Yo, Claudio Ezequiel Quezada Araujo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO y al INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS.

CLAUDIO EZEQUIEL QUEZADA ARAUJO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AOAC	=	Association of Oficial Analytical Chemists (Siglas en inglés de Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
°C	=	Grados centígrados
DCM	=	Diferencia cuadrática media
DNC	=	Departamento de Nutrición y Calidad
EESC	=	Estación Experimental Santa Catalina
Em.	=	Emisión
Ex.	=	Excitación
FAPAS	=	Food Analysis Performance Assessment Scheme (Siglas en inglés de Sistema de Evaluación del Funcionamiento de los los Análisis de Alimentos)
g	=	gramos
HPLC	=	Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución
INIAP	=	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
<i>k</i>	=	Factor de cobertura
Kg	=	Kilogramos
LSAIA	=	Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos
mL	=	Mililitros
mm	=	Milímetros
ng	=	Nanogramos
OAE	=	Organismo de Acreditación Ecuatoriano
OTA	=	Ocratoxina A
PBS	=	Buffer Fosfato Salino
SDC	=	Suma de diferencias cuadráticas
<i>u</i>	=	Incertidumbre combinada
<i>U</i>	=	Incertidumbre expandida
µg	=	Microgramos
µL	=	Microlitros
µm	=	Micrómetros
v/v	=	volumen / volumen

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS
ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE CUADROS
ÍNDICE DE GRÁFICOS
ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS
ÍNDICE DE ANEXOS
INTRODUCCIÓN

1.	PARTE TEÓRICA.....	1
1.1	El café.....	1
1.1.1	Características generales.....	1
1.1.2	Origen y descripción botánica.....	2
1.1.3	El café en el Ecuador.....	6
1.1.4	Producción y Comercialización.....	8
1.1.5	Post cosecha y calidad del café.....	10
1.1.6	Beneficio del café.....	11
1.1.6.1	Beneficio por vía húmeda.....	12
1.1.6.2	Beneficio por vía seca.....	13
1.2	Las micotoxinas.....	14
1.2.1	Aflatoxinas.....	16
1.2.2	Tricotecenos.....	17
1.2.3	Zearalenona.....	18
1.2.4	Fumonisinias.....	18
1.2.5	Patulina.....	20
1.2.6	Ocratoxina A.....	21
1.2.6.1	Toxicidad de la Ocratoxina A.....	22
1.2.6.2	Ocratoxina A y café.....	25
1.3	Validación de métodos analíticos.....	26
1.3.1	Parámetros de validación de un método.....	28
1.3.1.1	Selectividad.....	29
1.3.1.2	Linealidad y rango lineal.....	29
1.3.1.3	Precisión.....	30
1.3.1.4	Exactitud.....	31
1.3.1.5	Sensibilidad.....	32
1.3.1.6	Confiabilidad del método (robustez).....	33

1.3.1.7	Incertidumbre de medición.....	34
1.3.2	Materiales requeridos para la validación de ensayos de laboratorio.....	43
1.3.2.1	Material de referencia.....	43
1.3.2.2	Material de referencia certificado.....	46
1.3.2.3	Patrón de trabajo.....	47
1.3.3	Ensayo interlaboratorio.....	47
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	49
2.1	Lugar de la investigación.....	49
2.2	Materiales, equipos y reactivos.....	49
2.2.1	Materia prima.....	49
2.2.2	Materiales de laboratorio.....	50
2.2.3	Equipos.....	50
2.2.4	Reactivos.....	51
2.2.5	Estándares.....	51
2.3	Metodología.....	52
2.3.1	Fase de laboratorio.....	52
2.3.1.1	Procedimiento.....	52
2.3.2	Tratamiento estadístico.....	55
2.3.2.1	Linealidad y rango lineal.....	55
2.3.2.2	Límite de detección.....	57
2.3.2.3	Límite de cuantificación.....	57
2.3.2.4	Precisión (repetibilidad y reproducibilidad).....	58
2.3.2.5	Exactitud.....	60
2.3.2.6	Selectividad.....	60
2.3.2.7	Incertidumbre.....	60
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
4.	CONCLUSIONES.....	82
5.	RECOMENDACIONES.....	84
6.	RESUMEN.....	85
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	87
8.	ANEXOS.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Exportación de café ecuatoriano por calidad en el año 2008 (sacos de 60 kilogramos).....	7
TABLA No. 2	Importación de café ecuatoriano en el año 2008 (toneladas).....	10
TABLA No. 3	Algunos de los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos contaminantes de los alimentos.....	15
TABLA No. 4	Valores de dosis letal 50 (DL ₅₀) de la Ocratoxina A en algunas especies cuando la toxina se administra por vía oral.....	23
TABLA No. 5	Límites para la OTA en el café (µg/Kg) vigente en algunos países europeos.....	26
TABLA No. 6	Esquema para la evaluación de la linealidad del método.....	55
TABLA No. 7	Esquema para el estudio de la repetibilidad y reproducibilidad del método.....	58
TABLA No. 8	Esquema para el análisis de varianza.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Preparación de estándares para curvas de calibración de OTA.....	63
CUADRO No. 2	Resultados promedio de la curva de calibración de OTA para el día 1.....	63
CUADRO No. 3	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 1.....	64
CUADRO No. 4	Resultados promedio de la curva de calibración de OTA para el día 2.....	65
CUADRO No. 5	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 2.....	66
CUADRO No. 6	Resultados promedio de la curva de calibración de OTA para el día 3.....	67
CUADRO No. 7	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 3.....	68
CUADRO No. 8	Resultados promedio de la curva de calibración de OTA para el día 4.....	69
CUADRO No. 9	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 4.....	70
CUADRO No. 10	Resultados promedio de la curva de calibración de OTA para el día 5.....	71
CUADRO No. 11	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración del día 5.....	72
CUADRO No. 12	Resultados promedio de la curva de calibración global de OTA.....	73
CUADRO No. 13	Resultados del análisis de regresión lineal para la curva de calibración global de OTA.....	74
CUADRO No. 14	Resultados del cálculo de límite de detección y cuantificación utilizando curva de calibración.....	76
CUADRO No. 15	Resultados del análisis de precisión del método.....	76
CUADRO No. 16	Resultados del cálculo de la suma de diferencias cuadráticas y diferencias cuadráticas medias entre niveles y dentro de niveles.....	77
CUADRO No. 17	Resultados del cálculo de la desviación estándar y desviación estándar relativa de la repetibilidad y reproducibilidad.....	77
CUADRO No. 18	Resultados del cálculo del porcentaje de recuperación por día y total.....	78
CUADRO No. 19	Resultados del cálculo del porcentaje de recuperación en material de referencia.....	79
CUADRO No. 20	Resultados del cálculo de los coeficientes de sensibilidad para la incertidumbre.....	80
CUADRO No. 21	Resultados del cálculo de las contribuciones, incertidumbre combinada e incertidumbre expandida, asociada a la determinación de OTA en café verde.....	81

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Curva de calibración de OTA del día 1.....	64
GRÁFICO No. 2	Curva de calibración de OTA del día 2.....	66
GRÁFICO No. 3	Curva de calibración de OTA del día 3.....	68
GRÁFICO No. 4	Curva de calibración de OTA del día 4.....	70
GRÁFICO No. 5	Curva de calibración de OTA del día 5.....	72
GRÁFICO No. 6	Curva de calibración global de OTA.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Cerezas de café robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	5
FIGURA No. 2	Zonas de producción de café arábigo en el Ecuador.....	8
FIGURA No. 3	Granos de café tostado.....	9
FIGURA No. 4	Beneficio por vía húmeda.....	13
FIGURA No. 5	Estructura química de las aflatoxinas.....	17
FIGURA No. 6	Estructura química del desoxinivalenol (DON).....	18
FIGURA No. 7	Estructura química de la zearalenona.....	18
FIGURA No. 8	Estructura química de las fumonisinas.....	19
FIGURA No. 9	Estructura química de la patulina.....	20
FIGURA No. 10	Estructura química de las Ocratoxinas.....	21
FIGURA No. 11	Estructura química de la Ocratoxina A (OTA).....	22
FIGURA No. 12	Cromatograma de una muestra de café contaminado artificialmente con Ocratoxina A.....	79

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Arbusto de café.....	1
FOTOGRAFÍA No. 2	Cerezas de café arábigo (<i>Coffea arabica</i>).....	4
FOTOGRAFÍA No. 3	Cosecha de granos de café mediante pepiteo.....	11
FOTOGRAFÍA No. 4	Secado del café cereza en tendal.....	13
FOTOGRAFÍA No. 5	Café bola seca.....	14
FOTOGRAFÍA No. 6	Material de referencia.....	43
FOTOGRAFÍA No. 7	Departamento de nutrición y calidad (INIAP).....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Molienda y pesaje de la muestra de café verde para el análisis de Ocratoxina A.....	95
ANEXO No. 2	Extracción de la muestra para la determinación de Ocratoxina A.....	96
ANEXO No. 3	Purificación de los extractos para la determinación de Ocratoxina A.....	97
ANEXO No. 4	Cuantificación de Ocratoxina A mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	98
ANEXO No. 5	Tabla de factores multiplicadores para el cálculo de la incertidumbre.....	99
ANEXO No. 6	Ejemplo de tabla de análisis de incertidumbres.....	100
ANEXO No. 7	Tabla t student.....	101
ANEXO No. 8	Resultados del ensayo interlaboratorios (número de laboratorio 25 para LSAIA).....	102

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, el cultivo de café tiene relevante importancia en los órdenes económico, social y ecológico. La importancia económica del cultivo de café está determinada por su aporte de divisas al Estado, la generación de empleo y de ingresos para las familias de los caficultores y de los otros actores de la cadena productiva que dependen de las contingencias de producción y precios de este grano. (23)

La calidad de los alimentos depende de las características organolépticas, físicas, del valor nutritivo, de la apariencia visual o del estado sanitario de los productos. El café ecuatoriano para ser comercializado exitosamente en los principales mercados del mundo, como Estados Unidos, Europa y Japón requiere ser producido y procesado de manera apropiada, procurando reducir los defectos de los granos, evitar contaminaciones, destacar la excelente calidad de taza y satisfacer las exigencias de los mercados internacionales. (22)

El café se cultiva en casi todo el país aunque la producción comercial se concentra en algunas regiones. Existen diversas debilidades en la cadena agroindustrial que representan un factor de riesgo para la contaminación por hongos toxigénicos y la producción de micotoxinas como la Ocratoxina A (OTA). (35)(52)

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales (sin excluir las aves) y personas. Su exposición, puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, con resultados que van desde la muerte hasta efectos nocivos en los sistemas digestivo, nervioso central, cardiovascular y respiratorio. Estas pueden contaminar diversos productos de alimentación humana y animal. (35)

Dentro de las micotoxinas de importancia mundial tenemos la Ocratoxina A (OTA), que es una micotoxina nefrotóxica y nefrocarcinogénica producida por varias especies de

hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, especialmente *Aspergillus genus* y *Penicillium verrucosum*. (35)(45)

En la actualidad las exportaciones de café podrían verse seriamente disminuidas, debido a las últimas regulaciones técnicas que están en vigencia en la Unión Europea, para proteger la salud de los consumidores de una posible contaminación con Ocratoxina A (OTA), micotoxina clasificada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer como posible agente carcinogénico clase 2B es decir que probablemente causa cáncer. (10)(35)

La Unión Europea ha establecido límites máximos para OTA en cereales y derivados, uvas, pasas, alimentos infantiles, y tiene previsto fijarlos en productos como el café y el cacao, por esta razón y con fines de contar con datos de base y referenciales de la presencia de OTA en el café de producción nacional, es necesario en primera instancia, validar la metodología de análisis a fin de garantizar que los ensayos realizados en el laboratorio, cumplan determinados requisitos que avalen la calidad de su realización, que aseguren las exigencias del cliente y sea demostrativo de la competencia técnica del laboratorio de ensayo.

En esta tesis se formuló el objetivo general: Validar un método de análisis para determinación de Ocratoxina A en café verde, utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC); y, como objetivos específicos: Establecer las características de funcionamiento y limitaciones analíticas del ensayo de laboratorio para la determinación de Ocratoxina A en café verde; elaborar un plan de validación de la metodología establecida; evaluar parámetros de validación de la metodología analítica seleccionada, de acuerdo a criterios de la norma ISO-IEC-17025:2005 como requisito previo para la acreditación de la misma y del Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA) a través del Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE); y, realizar ensayos interlaboratorios a nivel internacional.

Se planteó la hipótesis: El proceso de validación evalúa experimentalmente los parámetros de calidad, que aseguren la aptitud del método de análisis, demostrando de esta manera ser aplicable para la determinación de Ocratoxina A.

Este estudio está enmarcado dentro del Proyecto de Fortalecimiento 2100068001/Act 28: Agroindustria, Energía y Nutrición, en su componente: “Valoración de cultivos y materias primas para respaldar las certificaciones de origen, desarrollar y aplicar procesos tecnológicos agroindustriales a través de sistemas integrados de calidad, sanidad e inocuidad a lo largo de la cadena agroproductiva”.

CAPÍTULO I

1. PARTE TEÓRICA

1.1 EL CAFÉ

1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El **café** (fotografía No. 1) pertenece a la familia botánica *Rubiaceae*, la cual tiene unos 500 géneros y más de 6.000 especies, la mayoría son árboles tropicales y arbustos que crecen en las partes bajas de los bosques. Otros miembros de la familia incluyen las gardenias y plantas que producen quinina y otras sustancias útiles, pero el *Coffea* es el miembro más importante de la familia, económicamente hablando. (47)



FOTOGRAFÍA No. 1 ARBUSTO DE CAFÉ

Los granos de café o semillas, están contenidos en el fruto del arbusto, que en el estado de madurez es de color rojo y se le denomina "*cereza*". Cada cereza consiste en una piel

exterior que envuelve una pulpa dulce. Debajo de la pulpa están los granos recubiertos por una delicada membrana dorada; estas membranas envuelven las dos semillas de café. La semilla del café es de aproximadamente un centímetro de largo, tostada y molida se usa para preparar una bebida estimulante. (6)(17)

Los cafetales empiezan a dar frutos cuando tienen de 3 a 5 años de edad; cuando los frutos están en el estado óptimo de madurez se recolectan manualmente, se despulpan, se fermentan, lavan y secan; este proceso es conocido como el beneficio agrícola por la vía húmeda. Posteriormente el grano seco se trilla para retirar la capa dorada que lo recubre. (6)

Otro método de beneficiar el café es a través del proceso conocido como beneficio agrícola por la vía seca, que consiste en deshidratar el café cereza por medios naturales o artificiales, hasta un nivel en que puede ser llevado a la piladora para la eliminación física de las envolturas del almendro. (53)

Una vez retirado las envolturas del almendro, el grano se selecciona y clasifica cuidadosamente, teniendo en cuenta su tamaño, peso, color y defectos. Finalmente estos granos seleccionados se tuestan para que desarrollen el sabor y aroma del café, se muelen y quedan listos para la preparación de la bebida. (6)

El café verde es el grano de café obtenido del fruto de los árboles del género *Coffea*, que han sido objeto de un proceso de desecación y descascarado, con cafeína y listo para el tostado. Se denomina también café crudo o café oro. (27)

1.1.2 ORIGEN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Aunque hay muchas versiones sobre la época y los orígenes del café se puede asegurar que fue en África donde se realiza su descubrimiento, en el siglo XIV, los árabes llevan la planta a Yemen y allí aparecen las primeras y únicas plantaciones, a finales del siglo XVI las plantaciones se expanden primero por Ceilán y luego a la India, fueron los

exploradores holandeses en el siglo XVII quienes se apropiaron de un pie del cafetal en Yemen y lo trasladaron al jardín botánico de Amsterdam. (12)

A principio del siglo XVIII el café llega a América, siendo aquí donde más y mejor se desarrollan los árboles; en tierras intertropicales y a una altitud no superior a 2000 metros sobre el nivel del mar. Hoy en día, algunas de las mejores variedades de café del mundo provienen de países como de Brasil y Colombia. (12)

El café presenta la siguiente clasificación botánica: (31)(53)

Reino:	Plantae
Tipo	Espermatofitas
Sub-tipo	Angiospermas
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Rubiaceae
Subfamilia:	Ixoroideae
Tribu:	Coffeae
Género:	<i>Coffea</i> L.
Sub-género	Eucoffea
Especies:	<i>Coffea arabica</i> , <i>Coffea benghalensis</i> , <i>Coffea canephora</i> , <i>Coffea congensis</i> , <i>Coffea excelsa</i> , <i>Coffea gallienii</i> , <i>Coffea bonnierii</i> , <i>Coffea mogenetii</i> , <i>Coffea liberica</i> , <i>Coffea stenophylla</i>

Los cafetales son arbustos de las regiones tropicales de la familia de los rubiáceos, las principales especies que se utilizan para la preparación de la bebida del café son: *Coffea arabica* y *Coffea canephora* o *robusta*, sus principales características se describen a continuación: (20)

Coffea arabica.- Es la única especie poliploide ($2n=48$) en el género *Coffea*. Es un arbusto que alcanza 3-7 m de altura y posee ramas redondeadas o comprimidas. Su porte es semierguido en la planta joven, pero en pleno desarrollo es horizontal o caedizo. Sus hojas son opuestas, de pecíolo corto, enteras, de forma ovalada u oval-lanceolada, acuminadas, con márgenes ondulados y superficie ligeramente rugosa. Las flores son blancas y desprenden un perfume parecido al del jazmín en el momento de su apertura. Se agrupan en número de 2-3 en la axila de las hojas formando verticilos florales de 8-15 flores. (21)

Las cerezas de café arábigo (fotografía No. 2) son ovales y el tiempo que transcurre desde la floración a la maduración de los frutos es de 210 a 240 días. Las cerezas normalmente contienen dos semillas planas, convexas en su cara dorsal y marcadas con un surco profundo en la ventral. Cuando solo un grano se desarrolla, recibe el nombre de peaberry. (47)



FOTOGRAFÍA No. 2 CEREZAS DE CAFÉ ARÁBIGO (*Coffea arabica*)

El café arábigo es a menudo susceptible al ataque de plagas y enfermedades, por tanto la resistencia a estas es un objetivo primordial de los programas de cultivo de la planta. El color de los granos crudos son generalmente verdes, tienen mayor contenido en aceites y azúcares que los robustas. Se cultivan siempre en terrenos altos: entre 800 y 2.000 metros sobre el nivel del mar, su producción comprende entre los 1500 a 3000 Kg granos/ha; además, presentan un contenido bajo en cafeína, en torno al 1%. (33)(47)

Coffea canephora (robusta).- Es una especie perenne diploide ($2n=22$), además es autoincompatible; es decir que el óvulo no puede fertilizarse con su propio polen y requiere polinización cruzada. Las plantas de esta especie son pequeños árboles vigorosos, de altura variable pudiendo alcanzar hasta los 12 metros. Los árboles de robusta pueden ser monocaules (un solo tallo productivo) o multicaules (varios tallos productivos). Se cultiva en densidades más bajas, preferentemente a 1.111 y 1.333 cafetos/hectárea. (20)

El sistema radicular del café robusta es abundante, la masa de raíces se concentra en las capas superiores del suelo. Las hojas son anchas, grandes y de color verde. Las inflorescencias son axilares, formando verticilios de 15 a 30 flores de color blanco y muy fragantes. Las cerezas de café robusta (figura No. 1) son redondeadas y su punto de maduración comprende entre los 240 y 270 días después de la floración, dependiendo de los factores climáticos de las zonas de cultivo, especialmente la temperatura. (20)(47)



FIGURA No. 1 CEREZAS DE CAFÉ ROBUSTA (*Coffea canephora*)

Los granos de café robusta tienden a ser más pequeños que los de arábica. Las semillas pueden ser redondeadas, ovaladas o elípticas, con puntas pronunciadas, dependiendo del clon. El color de los granos secos depende del tratamiento post cosecha; pues, tienden a verde cuando se benefician por la vía húmeda y de una tonalidad marrón-dorado cuando se benefician por la vía seca. El contenido de cafeína del café robusta varía entre 2 y 2.5 %. (20)

El café robusta y sus híbridos con otras especies manifiestan características decididamente favorables:

- a) Inmunidad o gran resistencia a la roya por hemileya
- b) Baja cantidad de fruta para la proporción de grano sembrado (3-5:1 en comparación de 5-6:1 para el café arábigo)
- c) Gran capacidad productora: 2300-4000 Kg granos/ha.
- d) Se cultiva por debajo de los 600 msnm.
- e) Capacidad para retener la fruta en el árbol durante un cierto tiempo tras su plena madurez. (7)

