



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”

GUIA PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO
“DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN
ALIMENTOS PARA ANIMALES”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUIMICO

P R E S E N T A:

NORMA LÓPEZ RAZO

DIRECTOR DE TESIS:

MTRO. VICTOR CORVERA PILLADO



MÉXICO D.F. 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

REALMENTE UNA SITUACIÓN MUY DIFÍCIL MENCIONAR A TODOS QUIENES HAN REALIZADO APORTACIONES EN LA CULMINACIÓN DE ESTE SUEÑO PERO AQUÍ VOY.

A MI MADRE: POR EL AMOR Y DEVOCIÓN QUE TIENES A TUS HIJOS, POR EL APOYO INCONDICIONAL QUE SIEMPRE ME HAZ DADO, POR, POR HABERME DADO LA VIDA Y ENSEÑADO A VIVIRLA, POR TODO LO QUE ME HAZ DADO NO TENGO PALABRAS PARA AGRADECERTE MAMÀ.

A MI PADRE: POR TODO TU AMOR, POR EL VALOR Y EL CORAJE QUE HAZ TENIDO PARA LEVANTARTE ANTE CUALQUIER ADVERSIDAD, POR LAS ENSEÑANZAS QUE ME HAZ DADO Y POR ANIMARME SIEMPRE A SEGUIR ADELANTE GRACIAS PAPÀ.

A MIS HERMANOS: POR SU AMOR Y PACIENCIA, GRACIAS POR PREOCUPARSE POR SU HERMANITA Y POR COMPARTIR CONMIGO LOS MOMENTOS MAS IMPORTANTES DE NUESTRAS VIDAS Y POR ACOMPAÑARME EN UNO MAS.

A MIS AMIGOS (SI NO MENCIONO NOMBRES NO SE ME OFENDAN ES PARA QUE NO SE ME PASE NINGUNO PERO IGUAL SABEN A QUIEN ME REFIERO): MUCHAS GRACIAS POR ESTAR CONMIGO EN TANTOS MOMENTOS FELICES Y OTROS TANTOS TRISTES PERO SIEMPRE JUNTOS GRACIAS POR TODO Y TENGAN LA CERTEZA QUE A PESAR DEL TIEMPO Y LA DISTANCIA SIEMPRE LOS LLEVARE EN MI CORAZÓN.

DE MANERA ESPECIAL A

MTRO. VÍCTOR CORVERA PILLADO, POR SU AYUDA Y PACIENCIA EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

I. Q. RAUL RAMON MORA HERNANDEZ: POR TODOS LOS CONSEJOS, POR TODOS LOS CONOCIMIENTOS APLICADOS EN MI FORMACION PROFESIONAL Y EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO QUE DE VERDAD NO SERIA POSIBLE SIN TU AYUDA Y SOBRETUDO POR TU INVALUABLE AMISTAD.

DR. ROBERTO MENDOZA SERNA, I.Q. EDUARDO VAZQUEZ ZAMORA, QF.B. ERIK ABEL DE LOS SANTOS MATA: SIN CUYA EXPERIENCIA, APOYO Y TIEMPO NO SE HUBIERA LLEGADO A LA CULMINACION DE ESTE TRABAJO Y POR SER TAN MAGNIFICAS PERSONAS.

CON MI ADMIRACION Y RESPETO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO (UNAM) FES ZARAGOZA POR HABERME ABIERTO LAS PUERTAS.

iiiiii“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”!!!!!!
NORMA.

INTRODUCCION

El aumento en la oferta y la demanda de productos de consumo animal que contienen una cantidad determinada de proteínas genera la necesidad de conocer el contenido proteico de estos, para lo cual es necesario recurrir a un laboratorio para solicitar dicha determinación.

Los laboratorios que proporcionan este servicio deben demostrar que son competentes para realizar este ensayo, un requisito para demostrar esta competencia es la validación del método. Sin embargo hasta el momento la validación no cuenta con criterios estandarizados por lo que cada laboratorio realiza sus validaciones conforme su entendimiento y recursos lo permiten

Recientemente la Comisión Federal Para la Protección Contra Riesgos Sanitarios "COFEPRIS" publico los criterios de validación (CCAYAC-P-058) con los cuales se pretende que todos los laboratorios se guíen para la adecuada validación de sus métodos.

En la presente investigación se propondrá de manera documental una guía que permita llevar a cabo la validación del método para la determinación de proteína en alimentos para animales apegándose a los criterios establecidos por la COFEPRIS y por lo tanto se puedan emitir resultados confiables de dicha determinación.

OBJETIVOS:

- Obtener de manera documental un ejemplo de protocolo para la validación del método de proteína para consumo animal apegado a los criterios establecidos por la COFEPRIS.
- Identificar los parámetros que se deben cumplir para realizar la validación parcial o confirmación del método para la determinación de proteínas AOAC 984.13 capítulo 4 alimentos para animales 18ª edición.
- Identificar las fuentes de incertidumbre en la determinación de proteínas y el modelo matemático para su estimación.
- Identificar los criterios de aceptación para evaluar los parámetros de desempeño aplicables al método de determinación de proteína en alimentos para animales.

INDICE

DEFINICIONES.....	01
CAPÍTULO I.....	03
1.1 Proteínas.....	03
1.2 Clasificación de las proteínas.....	03
1.3 Funciones de las proteínas.....	04
1.4 Principales fuentes de proteínas	05
CAPÍTULO II.....	06
2.1 Nutrición animal.....	06
2.2 Principales productos de ingesta animal.....	07
2.3 Importancia de la determinación de proteínas en alimentos de consumo animal.....	08
CAPÍTULO III.....	09
3.1 Control de calidad en alimentos de consumo animal.....	09
3.2 Requisitos para la distribución y uso de alimentos para animales de acuerdo a lo establecido por la Ley Federal de Sanidad Animal y su Reglamento.....	09
3.3 Laboratorios de constatación.....	10
CAPÍTULO IV.....	11
4.1 Pre requisitos para realizar la validación de un método analítico.....	11

4.1.1 Buenas prácticas de laboratorio.....	11
4.1.2 Equipos adecuados.....	12
4.1.3 Reactivos adecuados.....	13
4.1.4 Instalaciones apropiadas.....	13
4.1.5 Personal competente.....	14
4.1.6 Materiales de referencia.....	16
4.1.7 Muestras que contengan el analito de interés en concentración conocida.....	16
4.2 Requisitos de la NMX-EC-17025-IMNC -2006 para la validación de un método de ensayo.....	17
4.3 Determinación del grado de validación requerido.....	18
4.4 Criterios establecidos en la guía CCAYAC-P-058 para la validación de un método volumétrico.....	19
CAPÍTULO V: VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE PROTEÍNAS EN ALIMENTOS PARA ANIMALES MÉTODO AOAC 984.13 CAPÍTULO 4 ALIMENTOS PARA ANIMALES 18ª EDICIÓN. MÉTODO KJELDAHL.....	32
5.1 Clasificación del método.....	32
5.2 Parámetros de desempeño aplicables al método de determinación de proteínas en alimentos para animales.....	32
5.3 Selección del tipo de matriz a evaluar.....	32

5.4 Planteamiento de los parámetros de desempeño aplicables.....	33
5.4.1 Intervalo de trabajo.....	33
5.4.2 Recuperación.....	34
5.4.3 Sesgo.....	35
5.4.4 Repetibilidad y reproducibilidad.....	36
5.4.5 Incertidumbre.....	36
CAPITULO VI: EJEMPLO DE PROTOCOLO DE VALIDACIÓN.....	43
CAPITULO VII: EJEMPLO DE INFORME DE VALIDACIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	76

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS:

FIGURA 1: Clasificación de las proteínas.....	03
FIGURA 2: Grado de validación requerido.....	18
TABLA 1: Criterio N°3.....	21
TABLA2: Criterio N°4.....	22
FIGURA 3: Grafico de linealidad.....	23
FIGURA 4: Grafico de residuales.....	24
FIGURA 5: Respuesta analítica vs concentración.....	24
FIGURA 6: Repetibilidad y Reproducibilidad.....	28
TABLA 3: Criterio N°7.....	30
TABLA 4: Niveles del intervalo de trabajo.....	33
TABLA 5: Cantidad de lisina y sacarosa requerido por cada nivel.....	34
TABLA 6: Recuperación.....	35
TABLA 7: Sesgo.....	36
FIGURA 7: Método de ensayo.....	45



DEFINICIONES:

SAGARPA: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

CCYAC: Comisión de Desarrollo Analítico y Ampliación de Cobertura.

ANALITO: Es el componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra. Son especies químicas cuya presencia o concentración se desea conocer.

PLACEBO: Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

MENSURANDO: Es una magnitud. Es la cantidad de objeto de medida, es decir, la cantidad o concentración de analito. El mensurando es una cantidad que se somete a una medición en una comparación con un patrón que proporciona la información requerida.

VALIDACIÓN: Es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio que las características de desempeño del método satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

LABORATORIO APROBADO: Persona física o moral acreditada de acuerdo a lo establecido por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y aprobada por la SAGARPA , para prestar servicios relacionados con las pruebas o análisis para determinar la presencia o ausencia de una enfermedad o plaga de los animales o para realizar servicios de constatación o de contaminantes



físicos, microbiológicos y químicos conforme a las normas oficiales mexicanas en materia zoosanitaria y expedir informe de resultados.

LABORATORIO AUTORIZADO: Persona moral autorizada por la SAGARPA, para prestar servicios relacionados con el diagnóstico a fin de determinar la presencia o ausencia de una enfermedad o plaga de los animales o de constatación de productos para uso en animales o consumo por éstos, conforme a las disposiciones de la Ley Federal de Sanidad Animal y su Reglamento, así como para expedir informe de resultados.

PARAMETRO DE DESEMPEÑO: Parámetro específico a evaluar en una validación.

RESULTADO DE ENSAYO: Valor de un mensurando obtenido tras la realización de un método de ensayo específico.

BLANCO DE REACTIVOS: Reactivos usados durante el proceso analítico, los cuales son analizados para garantizar que la medición no es influenciada por los materiales utilizados durante el análisis.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN: Parámetros bajo los cuales el resultado de una prueba se considera aceptable.

