



Nota Técnica

Evaluación de la precisión de dos laboratorios venezolanos para la determinación de amilosa aparente en arroz (*Oryza sativa* L.) pulido

Precision evaluation of two Venezuelan laboratories for apparent amylose determination in milled rice (*Oryza sativa* L.)

Manuel **Ávila**^{1*}, José **Ávila**², Helis **Hernández**², Omar **Verde**², Marbella **Romero**¹, Yenny **Alejos**¹

¹Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Apartado 182, Parroquia San Javier, Estado Yaracuy, Venezuela.

²Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (Fundación CIEPE). San Felipe, Estado Yaracuy, Venezuela.

*Autor para correspondencia: manuel.avila@danac.org.ve

Aceptado 03-Marzo-2013

Resumen

El presente trabajo se trazó como objetivo evaluar la precisión de dos laboratorios de ensayo venezolanos para la determinación de amilosa aparente de arroz pulido. Para ello se realizó un diseño experimental completo al azar cuyos tratamientos fueron definidos por la combinación específica de 2 laboratorios y 5 genotipos, a los cuales se les determinó el contenido de amilosa mediante el método N° 61-03 de la American Association of Cereal Chemists. Los genotipos utilizados en el estudio fueron seleccionados en un amplio intervalo de amilosa (14 - 28 %). Las muestras se acondicionaron a partir de arroz paddy hasta obtener una harina y se entregaron codificadas a los laboratorios para los respectivos ensayos. Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva y para evaluar repetibilidad y estimar los resultados dudosos se aplicó la prueba de *F* del cociente de las varianzas entre laboratorios para cada genotipo. La reproducibilidad se evaluó mediante un análisis de varianza determinando los efectos genotipo, laboratorio y su interacción. La estadística descriptiva de los resultados indicó una baja variabilidad entre las réplicas dentro de cada laboratorio, la prueba de *F* reveló que no se presentaron datos dudosos y una adecuada repetibilidad de las réplicas dentro de cada

laboratorio. El análisis de varianza indicó que existieron diferencias altamente significativas entre los genotipos ($p < 0,01$), pero no se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre los dos laboratorios ni tampoco para la interacción genotipo x laboratorio. Los resultados indicaron una adecuada repetibilidad y reproducibilidad para un amplio intervalo de contenidos de amilosa a pesar del número reducido de laboratorio evaluados.

Palabras claves: arroz, calidad, fiabilidad, interlaboratorio, repetibilidad, reproducibilidad.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the precision of two Venezuelan laboratories in determining apparent amylose of milled rice. To achieve this, a complete random experimental design was carried out with a set of treatments defined by the specific combination of 2 laboratories and 5 genotypes. Apparent amylose was determined by the N° 61-03 method of the American Association of Cereal Chemists. The selected genotypes had an apparent amylose range between 14 % and 28 %. The samples were obtained from paddy rice, from which rice flour was obtained. Samples were identified with codes and submitted to the laboratories. The results were analyzed using descriptive statistics in order to evaluate repeatability. To estimate the doubtful results, an F test quotient of differences between laboratories for each genotype was applied. Reproducibility was evaluated through a variance analysis determining the effect of genotype, the laboratory, and interaction effects. The descriptive statistics of the results pointed out a low variability between observations within each laboratory. The F test revealed that doubtful data was not presented and there was an adequate repeatability of the observations within each laboratory. The variance analysis showed that there were highly significant differences among genotypes ($p < 0.01$), but statistical differences were not found ($p > 0.05$) between the two laboratories, neither for the genotype interaction by laboratory. The results indicated adequate repeatability and reproducibility for a wide range of amylose contents despite the small number of laboratory evaluated.

Key words: quality, reliability, repeatability, reproducibility, rice, ring test.