1.1.3 EL CAFÉ EN EL ECUADOR

Ecuador tiene una historia rica de caficultura que empieza con su introducción al país en los años 1800. En la primera parte del siglo XX fue el primer producto de exportación, desde entonces, el banano, el petróleo y el camarón lo han sobrepasado. Se vivió una época relativamente buena para el sector cafetalero en los años 70 y 80, luego con la ruptura del Acuerdo Internacional de Café en 1989, vino la anarquía en la producción que derivó en una sobreoferta, el deterioro de la calidad y la caída de los precios a nivel mundial. En el Ecuador como en muchos países cafetaleros los productores se empobrecieron y se vieron obligados a abandonar sus fincas en busca de su sobrevivencia en la ciudad o en el exterior. (19)

Afortunadamente, en los años 90 más y más consumidores empezaron a exigir un mejor café, tal vez como reacción a los cafés de mala calidad en el supermercado, por el crecimiento de la conciencia social y medioambiental o por una combinación de ellas. Como uno de los países megadiversos, la biodiversidad del Ecuador está simbióticamente relacionada con las formas de producción de los pequeños caficultores. (19)

Históricamente, desde el año 1860 se ha cultivado el grano de café en la zona de Jipijapa en la provincia de Manabí. Hasta 1876, el cultivo de este producto se encontraba en una etapa incipiente, con la apertura del Ecuador al comercio mundial se dio un impulso

significativo a las pequeñas plantaciones, alcanzando un cierto grado de desarrollo. En 1903 el cultivo del café disminuyó, pero dos años después se volvió a cultivar y se comenzó a exportar a varios países europeos, desde el puerto de Manta. (52)

En 1935 las exportaciones ascendían a la cifra de **220.000** sacos, en 1960 a **552.000** sacos, en 1975 a **1'018.000**, en 1985 se exportaron **1'810.000** y en 1995 el promedio descendió a **1'080.000** sacos. (52)

En el año 2001 se produjeron alrededor de **1'062.000** sacos de 60 Kg, lo que equivale a 63.720 TM (toneladas métricas), de los cuales se exportaron **311.804** sacos de café en grano. La superficie cultivada fue alrededor de las 262.060 hectáreas. (52)

Las exportaciones de café en grano en el año 2005 se ubicaron en 301.717 sacos de 60 Kg, en tanto que en el 2006 se exportó 293.300 sacos, y en el 2007 alrededor de 181.483 sacos de 60 Kg. El ingreso de divisas por este rubro ha disminuido considerablemente en los últimos dos años, de 32 millones de dólares en el 2006 hasta 22 millones en el 2007, aunque el precio pagado al productor a partir del 2005 se incrementó de 52 a 66 dólares. (24)

Las exportaciones de café en grano, en el año 2008 se ubicaron en 59.575,46 sacos de 60 Kg de café arábigo, 65.894,82 sacos de 60 Kg de café robusta y 748.608,86 sacos de 60 Kg de café industrializado. Por lo tanto, el total de sacos de 60 Kg exportados en el 2008 fue de 874.079,14, generando un ingreso para el país de 125.580.530,34 dólares, como se puede apreciar en la tabla No. 1: (3)

TABLA No. 1 EXPORTACIÓN DE CAFÉ ECUATORIANO POR CALIDAD EN EL AÑO 2008 (SACOS DE 60 KILOGRAMOS)

CALIDAD	SACOS	DÓLARES
ARÁBIGOS	5 9.575,46	9 .705.292,79
ROBUSTA	65.894,82	7.582.265,35
INDUSTRIALIZADO	748.608,86	108.292.972,20
TOTAL	874.079,14	125.580.530,34

FUENTE: ANECAFE (2009)

1.1.4 PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

El café arábigo (*Coffea arabica L.*) se cultiva en el Ecuador desde altitudes cercanas al nivel del mar hasta los 2.000 metros de altura, distribuidas principalmente en las provincias de Manabí, Loja, El Oro, Zamora Chinchipe, Pichincha, Guayas, Los Ríos, Bolívar, Imbabura, Esmeraldas y Napo (figura No. 2). Algunas variedades arábicas como Typica y Caturra rojo, se han adaptado y producen bien en las zonas tropicales secas donde otras especies vegetales no se desarrollan satisfactoriamente. En las zonas subtropicales, especialmente hacia las estribaciones occidentales de la cordillera de Los Andes, los cafetales arábicos han mostrado un excelente comportamiento productivo y buena calidad de taza. (21)

El café robusta (*Coffea canephora Pierre*), se cultiva en las zonas tropicales húmedas, por debajo de los 600 msnm, principalmente en las provincias de Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos, Napo, Sucumbios y Orellana. (21)

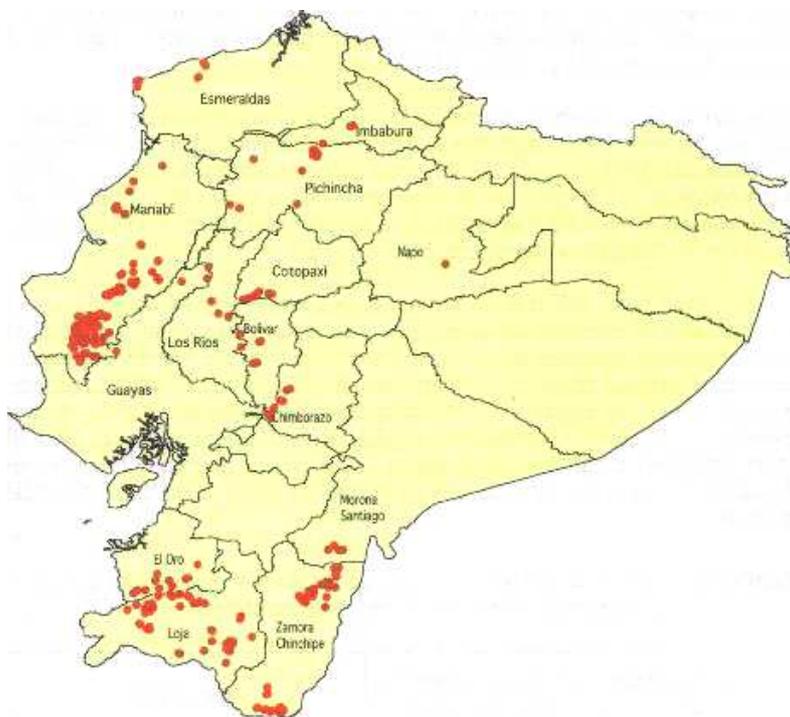


FIGURA No. 2 ZONAS DE PRODUCCIÓN DE CAFÉ ARÁBIGO EN EL ECUADOR

El café ecuatoriano se exporta actualmente a cerca de cincuenta países, entre los cuales se encuentran Estados Unidos, Colombia, España, Chile, Alemania, Italia, Francia, Polonia, Japón, Bélgica, Canadá, Países Bajos, Argentina y Suiza. Esto se debe gracias a sus ventajas comparativas y competitivas entre las que se encuentran las siguientes: (52)

- Oferta de los tres tipos de café: Arábigo lavado, Arábigo natural y Robusta.
- Precios competitivos a nivel mundial.
- Disponibilidad de producción durante la mayor parte del año.
- Gran variedad: verde, tostado (figura No. 3), tostado y molido, spray-dried, aglomerado y freeze-dried. El café especial y extractos de café son productos con gran potencial de desarrollo. (52)



FIGURA No. 3 GRANOS DE CAFÉ TOSTADO

En los últimos años el Ecuador ha tenido que realizar importaciones de café para cubrir los requerimientos de la industria de solubles, la procedencia de dichas importaciones ha sido especialmente de Perú, con café de baja calidad. (14)

Estas importaciones se efectúan bajo régimen especial (depósito industrial), sin pago de impuestos, en razón de que se destina a la industria y a la exportación. Esta situación debe ser un llamado para el establecimiento de políticas que permitan la recuperación de este importante sector productivo del país. (14)

Las importaciones de café en el año 2008 se ubicaron en 698,46 toneladas, siendo en este año Colombia nuestro principal proveedor con 67,26 toneladas, lo cual le costó al país

1063,293 miles de dólares FOB y 1083,205 miles de dólares CIF, lo cual se puede apreciar en la tabla No. 2: (5)

TABLA No. 2 IMPORTACIÓN DE CAFÉ ECUATORIANO EN EL AÑO 2008 (TONELADAS)

TIPO DE CAFÉ	PAÍS	TONELADAS	MILES USD FOB ¹	MILES USD CIF ²
LOS DEMÁS	PERU	631,12	681,406	690,137
EN GRANO	COLOMBIA	4,313	42,619	43,3
MOLIDO	COLOMBIA	57,243	285,059	293,547
DESCAFEINADO	COLOMBIA	5,702	54,084	56,074
DESCAFEINADO	ESTADOS UNIDOS	0,082	0,112	0,132
DESCAFEINADO	ITALIA	0,003	0,013	0,015
	TOTAL	698,463	1063,293	1083,205

FUENTE: BANCO CENTRAL DEL ECUADOR (2009)

¹FOB (free on board, franco a bordo)= La mercancía es puesta a bordo por el expedidor, libre de todo gasto, siendo de cuenta del destinatario los fletes, aduanas)

²CIF (cost+insurance+fletements)= Dichos artículos incluyen en su precio los costes propios, los de la poliza de seguro durante el trayecto así como los costes de flete de la mercancía)

1.1.5 POST COSECHA Y CALIDAD DEL CAFÉ

La calidad del café está determinada por sus propiedades físicas y organolépticas. Los principales factores que determinan la calidad del café son los siguientes: La altitud de la zona de cultivo, la composición del suelo y su fertilidad, la cantidad de lluvia y su distribución, la temperatura ambiental, el manejo agronómico de la plantación, la cosecha, el proceso post- cosecha, el secado y el almacenamiento. (20)

Durante el tratamiento post cosecha, la calidad del café está determinada por:

- Limpiar y dar el mantenimiento adecuado a la despulpadora, zarandas, marquesinas, tendales o tarimas, antes de iniciar la cosecha.
- Cosechar selectivamente los frutos en su punto óptimo de maduración, mediante el método del “pepiteo” o “desgrane” (fotografía No. 3), realizando las recolecciones de frutos maduros que sean necesarias durante la época de cosecha. El punto óptimo de maduración es de 6 a 8 meses después de la floración para la variedad de café arábigo, de 9 a 11 meses para otra variedad que es la de café robusta.

- Beneficiar el café cereza por la vía húmeda o mediante el beneficio ecológico.
- Realizar el despulpado del café cereza, inmediatamente después de la cosecha (el mismo día).
- Fermentar el café hasta su punto óptimo en tanques de cemento o de plástico bien limpios.
- Lavar el café con agua limpia, por varias veces y eliminar los granos vanos durante el lavado.
- Secar el café en marquesinas o tendales de cemento, en capas con un espesor de 5 centímetros de masa de café, removiendo con un rastrillo, varias veces al día, evitando el rehumedecimiento.
- Controlar el contenido de humedad hasta constatar que el grano tenga de 12 a 12.5 por ciento y evitar las mezclas de café con diferentes niveles de humedad.
- Guardar el café en sacos de yute o cabuya limpios, preferentemente nuevos, en estado de pergamino seco, luego de que se haya atemperado.
- Transportar el café pergamino seco o verde en condiciones de adecuada limpieza evitando el contacto con contaminantes.
- Almacenar el café en grano, en bodegas secas, ventiladas, limpias y libres de contaminación, sobre estibas de madera y separado de la pared. (22)



FOTOGRAFÍA No. 3 COSECHA DE GRANOS DE CAFÉ MEDIANTE PEPITEO

1.1.6 BENEFICIO DEL CAFÉ

El beneficio es el procedimiento para obtener el denominado café oro a partir de las cerezas maduras. Esta es una labor tan importante como cualquiera de las otras que

requiere el cultivo; pues, todo el esfuerzo, labores e inversión realizados por el caficultor, durante todo el año para conseguir un buen rendimiento, podrían perderse sino se realiza un correcto beneficio del grano. (23)

En la actualidad se reconocen fundamentalmente, dos métodos de beneficio, identificados como: Por la vía seca y por la vía húmeda. (23)

1.1.6.1 Beneficio por vía húmeda

El café cereza cosechado debe ser despulpado inmediatamente, si se amontona y demora el despulpado se produce una alteración en la fermentación, se modifica su perfil de taza y puede favorecer la colonización de hongos micotóxicos. (18)

La separación de los frutos secos y vanos; así como de las hojas y materias extrañas, antes de realizar el despulpado, es una práctica necesaria para facilitar el beneficiado y reducir los riesgos de contaminación por hongos y micotoxinas, especialmente de la Ocratoxina A (OTA). (18)

El café despulpado se coloca en los tanques de fermentación por un tiempo apropiado para permitir la remoción del mucílago, este período puede variar entre 10 y 20 horas, dependiendo de la zona de cultivo y la temperatura del ambiente. El café fermentado en su punto óptimo tiene que lavarse con abundante agua limpia, de esta manera se obtiene el café pergamino húmedo que es llevado a un tendal de cemento o marquesina para su secado hasta que el grano, en pergamino seco, alcance del 10 al 12% de humedad. (18)

En la figura No. 4 se puede apreciar un diagrama del proceso de beneficio por vía húmeda.



FIGURA No. 4 BENEFICIO POR VÍA HÚMEDA

1.1.6.2 Beneficio por vía seca

El beneficio por la vía seca consiste en cosechar el café cereza y deshidratarlo por medios naturales (tendal de cemento y exposición solar) (fotografía No. 4) o artificiales (secadora) hasta un nivel en que pueda ser sometido a una piladora, para la eliminación física de las envolturas de la almendra. (23)



FOTOGRAFÍA No. 4 SECADO DEL CAFÉ CEREZA EN TENDAL

El secado termina cuando el café alcanza el estado conocido como “bola seca” (fotografía No. 5), que luego es directamente pelado, empleando una máquina denominada piladora. Este es el procedimiento para obtener el café natural. (23)



FOTOGRAFÍA No. 5 CAFÉ BOLA SECA

1.2 LAS MICOTOXINAS

Las micotoxinas, que deriva de las palabras griegas mikes y toxina, que significan hongo y veneno respectivamente, son metabolitos secundarios tóxicos producidos por algunas especies de hongos, que incluye setas, mohos y levaduras, y que pueden afectar la salud de las personas y animales. Estas pueden contaminar diversos productos de alimentación humana y animal. (35)(45)

Las micotoxinas representan un peligro latente tanto para la salud humana como animal, estas se pueden encontrar de modo natural en un gran número de productos agrícolas, utilizados como materias primas para la preparación de alimentos balanceados para animales, y como contaminantes o residuos tóxicos de los productos de las explotaciones zootécnicas (leche, huevos carnes). La contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración hasta su conservación. (9)

Las micotoxinas más estudiadas y con una acción conocida en mamíferos y peces son: aflatoxinas, ocratoxinas, patulina, ácido penicilínico, citrinina, zearanelona, alcaloides de

ergot y tricotecenos. En la tabla No. 3 se resume los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos comunes en la contaminación de los alimentos. (34)

TABLA No. 3 ALGUNOS DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS TÓXICOS PRODUCIDOS POR HONGOS CONTAMINANTES DE LOS ALIMENTOS

HONGOS	PRINCIPAL METABOLITO TÓXICO
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B, M, G.
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B, M
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A
<i>Fusarium tricinctum</i>	T-2 toxina
<i>F. roseum</i>	T-2 toxina
<i>F. moniliforme</i>	Zearalenona (F-2 toxina)
<i>Gilerella zeae</i>	2-Deoxinivalenol (Don)
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ocratoxina A
<i>P. cyclopium</i>	Ocratoxina A

FUENTE: FAO (2009)

La imposibilidad de clasificar a estos compuestos en forma simple, ha llevado a considerar formas de clasificación que consideran aspectos más refinados tales como, mecanismos moleculares o activación biológica. (34)

Debido a esto, el autor japonés Yoshio Ueno, ha clasificado a las toxinas más importantes de acuerdo con su afinidad con los organelos celulares, definiendo entonces, características toxicológicas y transformaciones metabólicas. (34)

Según este criterio las micotoxinas se clasifican en:

- a. Inhibidores de la producción de energía. Actúan inhibiendo la actividad de los adenosintrifosfataza (ATPasa), inhibiendo en consecuencia, la fosforilación oxidativa celular. Ej.: citreoviridinas; luteoskirina, ergocromos, etc.
- b. Inhibidores de síntesis de proteínas: Actúan inhibiendo ya sea al inicio de la síntesis, tricotecenos tipo I (ej.: verrucarina A, fusarenona-X, nivalenol, entre otras), o inhibiendo la elongación y término de la proteína, tricotecenos tipo ET

- (ej.: deoxinivalenol, crotocina, verruvarol, entre otras). Otras micotoxinas inhiben en forma competitiva la actividad de la fenilalanil-tRNA sintetasa (ej.: Ocratoxina A).
- c. Modificadores de citoesqueleto. Actúan modificando las funciones de los microfilamentos y microtúbulos celulares. Ej.: griseofulvina, citocalasinas, cloropectido.
 - d. Micotoxinas estrógenicas. Provocan respuestas de crecimiento de masa en el útero y de alteración de niveles circulantes de hormonas. Ej.: zearalenona.
 - e. Generadores de temblor (tremorgenos). Actúan sobre el sistema nervioso central induciendo temblores generalizados en animales. Ej.: penitrem A.
 - f. Micotoxinas cancerígenas. Provocan desarrollo de tumores en hígado y en corteza renal. Ej.: aflatoxinas, esterigmatocistina. (34)

1.2.1 AFLATOXINAS

Las **aflatoxinas** son micotoxinas producidas por muchas especies del género de hongos *Aspergillus*, los más notables *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*, pero también pueden ser producidas por hongos del género *Penicillium*, como *P. verrucosum*. Las aflatoxinas son tóxicas y carcinogénicas tanto para animales como para humanos, luego de su entrada al cuerpo, las aflatoxinas se metabolizan por el hígado con un precursor intermedio, la aflatoxina M1. (9)

Las aflatoxinas son metabolitos fúngicos secundarios pertenecientes al grupo de las bifuranocumarinas, son formadas por moléculas heterocíclicas, con átomos de oxígeno y anillos de difurano, que difieren entre sí apenas por pequeñas variaciones en su estructura molecular básica. Son conocidas más de veinte sustancias del grupo de las aflatoxinas, pero las más comunes en los alimentos son las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (Figura No. 5). (30)

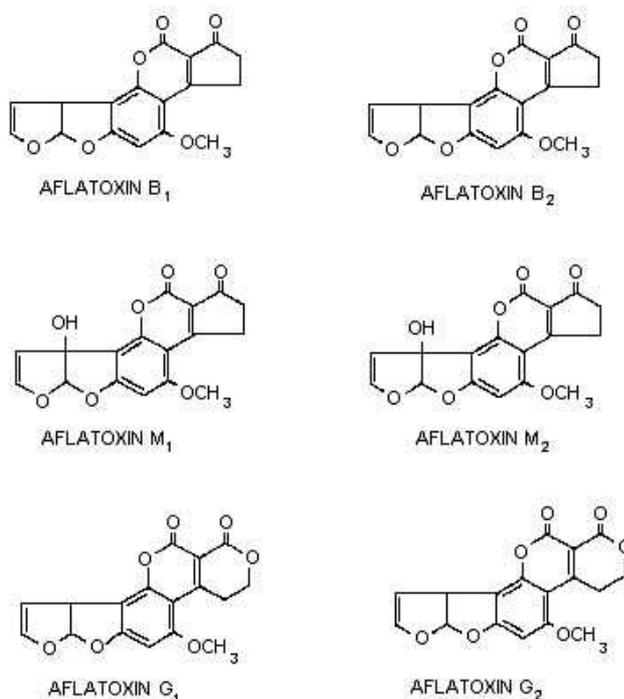
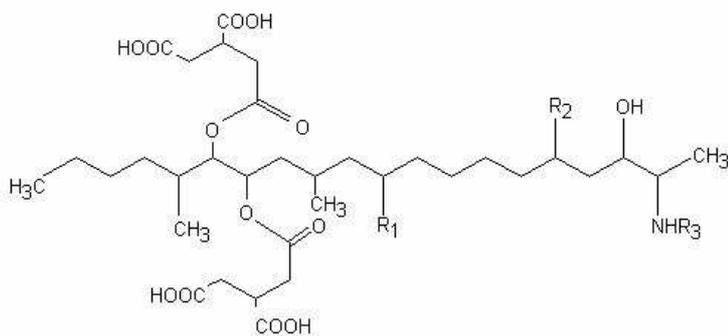