CAPITULO I

1.-PROTEÍNAS.

Las proteínas son sustancias cuaternarias, es decir, formadas por la suma de cuatro elementos: hidrógeno, nitrógeno, carbono y oxígeno. Son además, macromoléculas (moléculas gigantes), es decir, polímeros de gran tamaño y peso, formados por la unión covalente entre monómeros. El monómero de la proteína es el aminoácido, y son 20 los más comunes en las proteínas; la secuencia de éstos monómeros determina la estructura primaria de la proteína (esta macromolécula posee cuatro estructuras), que es única y diferente en cada una de ellas.

Cada aminoácido está formado por la unión de cinco componentes: un átomo de hidrógeno, una cadena carbonada, un grupo ácido y un radical amino; todos estos unidos a un átomo de carbono. Los aminoácidos se unen entre sí por medio de enlaces peptídicos, los cuales conectan el grupo ácido de un aminoácido con el radical amino de otro, de forma covalente, y produciendo reacciones de condensación, que significan la pérdida de agua.

1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

Existe una gran variedad de proteínas las cuales de acuerdo a sus propiedades pueden clasificarse como se muestra a continuación.

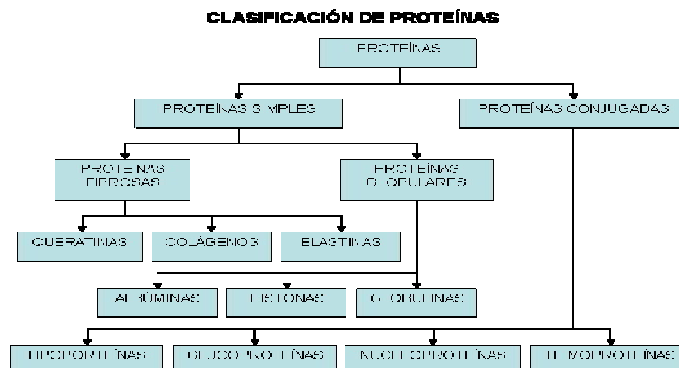


FIG.1



1.3 FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS.

La gran heterogeneidad estructural de las proteínas les permite desempeñar múltiples funciones en el ser vivo. Describir las funciones de las proteínas equivale a describir en términos moleculares todos los fenómenos biológicos. La gran mayoría de las reacciones metabólicas tienen lugar gracias a la presencia de un catalizador de naturaleza proteica específico para cada reacción. Estos biocatalizadores de naturaleza proteica reciben el nombre de enzimas. La gran mayoría de las proteínas son enzimas.

Las estructuras encargadas del reconocimiento de señales químicas de cualquier tipo son proteínas. Así, los receptores hormonales y los receptores de neurotransmisores son estructuras proteicas, que por lo general, interactúan con sus ligandos por complementariedad entre sus estructuras. Muchos de estos ligandos (hormonas y neurotransmisores) son, a su vez, de naturaleza proteica.

En los seres vivos son esenciales los fenómenos de transporte y los transportadores biológicos son siempre proteínas, que se encargan de:

- Transportar moléculas hidrofóbicas a través de un medio acuoso (la hemoglobina y las lipoproteínas transportan, respectivamente, oxígeno y lípidos a través de la sangre).
- Transportar vesículas cargadas de materiales diversos por el interior del citoplasma a través de la red de microtúbulos, como hace la kinesina.
- Transportar electrones en reacciones redox (como ocurre en la cadena transportadora de electrones de la membrana interna mitocondrial).

Hay proteínas cuya principal función es estructural. Las células poseen un citoesqueleto de naturaleza proteica que constituye un armazón alrededor del cual se organizan todos sus componentes, y que dirige fenómenos tan importantes como el transporte intracelular o la división celular. En los tejidos de sostén (conjuntivo, óseo, cartilaginoso) de los vertebrados, las fibras de colágeno presentes en la matriz extracelular son las encargadas de conferir resistencia mecánica tanto a la tracción como a la compresión.



La queratina (presente en cabello, plumas, uñas, cuernos), la fibroína y la fibrina que segregan las plaquetas para formar los coágulos sanguíneos también son proteínas con función estructural.

Todas las funciones de motilidad de los seres vivos están relacionadas con las proteínas. Así, la contracción del músculo resulta de la interacción entre dos proteínas, la actina y la miosina . El movimiento de la célula mediante cilios y flagelos está relacionado con la tubulina (la misma proteína que forma los microtúbulos).

1.5 PRINCIPALES FUENTES DE PROTEINAS.

Los alimentos que contienen proteínas de origen animal son variados y cada uno tiene sus funciones principales en el organismo del ser humano.

La parte del cuerpo del animal que contiene proteína es el músculo, es decir, la carne y no los huesos o ninguna grasa. Los alimentos que contienen proteínas de origen animal son necesarios para satisfacer las necesidades de los seres humanos.

Entre los diversos productos de origen animal que se consumen por los humanos y que aportan la mayor cantidad de proteínas encontramos los siguientes:

- Carne roja
- Pollo
- Pescado
- Huevo
- Leche
- Crustáceos
- Mariscos



CAPITULO II

2.1 NUTRICIÓN ANIMAL.

Es el proceso que permite proporcionar la cantidad de sustancias nutritivas o alimentos adecuados para producir una condición física óptima en los animales domésticos y animales destinados a consumo humano o que proporcionan productos consumibles (leche, huevo, etc.); para ello se debe tomar en consideración los requerimientos nutricionales, las características valorativas de los alimentos y la ración o forma de suministro de la cantidad de producto necesario para cubrir dichos requerimientos en los animales.

Alimentos son los productos naturales y artificiales que ingieren los animales para 1) mantenerlos, 2) acrecentar la producción y rendimiento, incluyendo aquellos ingredientes que se utilizan para impartir sabor, dar color y reducir el estrés, y/o mejorar la palatabilidad, proveer volumen o preservar el alimento.

Un alimento es digerido por el animal en el aparato digestivo y le proporciona uno o varios nutrientes, o elementos simples capaces de ser absorbidos por la mucosa del tubo digestivo, los cuales son metabolizados y utilizados por el animal para satisfacer sus necesidades de mantenimiento y producción.

El proceso digestivo es específico para cada especie animal, pero puede agruparse a los animales en dos grupos importantes según su fisiología digestiva: monogástricos, que comprende cerdos, conejos, caballos y aves; y poligástricos o rumiantes, que incluye a los bovinos, ovinos y caprinos.

Las diferencias más importantes entre unos y otros afectan a la digestión de los hidratos de carbono, cuyos nutrientes finales son básicamente glucosa en los monogástricos y ácidos grasos volátiles en los rumiantes. La principal función de la glucosa y de los ácidos grasos volátiles en el animal será el suministro de energía, aunque también intervienen en la síntesis de otros compuestos, tales como la lactosa de la leche.



La digestión de las proteínas presenta notables diferencias en unos y otros. En los dos casos los nutrientes finales son aminoácidos, pero mientras que en los monogástricos éstos serán sólo aquellos que se encontraban en los alimentos, en los rumiantes, proceden en parte de los alimentos y en parte de los microorganismos que se encuentran en su tubo digestivo. Los aminoácidos serán utilizados por el animal para la síntesis de proteínas principalmente.

2.2 PRINCIPALES PRODUCTOS DE INGESTA ANIMAL.

Las necesidades nutritivas de los animales se cubren mediante la ración que ingieren; esto es, la ración es una combinación de ingredientes que aporta los nutrientes requeridos por el animal. Las raciones de los animales se elaboran mediante la combinación de tres tipos de ingredientes:

a) Las materias primas son productos de origen vegetal, animal ó mineral que para efectos didácticos se clasifican en tres grandes grupos:

1.-Cereales:

- Cebada,
- Maíz,
- Trigo blando,
- Avena,
- Sorgo,
- Pulido de arroz,
- Cascarilla de arroz,
- Semilla de algodón,

2.-Harinas de subproductos animales

- Harina de carne ,
- Harina de pescado,
- Harina de sangre ,
- Harina de pluma,
- Harina de cuerno y pezuña,

3.-Subproductos lácteos.

- Leche desnatada,
- Suero de leche.



b) Los ingredientes complementarios permiten ajustar el contenido de las raciones en nutrientes específicos; los ingredientes complementarios incluidos en las raciones de monogástricos son aminoácidos esenciales y correctores vitamínico-minerales.

c) Los aditivos son ingredientes que mejoran las condiciones de elaboración, de conservación, de aprovechamiento digestivo y metabólico de las raciones.

2.3 IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN ALIMENTOS DE CONSUMO ANIMAL.

Como se mencionó anteriormente las proteínas son encargadas de una cantidad muy importante de funciones en el organismo, por ello es de suma importancia mantener una ingesta adecuada de las mismas.

La cantidad de proteínas que se suministra a los animales que son destinados al consumo humano deben estar reguladas de acuerdo a la cantidad proteica que estos deben ofrecer una mala alimentación en los animales provocara un bajo valor nutrimental de los productos provenientes de estos.



CAPITULO III

3.1 CONTROL DE CALIDAD EN ALIMENTOS PARA ANIMALES

Según lo establecido por el artículo 171 del reglamento de la ley federal de sanidad animal. Las personas físicas o morales que fabriquen productos para uso o consumo animal deberán contar con un laboratorio de control de calidad interno, el cual deberá estar autorizado por la SAGARPA y en el caso de no contar con él, deberán de contratar a un laboratorio autorizado o aprobado.

3.2 REQUISITOS PARA LA ELABORACION Y DISTRIBUCION DE PRODUCTOS DE CONSUMO ANIMAL DE ACUERDO A LO ESTABLECIDO POR EL REGLAMENTO Y LEY FEDERAL DE SANIDAD ANIMAL.

De acuerdo a lo establecido en el artículo 150 y 151 del reglamento de la ley federal de sanidad animal deben ser registrados y autorizados ante la SAGARPA los siguientes productos.