INTRODUCCIÓN

La precisión de los resultados de ensayo permite evaluar la competencia técnica de los laboratorios; esta hace referencia a la concordancia entre los diferentes resultados de un ensayo específico (COVENIN, 1996; 1997). Una de las metodologías aplicadas para determinar la precisión de los resultados de ensayo consiste en medir la repetibilidad y la reproducibilidad mediante el establecimiento de programas interlaboratorios (COVENIN, 2000). La repetibilidad consiste en comparar los valores resultantes de ensayo realizado bajo las

mismas condiciones en términos de analista, reactivos, equipos de medición y también laboratorio, mientras que la reproducibilidad se determina con aquellos valores de ensayo obtenidos bajo diferentes condiciones de ensayo incluyendo tiempo, analistas, equipos e incluso laboratorios. Cuando los ensayos interlaboratorios se mantienen permanentemente, estos pueden detectar las fallas y las oportunidades de mejora continua en los laboratorios participantes a fin de garantizar la calidad de los resultados de ensayo.

El contenido de amilosa aparente de arroz influye sobre las propiedades de cocción

del arroz, por ello su determinación es considerada un parámetro de calidad para la evaluación de la textura del arroz cocido (Webb, 1991). Existen diversos métodos de ensayo para la determinación del contenido de amilosa aparente, pero los métodos colorimétricos (complejo yodo-amilosa) se aplican con mayor frecuencia. (Zhu *et al.*, 2008).

El método de determinación de amilosa aparente de arroz pulido N° 61-03 descrito por la American Association of Cereal Chemists (AACC, 2000), ha sido considerado como un método de referencia. Sin embargo, estudios evidencian la falta de reproducibilidad de los resultados de amilosa aparente derivados de los métodos colorimétricos. Delwiche *et al.* (1995) y Zhu *et al.* (2008), indicaron que las diferencias se atribuyen principalmente a interferencia de amilopectina en el complejo amilosa-yodo; mientras que Fitzgerald *et al.* (2009), al evaluar una comparación de resultados de amilosa aparente de 17 cultivares de arroz provenientes de 27 laboratorios de calidad de diferentes partes del mundo, encontraron baja reproducibilidad entre los laboratorios, atribuido principalmente a variabilidad de la curva estándar de amilosa producto del patrón de amilosa empleado en cada laboratorio.

En Venezuela se lleva a cabo la determinación de amilosa aparente y es utilizada como indicador de las propiedades funcionales en variedades y líneas experimentales de arroz, con fines de mejoramiento genético y también para la caracterización y el desarrollo de nuevos productos (Ávila, 2001; Pérez *et al.*, 2009; Pérez-Almeida y Montoya-Aramburu, 2009). Las evaluaciones de confiabilidad de resultados del contenido de amilosa aparente mediante pruebas interlaboratorio han sido muy limitadas en el país. Al respecto, se conoce la participación de un laboratorio venezolano en comparaciones internacionales (Fitzgerald *et al.*, 2009); mientras que el establecimiento de

pruebas interlaboratorio en el país no han sido divulgadas. Esto obedece principalmente a que muy pocos laboratorios realizan regularmente la determinación de amilosa aparente; por ello difícilmente se adecuan a las pruebas estadísticas recomendadas para ensayos de exactitud (veracidad y precisión) interlaboratorio conforme a la norma venezolana COVENIN 2972-2:1997 que involucra un gran número de laboratorios (COVENIN, 1997). A pesar de estas limitaciones, los Laboratorios de Cereales de Fundación DANAC y Fundación CIEPE, los cuales realizan la determinación de amilosa en arroz por el método antes mencionado, establecieron un ensayo de comparación para establecer una primera aproximación referencial de su desempeño técnico para la determinación de amilosa aparente conducido por laboratorios venezolanos. Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se planteó como objetivo comparar los resultados de ensayo de dos laboratorios venezolanos para la determinación del contenido de amilosa aparente de arroz pulido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Método de ensayo

Los procedimientos de ensayo se realizaron en los Laboratorios de Cereales de la Fundación DANAC y Fundación CIEPE (Estado Yaracuy, Venezuela) conforme al método para la determinación de amilosa en arroz pulido N° 61-03 descrito por la AACC (2000), y los contenidos de amilosa fueron expresados en porcentaje. Los ensayos se aplicaron a muestras sin desgrasar empleando las soluciones químicas e instrumentos de medición específicos de cada laboratorio, siendo estos diferentes en marcas comerciales, y fueron ejecutados por los analistas con una experiencia mayor de 2 años en la aplicación de ensayos de amilosa aparente. Por otra parte, los laboratorios establecieron sus curvas estándares

a partir una misma fuente de amilosa de papa, tipo III (Sigma-Aldrich®, Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA), código de lote 120K3778.