FIGURA No. 5 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS AFLATOXINAS

La designación de aflatoxinas B1 y B2 se debe a que bajo la luz ultravioleta exhiben fluorescencia azul, mientras que las designadas como G muestran en sus estructuras relevantes fluorescencia amarilla verdosa. Además, dos de los productos metabólicos, aflatoxina M1 y M2 son contaminantes directos significativos de alimentos y piensos. (46)

1.2.2 TRICOTECENOS

Los tricotecenos son micotoxinas producidos por varias especies de *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* y *Stachybotrys*. Se han detectado cuatro tricótesenos: Toxina T-2, nivalenol, desoxinivalenol (DON) (Figura No. 6), y diacetoxiscirpenol como contaminantes en alimentos para uso humano y animal. El desoxinivalenol es el más común, pero menos tóxico de estos compuestos. Los tricotecenos son inhibidores fuertes de la síntesis de proteínas en las células de los mamíferos, sin embargo el desoxinivalenol recibe su nombre común, vomitoxina, por los vómitos que normalmente acompañan al envenenamiento por tricotecenos. (49)



Fumonisin	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
B4	H	H	H
A1	OH	OH	CH ₃ CO
A2	H	OH	CH ₃ CO

FIGURA No. 8 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS FUMONISINAS

Estos hongos infectan principalmente al maíz aunque también afectan ocasionalmente al arroz y al sorgo; sus metabolitos han sido implicados en enfermedades que afectan tanto a équidos (leucoencefalomalacia) como a cerdos en donde produce el “edema pulmonar porcino” caracterizado lógicamente por un edema pulmonar, además de pancreatitis y daño hepático. (9)

Aunque se han encontrado por lo menos 12 análogos de fumonisinas, las más importantes son las de la serie B (fumonisina B1, fumonisina B2 y fumonisina B3). Se considera a la fumonisina B1 como la más tóxica de este grupo, además de ser la fumonisina de mayor presencia en cultivos, piensos y productos alimenticios. (30)

La fumonisina B1 y fumonisina B2 poseen una unidad hidrocarburo de cadena larga, de estructura parecida a la de los esfingolípidos, esfingosina y esfinganina; la cual juega un papel importante en su toxicidad. La estructura química de la fumonisina B1 corresponde a un diéster del 2-amino, 12,16 dimetil, pentahydroxi-icosano, donde los grupos hidroxilo de los carbonos en posición 14 y 15 están esterificados con el ácido propano tricarbóxico. (9)

1.2.5 PATULINA

La patulina (Figura No. 9) es una micotoxina producida por diferentes mohos, pero fue en *Penicillium patulum*, más tarde llamado *Penicillium urticae* y hoy conocido como *Penicillium griseofulvum*, en la década de 1940 donde se describió primero. Esta micotoxina ha sido aislada de múltiples *Micromycetes* de los géneros *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Gymnoascus*, *Paecilomyces* y *Penicillium* aunque ahora se han añadido a la lista algunas cepas de *Mucor* y algunos *Deuteromycetes*. (54)

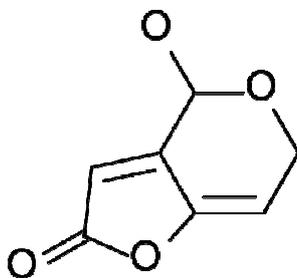


FIGURA No. 9 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PATULINA

Hoy en día, *Penicillium expansum*, causante de múltiples pérdidas en frutas, se conoce como uno de los mayores productores de patulina. Dicha sustancia, además, puede observarse en zumos de manzana no fermentada, y se conoce de su toxicidad a altas concentraciones en laboratorio, aunque las evidencias de su toxicidad natural son indirectas. Sin embargo esto ha sido suficiente para que la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), hayan establecido un máximo tolerable de ingesta de esta sustancia de 0,4 µg/kg de peso corporal al día. (54)

La patulina puede detectarse en frutas, hortalizas, cereales enmohecidos y piensos; no obstante, no puede excluirse la presencia de esta micotoxina en las frutas aparentemente sanas. El grado de contaminación está relacionado con el grado de podredumbre y la patulina apenas se extiende fuera de los tejidos alterados. (54)

1.2.6 OCRATOXINA A

Las Ocratoxinas son metabolitos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, químicamente se trata de derivados 3-4-dihidrometilisocumarina unidos con un enlace amida a un grupo amino de la L-β -fenilalanina (estructura fenilalanina-cumarinas) (Figura No. 10). (15)

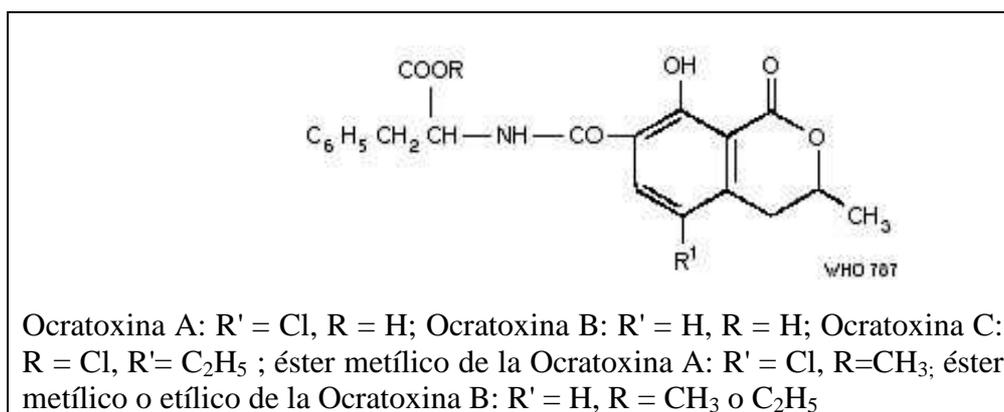


FIGURA No. 10 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS OCRATOXINAS

Estos compuestos se sabe que tienen toxicidad aguda en ratas y ratones, efectos nefrotóxicos (daño renal) en pollos y efectos carcinogénicos en humanos. La Ocratoxina A (OTA) es el compuesto más tóxico de este grupo, fue primeramente aislado del *A. Ochraceus* y más tarde fue encontrado como un metabolito secundario de las especies del género *Penicillium* en climas templados. (9)(15)

La Ocratoxina producida por *Aspergillus* parece estar limitada por condiciones de alta humedad y temperatura; sin embargo, algunas especies de *Penicillium* pueden producir Ocratoxina a temperaturas menores de los 5°C. (48)

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por ciertos hongos filamentosos, que al desarrollarse en los alimentos pueden originar su presencia en los mismos. La OTA fue descubierta en 1965 en África por Van der Merwe y colaboradores al observar su presencia en muestras de maíz; como fue descrita originalmente como un metabolito de *Aspergillus ochraceus*, fue rápidamente bautizada por este motivo con el nombre de Ocratoxina A. (45)

Esta molécula de estructura compleja (Figura No. 11) ha sido posteriormente detectada en numerosos alimentos, como los cereales, las legumbres, las especias, el café, el cacao, los frutos secos, la carne, el coco, la cerveza, en las pasas y también en el vino, además otros productos de origen animal como los riñones de cerdo. (8)(30)

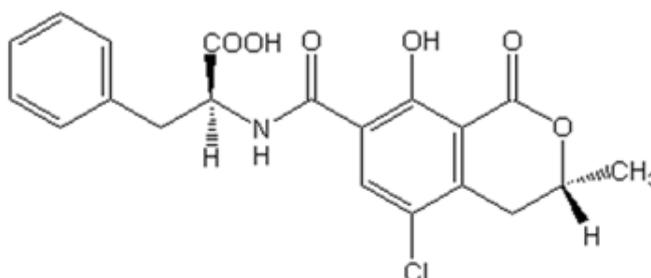


FIGURA No. 11 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA OCRATOXINA A (OTA)

La OTA es una molécula pequeña, soluble en agua, y químicamente está constituida por la combinación de un aminoácido (fenilalanina) y un policétido al carbono 10 (del metabolismo de las grasas), contiene un átomo de cloro necesario para su actividad biológica, es estable en el calor y se extrae fácilmente del café molido con agua caliente. (36)

La Ocratoxina A es una micotoxina con propiedades carcinógenas, nefrotóxicas, teratógenas, inmunotóxicas y, posiblemente, neurotóxicas. (30)

1.2.6.1 Toxicidad de la Ocratoxina A

De acuerdo a la Comisión Internacional para la Evaluación de Riesgos por Exposición a Micotoxinas, la Ocratoxina A presenta alta toxicidad. Por lo tanto, estableció provisionalmente que el límite máximo tolerable para la Ocratoxina A en los seres humanos sería 112 ng /kg/semana. Esta conclusión se basó en el nivel máximo de Ocratoxina tolerables para los cerdos, sin deterioro de la función renal, que es de 0.008 mg/Kg de peso corporal por día, lo que corresponde a alrededor de 0,2 mg de toxina por kg de ración. (30)

Los valores de la dosis letal 50 (DL₅₀) de la Ocratoxina A en algunos especies de animales domésticos se pueden ver en la tabla No. 4. (30)

TABLA No. 4 VALORES DE DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) DE LA OCRATOXINA A EN ALGUNAS ESPECIES CUANDO LA TOXINA SE ADMINISTRA POR VÍA ORAL

Especie	DL₅₀ (mg/Kg de peso corporal)
Perro	0.2
Ratón	46-58.3
Pollo	3.3
Pato	0.5
Rata	20-30.3
Rata recién nacida	3.9
Cerdo	1.0

FUENTE: MALLMANN, C; DIKIN, P. (2007)

La Ocratoxina A produce dos tipos de toxicidad: (45)

1. Toxicidad aguda
2. Toxicidad crónica

1. TOXICIDAD AGUDA

Es relativamente baja y muestra variaciones interespecíficas, la DL₅₀ por vía oral se encuentra en un intervalo entre aproximadamente 20 y 50 mg/Kg en ratas y ratones, y de 0.2-1 mg/Kg en perros, cerdos y pollos, que son las especies más sensibles. Los síntomas de la intoxicación aguda consisten en hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón, así como nefrosis y necrosis hepática y en el tejido linfoide. Existe descrito únicamente un caso de intoxicación aguda en el ser humano. (45)

2. TOXICIDAD CRÓNICA

Lo que más preocupa respecto de la Ocratoxina A son sus efectos crónicos, está demostrado que el consumo crónico de OTA produce una nefropatía intersticial en los animales de granja como pollos y cerdos, que puede causar importantes pérdidas

económicas. A pesar de las diferencias en cuanto a la toxicocinética en diversas especies, las lesiones renales en cerdos, aves y roedores son muy similares. (45)

En el ser humano se ha relacionado con la etiología de una nefropatía que es endémica en la zona de los Balcanes debido a que presenta una gran semejanza histopatológica con la que se produce en los animales, ya que la exposición a OTA parece ser muy alta en esa zona geográfica comparada con otras. Es esta una enfermedad renal crónica y progresiva que representa actualmente el 11% de todas las enfermedades primarias diagnosticadas en la antigua Yugoslavia, se caracteriza por una neuropatía túbulo-intersticial progresiva, que deriva en una atrofia tubular y fibrosis periglomerular, entre otros síntomas. (45)

Esta enfermedad se acompaña a veces de tumores malignos del tracto urinario superior que resultan muy agresivos, algunos estudios indican una incidencia ligeramente más elevada de esta enfermedad en las mujeres. Si bien la hipótesis no está comprobada, algunos estudios realizados en Francia, Tunes y Egipto indican una relación entre la ingesta de OTA a través de la dieta y el desarrollo de tumores renales y uroteliales. (45)

La OTA es también teratogénica, hepatotóxica, neurotóxica e inmunotóxica y está clasificada por la IARC (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer) como posible carcinógeno humano clase 2B ya que produce tumores renales en animales de experimentación. (45)

En cuanto a sus efectos genotóxicos, aunque los estudios de mutagenicidad con bacterias eran negativos, algunos autores utilizando la técnica de post-marcaje con P, observaron que esta micotoxina incrementaba la formación de aductos en el DNA de manera dosis-dependiente, tanto in vitro como in vivo. Además, la formación de aductos estaba correlacionada con la aparición de tumores, sin embargo en otros trabajos recientes utilizando Ocratoxina A marcada con H, no se han encontrado evidencias experimentales de que esta o alguno de sus metabolitos dieran lugar a aductos en el DNA. (45)

1.2.6.2 Ocratoxina A y Café

La Unión Europea (UE) estableció en el 2004 un límite máximo de 5 µg/Kg de OTA en el café tostado y molido y de 10 µg/Kg en el instantáneo, límites máximos que fueron ratificados en el 2005 y 2006, y que se mantienen hasta la actualidad. La Unión Europea ha considerado que el riesgo de las micotoxinas es tan elevado a largo plazo que es necesaria una regulación específica destinada a reducir su ingestión. (36)(42)

El problema se ha trasladado a los países productores, puesto que ahora se les exige sin retraso una mejora en los sistemas productivos que impida la proliferación de los hongos en el café. Estas medidas higiénicas suponen un compromiso al desarrollo para muchos países. Así, el límite que se ha establecido de 5 ppb implicaría un rechazo del 7% de las importaciones de café verde, casi el total de los beneficios de la comercialización de este producto, lo que indudablemente implica poner en compromiso el desarrollo de esos países. (42)

La formación de la micotoxina se produce cuando hay un agotamiento de los nutrientes en el producto y se comienza a ver la formación del sistema reproductivo del hongo, es decir, la parte visible de la colonia, que parece una agrupación con filamentos que recuerdan al algodón. (42)

Históricamente y antes de que los límites máximos de Ocratoxina A para café tostado molido e instantáneo fueran ratificados en el 2006 por la Unión Europea, algunos gobiernos han establecido niveles máximos para la Ocratoxina A en café tostado, soluble y, en algunos casos, verde. Se proporcionan los detalles en la tabla No. 5. (36)

TABLA No. 5 LÍMITES PARA LA OTA EN EL CAFÉ ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) VIGENTES EN ALGUNOS PAÍSES EUROPEOS

País	Verde	Tostado	Instantáneo
Alemania	-	3	6
República Checa	10	10	10
España	8	4	4
Finlandia	5	5	5
Grecia	20	-	-
Hungría	15	10	10
Italia	8	4	4
Países Bajos	-	10	10
Portugal	8	4	4
Suiza	5	5	5

FUENTE: FAO (2009)

1.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de métodos analíticos es el proceso para establecer las características de funcionamiento, limitaciones del método y la identificación de influencias que pueden cambiar estas características, cuando el método se desarrolla sin un problema particular previsto. (37)

Como una actividad previa a la validación tenemos lo que se conoce como la “puesta a punto”, la misma que debe realizar el laboratorio para llegar a tener un conocimiento general del método. Con esta actividad se consigue que el método “funcione” dando unas respuestas razonablemente aceptables y consistentes. (2)

Para ello, es necesario “afinar” el método en todos sus apartados, prestando una especial consideración a los diversos parámetros instrumentales de aplicación, (p.e. longitudes de onda, paso de celda, velocidad de aporte de muestra, limpieza de columna, temperaturas de horno, intervalo lineal. etc). (2)

Esta etapa puede convertirse para aquellos casos en los que no existan requisitos “externos” (normativos, de clientes), en la fuente de información que nos permita fijar objetivos de validación para los parámetros estudiados. (2)

Los métodos necesitan ser validados o revalidados en los siguientes casos:

- Antes de su introducción en el uso rutinario (métodos no estandarizados o métodos diseñados o desarrollados internamente).
- Siempre que las condiciones dentro de las cuales el método ha sido validado cambien por ejemplo, instrumento con diferentes características. (cuando se realizan algunos cambios en los métodos no estandarizados ya validados, se debe documentar la influencia de tales cambios, y si es necesario, se debe efectuar una nueva validación).
- Siempre que el método se cambie, y la variación este fuera del alcance original del mismo. (26)(43)

La validación incluye:

- ✓ La especificación de los requisitos
- ✓ La determinación de las características de los métodos
- ✓ Una verificación de que se pueden cumplir los requisitos al usar el método
- ✓ Una declaración de su validez (43)

La técnica para determinar el funcionamiento de un método puede ser una de las siguientes o su combinación:

- ✓ Calibración con el uso de normas o materiales de referencia
- ✓ Comparación de resultados obtenidos por otro(s) método(s)
- ✓ Comparaciones entre laboratorios
- ✓ Evaluación sistemática de los factores que influyen en los resultados
- ✓ Evaluación de la incertidumbre de los resultados basados en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y la experiencia práctica. (43)

El laboratorio deberá registrar:

- ✓ Los resultados obtenidos
- ✓ El procedimiento usado para la validación, y
- ✓ Una declaración acerca de que el método se ajusta al uso propuesto. (43)

Para las necesidades de los clientes deben ser relevantes el intervalo y la exactitud de los valores que se pueden obtener de los métodos validados, como son:

- ✓ La incertidumbre de los resultados
- ✓ Límite de detección
- ✓ Selectividad del método
- ✓ Linealidad
- ✓ Repetibilidad y reproducibilidad
- ✓ Robustez contra influencias externas
- ✓ Sensibilidad cruzada contra interferencias de la matriz de la muestra. (43)

Conforme avance el desarrollo del método, se deben llevar a cabo revisiones regulares para verificar que se siguen cumpliendo las necesidades del cliente. Cualquier cambio en los requisitos que necesiten modificaciones en el plan de desarrollo debe ser aprobado y autorizado. (43)

1.3.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

La validación de métodos analíticos considera la evaluación de los siguientes parámetros: (13)

1. Selectividad
2. Linealidad
3. Precisión
4. Exactitud
5. Sensibilidad
6. Robustez

7. Incertidumbre de la medición.

1.3.1.1 Selectividad

La selectividad se establece cuando la señal producida en la etapa de medición puede ser atribuida únicamente al analito y no a la presencia de algo similar o la coincidencia. La selectividad y la especificidad evalúan la confiabilidad de las mediciones ante la presencia de interferencias; la segunda se considera por lo general como un 100% de selectividad. Las interferencias pueden disminuir o aumentar la señal atribuida al analito. (43)

En métodos cromatográficos, la selectividad del método puede ser confirmada con uno o varios cromatogramas típicos, mediante el tiempo de retención relativo del analito en estudio, el cual es deducible desde el cromatograma. (13)

Para evaluar la selectividad la documentación necesaria puede incluir:

- Una lista de sustancias que puede ser encontradas en la solución de ensayo, especialmente sustancias que puede ser causa de problemas en la determinación cuantitativa.
- Tiempos de retención para el analito en cuestión, y productos secundarios.
- Diagrama de un cromatograma típico de una solución de ensayo y si es necesario el diagrama de cromatogramas de soluciones de ensayo piloto. (13)

1.3.1.2 Linealidad y rango lineal

Es el rango de concentraciones que va desde la menor concentración detectable y cuantificable con total exactitud y precisión (LOQ), hasta la concentración en la que la curva de calibración pierde su linealidad (límite de linealidad). (51)

Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco diluciones de un estándar, comprendiendo los ámbitos estudiados de trabajo con un exceso de al menos 50% sobre el

límite superior y un defecto de 50 % debajo del límite inferior del valor referencial de medida, las medidas de los puntos deben ser distribuidas lo más equidistante posible sobre el rango de trabajo, evitando ser concentrada tanto en la parte superior como inferior del rango, las cantidades del analito y el valor de la información acompañante son usadas para calcular los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado. (13)

Los documentos para evaluar la linealidad en la validación puede contener la siguiente información:

- Una tabla con las concentraciones de estándares utilizados y su respuesta en cada punto de la curva de calibración elaborada.
- Una representación gráfica de los valores medidos con la respuesta del equipo y los valores de pendiente, ordenada al origen, desviaciones estándar y límites de confianza.
- Rango de trabajo. (13)

1.3.1.3 Precisión

Describe el grado de concordancia entre réplicas de mediciones del analito en estudio, que se han realizado exactamente de la misma forma, y mide además el error aleatorio de un análisis. Para describir la precisión de un conjunto de datos se usan principalmente cuatro parámetros: media, desviación estándar, varianza y coeficiente de variación. Generalmente puede hablarse de precisión en dos términos: repetibilidad y reproducibilidad. (28)