- Las pre mezclas de cualquier tipo empleadas para la fabricación de productos alimenticios para consumo animal, que incluyan pre mezclas registradas y/o aditivos y/o principios activos farmacéuticos contenidos en las concentraciones, combinaciones,
- Alimentos para consumo animal, como alimentos terminados o pre mezclas, que contengan ingredientes y harinas de origen animal y que pueden contener pre mezclas y principios activos o aditivos
- Nutracéuticos o alimentos funcionales;
- Fórmulas lácteas que no contengan principios activos de uso farmacéutico o bien que contengan premezclas medicadas registradas
- Suplementos alimenticios no medicados.

Según el artículo 161 del reglamento de la ley federal de sanidad animal fracción IV Para la solicitud de autorización de productos nacionales o importados previstos en el artículo 151 de este Reglamento, los interesados



deberán presentar Informes de resultados de constatación del producto emitidos por un laboratorio oficial, aprobado o autorizado.

3.3 LABORATORIOS DE CONSTATACIÓN.

Debido a que es un requisito para la producción y distribución de productos de consumo animal contar con un certificado de análisis proveniente de un laboratorio de calidad interno o en caso de no contar con este contratar los servicios de un laboratorio externo el cual debe de estar aprobado por la secretaria de salud para emitir certificados de constatación.

Para que el laboratorio de constatación pueda emitir una información de utilidad debe demostrar su capacidad de realizar los ensayos para los cuales ofrece sus servicios, la manera más eficaz de demostrar esta capacidad es realizando la validación de los métodos de ensayo ya que al realizarla el laboratorio es reconocido por la SAGARPA.



CAPITULO IV

4.1 PRE REQUISITOS PARA REALIZAR LA VALIDACION DE UN METODO ANALITICO.

4.1.1 BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO:

Dentro de las buenas prácticas de laboratorio deben considerarse principalmente los siguientes puntos:

- Es recomendable realizar la selección adecuada del material de vidrio a utilizar de acuerdo a la metodología a emplear, en relación al proceso de medición que será realizado.
- Todo el material debe estar limpio y seco.
- El material volumétrico debe de estar verificado.
- Dejar separadas las juntas, llaves y válvulas esmeriladas después de su uso.
- Nunca meter el material volumétrico clase A en la estufa ya que la temperatura provoca la expansión del vidrio y esto provoca que el volumen al cual se calibró ya no sea válido.
- Enjuagar la pipeta o bureta con la solución que se va a medir y desechar la solución.
- Evitar las formaciones de burbujas antes de realizar la lectura del menisco.
- Utilizar balanzas calibradas y/o verificadas.
- Verificar que la burbuja de la balanza se encuentre centrada.
- Mantener los termómetros en posición vertical cuando no se estén usando debido a que el mercurio tiende a separarse y esto produce variaciones en las lecturas del termómetro.
- Los termómetros deben de estar calibrados y/o verificados.



- Situar lo más cerca posible los desecadores de las balanzas.
- Utilizar guantes de látex para la manipulación de reactivos.
- Utilizar lentes de seguridad dentro del laboratorio.

4.1.2 EQUIPOS ADECUADOS:

a) Tener disponibles en los sitios donde se utilizan, los procedimientos vigentes para la operación, mantenimiento, almacenamiento, calibración y verificación del equipo.

b) Establecer específicamente sobre que personal recae la responsabilidad del manejo, calibración y mantenimiento del equipo.

c) Mantener registros del cumplimiento de los programas de calibración y mantenimiento de todo el equipo y cada elemento del mismo, dichos registros deben contener: fecha, el sitio donde se realizó la actividad, persona que lo realizó, así como los detalles de almacenamiento entre usos.

d) Analizar el efecto que tiene la ausencia de los instrumentos, cuando son enviados a calibración externa, sobre la rutina normal de operación del laboratorio y tomar acciones al respecto.

e) Realizar en sitio la calibración de los equipos que sean sensibles al movimiento, es decir en donde opera.

f) Estar contenidas en los procedimientos de manejo de equipo, las precauciones a tomar para su manejo o traslado, en el caso de equipos o patrones sensibles al movimiento.

g) Documentar los procedimientos para realizar las comprobaciones intermedias para mantener la confianza en el estado de calibración de los equipos y en caso de que el equipo no las requiera, documentar la justificación técnica. Examinar los efectos sobre los ensayos o calibraciones realizadas anteriormente a la detección de un equipo fuera de especificaciones, desajustado o fuera de calibración, deben existir registros de aplicación de los



procedimientos de control de trabajo de ensayo o calibración no conforme, incluida la notificación a los clientes que sean afectados.

4.1.3 REACTIVOS ADECUADOS

De acuerdo al punto 4.6 de la NMX- 17025 el laboratorio debe:

- a) Definir y documentar claramente los servicios (por ejemplo servicios de calibración, mantenimiento, verificación, etc.), suministros, reactivos y materiales consumibles que afecten la calidad de los ensayos y/o calibraciones dentro del alcance de la acreditación.
- b) Documentar las especificaciones o características técnicas requeridas para los suministros, reactivos y materiales consumibles que afecten la calidad de los ensayos y/o calibraciones. En el caso de servicios de calibración se deben definir los intervalos críticos de uso de los equipos de medición o patrones de referencia.
- c) Evidenciar que las características técnicas de los servicios, suministros, reactivos y materiales señaladas en los documentos de compras son revisadas y aprobadas por una persona con conocimientos técnicos, para garantizar que el servicio o suministro adquirido cumple con los requisitos técnicos establecidos.

4.1.4 INSTALACIONES APROPIADAS

Las instalaciones de ensayos o calibraciones del laboratorio, incluidas, pero no de forma excluyente, las fuentes de energía, la iluminación y las condiciones ambientales deben facilitar la realización correcta de los ensayos o de las calibraciones.

El laboratorio debe asegurarse que las condiciones ambientales no invaliden los resultados ni comprometan la calidad requerida de las mediciones. Se deben tomar precauciones especiales cuando el muestreo y los ensayos o las calibraciones se realicen en sitios distintos de la instalación permanente del



laboratorio. Los requisitos técnicos para las instalaciones y las condiciones ambientales que puedan afectar a los resultados de los ensayos y de las calibraciones deben estar documentados.

El laboratorio debe realizar el seguimiento, controlar y registrar las condiciones ambientales según lo requieran las especificaciones, métodos y procedimientos correspondientes, o cuando estas pueden influir en la calidad de los resultados. Cuando las condiciones ambientales comprometan los resultados de los ensayos o de las calibraciones estos se deben interrumpir.

Debe haber una separación eficaz entre las áreas vecinas en las que se realicen actividades incompatibles. Se deben tomar medidas para evitar la contaminación cruzada.

Se deben controlar el acceso y el uso de las áreas que afectan a la calidad de los ensayos o de las calibraciones.

Se deben tomar medidas para asegurar el orden y la limpieza del laboratorio. Cuando sea necesario se deben preparar procedimientos especiales.

4.1.5 PERSONAL COMPETENTE

I. Para el personal operativo del laboratorio involucrado en las operaciones técnicas, es decir todos aquellos que realizan en forma total o parcial muestreos, ensayos y/o calibraciones, aun cuando no estén propuestos como signatarios, así como para los signatarios propuestos que como parte de sus funciones diarias realizan muestreos, ensayos y/o calibraciones, se debe:

a) Demostrar conocimiento (en forma práctica y documental) de los procedimientos técnicos, con base al alcance de acreditación solicitado y de acuerdo a sus funciones y responsabilidades



b) Conocer el sistema de gestión del laboratorio, de acuerdo a sus funciones, responsabilidades e interacciones con otras áreas

c) Mantener registros de los resultados de las evaluaciones de desempeño técnico práctico sobre los ensayos y/o calibraciones que realiza cada persona, como son: pruebas iniciales de desempeño, pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, etc. Esta evaluación debe realizarse por cada procedimiento de ensayo y/o calibración y debe realizarse en forma inicial y cuando existan cambios críticos en la metodología, equipos, instalaciones, etc.

d) Demostrar que la capacitación interna y/o externa otorgada a dicho personal es acorde a las actividades técnicas y administrativas que realiza y a las necesidades de capacitación detectadas

e) Mantener registros de la evaluación de la eficacia de la capacitación otorgada a dicho personal, que evidencien si se alcanzaron las metas u objetivos establecidos previamente

II. Para el personal de nivel supervisión o gerencial (jefes, supervisores, gerentes, directores, etc.) que no realizan ensayos y/o calibraciones como parte de sus funciones diarias, pero que realizan funciones de supervisión de muestreo, ensayos y/o calibraciones y que son propuestos como signatarios o no y por lo tanto son responsables de los informes de resultados emitidos, se debe:

a) Demostrar sólidos conocimientos de las actividades de ensayo y/o calibración en forma teórica, en forma documental y/o mediante entrevistas sobre los procedimientos técnicos (normas y/o métodos técnicos), con base al alcance de acreditación solicitado y de acuerdo a sus funciones y responsabilidades.

b) Conocer el sistema de gestión del laboratorio, de acuerdo a sus funciones, responsabilidades e interacciones con otras áreas.

c) Conocer y aplicar todos los documentos relacionados a la acreditación como son la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y su reglamento, Norma



NMX-EC-17025-IMNC- 2006 / ISO/IEC 17025:2005, políticas vigentes emitidas por la entidad; Política de trazabilidad e incertidumbre y de ensayos de aptitud).

4.1.6 MATERIALES DE REFERENCIA:

Un material de referencia es un material o sustancia a la que se le determinan y certifican una o más de sus propiedades lo cual produce el uso de los mismos para el proceso de validación de un método, la calibración de un instrumento y para evaluar la trazabilidad de los métodos de medición.

Consideraciones para seleccionar un material de referencia:

- Similitud con la matriz
- Estado físico del material de referencia
- Incertidumbre de las concentraciones certificadas sea compatible con los requerimientos de su uso
- Técnica a utilizar

4.1.7 MUESTRAS QUE CONTENGAN EL ANALITO DE INTERES EN CONCENTRACION CONOCIDA

Las cuales pueden ser:

- Blancos de muestras (Placebos). Matriz que no contiene el analito de interés.
- Muestras adicionadas. Matriz que contiene el analito y se le adiciona el mismo.

Seleccionar la matriz: más solicitada, y la más compleja.