Preparación de las muestras para los análisis

La preparación de las muestras fue realizada en el Laboratorio de Cereales y Oleaginosas de la Fundación CIEPE (Venezuela). Las muestras de arroz paddy fueron procesadas a 12 ± 1 % de humedad y a temperatura de 25 °C. Inicialmente las muestras de arroz paddy fueron descascaradas a través de un molino descascarador marca GRAINMAN®, modelo 64-115-60-WDC (Grain Machinery Manufacturing, Corp., FL, USA) con lo que se obtuvo el arroz cargo. Para obtener el arroz pulido se utilizó un molino de masa giratorio GRAINMAN® 60-115-60-2AT (Grain Machinery Manufacturing, Corp., USA), la pulitura se llevó a cabo en 2 pases de 1 minuto dejando reposar el equipo durante 1 minuto entre pases. A todas las muestras de arroz pulido (blanco total) se le aplicó un molienda de 2 pases en un molino de discos marca Cemotec™, modelo 1090 (FOSS Analytical A/S, Hillerød, Dinamarca - FOSS Tecator AB, Höganäs, Suecia). Para obtener la granulometría adecuada al ensayo, las muestras fueron cernidas con un tamiz de 150 micrones (Endecotts Limited, London, Reino Unido) y finalmente se identificaron y distribuyeron a los laboratorios para sus respectivos análisis. La ejecución de los ensayos fue realizada en un lapso no mayor de 5 días de diferencia entre los laboratorios.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 2 observaciones por tratamiento. Los tratamientos estuvieron definidos por la combinación específica de 5 genotipos codificados aleatoriamente (243, 568,

072, 104 y 991) y dos laboratorios (1 y 2) la unidad experimental estuvo constituida por 30 g de harina de arroz pulido con tamaños de partículas inferiores o iguales a 150 micrones. Los genotipos fueron seleccionados a fin de cubrir un amplio intervalo de contenidos de amilosa aparente (14 - 28 %) quedando incluidos los niveles típicos de las variedades comerciales venezolanas (24 - 27 %) (Ruiz, 2002). Una vez recolectados todos los datos de los laboratorios se calcularon y tabularon los promedios, las desviaciones estándar por genotipo dentro de cada laboratorio, conforme a lo establecido por la norma COVENIN 2972-2:1997 (COVENIN, 1997). La evaluación de la precisión de los laboratorios participantes se llevó a cabo en términos de repetibilidad y reproducibilidad. Debido al número reducido de laboratorios, la repetibilidad se evaluó por genotipo utilizando el cociente de las varianzas de los laboratorios, el cual fue comparado con el valor crítico de F a un nivel de confianza de 95 %. Si el valor de F calculado superaba el valor crítico tabulado, el resultado del laboratorio correspondiente se consideró dudoso y de baja repetibilidad (ISO, 1981). Luego se procedió a determinar la reproducibilidad mediante un análisis de varianza bajo el diseño inicialmente establecido considerando como fuentes de variación los genotipos, laboratorios y su interacción. Finalmente se realizó la comparación de medias por la prueba de Mínima Diferencia Significativa y se consideró como valor de referencia los promedios de cada genotipo. Todos los datos fueron analizados utilizando el programa Statgraphics® Plus, versión 4.0 (Statistical Graphics Corporation, Warrenton, VA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 presenta los resultados de los porcentajes de amilosa aparente enviados por los laboratorios participantes, también se indican los promedios y las desviaciones

Cuadro 1.- Resultados de los valores de amilosa aparente de los 5 genotipos de arroz enviados por los dos laboratorios.

Parámetro	Laboratorio	Réplicas	Genotipos de arroz (%)				
			243	568	072	104	991
Amilosa	1	1	15,35	17,46	22,05	24,42	28,03
		2	15,27	17,03	22,18	24,50	27,95
	2	1	14,96	16,89	22,27	24,27	28,26
		2	15,05	17,23	21,83	24,57	27,81
Promedios	1	-	15,31	17,25	22,12	24,46	27,99
	2	-	15,01	17,06	22,05	24,42	28,04
Desviación estándar	1	-	0,057	0,304	0,092	0,057	0,057
	2	-	0,064	0,240	0,311	0,212	0,318

estándar de los genotipos por laboratorio. Los valores de desviación estándar del contenido de amilosa por laboratorio de los diferentes genotipos de arroz estudiados, fueron comparables a los encontrados por Yuan *et al.* (1999) en una evaluación de métodos colorimétricos de arroz donde se emplearon diferentes laboratorios y analistas, estos autores señalaron una adecuada repetibilidad con base a sus resultados.