La repetibilidad, expresa la precisión obtenida para un grupo de resultados de un ensayo llevado a cabo bajo las mismas condiciones de operación dentro de un mismo laboratorio, con el mismo equipamiento y realizados por el mismo operador, en un intervalo corto de tiempo. También se denomina precisión intra ensayo. Los ensayos deben ser análisis independientes de muestras aplicando todo el procedimiento analítico desde la preparación de la muestra hasta el cálculo final. (28)

La repetibilidad se expresa en función de la desviación estándar de las mediciones que se realicen y puede llevarse a cabo de dos maneras:

- Con un mínimo de nueve determinaciones que se encuentren dentro del rango de concentraciones empleado durante el procedimiento, tres concentraciones / tres replicas para cada una, o
- Un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración del ensayo. (28)

La reproducibilidad, es la precisión bajo condiciones reproducibles por la cual los resultados de los ensayos son obtenidos con el mismo método, en diferentes laboratorios, con diferentes equipos y diferentes operarios, se la conoce como precisión inter laboratorios, se entiende por tanto que tiene relación con trabajos o estudios colaborativos entre laboratorios. (28)

La repetibilidad y la reproducibilidad generalmente dependen de la concentración del analito y por lo tanto se deben determinar para diferentes concentraciones, estableciendo, cuando sea relevante la relación entre la concentración y el coeficiente de variación. (43)

El documento para evaluar en la validación la repetibilidad y reproducibilidad puede contener la siguiente información:

- Resultados en forma de una tabla de todas las repeticiones.
- Valor medio de las respuestas obtenidas.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación. (13)

1.3.1.4 Exactitud

Es el grado de concordancia entre el valor medido y el valor real, dado que es difícil establecer un valor absoluto verdadero, se puede definir exactitud como la concordancia entre el valor medido y el valor real aceptado. (39)

La exactitud se mide como el porcentaje de recuperación del analito aplicando el método de ensayo, mediante el uso de muestras "spike", que constituyen muestras a las que se les adiciona cantidades conocidas del compuesto en estudio, o a su vez utilizando materiales de referencia certificados. (MCR). (39)

La recuperación, se evalúa mediante la capacidad de un método de determinar todo el analito presente en las muestras, según el alcance del método. La mejor manera de determinar la eficacia de extracción del método es adicionar diferentes concentraciones del analito a las muestras y procesarlas por el método completo. Aunque es la manera más común de cuantificar la recuperación, el analito adicionado puede no enlazarse tan fuertemente a la matriz como el presente de manera natural y dar como resultado la impresión de una elevada eficacia de extracción. (43)

La alternativa es efectuar el proceso con MR en la matriz deseada, si existen; si estos MR han sido generados mediante caracterización de muestras naturales el estudio de recuperación representará con mayor precisión la extracción de muestras reales. (43)

El documento para evaluar en la validación la exactitud puede contener la siguiente información:

- Una tabla mostrando las cantidades de sustancia a ser determinada, la misma que fue añadida, pesada o la adición de volúmenes de solución estándar con sus respectivas concentraciones. El correspondiente valor informativo, el "verdadero" y los valores medidos como recuperación.
- Valor medio para el porcentaje de recuperación. (13)

1.3.1.5 Sensibilidad

La sensibilidad es el gradiente de la curva de respuesta, o lo que es lo mismo, el cambio en la señal correspondiente a un cambio de concentración de analito. Para el intervalo lineal de un método, la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración, y es un parámetro objeto de seguimiento cuando se efectúan calibraciones rutinarias. (43)

Los parámetros a evaluar en la sensibilidad son el límite de detección y el límite de cuantificación:

El **límite de detección**, llamada también “cantidad mínima detectable” (LOD), es la concentración más baja de analito en estudio que es posible detectar (no cuantificar) con certeza. Se expresa en unidades de concentración. Su determinación se efectúa por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 ó 3. (13)(39)

El **límite de cuantificación**, es la concentración más baja de un analito que puede ser determinado con precisión y exactitud aceptables, bajo condiciones operacionales establecidas para el método. Esta concentración es proporcional a una respuesta, que después de haber aplicado el método completo, es igual a la media de la respuesta del blanco (ruido) más diez desviaciones estándar. (39)

1.3.1.6 Confiabilidad del método (Robustez)

La robustez de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes, estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas de equipos, analistas, laboratorios, fuente de columnas, etc, este estudio puede ser retrospectivo, a partir de los resultados históricos obtenidos en diferentes condiciones, pero en el caso de métodos nuevos el estudio es efectuado por el laboratorio emisor de la técnica. (13)

Es evidente que un método debe ser "sólido" (reproducibile) frente a cambios de analistas o instrumentos, pero no necesariamente debe serlo frente a todos los cambios que se estudien. (13)

1.3.1.7 Incertidumbre de medición

La palabra incertidumbre significa duda y por lo tanto en un sentido metrológico, “incertidumbre de medición” significa la duda que se tiene sobre el resultado experimental obtenido al realizar una medición. (38)

“Incertidumbre es un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden razonablemente ser atribuidos al mensurando”, puede ser considerada como la estimación que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se puede encontrar el valor verdadero de la magnitud medida, entendiéndose como valor verdadero aquel que representa la verdad absoluta. (38)

Incertidumbre es la duda que se tiene del resultado de una medición por los errores aleatorios de causas comunes presentes en el momento en que se lleva a cabo la medición más todos aquellos que se heredan por otras causas, tales como los siguientes: trazabilidad de los materiales de referencia, errores instrumentales, correcciones, entre otras. (38)

Para estimar la incertidumbre existen diferentes métodos, a continuación se describe los pasos que se pueden tomar como referenciales para realizar este cálculo: (1)

PASO 1

Poner la expresión de la magnitud de salida Y en función de todas las magnitudes de entrada X_i , (al menos serán aquellas que se miden directamente a partir de las que se calcula el resultado final; por ejemplo, si se mide el espacio, s , y el tiempo, t , para calcular la velocidad, poner la expresión $v = s/t$): (1)

Ec. 1.1.

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$$

PASO 2

Aplicar la ley de propagación de las varianzas a la expresión determinada anteriormente:

Ec. 1.2.
$$u^2(y) = \sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)$$

Donde:

Ec. 1.2.1.
$$c_i = \left[\frac{\partial Y}{\partial X_i} \right]_{x_i}$$
 Coficiente de sensibilidad

Ec. 1.2.2
$$u(x_i, x_j) = u(x_i) u(x_j) r(x_i, x_j)$$

y $u(x_i)$ y $u(x_j)$ son las incertidumbres típicas asociadas a las estimaciones de entrada x_i y x_j , siendo r el coeficiente de correlación entre ambas magnitudes de entrada, que siempre se encuentra entre -1 y +1. (1)

El coeficiente de correlación, r , se puede calcular a partir de m pares de valores (p_i, q_i) de las magnitudes de entrada X_i y X_j , definidas como P y Q en el caso concreto, tomados simultáneamente: (1)

Ec.1.3
$$r = s(\bar{p}, \bar{q}) = \frac{\sum_{k=1}^m (p_k - \bar{p})(q_k - \bar{q})}{m(m-1)}$$

NOTA

a) En el caso de que todas las magnitudes de entrada X_1, \dots, X_n sean independientes entre sí, y por tanto las $r(x_i, x_j) = 0$, la expresión anterior se reduce a:

Ec.1.4
$$u^2(y) = \sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i)$$

o

$$\text{Ec.1.5} \quad \boxed{u^2(y) = \sum_{i=1}^N u_{x_i}^2(y)}$$

Debido a que la contribución a la incertidumbre típica de la estimación de salida asociada a cada magnitud de entrada, $u_{x_i}^2(y)$, es el producto de la incertidumbre de la estimación de entrada, $u^2(x_i)$, por su correspondiente coeficiente de sensibilidad, c_i . (1)

b) Si además la expresión de Y es aditiva ($Y = \pm X_1 \pm X_2, \dots, \pm X_n$), con todos los c_i iguales a 1 , como es el caso habitual de medidas directas (las realizadas con un instrumento que nos da la indicación en las unidades en que queremos expresar el resultado; por ejemplo medir voltios con un voltímetro, metros con una regla o una cinta métrica, masas con una balanza, etc.), en las que las correcciones en el caso de que se hiciesen, se podrían poner como cantidades a añadir (\pm) a la indicación, (por ejemplo, correcciones expresadas como diferencia entre valor patrón e indicación en un certificado de calibración; también se podría considerar aditiva, una corrección estimada como un límite máximo directamente en las unidades de la indicación o como una corrección por temperatura que no se realiza en una regla metálica estimada a partir de un coeficiente de dilatación lineal máximo y una máxima diferencia de temperatura respecto a la de calibración). La expresión se reduce a la siguiente: (1)

$$\text{Ec.1.6} \quad \boxed{u^2(y) = \sum_{i=1}^N u^2(x_i) = \sum_{i=1}^N u_{x_i}^2(y)}$$

PASO 3

Calcular la incertidumbre típica asociada a cada x_i , $u(x_i)$, considerando todas las contribuciones asociadas. Para ello, si cada x_i puede ser considerada como variable de medida directa con todas las correcciones aditivas (caso b de la NOTA del paso 2) se seguirá la siguiente secuencia: (1)

Establecer tan detalladamente como sea posible las causas de incertidumbre que afectan a la medida realizada, asociadas a cada factor que la determina: (1)

De tipo A (si ha habido repetición de medidas de x_i y no se considera la contribución de tipo A sobre la función Y) y **de Tipo B** (posibles causas de incertidumbre a considerar para distintos tipos de medida y que conviene considerar su posible influencia, además de aquellas otras que específicamente sean significativas). (1)

NOTA.- Cuando se esté determinando la incertidumbre asociada a una calibración no deben considerarse las causas de incertidumbre ligadas a las características del instrumento a calibrar, salvo aquella que tenga influencia en el momento de la calibración (p.e. resolución) ya que se trata de caracterizar un procedimiento independiente de este instrumento. (1)

Evaluar la contribución de cada componente de la incertidumbre:

a) Las componentes de tipo A serán estimadas aplicando métodos estadísticos. Para ello se seguirán los siguientes pasos:

- Se realizará una serie de n medidas de la magnitud X_i correspondiente [identificada como Q (q_1, q_2, \dots, q_n)], según se defina en el procedimiento de calibración o medida correspondiente.
- Se calculará la media aritmética, como mejor estimador del valor verdadero de la estimación de salida: (1)

Ec.1.7

$$\bar{q} = \frac{\sum_{k=1}^n q_k}{n}$$

- Se calculará la varianza experimental de la serie de n medidas realizadas mediante:

Ec.1.8

$$s^2(q) = \frac{\sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2}{n-1}$$

- y la varianza de la media

Ec.1.9

$$s^2(\bar{q}) = \frac{s^2(q)}{n} = \frac{\sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2}{n(n-1)}$$

- La incertidumbre asociada a esta estimación es:

Ec.1.10

$$u(q) = s(\bar{q})$$

NOTA 1- Calibraciones - Si el número de mediciones n es pequeño ($n < 10$), la evaluación de tipo A expresada por la ecuación anterior puede no ser fiable. Si no se puede aumentar el número de observaciones deberían calcularse los grados efectivos de libertad. (1)

Ensayos - En general, es razonable suponer una distribución normal que proporcione un intervalo de cobertura con el nivel de confianza del 95% cuando el modelo es lineal en las magnitudes de entrada y se cumple alguna de las siguientes posibilidades: (1)

- Existe una contribución única y dominante a la incertidumbre, que se origina de una distribución normal, y los correspondientes grados de libertad son mayores de 30.
- Las tres principales contribuciones son de tamaño similar y los grados efectivos de libertad son mayores de 30. (1)

NOTA 2- En ocasiones, cuando la medición está correctamente caracterizada y bajo control estadístico, es posible que se disponga de una estimación combinada de la varianza (por ejemplo, de repetibilidad s_r^2) que caracterice mejor la dispersión que la

desviación típica estimada a partir de un número limitado de observaciones. En este caso, si el valor de la magnitud de entrada Q se calcula como la media aritmética \bar{q} de un número pequeño m de observaciones independientes, la varianza de esta media aritmética podrá estimarse como: (1)

$$\text{Ec.1.11} \quad s^2(\bar{q}) = \frac{s_r^2}{m}$$

b) Las componentes de tipo B serán estimadas basándose en el certificado de calibración, la experiencia, recomendaciones de fabricante, etc. Se estimarán a partir de la información disponible o, cuando no se dispone de otra información, se estimará la incertidumbre máxima de las componentes; en este caso $u(x_i)$ puede ser dada por la regla práctica siguiente: (1)

$$\text{Ec.1.12} \quad u(x_i) = \frac{\text{límite máximo de la componente}}{\sqrt{3}}$$

Para el caso que se estime una distribución de los posibles valores de tipo rectangular, o, en caso de distribución triangular: (1)

$$\text{Ec.1.13} \quad u(x_i) = \frac{\text{límite máximo de la componente}}{\sqrt{6}}$$

Componer todas las contribuciones, tanto de Tipo A como de Tipo B, cuadráticamente:

$$\text{Ec.1.14} \quad u^2(y) = \sum u^2(x_i) = \sum u_{x_i}^2(y)$$

NOTA - En el caso de que cada x_i no pueda ser considerada como variable de medida directa con todas las correcciones aditivas, se aplicará, para dicha variable, lo establecido en el paso 1 y paso 2 hasta llegar a variables que cumplan con lo anterior. (1)

PASO 4

La incertidumbre típica, $u(y)$, así calculada puede no haber tenido en cuenta otro tipo de contribuciones que habría que añadir en este momento (por ejemplo la contribución de Tipo A, si habiendo habido repeticiones de medidas no se ha considerado ya en las $u_{xi}(y)$ - ¡No considerarlo en los dos sitios pues sería considerar dos veces la misma contribución!; Asimismo, se debiera analizar si hay contribuciones que no se han considerado en las $u_{xi}(y)$ ya sea porque no se puede estimar su contribución a las mismas y sí al resultado final o porque esta última estimación es mejor o semejante y más cómoda de considerar en función de los datos disponibles: repetibilidad, reproducibilidad de la determinación a realizar, en su caso). (1)

$$\text{Ec.1.15} \quad \boxed{U^2(y)_{TOTAL} = u^2(y) + \Sigma(\text{otras contribuciones})^2}$$

PASO 5

Cálculo de la incertidumbre expandida de medida:

A partir de la incertidumbre típica total se expresará la incertidumbre de medida como un intervalo de incertidumbre simétrico alrededor de la estimación de salida (y) dentro del cual se estima que se encontrará el valor verdadero de la medida realizada, con un factor de cobertura (k). (38)

Este intervalo se determina multiplicando la incertidumbre típica total, $u(y)_{TOTAL}$, por un factor k (factor de cobertura). Este factor será, usualmente, $k=2$, si podemos atribuir al mensurando una distribución normal y la estimación de salida tiene la suficiente fiabilidad. La incertidumbre expandida así calculada corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente un **95%**. (38)

NOTA: Si no se cumple alguna de las dos condiciones (normalidad y fiabilidad suficiente), el factor usual de $k=2$ puede producir una probabilidad de cobertura inferior al 95%. En estos casos, para garantizar que la incertidumbre expandida se corresponde

con la misma probabilidad del 95%, tiene que utilizarse el procedimiento siguiente: Cuando se cumplen condiciones del Teorema Central del Límite (la distribución resultante de varios componentes derivados de distribuciones bien definidas -p.e. normales, rectangulares, triangulares,...- es normal), el factor de cobertura se estima en la tabla del anexo No.5 en función de los grados efectivos de libertad, ν_{ef} , de la $u(y)_{TOTAL}$, que se calculan según la siguiente fórmula: (38)

$$\text{Ec.1.16} \quad \nu_{ef} = \frac{u^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_{x_i}^4(y)}{\nu_i}}$$

Por tanto, la incertidumbre expandida se expresará: (38)

$$\text{Ec.1.17} \quad U = \pm k \times u(y)_{TOTAL}$$

PASO 6

Cálculo de la estimación de salida

Es la media de la serie de determinaciones del resultado realizadas a partir de las estimaciones de entrada corregidas $x_{ic} = \bar{x}_i + corr_i$, donde \bar{x}_i es la media de la serie de medidas de x_i realizadas para determinar cada resultado y $corr_i$ es la corrección a realizar para la indicación \bar{x}_i del equipo. (1)

NOTA: (1) Se entiende por corrección, $corr_i$, la cantidad que hay que sumar al valor obtenido, x_i , para obtener el valor convencionalmente verdadero. La determinación de $corr_i$, se puede deber a una corrección simple o al resultado de un conjunto de correcciones. Son posibles fuentes de corrección, el certificado de calibración ($corr_{calibración} = x_{ipatrón} - x_{ilectura\ equipo}$), la dilatación de un material, la variación con la temperatura de la resistencia eléctrica de un elemento, etc. (38)

NOTA: (2) En caso de que no se realicen correcciones, dichas correcciones no realizadas se tendrán en cuenta (en su máxima estimación) para aumentar la incertidumbre expandida. (38)

PASO 7

Expresión del resultado final

El resultado final de una medida se expresa por la estimación de salida y , con el intervalo de incertidumbre para un factor de cobertura k , dado (usualmente $=2$ para una probabilidad de cobertura del 95%); mediante la expresión: (38)

Ec.1.18

$$y \pm U \text{ (indicando siempre el valor } k)$$

En los procedimientos específicos de calibración y/o medida en que sea aplicable, se incluirá, o se hará referencia concreta, un análisis de las incertidumbres asociadas a los resultados cuantitativos de la calibración o medida considerando los equipos, variaciones máximas de las magnitudes de influencia que admite el procedimiento, método, etc. Se indicarán las contribuciones a considerar (fuentes de incertidumbre y los métodos para valorar las incertidumbres típicas asociadas, número de observaciones en caso de repetición, etc.) y la expresión para su composición. El cálculo de las incertidumbres se podrá realizar en registros específicos en los que se cuantifiquen los límites de las contribuciones y se compongan determinando, en su caso, una tabla o expresión a aplicar para cada resultado concreto que se obtenga en una calibración o medida siguiendo dicho método. (1)(38)

Para mayor claridad, es recomendable presentar los datos referentes a este análisis en forma tabulada. En la tabla, las magnitudes deben expresarse mediante un símbolo físico, X_i , o un breve identificador, indicando para cada una de ellas, como mínimo, el valor de la estimación de entrada, x_i , la incertidumbre típica asociada a ésta, $u(x_i)$, el coeficiente de sensibilidad, c_i , y las diferentes contribuciones, $u_{xi}(y)$, a la incertidumbre típica, $u(y)$.