- La matriz se analiza antes de la adición para determinar el contenido inicial del analito, en la práctica se recomienda un mínimo de 6 repeticiones.

Para muestras adicionadas, se puede utilizar la mitad de la cantidad requerida por el método y adicionar para completar el contenido del analito.



Cuando no sea posible adicionar de manera directa el analito a la muestra, la adición puede realizarse en alguna etapa del método.

4.2 REQUISITOS DE LA NMX-EC-17025-IMNC-2006 PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ENSAYO.

El laboratorio debe:

- Documentar todos los métodos de prueba incluidos en el marco analítico por autorizar (incluidos los procedimientos para el manejo, transporte y preparación de muestras) y tenerlos disponibles para consulta en el lugar en el que se realicen las actividades de ensayo.
- Demostrar que las desviaciones ocasionales a los métodos y procedimientos documentados están: justificadas técnicamente, autorizadas por la función del laboratorio con autoridad para permitir dichas desviaciones y aceptadas por el cliente por escrito; siempre y cuando estas desviaciones no afecten los resultados de ensayo o calibración.
- Documentar e implementar procedimientos para estimar la incertidumbre de medición.
- Documentar e implementar procedimientos para el manejo de datos de las pruebas cuando se utilicen computadoras o equipos automatizados. En este caso para la integridad y confidencialidad de los datos contar con niveles de acceso de las claves de usuario previamente definidas y documentadas.
- Validar todas las aplicaciones informáticas desarrolladas por el laboratorio sobre plataformas comerciales con fines específicos e impacto directo en la adquisición, almacenamiento, procesamiento, registro o informe de datos de ensayos o calibraciones. Esto incluye hojas de cálculo, bases de datos, procesadores de texto, etc.

- Para métodos o procedimientos normalizados el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la confirmación del método para demostrar que cumple las especificaciones del mismo y cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente tomando en consideración sus propias instalaciones, equipo, personal. Así mismo, para los métodos no normalizados, propios o desarrollados por el laboratorio, los métodos obtenidos de publicaciones científicas, así como los métodos normalizados modificados o ampliados o usados fuera de su alcance propuesto el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la validación del método.

La confirmación del método debe realizarse de acuerdo a lo siguiente:

Para los ensayos que involucren mediciones analíticas:

1. Recuperación
2. Límite de detección
3. Límite de cuantificación
4. Intervalo lineal y de trabajo
5. Reproducibilidad
6. Repetibilidad
7. Sesgo o error
8. Incertidumbre

4.3 DETERMINACION DEL GRADO DE VALIDACION REQUERIDO

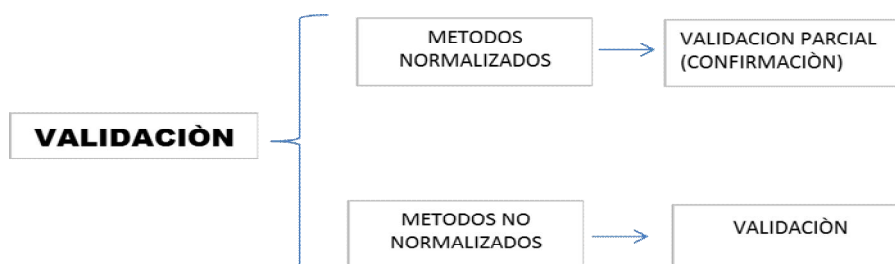


FIG.2



4.4 CRITERIOS ESTABLECIDOS EN LA GUIA CCAYAC-P-058 PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO VOLUMÉTRICO.

CRITERIO No. 1.

Clasificar el método como Normalizado o no Normalizado conforme a lo siguiente:

- Método Normalizado es aquel método publicado como primera instancia en:

1. Normas Oficiales Mexicanas (NOM)
2. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)
3. Normas Mexicanas (NMX).

Como segunda instancia:

4. Métodos Oficiales del AOAC
5. Standard Methods
6. Environmental Protection Agency (EPA)
7. Pesticide Analytical Manual (PAM)
8. Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC)
9. United States Pharmacopoeia (USP)
10. British Pharmacopoeia (BP)
11. American Society for Testing Materials (ASTM)
12. International Standard Organization (ISO)
13. Codex Alimentarius
14. Food and Drug Administration (FDA)
15. Food and Agriculture Organization (FAO)
16. European Commission (CE)
17. United States Department of Agriculture (USDA)



- Método no Normalizado es aquel:
 1. Desarrollado por el laboratorio (método propio).
 2. Método obtenido de publicaciones científicas (Journals, tesis, etc).
 3. Método normalizado modificado, ampliado o usado fuera de su alcance

CRITERIO Nº 2: PARÁMETROS DE DESEMPEÑO APLICABLES A UN MÉTODO VOLUMÉTRICO

- Intervalo lineal y de trabajo.
- Límite de cuantificación.
- Recuperación.
- Sesgo.
- Repetibilidad.
- Reproducibilidad.
- Incertidumbre.



CRITERIO Nº 3 CLASIFICAR EL MÉTODO DEACUERDO AL TIPO DE PRUEBA.

TABLA 1

Tipo de prueba	Metodología
Espectrofotométrica	Espectrofotometría UV-Visible Turbiedad Absorción Atómica Plasma inductivamente acoplado (ICP)
Cartográfica	Cromatografía de líquidos (HPLC) Cromatografía de gases (GC) Cromatografía de líquidos - masas (HPLC - MS) Cromatografía de gases - masas (GC-MS)
Potencio métrica	.Ph Aniones y cationes por técnica del ión selectivo conductimetría
Volumétrica	Valoraciones por titulación(manual y automática)
Gravimétrica	Pérdida por secado Residuo de ignición



CRITERIO Nº 4 PARAMETROS DE DESEMPEÑO DEACUERDO AL TIPO DE PRUEBA.

TABLA 2

PARAMETROS DE DESEMPEÑO	TIPO DE PRUEBA					
	Espectrofotométrica	Cromatografía	Potencio métrica	Volumétrica	Gravimétrica	Física
INTERVALO LINEAL Y DE TRABAJO	SI	SI	SI	SI	SI	NO
LIMITE DE DETECCIÓN	SI	SI	NO	NO	NO	SI
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	SI	SI	SI	SI	SI	NO
RECUPERACIÓN	SI	SI	NO	SI	SI	NO
SESGO	SI	SI	SI	SI	SI	NO
REPETIBILIDAD	SI	SI	SI	SI	SI	SI
REPRODUCIBILIDAD	SI	SI	SI	SI	SI	SI
INCERTIDUMBRE	SI	SI	SI	SI	SI	SI

CRITERIO Nº5 SELECCIÓN DEL TIPO DE MATRIZ

La más solicitada.

La más compleja.

CRITERIO Nº 6 EVALUACIÓN DE LOS PARAMETROS DE DESEMPEÑO

Intervalo lineal y de trabajo.

El intervalo lineal, es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo dado.

Este intervalo lineal se determina de la siguiente manera:

- 1.- Analizar por triplicado blancos de muestra o muestras adicionadas con un mínimo de 5 niveles diferentes de concentración.
- 2.- Graficar la respuesta analítica (eje y) contra la concentración (eje X).
- 3.- Verificar de forma visual la existencia de "linealidad".

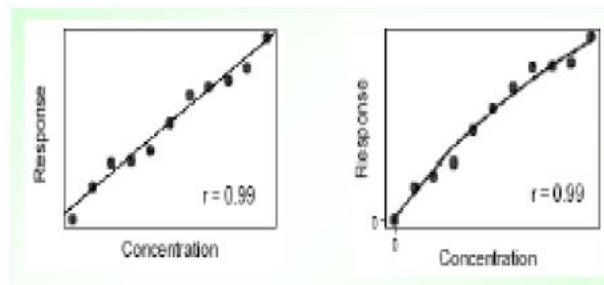


FIG.3

- 4.- Elaborar grafico de residuales.

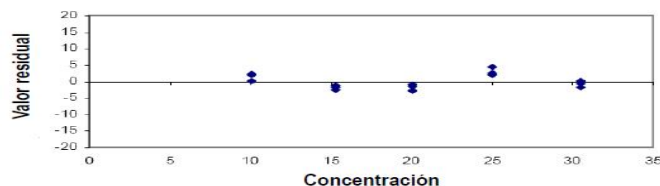
Establecer la ecuación de la recta (regresión lineal) y calcular el valor predicho y' por la línea recta para cada valor de concentración X.

$$y' = mx + b$$

Calcular los valores residuales.

Respuesta analítica obtenida (y) – valor calculado por curva ajustada (y')

Graficar valores residuales



Se establece que existe linealidad si hay una distribución aleatoria alrededor de la línea recta.

FIG.4

- Intervalo de trabajo: Intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior del analito en la muestra (incluyendo dichas concentraciones) para las que se ha demostrado que dicho analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de linealidad, repetibilidad y recuperación.

Es necesario conocer el intervalo de concentraciones del analito en la muestra, sobre los cuales el método puede aplicarse.

Se deben considerar los valores de la especificación o de aceptación y rechazo del producto.

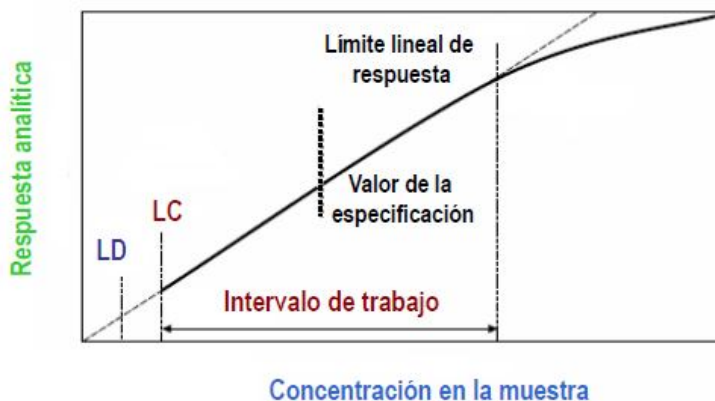


FIG. 5



El intervalo de trabajo se determina de la siguiente manera:

1. De los datos obtenidos en la prueba de linealidad, considerar los niveles que cumplen los criterios para repetibilidad y recuperación.

$$\%Recobro = \frac{C_f}{C_a} * 100$$

Dónde:

Cf = Concentración calculada en la muestra fortificada.