Al estudiar la repetibilidad por medio del estadístico F , se observó que las diferencias entre laboratorios para cada uno de los genotipos evaluados no fueron significativas ($p < 0,05$), es decir, las varianzas entre laboratorios fueron homogéneas (Cuadro 2). Por ello, no se encontraron valores dudosos en ningún laboratorio, indicativo de una repetibilidad adecuada para las observaciones dentro de cada laboratorio. La Fig. 1 presenta la dispersión de los valores de amilosa aparente en las réplicas de todos los genotipos para cada laboratorio y resulta de gran utilidad práctica si se requiere establecer un orden de mérito entre los laboratorios. En esta se puede destacar que, a pesar de no existir diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre la dispersión de observaciones intralaboratorio, se encontró una menor

dispersión en los resultados del laboratorio 1. La adecuada repetibilidad entre laboratorios fue consistente con la obtenida por Fitzgerald *et al.* (2009) en pruebas de comparaciones con métodos similares. Se pudo evidenciar, para el momento del ensayo, que los laboratorios participantes gozaban de planes de calibración de sus equipos, trazabilidad de la medición, actualización técnica de los analistas, así como otras actividades relativas a las “buenas prácticas de laboratorio”; dichos factores contribuyen en gran medida a mejorar la repetibilidad.

La reproducibilidad evaluada mediante el análisis de varianza, reveló diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre los valores de amilosa aparente para el efecto genotipo y no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para los efectos de los laboratorios y la interacción genotipo x laboratorio (Cuadro 3). La comparación de medias entre genotipos reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) y la conformación de 5 grupos homogéneos, los cuales corroboraron la adecuada selección de los genotipos para un amplio intervalo de contenidos de amilosa (Cuadro 4); donde se enmarcan los genotipos experimentales y variedades comerciales de

Cuadro 2.- Significación de la prueba de *F* para los 5 genotipos de arroz (repetibilidad interlaboratorios).

Genotipos de arroz	<i>F</i>	Valor de <i>p</i>	Datos dudosos	
			Laboratorio 1	Laboratorio 2
243	0,7901	0,9252 ^{NS}	0	0
568	1,5995	0,8519 ^{NS}	0	0
072	0,0873	0,3658 ^{NS}	0	0
104	0,0711	0,3318 ^{NS}	0	0
991	0,0316	0,2240 ^{NS}	0	0

NS: no significativo.