Asimismo debe indicarse la dimensión de cada magnitud, junto con los valores que se facilitan en la tabla. En el anexo No.6 se ofrece un ejemplo de este tipo de tabla. (38)

NOTA: En el procedimiento, los valores se indicarán por su expresión, criterio o referencia a ellos, salvo cuando el valor sea constante para todo el alcance del procedimiento (se indicará). En los registros del cálculo concreto se expresarán los valores numéricos en lo posible. (38)

1.3.2. MATERIALES REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE ENSAYOS DE LABORATORIO

1.3.2.1 Material de referencia

Un **material de referencia** (fotografía No. 6), según la guía ISO 30 [ISO, 1992], es un “material o sustancia que tiene una o varias de sus propiedades suficientemente bien establecidas para calibrar un aparato o instrumento, validar un método analítico, o asignar valores a un material o sistema”. (41)



FOTOGRAFÍA No. 6 MATERIAL DE REFERENCIA

Los Materiales de Referencia, tienen una gran importancia ya que son un componente clave de todo programa de calidad. En el campo de la Medición Analítica se recurre a materiales de referencia para garantizar la exactitud y ajustarse a un sistema válido de medidas. (25)

Un material de referencia puede presentarse bajo la forma de un gas, un líquido o un sólido, puro o compuesto. Ejemplos: el agua para la calibración de viscosímetros, el zafiro que permite calibrar la capacidad térmica en calorimetría, las soluciones utilizadas para la calibración en los análisis químicos, soluciones para análisis químico, agua para calibración de un refractómetro, mezclas de gas, cepas para análisis microbiológicos y otras. (29)

Para que no exista la ambigüedad cuando se trate de materiales de referencia se han consagrado algunos términos prácticos, los cuales son:

- MATERIAL DE REFERENCIA INTERNO ("Internal Reference Material" IRM): Es todo material preparado por un laboratorio para su exclusivo uso interno.
- MATERIAL DE REFERENCIA EXTERNO ("External Reference Material" ERM): Es el suministrado por un laboratorio ajeno al del propio usuario.
- MATERIAL DE REFERENCIA ESTANDAR ("Standard Reference Material" SRM): Es aquel material de referencia certificado por entidades reconocidas internacionalmente. (25)

Los requisitos que debe satisfacer un Material de Referencia para poder comercializarse se pueden agrupar en 2 categorías: (25)

1. Requisitos básicos
2. Requisitos adicionales

1. REQUISITOS BÁSICOS

- **Homogeneidad:** Se refiere a que para un mismo material, no existan diferencias en el valor certificado ni en la matriz, o entre y/o dentro de diferentes frascos, ampollas. En rigor, este requisito básico sólo se cumple para las sustancias de referencia ultrapuras, por lo que en los demás casos hay que admitir un cierto

grado de falta de homogeneidad, pero la exactitud de los valores certificados debe indicar este hecho. (25)

- **Estabilidad:** El material preparado debe ser estable en el tiempo, (se debe incluir la fecha de caducidad, si procede) así como permitir ser transportado. El cliente debe conocer durante cuánto tiempo permanece estable desde su recepción y desde que se abre el recipiente. La estabilidad se extiende a los parámetros certificados y a la matriz. (25)

- **Exactitud y trazabilidad:** Los materiales de referencia certificados se usan para verificar los resultados analíticos o para calibrar instrumentos. Para ambas aplicaciones la exactitud y la trazabilidad de valores certificados son exigencias básicas. Dichos valores deben dar la mejor aproximación al valor verdadero; de ahí que los métodos empleados para la certificación serán aquellos que proporcionen la mayor exactitud posible. (25)

La trazabilidad con las unidades fundamentales significa que la unidad de medida puede ser relacionada con las unidades internacionales y que los valores medidos se relacionan correctamente con aquella unidad. (25)

2. REQUISITOS ADICIONALES

- **Similitud con la muestra real:** Si el material de referencia se usa para comprobar la exactitud de un procedimiento analítico o para llevar a cabo el calibrado, la matriz del material de referencia debe ser tan parecida como sea posible a la de las muestras a analizar. La preparación de un material de referencia presenta con frecuencia el problema de que la matriz introduce riesgos de falta de estabilidad y homogeneidad del material. Así, este requisito de semejanza de matriz es fácil de cumplir para análisis de metales o minerales, pero mucho más complicado en el caso de muestras ambientales (contaminación), alimentos o biológicas. (25)

- **Precisión:** Cualquier valor certificado va acompañado del grado de incertidumbre inherente al mismo. Dicha incertidumbre ha de ser tan pequeña como sea posible, para lo cual, en el proceso de certificación, debe emplearse un gran número de resultados obtenidos por diferentes procedimientos analíticos. (25)

1.3.2.2. Material de referencia certificado (MRC)

Un **material de referencia certificado** [ISO, 1992], es un “material de referencia que tiene certificados uno o varios de sus valores de una o más de sus propiedades por procedimientos técnicamente válidos llevados a cabo por un organismo competente”. La principal diferencia entre un MR y un MRC es el certificado asociado al MRC emitido por un organismo competente, no se trata ‘únicamente’ de un certificado, sino que este certificado garantiza que un MRC sea desde un punto de vista práctico, la mejor referencia posible en la verificación de la trazabilidad de un método analítico. (41)

Los MRC se preparan en general en lotes en los que los valores de sus propiedades se determinan, dentro de los límites de incertidumbre indicados, por medio de mediciones sobre muestras representativas del lote entero. (29)

Certificado de un material de referencia: Documento que acompaña a un material de referencia certificado, que indica uno o más valores de sus propiedades, su incertidumbre y confirma que han sido realizados los procedimientos necesarios para asegurar su validación y trazabilidad. (29)

Los MRC pueden ser:

- Soluciones patrón y mezclas de gas, a menudo preparadas gravimétricamente a partir de sustancias puras y utilizadas para calibración.
- Sustancias puras caracterizadas por la pureza química y/o trazas de impurezas.
- MR matriciales, caracterizados por la composición. Cada material puede prepararse con matrices de materiales naturales que contengan los componentes de interés o con mezclas sintéticas.

- MR físico-químicos, caracterizados por sus propiedades, como la viscosidad o la densidad óptica.
- Objetos o artefactos de referencia, caracterizados por las propiedades funcionales como el gusto, el olor, la dureza, el índice de octano, este tipo incluye especímenes microscópicos. (29)

1.3.2.3 Patrón de trabajo

Patrón que se utiliza corrientemente para calibrar y/o controlar dispositivos o instrumentos de medición, así como también materiales de referencia. (44)

Un patrón de trabajo es habitualmente calibrado con un patrón de referencia (Patrón, generalmente de la máxima calidad metrológica disponible en un lugar dado, del cual derivan las medidas efectuadas en dicho lugar). Por otra parte cuando un patrón de trabajo es utilizado corrientemente para asegurar que las medidas estén realizadas correctamente se denomina patrón de control. (16)

1.3.3 ENSAYO INTERLABORATORIO

La validación sería incompleta sin alguna referencia adicional, por lo que es necesario el uso de los estudios colaborativos interlaboratorios como un medio de evaluar los atributos de un método, la habilidad de los analistas, los valores de referencia de un material, o comparar métodos de análisis. (32)

Se denominan comparaciones interlaboratorios a la organización, realización y evaluación de ensayos sobre el mismo ítem de ensayo o sobre ítems de ensayos similares, por dos o más laboratorios de acuerdo con condiciones predeterminadas. (40)

Un ensayo interlaboratorios consiste en una serie de ensayos (determinaciones), de una o más características (analitos), que se realizan independientemente, por un grupo de laboratorios, sobre una submuestra tomada en forma aleatoria de una muestra

homogénea, distribuida simultáneamente a los laboratorios participantes, con diferentes propósitos. (11)

Las ventajas de este tipo de ensayo son:

- Evitar el rechazo de lotes con las pérdidas económicas que conllevan.
- Conocer la precisión de los resultados que se generan y su relación con las especificaciones pactadas.
- Generar confianza en las metodologías de control entre partes.
- Bajar los costos de control, al minimizar frecuencia de análisis, pasando de control total a control aleatorio. (11)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA), Sección Residuos Tóxicos del Departamento de Nutrición y Calidad (DNC) (fotografía No. 7), de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP.



FOTOGRAFÍA No. 7 DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD (INIAP)

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIA PRIMA

La materia prima se obtuvo con la colaboración de la empresa de elaborados de café, ‘EL CAFÉ C.A.’, la misma que estuvo constituida por 2 Kg de granos de café verde, los

materiales de referencia se adquirieron por medio del Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS).

2.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Probetas de borosilicato de 10 mL a 1000 mL
- Balones volumétricos de 5 mL a 2000 mL
- Vasos de precipitación de borosilicato de 10 mL a 1000 mL
- Embudos de filtración de vidrio
- Pipetas volumétricas de 4 mL
- Vasos de vidrio para licuadora de 500 mL
- Tubos de ensayo de vidrio con punta cónica de 15 mL
- Sistema de extracción al vacío
- Gradillas porta tubos de ensayo
- Espátula de metal
- Micropipeta automática de 100 a 1000 μ L y de 10 a 100 μ L
- Puntas para micropipeta automática
- Papel filtro de 12,5 cm de diámetro Whatman 4 o equivalente
- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,45 μ m de poro, 47 mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,22 μ m de poro, 25 mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana de fibra de vidrio tipo APFB
- Jeringuillas de polipropileno de 10 mL y 60 mL desechables
- Columnas de inmunoafinidad para purificación de OTA (recuperación \geq 90%)

2.2.3 EQUIPOS

- Molino (Thomas Wiley)
- Balanza de dos dígitos de capacidad para 4200 g y precisión \pm 0.01 g (Shimadzu UW4200H)

- Balanza analítica de capacidad de 220 g y precisión de 0.1 mg (Shimadzu AUX220)
- Evaporador de muestras.
- Baño María (Memmert)
- Equipo de Extracción en fase sólida al vacío (Waters)
- Agitador de Tubos (Maxi Mix II)
- Baño Ultrasonido (Cole Parmer)
- Equipo HPLC (Agilent 1200 series)
- Licuadoras (Osterizer)
- Bomba de vacío (GE-MOT-012)
- Plancha Agitadora / calentadora (Cole Parmer)
- Cronómetro digital (Thomas Scientific)
- Espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu 2201)

2.2.4 REACTIVOS

- Agua tipo I
- Bicarbonato de sodio grado p.a. pureza del 99,9%
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Metanol grado p.a. 99.8%
- Cloruro de Potasio grado p.a. pureza > 99.5%
- Cloruro de sodio grado p.a. pureza > 99.5%
- Dihidrógeno fosfato de potasio anhidro
- Hidrogeno fosfato disódico anhidro
- Ácido Acético grado p.a. pureza del 99,8%
- Tolueno >99, 9%
- Gas Nitrógeno 99.9% de pureza

2.2.5 ESTÁNDARES

- Estándar Ocratoxina A pureza > 98% (Sigma O1877)

2.3 METODOLOGÍA

Los análisis de laboratorio se realizaron tomando como referencia el método oficial de la AOAC 2004.10 (2005), que corresponde a la determinación de Ocratoxina A en café verde utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), método que fue adaptado y validado. (4)

El método seleccionado está basado en la utilización de columnas de inmunoafinidad que poseen anticuerpos monoclonales específicos para OTA, tecnología que es altamente específica, sensible, rápida en relación a las tecnologías tradicionales de purificación. En este método la OTA es extraída de la muestra con soluciones de metanol con bicarbonato de sodio, la misma que es aplicada sobre la columna de inmunoafinidad que atrapa a la toxina, la columna es lavada para eliminar todas las interferencias, y la OTA es recuperada de la columna con una solución metanol, la toxina recuperada es cuantificada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna de fase reversa C18 y detector de fluorescencia.

2.3.1 FASE DE LABORATORIO

2.3.1.1 Procedimiento

A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Solución Buffer Fosfato Salino PBS 0.1%: Transferir cuantitativamente e individualmente 0.2 g de dihidrógeno fosfato de potasio, 1,5 g de hidrogeno fosfato disódico dihidratado, 8.0 g de cloruro de sodio, 0.2 g de cloruro de potasio, en un balón volumétrico de 1000 mL completar a volumen con agua purificada y homogenizar.
- Solución Bicarbonato de Sodio al 3%: Pesar 30 g de bicarbonato de sodio, transferir a un balón de 1000 mL y completar el volumen con agua purificada y homogeneizar
- Solución de Extracción: Solución de metanol: bicarbonato de sodio al 3% (v/v).

- Solución fase móvil. Acetonitrilo:Metanol:Ácido Acético 0,2% en agua bidestilada. 40:30:30 (v/v/v).

B. MOLIENDA Y PESAJE DE LA MUESTRA

- a) Moler 2 Kg. de granos de café verde en el molino, obtener un tamaño de partículas de 1mm.
- b) Colocar un frasco de vidrio de 500 mL, con número de identificación de la muestra sobre la balanza, encerrar la balanza.
- c) Pesar 25 gramos de muestra previamente homogenizada en el frasco de vidrio con la ayuda de una espátula.
- d) Llevar el frasco de vidrio con la muestra hacia el lugar de extracción.

C. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

- a) Adicionar a la muestra 200 mL de solución de Metanol: bicarbonato de sodio 3% (1:1, v/v).
- b) Colocar el frasco en la licuadora, asegurar el mismo y homogeneizar durante 5 minutos a alta velocidad.
- c) Filtrar la muestra por gravedad usando papel filtro y membrana de fibra de vidrio.
- d) Tomar 4 mL del filtrado y transferir a un balón volumétrico de 100 mL, aforar a 100mL con la solución tampón PBS 1% y homogeneizar.

D. PURIFICACIÓN DE LA MUESTRA.

- a) Adaptar una jeringa de polipropileno de 60 mL a una columna de inmunoafinidad y conectar al sistema de filtración al vacío.
- b) Pasar cuantitativamente el contenido del balón de 100 mL por la columna, dejar pasar a través de la columna controlando el flujo con el embolo.
- c) Lavar la columna con 10 mL de agua y dejar secar la columna.
- d) Desconectar la columna del sistema de vacío y aplicar presión positiva.

- e) Sustituir la jeringa de plástico de 60 mL por una jeringa de plástico de 10 mL.
- f) Transferir 4 mL de metanol grado HPLC por la jeringa de vidrio, eluir la Ocratoxina A utilizando presión positiva y controlando el flujo por medio del embolo de la jeringa.
- g) Evaporar el eluido a sequedad utilizando nitrógeno en baño de agua con agitación y control de temperatura a 50°C.
- h) Redisolver los residuos obtenidos en la etapa de purificación con 300 µL de metanol grado HPLC, agitar utilizando un agitador de tubos y en un baño ultrasonido por 5 minutos.

D.CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Inyectar 20 µL en el HPLC (Agilent 1200) bajo las siguientes condiciones:

- o Columna: C18 (150 x 4,6 mm), tamaño de partícula de 5 µm
- o Temperatura de Columna: 30°C
- o Detector de Fluorescencia: Longitud de Onda de Excitación 330 nm, Emisión. 475nm
- o Fase móvil: Acetonitrilo:Metanol:Ácido Acético 0.2% en agua (40:30:30 v/v/v)
- o Flujo: 1mL /minuto
- o Volumen de Inyección: 20 µL

F. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo y utilizando la siguiente fórmula:

Ec.2.1

$$OTA(\mu g / kg) = \frac{(ABC)}{(DE)}$$

A = área del pico correspondiente a OTA de la muestra

B = concentración de OTA (ng/µL) de solución estándar

C = Volumen final de muestra (μL)

D = área de el pico de OTA en la solución patrón

E = peso de la muestra representada en la solución (g)

2.3.2 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

2.3.2.1 Linealidad y rango lineal

La linealidad del método se evaluó relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de Ocratoxina A, utilizando el esquema que se presenta en la tabla No. 6:

TABLA No. 6 ESQUEMA PARA LA EVALUCIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO

CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR	RESPUESTA DEL EQUIPO				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
P ₁					
P ₂					
P ₃					
P ₄					
P ₅					

Con los resultados obtenidos se realizó el estudio de regresión lineal, evaluando los siguientes parámetros:

- **Coefficiente de correlación (r) :**

$$\text{Ec.2.2} \quad r = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]^{1/2} \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]^{1/2}}$$

Donde:

n= número de mediciones

x= Concentración (ng/mL)

y= Área (LU)

- **Pendiente (m):**

$$\text{Ec.2.3} \quad m = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = \frac{S_{yx}}{S_{xx}}$$

- **Intercepto (L):**

$$\text{Ec.2.4} \quad L = \frac{\sum y - m \sum x}{n} = \bar{y} - m \bar{x}$$

- **Desviación estándar de la pendiente (Sm):**

$$\text{Ec.2.5} \quad Sm = \sqrt{\frac{S^2_{yx}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} = \frac{S_{yx}}{\sqrt{S_{xx}}}$$

- **Desviación estándar del intercepto (SL):**

$$\text{Ec.2.6} \quad SL = \sqrt{Sm^2 \frac{\sum x^2}{n}} = Sm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$$

- **Error Típico (Sy,x) :**

$$\text{Ec.2.7} \quad S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 2}}$$

- **Límite de confianza de la pendiente:**

$$\text{Ec.2.8} \quad m : m \pm t \cdot Sm$$

Donde:

t= Valor de t de la distribución t de student con n-2 grados de libertad (t tabla)

- **Límite de confianza del intercepto :**

Ec.2.9

$$L : L \pm t.SL$$

- **Prueba t-student para el coeficiente de correlación:**

Hipótesis nula (H₀): No correlación entre X (concentración) e Y (área) ($r = 0$)

Hipótesis alterna (H₁): “r” NO debe ser significativamente diferente de uno ($r \neq 0$)

Criterio de aceptación: El valor de tcalculado (tr) debe ser mayor a ttabla. La hipótesis nula se rechaza, existiendo una correlación lineal significativa. Por lo tanto $r \cong 1$.

Ec.2.10

$$tr = \frac{|r| * \sqrt{n - 2}}{\sqrt{(1 - r^2)}}$$

2.3.2.2 Límite de detección

Utilizando el estudio de regresión lineal, se evaluó el límite de detección con la siguiente relación:

Ec.2.11

$$LD = 3L / m$$

L = intercepto

m = pendiente

2.3.2.3 Límite de cuantificación

Utilizando el estudio de regresión lineal, se evaluó el límite de cuantificación con la siguiente relación:

Ec.2.12

$$LC = 10L / m$$

L = Intercepto

m = pendiente

2.3.2.4 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

El estudio de repetibilidad y reproducibilidad se realizó utilizando muestras artificialmente contaminadas con OTA (muestras spike) y, materiales de referencia certificados de café verde, mediante el esquema que se presenta en la tabla No. 7.

TABLA No. 7 ESQUEMA PARA EL ESTUDIO DE LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

NIVEL	Repeticiones	Respuestas				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
P ₁	R1					
	R2					
	R3					
P ₂	R1					
	R2					
	R3					
P ₃	R1					
	R2					
	R3					

Mediante estos resultados se realizó un análisis de varianza y se evaluó la desviación estándar de la repetibilidad S_r y la desviación estándar de la reproducibilidad S_R . El análisis de varianza se realizó mediante el esquema que se presenta en la tabla No. 8.

TABLA No. 8 ESQUEMA PARA EL ANÁLISIS DE VARIANZA

Análisis simple de la varianza			
Origen de la varianza	Grados de libertad (ν)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM=SDC/ ν)
Entre niveles (Between)	$\nu_1 = k - 1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^k p(\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{k - 1}$
Dentro de niveles (Within)	$\nu_2 = n - k$	$SDC_W = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{n - k}$
Total	$\nu = n - 1$ ($= \nu_1 + \nu_2$)	$SDC_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (x_{ij} - \bar{x})^2$ ($= SDC_B + SDC_W$)	$DCM_T = \frac{SDC_T}{n - 1}$

Las diferencias cuadráticas medias (DCM) son las respectivas varianzas.

La desviación estándar de repetibilidad (S_r) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Ec.2.13} \quad S_r = \sqrt{DCM_W}$$

Utilizando la S_r se calculó la desviación estándar relativa de repetibilidad RSD_r :

$$\text{Ec.2.14} \quad RSD_r = \left(\frac{S_r}{x} \right) \times 100$$

La desviación estándar de reproducibilidad (S_R) es:

$$\text{Ec.2.15} \quad S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$$

Donde:

$$\text{Ec.2.16} \quad S_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{p}$$

Siendo el denominador (p) igual al número de observaciones que se realizan cada día (en cada nivel), cuando es el caso de un diseño experimental homogéneo de factores (totalmente anidados) como el que se ha planteado.

Utilizando la S_R se calculó la desviación estándar relativa de reproducibilidad RSD_R :

$$\text{Ec.2.17} \quad RSD_R = \left(\frac{S_R}{x} \right) \times 100$$

2.3.2.5 Exactitud

Se calculó el porcentaje de recuperación en cada uno de los niveles expuestos en la tabla para el análisis de la repetibilidad y reproducibilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ec.2.18} \quad \% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{obtenido}}}{C_{\text{esperado}}} \times 100$$

C_{obtenido} es el resultado obtenido.

C_{esperado} es el valor teórico del mismo.

2.3.2.6 Selectividad

Este parámetro se estableció bibliográficamente, pues el método seleccionado cuenta con información sobre su selectividad y las interferencias que se conocen, además se utilizó columnas de inmutofinidad con anticuerpos monoclonales específicos para OTA, que permiten separar al analito de las interferencias producidas por la matriz.

2.3.2.7 Incertidumbre

Este parámetro de la validación se lo estableció siguiendo los pasos señalados en la parte teórica del presente trabajo: la expresión final de la incertidumbre se estableció con las siguientes fórmulas:

- **Incertidumbre típica combinada (u):**

$$\text{Ec.2.19} \quad u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)}$$

$$\text{Ec.2.19.1} \quad c_i = \left[\frac{\partial Y}{\partial X_i} \right]_{x_i} \quad (\text{Coeficiente de sensibilidad})$$

- **Incertidumbre expandida (U):**

Ec.2.20

$$U = k \cdot u(y)_{TOTAL}$$

Siendo el factor de cobertura $k=2$.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Una vez escogida la metodología se procedió a realizar pruebas en el laboratorio, estableciéndose las condiciones del proceso de análisis. La estandarización del método para la determinación de Ocratoxina A en café verde utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se realizó con un estándar de Ocratoxina A pureza >98%.