Ca = Concentración adicionada a la muestra de prueba.

2. Graficar la concentración obtenida (y) vs concentración añadida (x).
3. Mediante regresión lineal calcular la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r).

- Límite de detección y límite de cuantificación:

Límite de detección: Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas.

Límite de cuantificación: Es la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas.

Para propósitos de validación es suficiente proporcionar un indicativo del nivel al cual la detección resulta problemática.



Se determinan de la siguiente manera.

De los datos obtenidos en el intervalo de trabajo (concentración vs respuesta analítica) calcular:

La pendiente (m). La desviación estándar de la regresión ($s_{y/x}$). La desviación estándar de la ordenada al origen (s_b)

Aplicar las siguientes ecuaciones para la estimación de estos límites:

$$LD = \frac{3.3 * s_b}{m}$$

$$LC = \frac{10 * s_b}{m}$$

LC practico= nivel inferior del intervalo de trabajo.

LD= Limite de detección

- Recuperación: Cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada cuando esta es conducida a través del método analítico completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en términos de porcentaje.

Usualmente no se conoce la cantidad de analito presente en una porción de prueba.

Los métodos analíticos no siempre cuantifican el total del analito presente en una muestra.

Evalúa la eficiencia de extracción, proceso de preparación o interferencias que pueden existir al aplicar el método de ensayo.



Se determina de la siguiente manera:

1. Utilizar los datos obtenidos en el intervalo de trabajo
 2. Reportar como intervalo de % de recobro.
- **Sesgo:** Es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de referencia aceptado o conocido.

Como se determina:

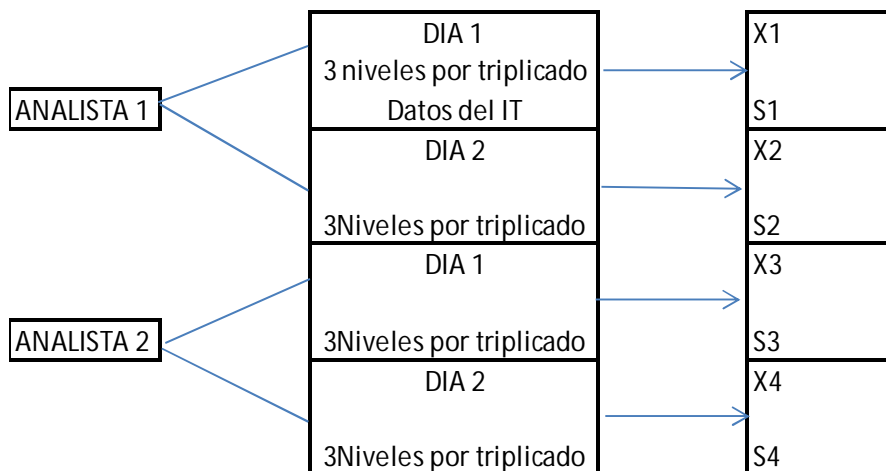
1. Efectuar la resta aritmética de la concentración añadida menos la concentración recuperada.
 2. Reportar como un intervalo conforme a las unidades establecidas por el método.
- **REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD:**
Repetibilidad: grado de concordancia entre resultados individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo.
Reproducibilidad: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días.

Miden la variabilidad del método analítico en la rutina de trabajo.

Como se determinan:

1. Preparar blancos de muestra o muestras adicionadas con las concentraciones equivalentes a los niveles inferior, medio y superior obtenidos en el intervalo de trabajo (nueve replicas por cada nivel).
2. Analizar por triplicado en dos días diferentes (días 1 y 2) por dos analistas diferentes (analistas 1 y 2) utilizando los mismos equipos y método.

3. Utilizar los datos obtenidos para los niveles inferior, medio y superior obtenidos en el intervalo de trabajo como los datos para el analista 1 día 1.
4. Calcular el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (s) de los resultados de % de recobro de cada analista, para cada día y cada nivel de concentración.
5. Calcular el promedio de las medias individuales para cada nivel.
6. Calcular la desviación estándar de la repetibilidad (s_r) y la reproducibilidad (s_R).



s_r : Raíz de la suma de cuadrados de S1, S2, S3 y S4

s_R : Raíz de la suma de los cuadrados de X1, X2, X4

FIG. 6

CALCULO DE LAS MEDIAS:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + \dots + x_n}{n}$$



- INCERTIDUMBRE

- Estimación que caracteriza el intervalo de valores, dentro de los cuales se encuentra el valor convencionalmente verdadero de la magnitud medida.
- Es un parámetro único (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición.
- Su estimación considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado.
- Se establece una vez que se ha efectuado la validación o confirmación del método.
- Un resultado analítico no puede ser interpretado sin el valor de incertidumbre asociado.
- Elemento indispensable en la trazabilidad de las mediciones.
- Se requiere para verificación de conformidad con especificaciones.
- No es una tarea de rutina ni puramente matemática.
- Depende del conocimiento detallado de lo que se mide y como se mide. No aplica para métodos cualitativos o semicuantitativos

¿Porque es importante?

Medida de calidad de un resultado analítico.

Comparación contra límites permitidos (legislación).

Requerimiento normativo MNX- 17025.

Ayuda al conocimiento y mejora del método.



● CRITERIO Nº 7 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

TABLA 3

PARAMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
INTERVALO LINEAL	<ul style="list-style-type: none">•Comportamiento lineal de la gráfica de concentración vs respuesta analítica•Datos aleatorios en el gráfico de residuales
INTERVALO DE TRABAJO	<ul style="list-style-type: none">•Pendiente valor cercano a 1•Coeficiente de correlación $r \geq 0.98$ (impurezas insolubles)$r \geq 0.99$ (contenido o ingrediente activo)
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN PRACTICO	Nivel inferior del intervalo de trabajo
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN ESTIMADO	Menor o igual al nivel inferior del intervalo de trabajo
LIMITE DE DETECCIÓN	Los establecidos en la referencia original del método
RECUPERACION	
REPETIBILIDAD	
REPRODUCIBILIDAD	



● CRITERIO Nº 8 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN: DEBE CONTENER LA SIGUIENTE INFORMACIÓN:

- ▶ Título.
- ▶ Objetivo.
- ▶ Alcance.
- ▶ Método de ensayo.
- ▶ Equipo.
- ▶ Materiales.
- ▶ Reactivos.
- ▶ Muestras.
- ▶ Desarrollo experimental.
- ▶ Resultados.
- ▶ Análisis estadístico.
- ▶ Criterios de aceptación.



CAPITULO V: VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE PROTEÍNAS EN ALIMENTOS PARA ANIMALES MÉTODO AOAC 984.13 CAPÍTULO 4 ALIMENTOS PARA ANIMALES 18ª EDICIÓN. MÉTODO KJELDAHL.

5.1 CLASIFICACIÓN DEL MÉTODO.

El método para la determinación de proteínas en alimentos para animales es un método normalizado ya que se encuentra publicado en AOAC.

5.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO APLICABLES AL MÉTODO DE DETERMINACION DE PROTEÍNAS EN ALIMENTOS PARA ANIMALES.

Debido a que el método de determinación de proteínas en alimentos para animales AOAC 984.13 es un método volumétrico los parámetros de desempeño a evaluar son:

- ◆ Intervalo de trabajo,
- ◆ Límite de cuantificación,
- ◆ Recuperación,
- ◆ Sesgo,
- ◆ Repetibilidad,
- ◆ Reproducibilidad,
- ◆ Incertidumbre.

5.3 SELECCION DEL TIPO DE MATRIZ A EVALUAR.

De acuerdo a lo establecido en la guía de la **CCAYAC 058** se debe de realizar la validación con la matriz más compleja y la más solicitada, sin embargo para fines de este trabajo se harán los planteamientos tomando en cuenta un estándar de lisina con una cantidad del 15.20 % de nitrógeno.



5.4 PLANTEAMIENTO DE LOS PARAMETROS DE DESEMPEÑO APLICABLES.

5.4.1 INTERVALO DE TRABAJO:

Si se cuenta con un estándar de lisina que contiene una cantidad de nitrógeno conocida que en este caso se tomara como 15.20% de nitrógeno, el % de proteína se calcula de la siguiente manera para cada nivel:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25$$

Entonces para tener un 10% de proteína:

$$\% \text{ N} = \frac{10}{6.25} = 1.60\%$$

Se divide entre la concentración de nitrógeno en el estándar para obtener los gramos de lisina que se deben pesar

$$g \text{ lisina} = \frac{1.60}{15.20} = 0.1053g \text{ de lisina}$$

Estos gramos se diluyen en sacarosa para obtener un gramo de muestra y la cantidad de sacarosa se obtiene restando 1g menos los gramos de lisina

$$g \text{ sacarosa} = 1 - 0.1053 = 0.8947g \text{ de sacarosa}$$

Se hace lo mismo para cada nivel de proteína deseado

TABLA 4

Nivel	% Proteína deseado	% Nitrógeno	Lisina (g)	Sacarosa (g)
1	10	1.6	0.1053	0.8947
2	20	3.2	0.2105	0.7895
3	30	4.8	0.3158	0.6842
4	40	6.4	0.4210	0.5790
5	50	8	0.5263	0.4737



TABLA 5

Nivel	% Proteína deseado	% Nitrógeno	Lisina (g)	Sacarosa (g)	* HCl 0.5M (mL)	* NaOH 0.1M(mL)
1	10	1.6	0.1053	0.8947		
2	20	3.2	0.2105	0.7895		
3	30	4.8	0.3158	0.6842		
4	40	6.4	0.4210	0.5790		
5	50	8	0.5263	0.4737		

* DATO OBTENIDO EN EL DESARROLLO EXPERIMENTAL.

5.4.2 RECUPERACION.

Utilizar los datos obtenidos en el intervalo de trabajo.

Reportar como % de recobro.