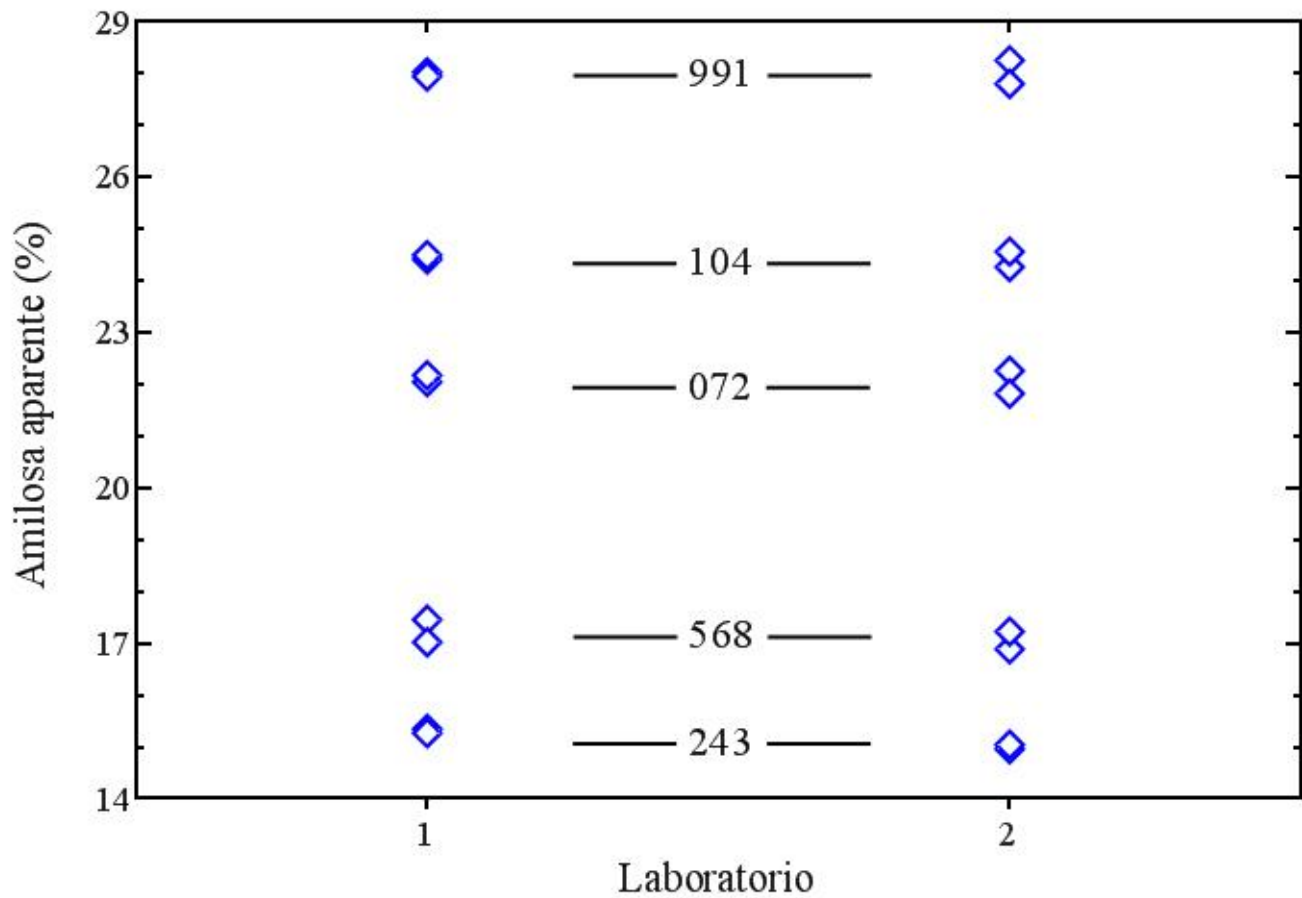


Figura 1.- Dispersión de las réplicas por genotipo para cada laboratorio.

Cuadro 3.- Análisis de varianza de valores de amilosa aparente de los 5 genotipos de arroz (reproducibilidad interlaboratorios).

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Valor de p
Genotipo (A)	441,800	4	110,450 **	2659,00	< 0,0001
Laboratorio (B)	0,061	1	0,061 ^{NS}	1,46	0,2553
Interacción (A x B)	0,075	4	0,019 ^{NS}	0,45	0,7712
Residual	0,415	10	0,042		
Total	442,351	19			

** Efecto altamente significativo (a nivel de $p < 0,01$). NS: no significativo.

Cuadro 4.- Comparación de medias de los valores de amilosa aparente de los laboratorios entre genotipos.

Genotipo	Promedios ¹
243	15,16 ^a
568	17,15 ^b
072	22,08 ^c
104	24,44 ^d
991	28,01 ^e

¹ Letras diferentes denotan diferencias estadísticas a nivel de $p < 0,05$.

arroz venezolanos (Ruiz, 2002). La ausencia de significación estadística para el factor laboratorio (Cuadro 3) indicó que a pesar de que los resultados de ensayos fueron generados por laboratorios diferentes, estos pueden ser considerados de una misma población, por genotipo evaluado. Por otra parte, la ausencia de interacción significativa para genotipo x laboratorio, reveló que la ubicación de los genotipos conforme a los contenidos de amilosa fue consistente a través de los laboratorios (Fig. 1) y por tal motivo se puede señalar que los resultados presentaron adecuada reproducibilidad.