Para establecer las condiciones del sistema cromatográfico se realizaron pruebas en el equipo, tomando como referencia la técnica de análisis para Ocratoxina A en café verde (método AOAC 2004.10), obteniendo los siguientes parámetros de trabajo:

- Longitud de Onda: Excitación 330 nm, Emisión 475 nm
- Flujo: 1mL/minuto
- Presión: 73 Bares
- Temperatura: 30 °C
- Volumen de inyección: 20 µL
- Fase móvil: Acetonitrilo: Metanol: Ácido Acético 0,2% en Agua (40:30:30 v/v/v)

3.2 LINEALIDAD Y RANGO LINEAL

Para evaluar este parámetro se utilizó un estándar de Ocratoxina A de pureza > 98%, a partir del cual se preparó una solución madre del mismo, inyectando un volumen determinado de solución de Tolueno: Ácido Acético (99:1 v/v), de acuerdo a la concentración requerida, la determinación de la concentración exacta de la solución

madre de Ocratoxina A se realizó utilizando el espectrofotómetro UV-VIS de acuerdo al método AOAC 970.44 (2005).

A partir de la solución madre de Ocratoxina A mediante diluciones sucesivas, se preparó un estándar de trabajo para elaborar las curvas de calibración, este estándar se ajustó a una concentración de 50 ng/mL. Partiendo de esta solución se prepararon 5 estándares mediante diluciones con metanol, en las concentraciones que se observan en el cuadro No. 1:

CUADRO No. 1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES PARA CURVAS DE CALIBRACIÓN DE OTA. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA).DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Volumen de solución OTA (µL)	Volumen de Metanol (µL)	Concentración de OTA (ng/mL)
2000	0	50
1000	1000	25
500	1500	12,5
126	1874	3,15
62,4	1937,6	1,56

Una vez preparados los estándares se realizaron cinco curvas calibración, para lo cual se inyectó cada estándar por triplicado en cinco días diferentes. Los resultados promedios de la curva de calibración de OTA para el día 1 se muestran en el cuadro No 2:

CUADRO No. 2 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA PARA EL DIA 1. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Concentración (ng/mL)	1,56	3,15	12,5	25	50
Curva 1	9,7948	21,6515	86,3774	176,4011	356,1604

Con base a los resultados obtenidos en el cuadro No 2, se graficó la concentración de OTA (ng/mL) versus el área (LU) para el día 1.

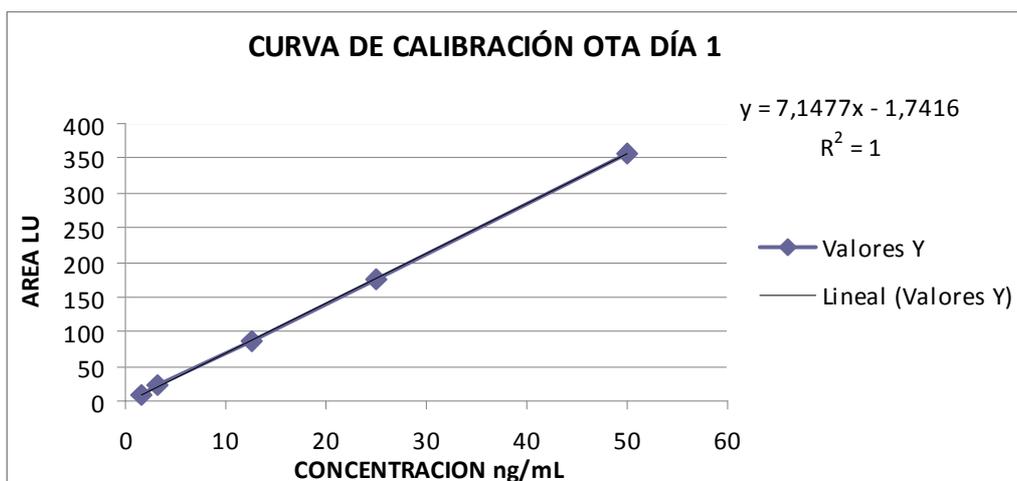


GRÁFICO No. 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA DEL DÍA 1. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DPTO. DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

En el gráfico No 1, se puede observar la ecuación obtenida para la primera curva de calibración, encontrándose un valor de la pendiente de 7,147 y de la ordenada al origen de -1,741, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 1, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente a día 1, los resultados se observan en el cuadro No. 3:

CUADRO No. 3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 1. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP.CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Parámetros	curva 1
m=	7,15
Lo=	-1,74
S y,x=	1,00
Sm=	0,03
SLo=	0,64
t=	3,18
tr=	285,51
mmín=	7,07
m máx=	7,23
Lo mín=	-3,79
Lo máx=	0,30

En el cuadro No. 3, se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r , el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (area), observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 285,51 y el valor t de las tablas al 95% de confianza es de 3,18, por lo cual se puede establecer que el valor de $t_r \gg t$ tabla, lo que nos indica que existe una alta correlación lineal entre X y Y .

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 1, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 7,15 y de la ordenada al origen (L_0) de -1,74, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (S_m) y desviación estándar de la ordenada al origen (S_{L_0}) , con valores de 0,03 y 0,64 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 7,07 a 7,23 y de intercepto de -3,79 a 0,30.

De igual manera en el cuadro No. 3, se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 1 con un valor de 1,00, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedios de la curva de calibración de OTA para el día 2 se muestran en el cuadro No 4:

CUADRO No. 4 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA PARA EL DÍA 2. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Concentración (ng/mL)	1,56	3,15	12,5	25	50
Curva 2	11,1894	21,6002	86,9339	176,3832	353,9594

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No 4, se graficó la concentración de OTA (ng/mL) versus el área (LU) para el día 2.

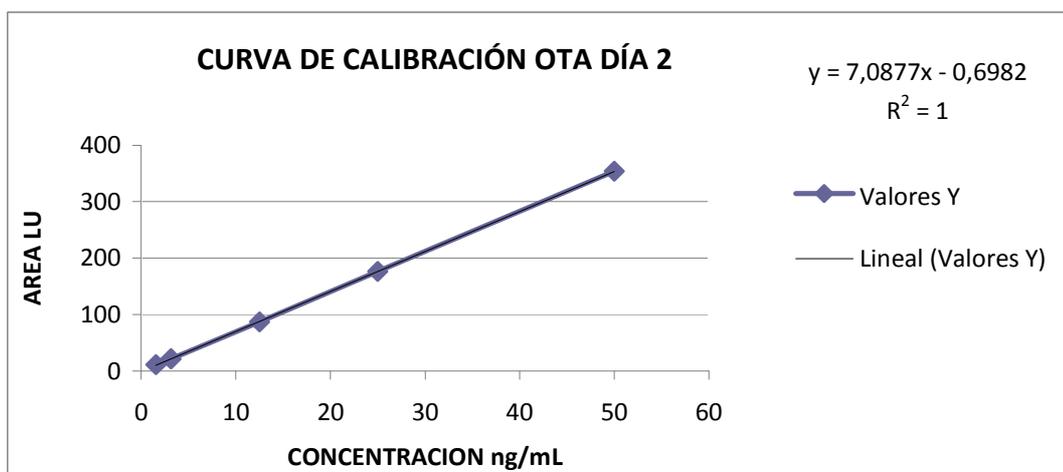


GRÁFICO No. 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA DEL DÍA 2. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DPTO. DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

En el gráfico No 2, se puede observar la ecuación para la segunda curva de calibración, obteniéndose un valor de la pendiente de 7,087 y de la ordenada al origen de -0,698, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 1, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 2, los resultados se observan en el cuadro No. 5:

CUADRO No. 5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 2. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Parámetros	curva 2
m=	7,09
Lo=	-0,70
S _{y,x} =	0,75
Sm=	0,02
SLo=	0,49
t=	3,18
tr=	375,00
mmín=	7,03
m máx=	7,15
Lo mín=	-2,24
Lo máx=	0,85

En el cuadro No. 5, se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r , el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (área), observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 375,00 y el valor t de las tablas al 95% de confianza es de 3,18, por lo cual se puede establecer que el valor de $t_r \gg t$ tabla, lo que nos indica que existe una alta correlación lineal entre X y Y .

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 2, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 7,09 y de la ordenada al origen (L_0) de -0,70, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (S_m) y desviación estándar de la ordenada al origen (S_{L_0}) , con valores de 0,02 y 0,49 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 7,03 a 7,15 y de intercepto de -2,24 a 0,85.

De igual manera en el cuadro No. 5, se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 2 con un valor de 0,75, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedios de la curva de calibración de OTA para el día 3 se muestran en el cuadro No 6:

CUADRO No. 6 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA PARA EL DÍA 3. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Concentración (ng/mL)	1,56	3,15	12,5	25	50
Curva 3	10,3033	22,2750	87,0699	177,4888	352,1671

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No 6, se graficó la concentración de OTA (ng/mL) versus el área (LU) para el día 3.

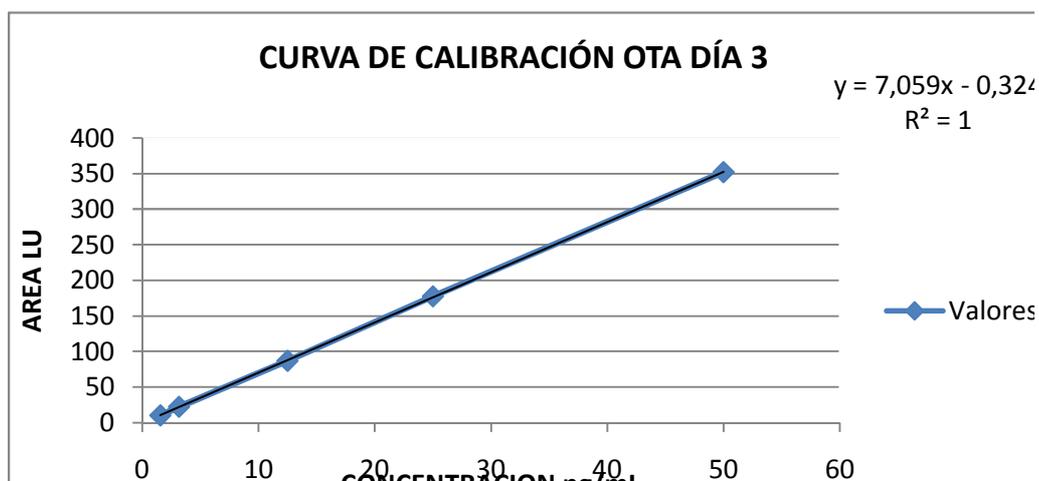


GRÁFICO No. 3. CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA DEL DÍA 3. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DPTO. DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

En el gráfico No 3, se puede observar la ecuación obtenida para la tercera curva de calibración, obteniéndose un valor de la pendiente de 7,059 y de la ordenada al origen de -0,324, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 1, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 3, los resultados se observan en el cuadro No. 7:

CUADRO No. 7 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 3. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Parámetros	curva 3
m=	7,06
Lo=	-0,32
S_{y,x}=	1,00
Sm=	0,03
SLo=	0,64
t=	3,18
tr=	282,13
mmín=	6,98
m máx=	7,14
Lo mín=	-2,37
Lo máx=	1,72

En el cuadro No. 7, se presenta los resultados del análisis mediante la prueba t-student para el coeficiente de correlación r , el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (área), observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 282,13 y el valor t de las tablas al 95% de confianza es de 3,18, por lo cual se puede establecer que el valor de $t_r \gg t$ tabla, lo que nos indica que existe una alta correlación lineal entre X y Y .

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 3, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 7,06 y de la ordenada al origen (L_0) de -0,32, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (S_m) y desviación estándar de la ordenada al origen (S_{L_0}) , con valores de 0,03 y 0,64 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 6,98 a 7,14 y de intercepto de -2,37 a 1,72.

De igual manera en el cuadro No. 7, se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 3 con un valor de 1,00, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedios de la curva de calibración de OTA para el día 4 se muestran en el cuadro No 8:

CUADRO No. 8 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA PARA EL DÍA 4. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Concentración (ng/mL)	1,56	3,15	12,5	25	50
Curva 4	11,2429	22,3573	90,7521	177,7108	353,3424

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No 8, se graficó la concentración de OTA (ng/mL) versus el área (LU) para el día 4.

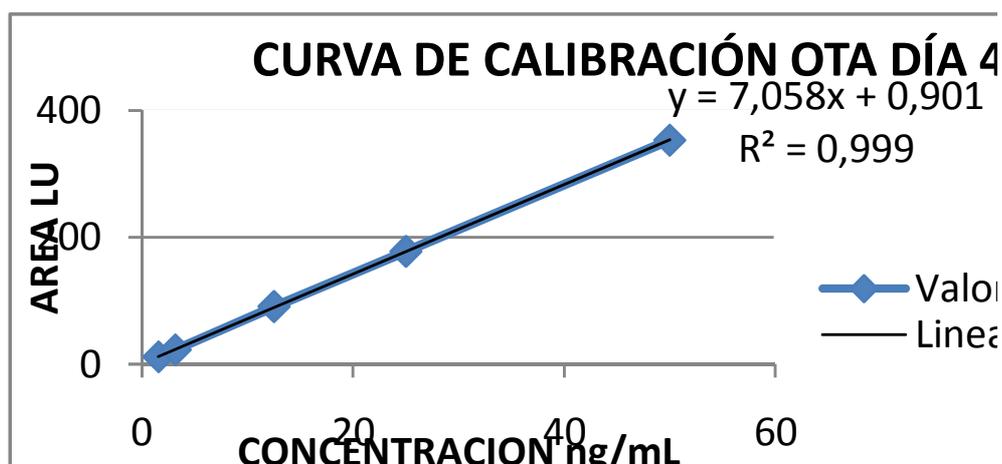


GRÁFICO No. 4. CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA DEL DÍA 4. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DPTO. DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

En el gráfico No 4 se puede observar la ecuación obtenida para la cuarta curva de calibración, obteniéndose un valor de la pendiente de 7,058 y de la ordenada al origen de 0,901, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 0,999, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 4, los resultados se observan en el cuadro No 9.

CUADRO No. 9 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 4. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Parámetros	curva 4
m=	7,06
Lo=	0,90
S y,x=	1,16
Sm=	0,03
SLo=	0,75
t=	3,18
tr=	243,05
mmín=	6,97
m máx=	7,15
Lo mín=	-1,47
Lo máx=	3,27

En el cuadro No. 9, se presenta los resultados del análisis con la prueba t-student para el coeficiente de correlación r , el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (área), observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 243,05 y el valor t de las tablas al 95% de confianza es de 3,18, por lo cual se puede establecer que el valor de $t_r >> t$ tabla, lo que nos indica que existe una alta correlación lineal entre X y Y .

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 4, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 7,06 y de la ordenada al origen (L_0) de 0,90, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (S_m) y desviación estándar de la ordenada al origen (S_{L_0}) , con valores de 0,03 y 0,75 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 6,97 a 7,15 y de intercepto de -1,47 a 3,27.

De igual manera en el cuadro No. 9, se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 4 con un valor de 1,16, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados promedios de la curva de calibración de OTA para el día 5 se muestran en el cuadro No 10:

CUADRO No. 10 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA PARA EL DÍA 5. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Concentración (ng/mL)	1,56	3,15	12,5	25	50
Curva 5	10,4610	21,2470	88,5246	179,9534	357,9179

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No 10, se graficó la concentración de OTA (ng/mL) versus el área (LU) para el día 5.

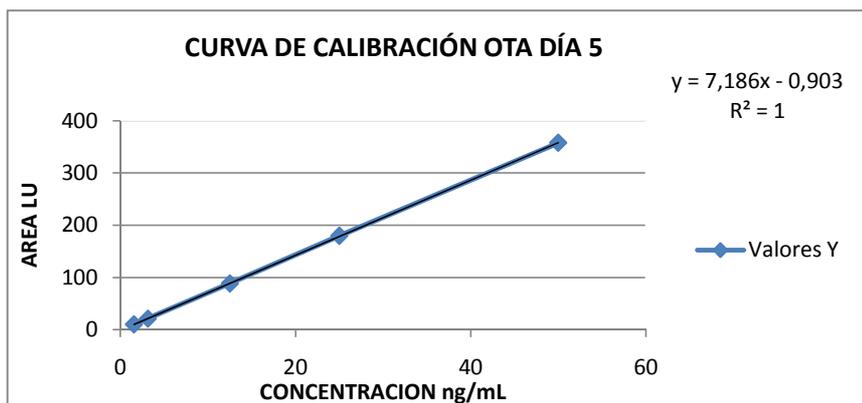


GRÁFICO No. 5. CURVA DE CALIBRACIÓN DE OTA DEL DÍA 5. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DPTO. DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

En el gráfico No 5 se puede observar la ecuación obtenida para la quinta curva de calibración, obteniéndose un valor de la pendiente de 7,186 y de la ordenada al origen de -0,903, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 1,00, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración correspondiente al día 5, los resultados se observan en el cuadro No. 11:

CUADRO No. 11 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DÍA 5. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Parámetros	curva 5
m=	7,19
Lo=	-0,90
S _{y,x} =	0,84
Sm=	0,02
SLo=	0,54
t=	3,18
tr=	342,60
mmín=	7,12
m máx=	7,25
Lo mín=	-2,62
Lo máx=	0,81

En el cuadro No. 11, se presenta los resultados del análisis con la prueba t-student para el coeficiente de correlación r , el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (area), observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 342,60 y el valor t de las tablas al 95% de confianza es de 3,18, por lo cual se puede establecer que el valor de $t_r >> t$ tabla, lo que nos indica que existe una alta correlación lineal entre X y Y .

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración en el día 5, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 7,19 y de la ordenada al origen (L_0) de -0,90, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (S_m) y desviación estándar de la ordenada al origen (S_{L_0}) , con valores de 0,02 y 0,54 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 7,12 a 7,25 y de intercepto de -2,62 a 0,81.

De igual manera en el cuadro No. 11, se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración del día 5 con un valor de 0,84, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado. Los resultados asociados a la curva de calibración promedio de OTA se muestran en el cuadro No 12:

CUADRO No. 12 RESULTADOS PROMEDIO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN GLOBAL DE OTA. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Concentración (ng/mL)	1,56	3,15	12,5	25	50
promedio área (LU)	10,5983	21,8262	87,9316	177,5875	354,7095

En base a los resultados obtenidos en el cuadro No 12, se graficó la concentración de OTA (ng/mL) versus el área (LU) para el promedio de los cinco días.

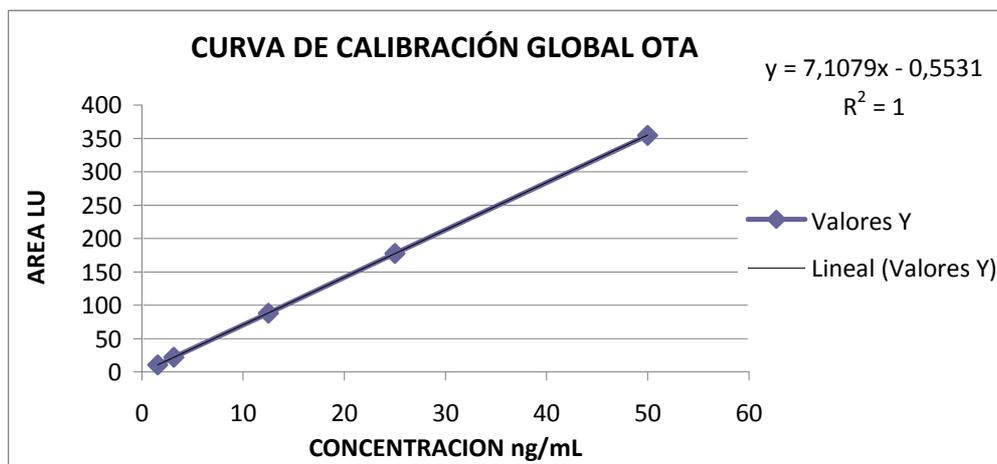


GRÁFICO No. 6. CURVA DE CALIBRACIÓN GLOBAL DE OTA. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DPTO. DE NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

En el gráfico No 6 se puede observar la ecuación obtenida para la curva de calibración promedio, obteniéndose un valor de la pendiente de 7,107 y de la ordenada al origen de -0,553, el coeficiente de correlación lineal R^2 obtenido fue de 1,00, el mismo que nos indica que existe una correlación lineal entre los resultados de las áreas obtenidas en función de la concentración de OTA. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para la curva de calibración global, los resultados se observan en el cuadro No. 13:

CUADRO No.13 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN GLOBAL DE OTA. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Parámetros	Global
m=	7,11
Lo=	-0,55
S y,x=	1,16
Sm=	0,02
SLo=	0,61
t=	3,18
tr=	305,66
mmín=	6,97
m máx=	7,25
Lo mín=	-3,79
Lo máx=	3,27

En el cuadro No. 13, se presenta los resultados del análisis con la prueba t-student para el coeficiente de correlación r , el mismo que nos permite verificar si existe correlación lineal significativa entre los valores X (concentración) y Y (área), observando los resultados se puede establecer que el valor de t_r calculado es 305,66 y el valor t de las tablas al 95% de confianza es de 3,18, por lo cual se puede establecer que el valor de $t_r \gg t$ tabla, lo que nos indica que existe una alta correlación lineal entre X y Y .