Se calcula el % de proteína obtenido en cada nivel y en cada repetición de la siguiente manera:

$$\%N = \frac{((MHCL * VHCL) - (MNaOH * Vbco) - (MNaOH * VNaOH))}{PESO MTRA} * 1.4007$$

% PROTEINA= % NITROGENO*FACTOR

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\% \text{ proteína obtenido}}{\% \text{ proteína teorico}}$$



TABLA 6

Nivel	% Proteína agregado	% Nitrógeno	Lisina (g)	Sacarosa (g)	HCl 0.5M (mL)	* NaOH 0.1M (mL)	% * Proteína obtenido	% *Recuperación
1	10	1.6	0.1053	0.8947				
2	20	3.2	0.2105	0.7895				
3	30	4.8	0.3158	0.6842				
4	40	6.4	0.4210	0.5790				
5	50	8	0.5263	0.4737				

* DATO OBTENIDO EN EL DESARROLLO EXPERIMENTAL.



5.4.3 SESGO: Efectuar la resta del % de proteína añadido menos el % de proteína obtenido.

TABLA 7

Nivel	% Proteína adicionada	% *Proteína obtenido	*Sesgo
1	10		
2	20		
3	30		
4	40		
5	50		

* DATO OBTENIDO EN EL DESARROLLO EXPERIMENTAL.

5.4.4 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Preparar blancos de muestra que contengan 10, 30 y 50% de proteína nueve replicas por cada nivel.

Analizar por triplicado en dos días diferentes por dos analistas diferentes utilizando los mismos equipos y método. Los datos del intervalo de trabajo de



los niveles de 10, 30 y 50% de concentración de proteína se consideran como los datos del día 1 para el analista 1.

Calcular el promedio de los resultados de % de recobro de cada analista por cada día y cada nivel de concentración.

Calcular el promedio de las medias individuales para cada nivel.

Calcular la desviación estándar de la repetibilidad (sr) y la reproducibilidad(s R).

5.4.5 INCERTIDUMBRE

I) Identificar las fuentes de incertidumbre del método para la determinación de proteínas

Referencia: AOAC 984.13 capítulo 4 alimentos para animales 18° edición.

II) MENSURANDO: determinación de proteína en alimentos para animales por el método kjeldahl

III) FORMULA:

$$\%N = \frac{((M_{HCL} * V_{HCL}) - (M_{NaOH} * V_{bco}) - (M_{NaOH} * V_{NaOH}))}{PESO\ MTRA} * 1.4007$$

% PROTEINA= % NITROGENO * FACTOR

Dónde:

M_{HCl} : Molaridad real del ácido estandarizado utilizado para recibir el destilado.

V_{HCl} : Cantidad en ml de ácido estandarizado utilizado para recibir el destilado

M_{NaOH} : Molaridad real de la base estandarizada utilizada para titular el destilado

V_{bco} : mL de base estándar utilizados para titular un mililitro de ácido estandarizado menos los mililitros de base estándar necesarios para titular el blanco de reactivos llevado a través del método y destilado en un mililitro de ácido estandarizado.



V_{NaOH} : Mililitros de base estandarizada necesarios para titular la muestra.

1.4007: Miliequivalentes del nitrógeno * 100 para pasar a porcentaje

Factor: Un concentrado de proteínas puras contiene 16% de nitrógeno entonces

$$\text{Factor} = 100/16 = 6.25$$

Modelo matemático:

$$\%N = f(M_{HCL}, V_{HCl}, M_{NaOH}, V_{bco}, V_{NaOH}, \text{PESO MTRA})$$

IV) MAGNITUDES DE ENTRADA

$$X_1 = M_{HCl}$$

$$X_2 = V_{HCl}$$

$$X_3 = M_{NaOH}$$

$$X_4 = V_{bco}$$

$$X_5 = V_{NaOH}$$

$$X_6 = \text{PESO MTRA}$$

V) DETERMINACION DE LA INCERTIDUMBRE ESTANDAR INDIVIDUAL

$$X_1 \text{ MHCL} = \sqrt{U_{\text{valoración HCl}}^2}$$

$$U_{\text{valoración HCl}} = \sqrt{U_{\text{valoración NaOH}}^2 + U_{\text{gasto HCl}}^2}$$

$$U_{\text{valoración NaOH}} = \sqrt{U_{\text{std}}^2 + U_{\text{peso std}}^2}$$

$$U_{\text{std}} = \frac{100\% - \% \text{pureza}}{\sqrt{3}}$$

Esta información viene reportada en el certificado de análisis del estándar utilizado para realizar la valoración que en este caso es biftalato de potasio.



U peso std =U balanza

$$U \text{ balanza} = \frac{\text{resolución}}{2\sqrt{3}}$$

Resolución: es la mínima cantidad que puede pesarse en la balanza analítica que es de 0.0001g.

$$U \text{ balanza} = \frac{0.0001g}{2\sqrt{3}} = 2.89 * 10^{-5}g$$

Para hacer adimensional se divide entre la cantidad de estándar que debe pesarse para la valoración en este caso es 2.5g

$$U \text{ balanza} = \frac{2.89 * 10^{-5}g}{2.5g} = 1.16 * 10^{-5}$$

U gasto de HCl=U bureta

$$U \text{ bureta} = \frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

La tolerancia para una bureta de 50mL de clase A es igual a 0.05mL y viene reportada en la parte inferior de la bureta al concluir la escala.

$$U \text{ bureta} = \frac{0.05mL}{\sqrt{3}} = 0.03mL$$

Para hacer adimensional se divide entre 40ml ya que es el gasto aproximado que se espera ya que se titula con 40mL de base.

$$U \text{ bureta} = \frac{0.03mL}{40mL} = 7.5 * 10^{-4}$$

X₂= U V_{HCl} = U pipeta volumétrica de 20mL

$$U V_{HCl} = \frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

$$U V_{HCl} = \frac{0.03mL}{\sqrt{3}} = 0.02mL$$

Para hacer adimensional se divide entre el volumen de la pipeta



$$U V_{\text{HCl}} = \frac{0.02\text{mL}}{20\text{mL}} = 1.00 * 10^{-3}$$

$$X_3 = U M_{\text{NaOH}} = U_{\text{valoración NaOH}} - \sqrt{U_{\text{std}}^2 + U_{\text{peso std}}^2}$$

$$U_{\text{std}} = \frac{100\% - \% \text{pureza}}{\sqrt{3}}$$

Esta información viene reportada en el certificado de análisis del estándar utilizado para realizar la valoración que en este caso es biftalato de potasio.

U peso std = U balanza

$$U_{\text{balanza}} = \frac{\text{resolución}}{2\sqrt{3}}$$

Resolución: es la mínima cantidad que puede pesarse en la balanza analítica que es de 0.0001g.

$$U_{\text{balanza}} = \frac{0.0001\text{g}}{2\sqrt{3}} = 2.89 * 10^{-5}\text{g}$$

Para hacer adimensional se divide entre la cantidad de estándar que debe pesarse para la valoración en este caso es 2.5g

$$U_{\text{balanza}} = \frac{2.89 * 10^{-5}\text{g}}{2.5\text{g}} = 1.16 * 10^{-5}$$

X₄ = U V_{BCO} = U pipeta volumétrica de 1mL

$$U V_{\text{BCO}} = \frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

$$U V_{\text{BCO}} = \frac{0.007\text{mL}}{\sqrt{3}} = 4.04 * 10^{-3}\text{mL}$$

Para hacer adimensional se divide entre el volumen de la pipeta

$$U V_{\text{BCO}} = \frac{4.04 * 10^{-3}\text{mL}}{1\text{mL}} = 1.00 * 10^{-3}$$

X₅ U V_{NaOH} = U bureta

$$U_{\text{bureta}} = \frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$



La tolerancia para una bureta de 50mL de clase A es igual a 0.05mL y viene reportada en la parte inferior de la bureta al concluir la escala.

$$U_{\text{bureta}} = \frac{0.05\text{mL}}{\sqrt{3}} = 0.03\text{mL}$$

Para hacer adimensional se divide entre 40ml ya que es el gasto aproximado que se espera ya que se titula con 40mL de base.

$$U_{\text{bureta}} = \frac{0.03\text{mL}}{40\text{mL}} = 7.5 * 10^{-4}$$

X_6 U peso mtra = U balanza

$$U_{\text{balanza}} = \frac{\text{resolución}}{2\sqrt{3}}$$

Resolución: es la mínima cantidad que puede pesarse en la balanza analítica que es de 0.0001g.

$$U_{\text{balanza}} = \frac{0.0001\text{g}}{2\sqrt{3}} = 2.89 * 10^{-5}\text{g}$$

Para hacer adimensional se divide entre la cantidad de estándar que debe pesarse para la valoración en este caso es 2.5g

$$U_{\text{balanza}} = \frac{2.89 * 10^{-5}\text{g}}{2.5\text{g}} = 1.16 * 10^{-5}$$

VI) Obtener la incertidumbre combinada:

$$U_c = \sqrt{\sum_{i=0}^n U_i^2 + S_{tot}^2}$$

Dónde:

U_i = es la incertidumbre de cada una de las fuentes de incertidumbre

S_{tot}^2 = variabilidad total

$$S_{tot} = \sqrt{\frac{S_r^2}{n} + S_R^2}$$



Sr= desviación estándar en condiciones de repetibilidad

SR= desviación estándar en condiciones de reproducibilidad

n= número de resultados repetidos

VII) Obtener la incertidumbre expandida:

$U_{exp} = \pm U_c * k$

Uc= Incertidumbre combinada.