Los resultados del presente estudio contrastaron con los obtenidos por Fitzgerald *et al.* (2009). Al evaluar los contenidos de amilosa

de 17 cultivares en 27 laboratorios, encontraron interacciones genotipo x laboratorio y baja reproducibilidad. La adecuada reproducibilidad encontrada en este trabajo puede ser atribuida al número reducido de laboratorios y al uso de una misma fuente de amilosa. La amilosa de papa puede poseer atributos variables dentro una misma marca en lotes de producción diferentes, como por ejemplo el índice de afinidad al yodo (reactivo elemental para la determinación de amilosa), lo que podría generar curvas de referencias diferentes y en consecuencia afectar el cálculo del contenido de amilosa aparente. Esto dista de los atributos que debe poseer un patrón en términos de trazabilidad de la medición. Al eliminar esta fuente de variación en el diseño del experimento, probablemente

condujo a resultados comparables entre laboratorios, y adicionalmente, plantea la necesidad de seleccionar patrones con propiedades más estables, en ensayos de amilosa aparente en arroz.

CONCLUSIONES

En la evaluación de la precisión de dos laboratorios para la determinación de amilosa aparente en arroz pulido mediante el método N° 61-03 de la AACC (2000), los resultados indicaron adecuada repetibilidad y reproducibilidad para un amplio intervalo de contenidos de amilosa, sin datos dudosos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC. 2000. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods. (10th. ed.). Amylose content of milled rice. Method 61-03. Saint Paul, MN, USA.
- Ávila, Manuel. 2001. Evaluación de la calidad culinaria del arroz: una herramienta para el mejoramiento genético. Boletín Informativo DANAC. 7(1):1-2.
- COVENIN. 1996. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Exactitud (veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados. Parte 1: principios y definiciones generales. Norma Venezolana COVENIN 2972-1:1996 (ISO 5725-1:1994). Caracas, Venezuela.
- COVENIN. 1997. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Exactitud (veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados. Parte 2: método básico para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad de un método estándar de medición. Norma Venezolana COVENIN 2972-2:1997 (ISO 5725-2:1994). Caracas, Venezuela.
- COVENIN. 2000. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Norma Venezolana COVENIN 2534:2000 (ISO/IEC 17025:1999). Caracas, Venezuela.
- Delwiche, Stephen R.; Bean, Maura M.; Miller, Raymond E.; Webb, Bill D. and Williams, Philip C. 1995. Apparent amylose content of milled rice by Near-Infrared Reflectance Spectrophotometry. Cereal Chemistry. 72(2):182-187.
- Fitzgerald, Melissa A.; Bergman, Christine J.; Resurreccion, Adoracion P.; Möller, Jürgen; Jimenez, Rosario; Reinke, Russell F.; Martin, Margrit; Blanco, Pedro *et al.* 2009. Addressing the dilemmas of measuring amylose in rice. Cereal Chemistry. 86(5):492-498.
- ISO. 1981. International Organization for Standardization. Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility by inter-laboratory tests. ISO 5725:1981.
- Pérez, Elevina; Baragaño, Mercedes; Arteaga, Madella and Schroeder, Mily. 2009. Proximal composition and categorization by the amylose content of rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Revista de la Facultad de Agronomía (UCV). 35(3):94-99.
- Pérez-Almeida, Iris y Montoya-Aramburu, María A. 2009. Calidad del grano y variabilidad genética de variedades y líneas de arroz del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Agronomía Tropical. 59(4):445-456.
- Ruiz, Fresther. 2002. Efectos del genotipo y tiempo de almacenamiento sobre la calidad culinaria de variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Venezuela. 78 p.
- Webb, B.D. 1991. Rice quality and grades. In Rice utilization. Volume II. (2nd. ed.). (pp. 89-119). New York, NY, USA: Van Nostrand Reinhold.
- Yuan, Jian; Yang, Xiaorong and Wang, Zhaoci. 1999. Research on method for determination of amylose content in rice. In Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-Product Protection. 14-19 October, 1998. Volume II. (pp. 1710-1714). Beijing, China.
- Zhu, Thianming; Jackson, David S.; Wehling, Randy L. and Geera, Bhima. 2008. Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. Cereal Chemistry. 85(1):51-58.