Del análisis de regresión lineal realizado para la curva de calibración promedio, se puede observar un valor de pendiente de la recta de (m) de 7,11 y de la ordenada al origen (L_0) de -0,55, además se presenta los valores de desviación estándar de la pendiente (S_m) y desviación estándar de la ordenada al origen (S_{L_0}) , con valores de 0,02 y 0,61 respectivamente. Utilizando los valores de la pendiente, el intercepto y las desviaciones de cada parámetro, se establecieron los límites de confianza mediante el parámetro estadístico t-student al 95% de seguridad. De este análisis se obtuvo un valor de la pendiente aceptable entre 6,97 a 7,25 y de intercepto de -3,79 a 3,27.

De igual manera en el cuadro No. 13, se presenta los valores para el error típico $S_{y,x}$, en la curva de calibración promedio con un valor de 1,16, este valor representa a la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado.

3.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se realizó la estimación del límite de detección y de cuantificación en base a los resultados establecidos en el estudio de linealidad, esto es utilizando el valor del intercepto, en este caso 1,74 y de la pendiente, siendo el valor de la misma de 7,11. Para la determinación del límite de detección se aplica la ecuación 2.11 y para el cálculo del límite de cuantificación se aplica la ecuación 2.12. De esta manera se obtuvo un límite de detección de 0,73 ng/mL y un límite de cuantificación de 2,45 ng/mL. Estos resultados se transformaron a valores representativos en muestra, utilizando los volúmenes de inyección y la masa de muestra inyectada al equipo los resultados se observan a continuación en el cuadro No. 14:

CUADRO No. 14 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN UTILIZANDO CURVA DE CALIBRACIÓN. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Límite de detección ng/mL	Límite de detección µg/Kg	Límite de cuantificación ng/mL	Límite de cuantificación µg/Kg
0,73	0.44	2,45	1.47

De esta manera podemos deducir que el método, presenta un límite de detección inferior a 1µg/Kg y de cuantificación de 1,5 µg/Kg aproximadamente, indicando que el método presenta una alta sensibilidad para el análisis de OTA.

3.4 PRECISIÓN

Para establecer la precisión del método se realizó el análisis de muestras de café verde contaminada artificialmente con OTA (muestras spike) en tres niveles de concentración, por triplicado en cinco días diferentes, los resultados de esta prueba se presentan en el cuadro No 15:

CUADRO No. 15 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PRECISIÓN DEL MÉTODO. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA).DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Concentración de OTA (µg/Kg)					
Muestras spike	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
2,66	2,31421	2,71079	2,2070	2,4058	2,3945
2,66	2,30221	2,37252	2,2994	2,3754	2,5109
2,66	2,45330	2,14433	2,5303	2,2893	2,3715
15,66	14,42461	14,79033	13,4016	14,6999	14,6844
15,66	15,02920	14,87791	13,2029	14,1202	15,0472
15,66	14,19181	15,25646	13,8657	14,8166	14,8574
25,66	23,17848	24,75417	24,0197	24,3817	23,4041
25,66	23,11369	25,13830	23,3883	24,2436	24,2819
25,66	23,63935	24,76684	23,7464	24,4163	24,8869

En base a los resultados que se muestran en el cuadro No. 15, se realizó un análisis de varianza, calculando primeramente la suma de diferencias cuadráticas entre niveles (SDCb) y la suma de diferencias cuadráticas dentro de niveles (SDCw). Así mismo se calculó las diferencias cuadráticas medias entre niveles (DCMb) y dentro de niveles (DCMw) (tabla No. 8). Estos resultados se muestran en el cuadro No.16.

CUADRO No.16 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA SUMA DE DIFERENCIAS CUADRÁTICAS Y DIFERENCIAS CUADRATICAS MEDIAS ENTRE NIVELES Y DENTRO DE NIVELES. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

µg/Kg	SDCb	DCMb	SDCw	DCMw
2,66	0,01560	0,00390	0,2505	0,0251
15,66	4,14125	1,03531	1,0718	0,1072
25,66	4,36964	1,09241	1,5886	0,1589

En base a los resultados del cuadro No.16 se evaluó la desviación estándar de la repetibilidad (S_r) (ecuación 2.13) y la desviación estándar de la reproducibilidad (S_R) (ecuación 2.15), así como la desviación estándar relativa de repetibilidad (RSD_r) (ecuación 2.14) y la desviación estándar relativa de reproducibilidad (RSD_R) (ecuación 2.17). Estos resultados se pueden apreciar en el cuadro No. 17.

CUADRO No. 17 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

µg/Kg	Sr	RSDr (%)	SL²	S_R	RSD_R (%)
2,66	0,16	5,95	-0,0071	0,13	5,04
15,66	0,33	2,09	0,3094	0,65	4,12
25,66	0,40	1,55	0,3112	0,69	2,67

Como se puede apreciar en el cuadro No.17, los valores de RSD_r y RSD_R cumplen con los criterios exigibles a los métodos de análisis de Ocratoxina A por la CE (Comunidad Europea), que establece que se aceptará valores de $RSD_R \leq 30\%$ y $RSD_r \leq 20\%$, cuando el rango concentración en el que se evalúa el analito es de 1 a 10 µg/Kg (ppb).

3.5 EXACTITUD

La exactitud se determinó en base al porcentaje de recuperación. Para lo cual en las muestras de café artificialmente contaminadas en los tres niveles de concentración: 2,66 µg/Kg, 15,66 µg/Kg y 25,66 µg/Kg, se calculó el porcentaje de recuperación utilizando la ecuación 2.18, obteniéndose un porcentaje de recuperación total de 91,92%. Los porcentajes de recuperación promedio por día y total se muestran en el cuadro No 18:

CUADRO No. 18 RESULTADOS DEL CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN POR DÍA Y TOTAL. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

NIVEL (µg/Kg)	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
2,66	88,47	90,48	88,22	88,72	91,10
15,66	92,89	95,62	86,14	92,89	94,89
25,66	90,84	96,97	92,44	94,88	94,25
% RECUPERACIÓN PROMEDIO POR DÍA	90,73	94,36	88,93	92,16	93,41
% RECUPERACIÓN PROMEDIO TOTAL	91,92				

Como se puede apreciar en el cuadro No.18, los valores de porcentaje de recuperación por día y total cumplen con los criterios exigibles a los métodos de análisis de Ocratoxina A por la Comunidad Europea (CE), que establece que se aceptará valores de porcentaje de recuperación de 70 a 110%, cuando el rango de concentración en el que se evalúa el analito es de 1 a 10 µg/Kg (ppb).

De igual manera se evaluó la exactitud del método, determinando el porcentaje de recuperación en el material de referencia certificado, obteniéndose un porcentaje de recuperación de 89,4%, lo cual demuestra que el método presenta una exactitud adecuada, la misma que se encuentra dentro de los valores exigidos en la Comunidad Europea (70-110 %). Los resultados del análisis del material de referencia se muestran en el cuadro No.19:

CUADRO No. 19 RESULTADOS DEL CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN EN MATERIAL DE REFERENCIA. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA). DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

OCRATOXINA A $\mu\text{g/Kg}$	valor medio	9,17
	rango satisfactorio	5,13 - 13,20
resultados LSAIA	R1	8,25
	R2	8,14
	Promedio	8,20
RECUPERACIÓN CON MATERIAL DE REFERENCIA (%)		89,4

3.6 SELECTIVIDAD

Este parámetro se estableció bibliográficamente, pues el método seleccionado utiliza columnas de inmovofinidad con anticuerpos monoclonales específicos para OTA, que permiten separar al analito de las interferencias producidas por la matriz.

Además un indicador de la selectividad es la pureza de pico que se puede observar en un cromatograma con pico de analito libre de interferencia, esto se puede apreciar claramente en la figura No. 12.

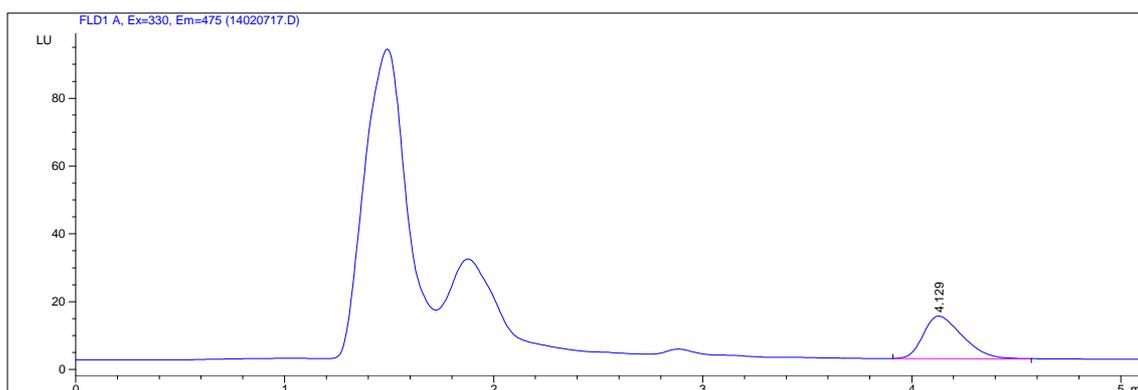


FIGURA No. 12 CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE CAFÉ CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON OCRATOXINA A

3.7 INCERTIDUMBRE

Para el cálculo de la incertidumbre, primeramente en base a la expresión final del análisis (ecuación 3.1), se calculó los coeficientes de sensibilidad mediante derivadas parciales de cada una de las variables con respecto al resultado final utilizando la ecuación 1.2.1, los resultados se exponen en el cuadro No. 20.

$$\text{Ec.3.1} \quad \boxed{OTA_{\mu g / Kg} = \frac{C}{M_s} * \frac{V_1}{V_2} * \frac{V_3}{V_4} * R}$$

C = Lectura del equipo expresada en nanogramos

V₁ = Volumen de extracción

V₂ = Volumen de alícuota de extracto aplicado en la columna de inunoafinidad

V₃ = Volumen final de extracto redissuelto en metanol

V₄ = Volumen de extracto inyectado al equipo

M_s = Peso de muestra en gramos

R = Factor de Recuperación

CUADRO No. 20 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES DE SENSIBILIDAD PARA LA INCERTIDUMBRE. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA).DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Variable	Coficiente de sensibilidad (c)
C	33
V ₁	0,165
V ₂	-8,25
V ₃	0,11
V ₄	-1,65
M _s	1,32
R	0,12

Posteriormente se calculó la contribución de la incertidumbre asociada a cada variable, además de la contribución asociada al factor de recuperación aplicando la ecuación 1.5. A continuación, se calculó la incertidumbre típica combinada aplicando la ecuación

2.19. Por último, se calculó la incertidumbre expandida (ecuación 2.20), de esta manera se obtuvo una incertidumbre de 0,69, que va asociada al resultado final, de tal manera que el resultado obtenido en la determinación Ocratoxina A en café verde utilizando columnas de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta resolución tendrá un margen de error de +/- 0,69.

Los resultados de las contribuciones de cada variable, la incertidumbre combinada e incertidumbre expandida para la determinación de OTA en café verde se pueden apreciar en el cuadro No. 21.

CUADRO No. 21 RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LAS CONTRIBUCIONES, INCERTIDUMBRE COMBINADA E INCERTIDUMBRE EXPANDIDA, ASOCIADA A LA DETERMINACIÓN DE OTA EN CAFÉ VERDE. LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA).DEPARTAMENTO NUTRICIÓN Y CALIDAD. ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA. INIAP. CUTUGLAGUA. ABRIL DEL 2009.

Fuente	contribución incertidumbre (u*c)	v_i ou v_{eff}	
Calibración (C)	0,3266	∞	
Volumen de Extracción (V ₁)	0,0112	∞	
Volumen de Alícuota de Extracto tomado (V ₂)	0,0839	∞	
Volumen de Redisolución de extracto (V ₃)	0,0418	∞	
Volumen de Extracto Inyectado al equipo (V ₄)	0,0024	∞	
Peso de Muestra (Ms)	0,0156	∞	
Factor de Recuperación (R)	0,0391	∞	
Incertidumbre combinada total (u)	0,3426		
Incertidumbre expandida (U)	k	2	0,69

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. El método es selectivo; por no existir interferencia de la matriz, además se observa una pureza de pico del 100%.
2. El límite de detección encontrado es de 0,44 $\mu\text{g/Kg}$ de OTA en café verde, lo cual indica que el método es capaz de detectar cantidades traza de la toxina.
3. El límite de cuantificación encontrado fue de 1,47 $\mu\text{g/Kg}$ de OTA en café verde, lo cual nos indica que el método puede medir concentraciones de OTA a partir de 1,47 $\mu\text{g/Kg}$ con exactitud y precisión.
4. El método es lineal ya que existe una alta correlación entre la concentración de OTA (ng/mL) y el área (LU), lo cual se puede demostrar gráficamente con un coeficiente de correlación igual a uno, y mediante el test de hipótesis para el coeficiente de correlación, en donde el t obtenido es mucho mayor al t tabulado, demostrando la correlación lineal entre estas dos variables.
5. El método es preciso; porque se obtienen resultados repetitivos con una desviación estándar relativa de repetibilidad (RSD_r) $\leq 20\%$ y además reproducibles con una desviación estándar relativa de reproducibilidad (RSD_R) $\leq 30\%$, cumpliendo con los parámetros expuestos en la ecuación de Horwitz.
6. El método es exacto; debido a que presenta una recuperación media (91,92%), cumpliendo con los requerimientos para este tipo de métodos de recuperación entre 70 y 110%.

7. El método analítico para cuantificar Ocratoxina A en café verde utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución, ha sido validado experimentalmente, en un rango de concentración de 1,47 a 30 $\mu\text{g/Kg}$.
8. La incertidumbre Expandida (U) para un $k=2$ correspondiente al 95% de confianza presenta un valor de 0,69, lo cual indica que el método presenta un margen de error de $\pm 0,69 \mu\text{g/Kg}$ para cualquier medición realizada con este proceso analítico validado.
9. El método analítico para determinar Ocratoxina A utilizando purificación con columnas de inmunoafinidad y cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia, se ha validado siguiendo un protocolo o plan de validación y, reúne todos los requisitos de la norma ISO-IEC-17025:2005 para cumplir con la regulaciones de la Comunidad Europea (CE).
10. El Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA) perteneciente al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), está en capacidad de atender los requerimientos del sector cafetalero del país en sus controles de calidad y, evaluación de la concentración de Ocratoxina A en el café de producción nacional.
11. Se realizaron los ensayos interlaboratorios a nivel internacional (anexo No. 8) con todo éxito, demostrando de esta manera que el método analítico es confiable, y brinda resultados seguros.
12. Se confirma la hipótesis planteada puesto que el proceso de validación evalúa experimentalmente los parámetros de calidad, asegurando de esta manera la aptitud del método, demostrando además que el mismo es aplicable a la determinación de Ocratoxina A.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Seguir todas las instrucciones de los protocolos analíticos y las buenas prácticas de laboratorio para evitar resultados erróneos por falta de cuidado en la manipulación de los elementos de ensayo y los equipos de medición.
2. Durante el estudio de validación debe controlarse el nivel de saturación de la columna, a fin de evitar la formación de picos atípicos (asimetría), es recomendable someter a la columna a la limpieza luego de su jornada de trabajo.
3. Se recomienda la previsión de comprar equipo para generación de nitrógeno, pues su consumo es alto en el secado de muestras, y una demanda alta del análisis causa problemas en la adquisición de este gas necesario para el proceso de medición.
4. Se recomienda utilizar nitrógeno líquido en la molienda de las muestras de café, pues este congela las muestras y facilita mucho el proceso de molienda.
5. Se recomienda calcular la concentración exacta de los estándares preparados en el laboratorio utilizando el espectrofotómetro UV-Visible, de tal manera de darles trazabilidad a los mismos.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

Se realizó la validación de un método de análisis para determinar Ocratoxina A en café verde, mediante el método científico, 2004.10 de la AOAC, que consiste en determinar esta toxina por HPLC, utilizando columnas de inmovilización y detector de fluorescencia, con el interés de demostrar la aplicabilidad de este método analítico en el Ecuador, permitiendo un control del café de exportación. La validación se llevó a cabo en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA) del INIAP. La materia prima fue proporcionada por la empresa “EL CAFÉ C.A.”, que estuvo constituida por 2 Kg de café verde. A 25g de muestra se le fortificó con tres niveles de concentración de Ocratoxina A: 2,66, 15,66 y 25,66 $\mu\text{g/Kg}$, por triplicado en cada nivel, estableciéndose los parámetros de selectividad, exactitud y precisión. Para establecer los parámetros de linealidad y rango lineal, límite de detección y cuantificación, a partir de un estándar de trabajo de 50 ng/mL se hicieron cuatro diluciones más y se inyectaron por triplicado. La evaluación de los parámetros de validación demostró que el método analítico propuesto es selectivo, porque no se evidencian que otras sustancias interfieran en el análisis de la Ocratoxina A, además se obtiene un porcentaje de pureza de pico del 100%; es lineal en un rango de 1,47 a 30 $\mu\text{g/Kg}$, obteniéndose un coeficiente de correlación $r = 1$; es preciso ya que para la repetibilidad se obtiene una $\text{RSD} \leq 20\%$; y para la reproducibilidad se obtiene una $\text{RSD} \leq 30\%$; y finalmente es exacto porque se obtiene un porcentaje de recuperación de 91,92%. Además, el límite de detección fue de 0,44 $\mu\text{g/Kg}$ y el límite de cuantificación de 1,47 $\mu\text{g/Kg}$, y al resultado final va asociado una incertidumbre de 0,69, comprobándose de esta forma la validez del método analítico.