K= Factor de cobertura para un 95.45 % de confianza:



CAPITULO VI: EJEMPLO DE PROTOCOLO DE VALIDACION

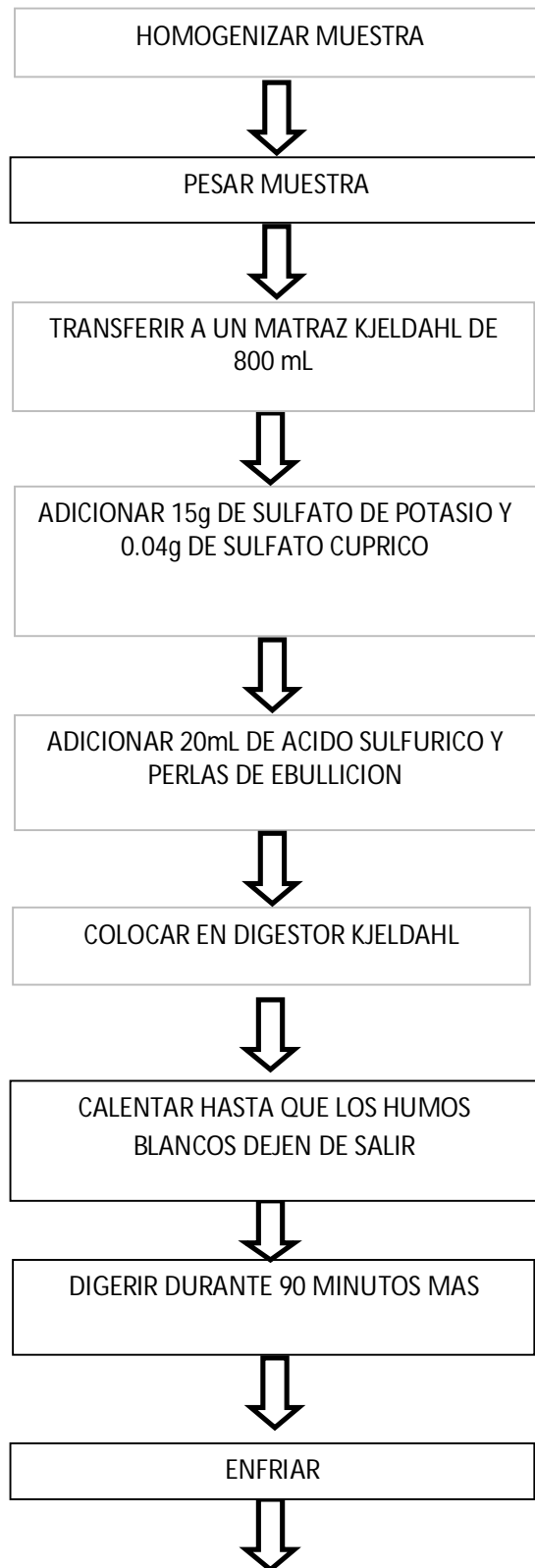
OBJETIVO:

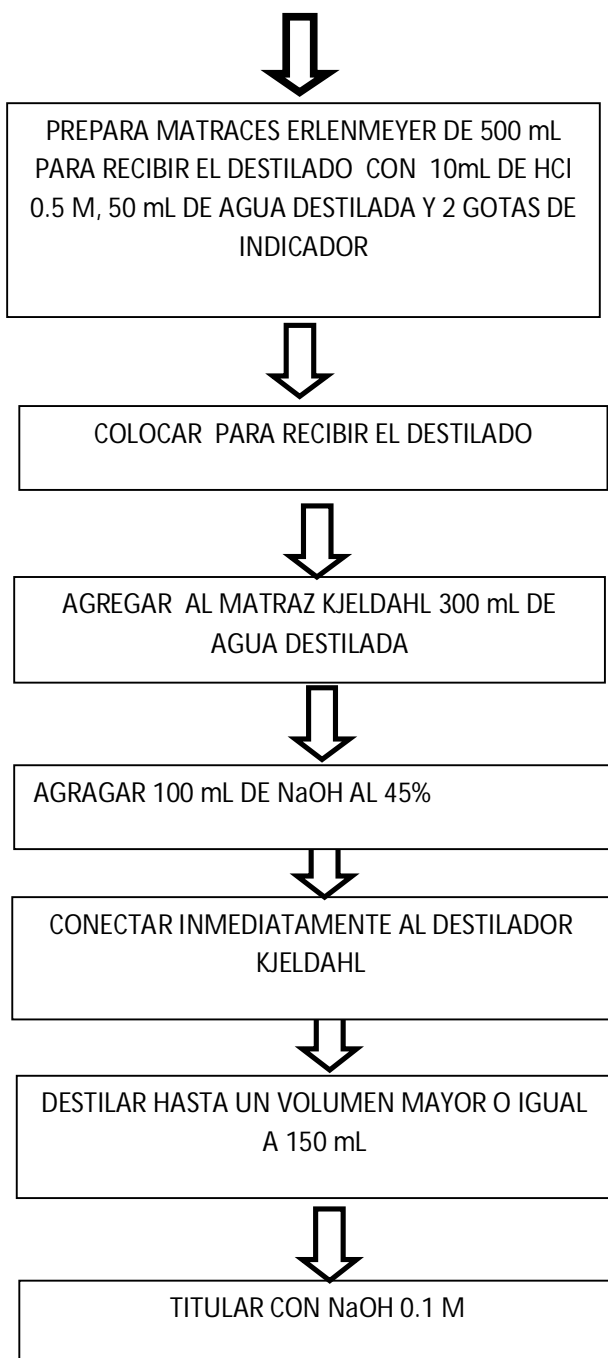
EVALUAR EL INTERVALO DE TRABAJO, RECUPERACIÓN, SESGO, REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD, INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN DE PROTEINA EN ALIMENTOS PARA ANIMALES CON EL MÉTODO AOAC 984.13 CAPITULO 4.

ALCANCE: PRODUCTOS DE CONSUMO ANIMAL CON UN CONTENIDO DE PROTEINA ENTRE 10 Y 50%



MÉTODO DE ENSAYO







Equipo:

- ✓ Horno de secado.
- ✓ Campana de extracción.
- ✓ Balanza analítica.
- ✓ Balanza granataria.
- ✓ Digestor kjeldahl.
- ✓ Destilador kjeldahl.
- ✓ Careta de seguridad.
- ✓ Guantes de asbesto.
- ✓ Termómetro verificado a 120°C.
- ✓ Mandil.

Material de uso general:

- ✓ Matraces kjeldahl de 800 mL.
- ✓ Matraces Erlenmeyer de 500 mL
- ✓ Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- ✓ Perlas de vidrio
- ✓ Probeta de 100 mL
- ✓ Probeta de 25 mL
- ✓ Vaso de precipitado de 250 mL
- ✓ Espátula



Material volumétrico

- ✓ Bureta de 50 mL
- ✓ Pipeta volumétrica de 1 mL
- ✓ Pipeta volumétrica de 10 mL
- ✓ Pipeta volumétrica de 15 mL
- ✓ Pipeta volumétrica de 20 mL
- ✓ Matraz volumétrico de 1L
- ✓ Matraz volumétrico de 2L

Reactivos:

Ácido sulfúrico

Ácido clorhídrico

Sulfato cúprico

Sulfato de potasio

Sacarosa

Hidróxido de sodio

Indicador rojo de metilo

Indicador fenoltaleína

Alcohol etílico

Lisina HCl de alta pureza

Biftalato de potasio (sustancia de referencia previamente seco a 120°C durante 2 horas)

Agua destilada tipo II



Soluciones de trabajo:

Solución NaOH(1+1)

En la campana de extracción y en un baño de agua fría disolver 500g de NaOH en 500ml de agua destilada.

Indicador fenolftaleína al 1%

Pesar 1g de fenolftaleína y disolver en 100ml de alcohol etílico

Indicador rojo de metilo al 1%

Pesar 1g de rojo de metilo y disolver en 100ml de alcohol etílico

Solución NaOH 0.1 M

Preparación:

Medir 5.4ml de una solución de NaOH (1+1), transferir a un matraz volumétrico que contiene aproximadamente 500ml de agua destilada libre de CO₂ (previamente hervida durante 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente), agitar para disolver y aforar.

Estandarización:

Pesar aproximadamente 0.5g de biftalato de potasio (previamente seco a 120°C durante dos horas) en un matraz erlenmeyer de 250 mL, agregar 50



mL de agua libre de CO₂ y agitar hasta disolver el estándar, adicionar dos gotas de fenolftaleína y titular con la solución de NaOH.

Realizar esta valoración se realiza por triplicado

$$MOLARIDAD = \frac{GRAMOS DE BIFTALATO * 1000}{ML NaOH * 204.229}$$

Gramos de biftalato= Peso real del estándar corregido por pureza.

mL NaOH = Mililitros de hidróxido de sodio gastados en la titulación.

204.229 = Mili equivalentes del biftalato de potasio.

Solución NaOH 0.5 M

Preparación:

Medir 27mL de una solución de NaOH (1+1), transferir a un matraz volumétrico que contiene aproximadamente 500 mL de agua destilada libre de CO₂ (previamente hervida durante 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente), agitar para disolver y aforar.

Estandarización:

Pesar aproximadamente 2.5g de biftalato de potasio (previamente seco a 120°C durante dos horas) en un matraz erlenmeyer de 250 mL, agregar 50 mL de agua libre de CO₂ y agitar hasta disolver el estándar, adicionar dos gotas de fenolftaleína y titular con la solución de NaOH.

Realizar esta valoración se realiza por triplicado

$$MOLARIDAD = \frac{GRAMOS DE BIFTALATO * 1000}{ML NaOH * 204.229}$$



Gramos de biftalato= peso real del estándar corregido por pureza.

mL NaOH = mililitros de hidróxido de sodio gastados en la titulación.

204.229 = mili equivalentes del biftalato de potasio.

Solución HCl 0.5M

Preparación:

Medir 43 mL de ácido clorhídrico, transferir a un matraz volumétrico de 1L que contiene aproximadamente 500 mL de agua destilada libre de CO₂ (previamente hervida durante 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente), agitar para disolver y aforar.

Estandarización:

Medir 40ml de una solución de NaOH 0.5M previamente valorada con estándar biftalato de potasio, transferir a un matraz erlenmeyer de 250ml y agregar 2 gotas de fenolftaleína y titular con la solución de HCl.