SUMMARY

The validation of an analysis method to determine Ochratoxin A in green coffee was carried out through the scientific method 2004.10 of the AOAC consisting in determining this toxin by HPLC using immunoaffinity columns and fluorescence detector to demonstrate this analytical method applicability in Ecuador, permitting an export coffee control. The validation was carried out in the Analytical Services and Food Investigation Lab (LSAIA) of the INIAP. The raw material was provided by the enterprise "EL CAFÉ C.A.", which consisted of 2 Kg green coffee. 25 g sample were strengthened with three levels of Ochratoxin A concentration: 2.66, 15.66 and 25.66 $\mu\text{g/Kg}$ in triplicate in each level, establishing the selectivity, accuracy and precision parameters. To establish the linearity parameters and the lineal range, detection and quantification limit from a work standard of 50 ng/mL four more dilutions were made and were injected in triplicate. The evaluation of validation parameters showed that the proposed analytical method is selective because no substances interfering the Ochratoxin A analysis are evident; moreover there is a peak purity percentage of 100%; it is lineal in a range of 1.47 to 30 $\mu\text{g/Kg}$ resulting in a correlation coefficient of $r=1$; it is necessary as for repeatability an $\text{RSD} \leq 20\%$ is obtained; and for reproduction an RSD of $\leq 30\%$ is obtained and finally it is exact because a 91.92% recovery percentage is obtained. Moreover the detection limit was 0.44 $\mu\text{g/Kg}$ and 1.47 $\mu\text{g/Kg}$ quantification limit and the final result is associated to 0.69 uncertainty showing this way the analytical method validity.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **ASESORES EN CALIDAD Y MEDIOAMBIENTE (ASECAL).** 2008.
Cálculo de Incertidumbre de Medida. Quito: ASECAL. 38 p.
2. **ASESORES EN CALIDAD Y MEDIOAMBIENTE (ASECAL).** 2008.
Validación de Métodos Analíticos. Quito: ASECAL. p.21.
3. **ASOCIACIÓN NACIONAL DE EXPORTADORES DE CAFÉ (ANECAFÉ).** Exportación de Café del Ecuador por Calidad, Año 2008
<http://www.anecafe.org.ec/documentos/EXPORTACION%20POR%20CALIDAD%20-%202008.pdf>
20090715
4. **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (AOAC).** 2005.
Official Methods of Analysis. 18th edition, 1st revision. United States of America: AOAC International. Chapter 49. pp. 61-63
5. **BANCO CENTRAL DEL ECUADOR.** 2009. Estadísticas del Departamento de Comercio Exterior; Información sobre importaciones de café. Quito, Ecuador.
6. **BESNARD-JVAUDIN, E.** El Café: Cultivo, Agricultura y Cultura
<http://www.ebj-prof.com/DESCUBRIR/cafe/cafe.htm#el%20Café%20:20cultivo,%20agricultura%20y%20cultura>
20080810

7. **BUSI CAFÉS, S.L. Café Arabo.** Café
<http://www.cafearabo.com/cafe-robusta-cas.html>
20090510
8. **CABAÑES, F.J.** 2000. Las Micotoxinas Emergentes: Introducción. Iberoamericana (España) (17): 61,62.
9. **CAMEÁN, A. et al.** 2006. Toxicología Alimentaria. España: Ediciones Díaz de Santos. pp. 291, 292, 295, 299, 301
10. **CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION.** 2007. Discussion paper on ochratoxin A in cocoa. Rome, Italy: WHO/ FAO. p. 2.
11. **CONSEJO FEDERAL DE FISCALIZACIÓN DE LABORATORIOS (COFILAB).** Ensayos Interlaboratorios
<http://www.cofilab.org.ar/ensayos.html>
20090510
12. **CONSUMER EROSKI.** Origen e Historia del Café
http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/curiosidades/2001/07/05/34968.php
20090510
13. **CORRALES, M.** 1995. Validación de Métodos Analíticos por HPLC. Tesis Dr. BQF. Quito. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 13, 14, 18, 21, 24-26.
14. **CRIOLLO, M; VALAREZO, J.** Estudio Económico y Comercial del Café en Ecuador
<http://www.uees.edu.ec/investigacion/csectorial3/Cafe.PDF>
20090510

15. **DE LUCA, L.** Micotoxinas
http://www.engormix.com/micotoxinas_laboratorios_burnet__s_articulos_464_MYC.htm
20090712
16. **DEFINICIÓN LEGAL.COM.** Definición de Patrón de trabajo
<http://www.definicionlegal.com/definicionde/Patrontrabajo.htm>
20090510
17. **DEFINICIÓN.ORG.** Glosario: Definición de Café
<http://www.definicion.org/cafe>
20090510
18. **DUICELA, L.; CORRAL, R.; GUAMÁN, J.** 2005. Buenas Prácticas Agrícolas en la Caficultura Ecuatoriana. Manta, Ecuador: Impregcol. p.22.
19. **DUICELA, L. et al.** 2004. Cafés Especiales del Ecuador. Guayaquil: Poligráfica. pp.9, 11.
20. **DUICELA, L. et al.** 2005. Calidad Física y Organoléptica de los Cafés Robustas Ecuatorianos. Manta, Ecuador: Impregcol. pp.8, 37.
21. **DUICELA, L. et al.** 2004. Caracterización Física y Organoléptica de Cafés Arábigos en los Principales Agroecosistemas del Ecuador. Manta, Ecuador: Impregcol. pp.14, 15.
22. **DUICELA, L; CORRAL, R; CHÓEZ, F.** 2006. Normas de Producción Ecológica de Café Arábigo y Cacao en la Región Sur de la Amazonía Ecuatoriana. Manta, Ecuador: Neografic. p. 16.

23. **DUICELA, L.; CORRAL, R.; FERNÁNDEZ, F.** 2001. Producción de Café Arábigo: Guía Para El Caficultor Ecuatoriano. Quito: Artes Gráficas Silva. p.1, 53.
24. **ECUADOR, MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA Y PESCA (MAGAP).** 2007. Superficie, producción y Rendimiento de Café. Evolución mensual de las exportaciones de café en grano. Precios del café pagados al productor (correo electrónico). Quito, Ecuador.
25. **EMPRESA CENTRAL DE LABORATORIOS “JOSÉ ISAAC DEL CORRAL” (LACEMI).** Material de Referencia
<http://www.lacemi.cubaindustria.cu/mr.htm>
20090510
26. **HUBER, L.** 1998. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. Waldbronn- Germany: Klett Cota. p.2
27. **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (INEN).** 2006. Café Verde en Grano: Clasificación y requisitos. Quito: INEN. p.6.
28. **JARAMILLO, M.** 2004. Determinación de Monosacáridos por Cromatografía en Fase Gaseosa para Caracterizar la Pared Celular de las Frutas. Tesis Lcd. Cc. Químicas. Quito. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Escuela de Ciencias Químicas. pp. 56-57.
29. **LOPEZ, M.** Materiales de Referencia
<http://www.iat.es/simce/html/subidas/descarga/mr.pdf>
20090510
30. **MALLMANN, C; DIKIN, P.** 2007. Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos. Santa Maria, Brasil: Santa Maria. pp. 35, 36, 105, 159-161.

31. **MONROIG, M.** Botánica del Café: Descripción Botánica del Cafeto
<http://academic.uprm.edu/mmonroig/id51.htm>
20090510

32. **NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES (NATA).** 1997.
Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and
Verification of Chemical Test Methods. Australia: NATA. p. 7.

33. **NUESTROCAFÉ.** Cafés Arabicas
<http://www.nuestrocafe.com/articulo/41>
20090510

34. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA
AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO).** Micotoxinas – Rol e
Importancia en Nutrición Acuícola
<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S13.htm>
20090510

35. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA
AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO).** Plan Nacional de
Acción para la Prevención de Ocratoxina A (OTA) en el Café Ecuatoriano.
Quito: FAO. p. 7, 11.

36. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA
AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO).** Reducción de la
Ocratoxina A en el Café: Preguntas Frecuentes
<http://www.coffee-ota.org/faq.asp?lang=es>
20090510

37. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO).** 2008. Taller Subregional sobre Aseguramiento de Calidad y Validación de Metodología para Análisis Químicos. Quito: FAO. p. 14.
38. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO).** 2006. Taller Subregional sobre Metodología de Muestreo Analítico, Principios de Metrología Científica y Cálculos de Incertidumbre. Quito: FAO. pp. 66, 67, 70-75.
39. **PAZMIÑO, K.** 2005. Estudio del Comportamiento de Fructuosa, Glucosa y Sacarosa en almendras de cacao de producción nacional durante la fermentación. Tesis Dr. Quím. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias Químicas. pp. 38,39.
40. **PERDOMO, A.; RODRÍGUEZ, J; FERNÁNDEZ; F.** 2004. Ensayo Interlaboratorio: Piedra Angular de la "Confiabilidad Analítica". Alimentaria (España) (358): 65-66
41. **RIU, J.** Materiales de Referencia Certificados
<http://www.quimica.urv.es/quimio/general/CRMs.pdf>
20090510
42. **RODRÍGUEZ, J.** Café y Micotoxinas
<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2006/10/11/25267.php>
20090510

43. **SÁNCHEZ, D.** Qué es la Validación de Métodos Analíticos
http://gemini.udistrital.edu.co/comunidad/estudiantes/dlilian/que_es_valid.htm
20090510

44. **SERVICIO AUTONOMO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, CALIDAD, METROLOGÍA Y REGLAMENTOS TÉCNICOS (SENCAMER).** Patrones y Materiales de Referencia.
<http://portal.sencamer.gob.ve/node/34>
20090510

45. **SORIANO, J. et al.** 2007. Micotoxinas en Alimentos. 1a. ed. España. Ediciones Díaz de Santos. pp. 3, 201,203, 204.

46. **WAGENINGEN UNIVERSITY.** Aflatoxinas
<http://www.food-info.net/es/tox/afla.htm>
20090510

47. **WAGENINGEN UNIVERSITY.** La Planta de Café
<http://www.food-info.net/es/products/coffee/plant.htm>
20080810

48. **WAGENINGEN UNIVERSITY.** Ocratoxina
<http://www.food-info.net/es/tox/ochra.htm>
Friday 21 November, 2008

49. **WAGENINGEN UNIVERSITY.** Tricotecenos
<http://www.food-info.net/es/tox/trich.htm>
20090510

50. **WAGENINGEN UNIVERSITY.** Zearalenona
<http://www.food-info.net/es/tox/zear.htm>
20090510

51. **WAKAO, H.** Estudio de la Variación del Contenido de Alcaloides en Cacao (*Theobroma cacao* L.) de Producción Nacional Durante el Proceso de Beneficio, Tesis: Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Químicas. Quito. 2002. p.33

52. **WIKIMEDIA FOUNDATION, INC.** Café Ecuatoriano
http://es.wikipedia.org/wiki/Caf%C3%A9_ecuatoriano
20080807

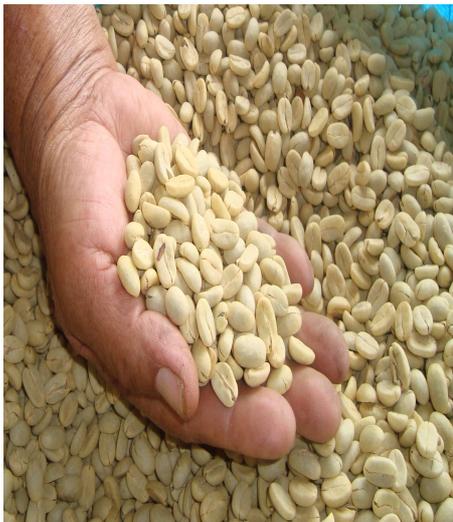
53. **WIKIMEDIA FOUNDATION, INC.** Coffea
<http://es.wikipedia.org/wiki/Coffea>
20090126

54. **WIKIMEDIA FOUNDATION, INC.** Patulina
<http://es.wikipedia.org/wiki/Patulina>
20090510

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

ANEXO No. 1 MOLIENDA Y PESAJE DE LA MUESTRA DE CAFÉ VERDE PARA EL ANÁLISIS DE OCRATOXINA A



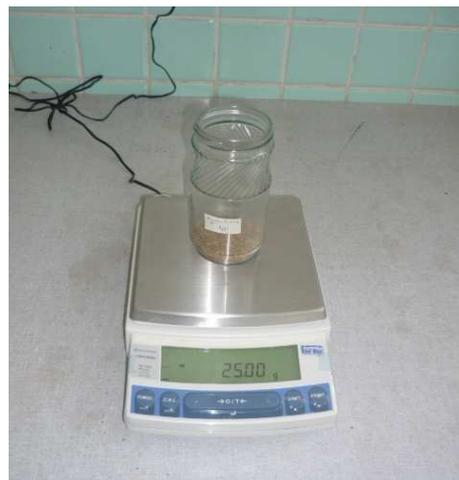
Granos de café verde



Molienda de los granos de café verde



Conservación de la muestra en congelación



Pesaje de 25g de muestra

ANEXO No. 2 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A



Fortificación de la muestra con una solución madre de Ocratoxina A



Licuada de la muestra con una sln. Metanol: bicarbonato 3% (1:1 v/v)



Filtrado de la muestra por gravedad



Dilución del extracto con PBS 1%



Aforamiento a 100 mL y homogenización del extracto con PBS 1%

ANEXO No. 3 PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A



Filtrado del extracto al vacío y utilizando columna de inmunoafinidad



Lavado de la columna de inmunoafinidad con 10 mL de agua tipo I



Eluido de la OTA con metanol



Evaporación del eluido a sequedad con gas nitrógeno 99,9% de pureza



Reconstitución de los residuos con metanol HPLC



Homogenización en baño ultrasonido de los residuos con metanol HPLC

ANEXO No. 4 CUANTIFICACIÓN DE OCRATOXINA A MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**Colocación de la muestra en los viales****Ordenamiento de los viales en el equipo HPLC Agilent 1200****Lectura en el Equipo HPLC Agilent 1200**

ANEXO No. 5 TABLA DE FACTORES MULTIPLICADORES PARA EL CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE

Valores de $t_p(\nu)$ de la distribución t para ν grados de libertad que definen un intervalo $-t_p(\nu)$ a $+t_p(\nu)$ que incluyen la fracción p de la distribución

Grados de libertad EFFECTIVOS ν	Fracción p en por ciento					
	68,27 ^(a)	90	95	95,45	99	99,73 ^(a)
1	1,84	6,31	12,71	13,97	63,66	235,80
2	1,32	2,92	4,30	4,53	9,92	19,21
3	1,20	2,35	3,18	3,31	5,84	9,22
4	1,14	2,13	2,78	2,87	4,60	6,62
5	1,11	2,02	2,57	2,65	4,03	5,51
6	1,09	1,94	2,45	2,52	3,71	4,90
7	1,08	1,89	2,36	2,43	3,50	4,53
8	1,07	1,86	2,31	2,37	3,36	4,28
9	1,06	1,83	2,26	2,32	3,25	4,09
10	1,05	1,81	2,23	2,28	3,17	3,96
11	1,05	1,80	2,20	2,25	3,11	3,85
12	1,04	1,78	2,18	2,23	3,05	3,76
13	1,04	1,77	2,16	2,21	3,01	3,69
14	1,04	1,76	2,14	2,20	2,98	3,64
15	1,03	1,75	2,13	2,18	2,95	3,59
16	1,03	1,75	2,12	2,17	2,92	3,54
17	1,03	1,74	2,11	2,16	2,90	3,51
18	1,03	1,73	2,10	2,15	2,88	3,48
19	1,03	1,73	2,09	2,14	2,86	3,45
20	1,03	1,72	2,09	2,13	2,85	3,42
25	1,02	1,71	2,06	2,11	2,79	3,33
30	1,02	1,70	2,04	2,09	2,75	3,27
35	1,01	1,70	2,03	2,07	2,72	3,23
40	1,01	1,68	2,02	2,06	2,70	3,20
45	1,01	1,68	2,01	2,06	2,69	3,18
50	1,01	1,68	2,01	2,05	2,68	3,16
100	1,005	1,660	1,984	2,025	2,626	3,077
∞	1,000	1,645	1,960	2,000	2,576	3,000

^(a) Para una magnitud z descrita mediante una distribución normal con esperanza μ_z y desviación típica σ_z , el intervalo $\mu_z \pm k\sigma_z$ incluye la fracción $p=68.27, 95.45$ y 99.73% de la distribución para $k=1, 2$ y 3 , respectivamente.

ANEXO No. 6 EJEMPLO DE TABLA DE ANÁLISIS DE INCERTIDUMBRES

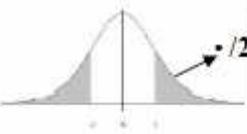
Para la presentación y el cálculo de $u(y)$ es muy recomendable utilizar una tabla del tipo:

<i>Magnitud de entrada</i> X_i	<i>Unidades de la magnitud de entrada</i>	<i>Estimación de entrada</i> x_i	<i>Incertidumbre típica</i> $u(x_i)$	<i>Coficiente de sensibilidad</i> c_i	<i>Contribución a la inc. típica</i> $u'_N(y)$
X_1		x_1	$u(x_1)$	c_1	$u_1(y)$
X_2		x_2	$u(x_2)$	c_2	$u_2(y)$
X_N		X	$u(x_N)$	c_N	$u_N(y)$
Y		Y			$u(y)$

NOTA: En el caso de variables complejas, podría ser muy práctico realizar una tabla de este tipo para la presentación (y cálculo) de cada $u(x_i)$

ANEXO No. 7 TABLA T STUDENT

Tabla de valores críticos de la distribución t de Student



Niveles de Significancia DOS COLA

	0.500	0.250	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005
1	1.00	2.41	3.08	6.31	12.71	25.45	127.32
2	0.82	1.60	1.89	2.92	4.30	6.21	14.09
3	0.76	1.42	1.64	2.35	3.18	4.18	7.45
4	0.74	1.34	1.53	2.13	2.78	3.50	5.60
5	0.73	1.30	1.48	2.02	2.57	3.16	4.77
6	0.72	1.27	1.44	1.94	2.45	2.97	4.32
7	0.71	1.25	1.41	1.89	2.36	2.84	4.03
8	0.71	1.24	1.40	1.86	2.31	2.75	3.83
9	0.70	1.23	1.38	1.83	2.26	2.69	3.69
10	0.70	1.22	1.37	1.81	2.23	2.63	3.58
11	0.70	1.21	1.36	1.80	2.20	2.59	3.50
12	0.70	1.21	1.36	1.78	2.18	2.56	3.43
13	0.69	1.20	1.35	1.77	2.16	2.53	3.37
14	0.69	1.20	1.35	1.76	2.14	2.51	3.33
15	0.69	1.20	1.34	1.75	2.13	2.49	3.29
16	0.69	1.19	1.34	1.75	2.12	2.47	3.25
17	0.69	1.19	1.33	1.74	2.11	2.46	3.22
18	0.69	1.19	1.33	1.73	2.10	2.45	3.20
19	0.69	1.19	1.33	1.73	2.09	2.43	3.17
20	0.69	1.18	1.33	1.72	2.09	2.42	3.15
21	0.69	1.18	1.32	1.72	2.08	2.41	3.14
22	0.69	1.18	1.32	1.72	2.07	2.41	3.12
23	0.69	1.18	1.32	1.71	2.07	2.40	3.10
24	0.68	1.18	1.32	1.71	2.06	2.39	3.09
25	0.68	1.18	1.32	1.71	2.06	2.38	3.08
26	0.68	1.18	1.31	1.71	2.06	2.38	3.07
27	0.68	1.18	1.31	1.70	2.05	2.37	3.06
28	0.68	1.17	1.31	1.70	2.05	2.37	3.05
29	0.68	1.17	1.31	1.70	2.05	2.36	3.04
30	0.68	1.17	1.31	1.70	2.04	2.36	3.03
31	0.68	1.17	1.31	1.70	2.04	2.36	3.02
32	0.68	1.17	1.31	1.69	2.04	2.35	3.01
33	0.68	1.17	1.31	1.69	2.03	2.35	3.01
34	0.68	1.17	1.31	1.69	2.03	2.35	3.00
35	0.68	1.17	1.31	1.69	2.03	2.34	3.00
36	0.68	1.17	1.31	1.69	2.03	2.34	2.99
37	0.68	1.17	1.30	1.69	2.03	2.34	2.99
38	0.68	1.17	1.30	1.69	2.02	2.33	2.98
39	0.68	1.17	1.30	1.68	2.02	2.33	2.98
40	0.68	1.17	1.30	1.68	2.02	2.33	2.97

ANEXO No. 8 RESULTADOS DEL ENSAYO INTERLABORATORIOS (NÚMERO DE LABORATORIO 25 PARA LSAIA)

Table 1: Results and z-Scores, Green Coffee Test Material

laboratory number	analyte			laboratory number	analyte		
	assigned value	OTA			assigned value	OTA	
		7.53	µg/kg			7.53	µg/kg
result µg/kg	recovery %	z-score	result µg/kg	recovery %	z-score		
001	6.8	71	-0.4	022	8.8	uncorr	0.8
002	6.5	uncorr	-0.6	023	9.37	90	1.1
003	5.9	100	-1.0	024	6.8	98	-0.4
004	9.4	93	1.1	025	7.67	90	0.1
005	7.8	77	0.2	026	7.20	105	-0.2
006	10.07	95	1.5	027	7.49	86	0.0
007	7.7	100	0.1	028	10.1	90	1.6
008	7.07	94.5	-0.3	029	8.32	79	0.5
009	5.97	99.8	-0.9	030	7	N.A	-0.3
010	6.11	90.4	-0.9	031	3.8	uncorr	-2.3
011	8.4	73.8	0.5	032	7.95	uncorr	0.3
012	7.58	87.31%	0.0	033	7.94	87.20	0.3
013	7.58	72	0.0	034	7.73	102	0.1
014	6.41	77	-0.7	035	9.0	80	0.9
015	7.52	99	0.0	036	6.0	85	-0.9
016	5.72	90.87	-1.1	037	6.9	85	-0.4
017	8.5	90.0	0.6	038	9.8	100	1.4
018	7.1	70	-0.3	039	8.75	104	0.7
019	4.1	uncorr	-2.1	040	5.75	uncorr	-1.1
020	5.3	98.6	-1.3	041	6.2	115.6	-0.8
021	8.65	87	0.7	042	4.3	88	-1.9

uncorr = participant did not state recovery or stated not corrected for recovery

z-scores outside the satisfactory range, i.e. $|z| > 2$, are shown in bold