Realizar esta valoración por triplicado



MUESTRAS: Debido a que no se cuenta con una muestra libre de nitrógeno proteico se realizaran diluciones con un patrón de referencia (lisina) que tiene un contenido de nitrógeno conocido como se describe a continuación:

nivel	%proteína deseado	%nitrógeno	g lisina	g sacarosa
1	10	1.6	0.1053	0.8947
2	20	3.2	0.2105	0.7895
3	30	4.8	0.3158	0.6842
4	40	6.4	0.4210	0.5790
5	50	8	0.5263	0.4737

nivel	%proteína deseado	%nitrógeno	g lisina	g sacarosa	mL HCl 0.5M(propuesto)
1	10	1.6	0.1053	0.8947	10
2	20	3.2	0.2105	0.7895	10
3	30	4.8	0.3158	0.6842	15
4	40	6.4	0.4210	0.5790	15
5	50	8	0.5263	0.4737	20

Desarrollo experimental:

1.- Pesar por triplicado muestras que contengan .1053g de lisina y 0.8947g de sacarosa, .2105g de lisina y .7895g de sacarosa, .3158g de lisina y .6892g de sacarosa, .4210g de lisina y .5790g de sacarosa, .5263g de lisina y .4737 g de sacarosa.

2.- Determinar el contenido de proteína con el método AOAC 983.15 capítulo 4 alimentos para animales 18ª edición por un mismo analista bajo las mismas condiciones.



3.- Graficar los valores de respuesta analítica (y) vs los valores de concentración añadida (x).

4.- Graficar los valores de % proteína obtenida (y) vs los valores de % proteína adicionada (x). Verificar de manera visual la existencia de linealidad de los datos.

5.- Con estos datos determinar el valor de la respuesta analítica ajustada (y') para cada valor de concentración empleando la siguiente ecuación:

$$y' = mx + b$$

6.- Calcular los valores residuales por medio de la curva ajustada (y'), para cada nivel de proteína (%).

RECUPERACIÓN Y SESGO:

1 Utilizar los resultados de recuperación obtenidos en la determinación del intervalo de trabajo.

2 Para calcular el sesgo, hacer la sustracción de los g de proteína añadidos menos los g de proteína obtenidos

3 Reportar como intervalo de recuperación en % y el intervalo de sesgo en % de proteína

REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

1 Preparar muestras con 10, 30 Y 50% de proteína nueve réplicas de cada nivel.



2 Analizar las muestras por triplicado en dos días diferentes (días 1 y 2) y por dos analistas diferentes (analista 1 y 2), utilizando los mismos equipos y método y obtener el % de recobro. Utilizar los resultados obtenidos en la prueba de intervalo de trabajo para los niveles de 10, 30 y 50% de proteína, como los datos para el analista 1 día 1.

3 Reportar los intervalos de coeficiente de variación (CVr y CVR) obtenidos a partir de los tres niveles de % de proteína.

4 Calcular el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (s) de los resultados de % de recobro de cada analista, para cada día y cada nivel de % de proteína.

5 Calcular el promedio de las medias individuales para cada nivel de % de proteína.

6 Para determinar la repetibilidad del método (CVr), calcular la desviación estándar de la repetibilidad (s_r) y dividir este resultado entre el promedio de las medias individuales (\bar{x}) de cada nivel de % de proteína.

7 Para determinar la reproducibilidad del método (CVR), calcular la desviación estándar de la reproducibilidad (s_R) y dividir este resultado entre el promedio de las medias individuales (\bar{x}) de cada nivel de % de proteína.

Incertidumbre:

1.- Identificar todas las fuentes de incertidumbre.

2.- Determinar la incertidumbre estándar y la incertidumbre expandida.

**RESULTADOS:****INTERVALO DE TRABAJO:**

Fecha de inicio: Indicar fecha de inicio

Fecha de término: Indicar fecha de término

Analista: Indicar el nombre del analista que realiza

Laboratorio: Indicar el nombre del laboratorio.

Analito: Indicar el analito q se cuantifica.

Matriz: Indicar la matriz a evaluar.

Unidades: Indicar las unidades en las que se reporta.

Bitácora: Indicar la bitácora y el o los folios donde se encuentra registrado

Nivel	% Proteína deseado	%Nitrógeno	g Lisina	g Sacarosa	*Desviación estándar	* % C. V.
1	10	1.6	0.1053	0.8947		
2	20	3.2	0.2105	0.7895		
3	30	4.8	0.3158	0.6842		
4	40	6.4	0.4210	0.5790		
5	50	8	0.5263	0.4737		

* DATO OBTENIDO EN EL DESARROLLO EXPERIMENTAL.

**Recuperación y sesgo:**

Fecha de inicio: Indicar fecha de inicio

Fecha de término: Indicar fecha de término

Analista: Indicar el nombre del analista que realiza

Laboratorio: Indicar el nombre del laboratorio.

Analito: Indicar el analito q se cuantifica.

Matriz: Indicar la matriz a evaluar.

Unidades: Indicar las unidades en las que se reporta.

Bitácora: Indicar la bitácora y el o los folios donde se encuentra registrado.

Nivel	% Proteína deseado	%Nitrógeno agregado	% Proteína obtenido	% Recuperación	Sesgo
1	10	1.6			
2	20	3.2			
3	30	4.8			
4	40	6.4			
5	50	8			



Repetibilidad y reproducibilidad:

Fecha de inicio: Indicar fecha de inicio

Fecha de término: Indicar fecha de término

Analista: Indicar el nombre del analista que realiza

Laboratorio: Indicar el nombre del laboratorio.

Analito: Indicar el analito q se cuantifica.

Matriz: Indicar la matriz a evaluar.

Unidades: Indicar las unidades en las que se reporta.

Bitácora: Indicar la bitácora y el o los folios donde se encuentra registrado

DIA	MUESTRA	NIVEL INFERIOR (10%)		NIVEL MEDIO (30%)		NIVEL SUPERIOR (50%)	
		ANALISTA	ANALISTA	ANALISTA	ANALISTA	ANALISTA	ANALISTA
		1	2	1	2	1	2
1	1						
	2						
	3						
	PROMEDIO						
	DESV. EST.						
2	1						
	2						
	3						
	PROMEDIO						
	DESV. EST.						

\bar{X}							
Sr							
C. V. r							
SR							
C. V. R							



CAPITULO VII: EJEMPLO DE INFORME DE VALIDACIÓN

1.- Objetivo: evaluar el intervalo de trabajo, repetibilidad, reproducibilidad, sesgo, recuperación en la determinación de proteína en alimentos para animales por el método Kjeldahl AOAC 984.13 capítulo 4

2- Alcance: Aplica a productos de consumo animal en los cuales el contenido de proteína sea cuantificable por el método Kjeldahl AOAC 984.13

3.- Antecedentes:

Mencionar antecedentes de la determinación de proteínas en alimentos de consumo animal.

4.- Equipo

Equipo	Marca	Modelo	Serie	Identificación	Intervalo de trabajo
Balanza analítica	Indicar la marca	Indicar el modelo	Indicar el número de serie	Indicar la clave interna	Indicar el intervalo de medición
Balanza granataria	Indicar la marca	Indicar el modelo	Indicar el número de serie	Indicar la clave interna	Indicar el intervalo de medición
Termómetro	Indicar la marca	Indicar el modelo	Indicar el número de serie	Indicar la clave interna	Indicar el intervalo de medición



5.- Materiales

5.1 Materiales de uso general:

Matraz kjeldahl de 800mL

Matraz erlenmeyer de 500mL

Matraz erlenmeyer de 250mL

Probeta de 100mL

Probeta de 25mL

5.2 Material volumétrico

Descripción	Marca	Clave	Volumen nominal	Volumen Real
Bureta	Indicar la marca	Indicar clave interna	Indicar el volumen	Indicar el volumen y tolerancia
Pipeta	Indicar la marca	Indicar clave interna	Indicar el volumen	Indicar el volumen y tolerancia
Pipeta	Indicar la marca	Indicar clave interna	Indicar el volumen	Indicar el volumen y tolerancia
Pipeta	Indicar la marca	Indicar clave interna	Indicar el volumen	Indicar el volumen y tolerancia
Pipeta	Indicar la marca	Indicar clave interna	Indicar el volumen	Indicar el volumen y tolerancia
Matraz	Indicar la marca	Indicar clave interna	Indicar el volumen	Indicar el volumen y tolerancia
Matraz	Indicar la marca	Indicar clave interna	Indicar el volumen	Indicar el volumen y tolerancia

Nota: Deben indicarse estos datos para cada material volumétrico que se utilice aunque sea más de uno del mismo volumen.



6.- Reactivos

Nombre	Marca	Grado	pureza	Presentación	Lote
Ácido sulfúrico	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote
Ácido clorhídrico	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote
Hidróxido de sodio	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote
Sulfato de potasio	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote
Sulfato Cúprico	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote
Sacarosa	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote
Rojo de metilo	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote
Fenolftaleína	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote
Alcohol etílico	Indicar la marca	reactivo	Indicar la pureza	Indicar el contenido	Indicar el lote

6.1 Patrón de referencia

Nombre	Marca	Grado	Pureza	Presentación	Lote
Lisina	Indicar marca	Estándar	Indicar pureza	Indicar contenido	Indicar lote



6.2 SOLUCIONES DE TRABAJO

Solución NaOH (1+1)

En la campana de extracción y en un baño de agua fría disolver 500g de NaOH en 500ml de agua destilada.

Bitácora: Anotar la bitácora en donde se registra la solución.

Indicador fenolftaleína al 1%.

Pesar 1g de fenolftaleína y disolver en 100ml de alcohol etílico.

Bitácora: indicar la bitácora donde se registra la solución.

Indicador rojo de metilo al 1%.

Pesar 1g de rojo de metilo y disolver en 100ml de alcohol etílico.

Bitácora: Indicar la bitácora donde se registra la solución.

6.3 SOLUCIONES DE REFERENCIA.

Solución NaOH 0.1 M

Preparación:

Medir 5.4ml de una solución de NaOH (1+1), transferir a un matraz volumétrico que contiene aproximadamente 500ml de agua destilada libre de CO_2 (previamente hervida durante 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente), agitar para disolver y aforar.

Estandarización:

Pesar aproximadamente 0.5g de biftalato de potasio (previamente seco a 120°C durante dos horas) en un matraz erlenmeyer de 250ml, agregar 50ml de agua libre de CO_2 y agitar hasta disolver el estándar, adicionar dos gotas de fenolftaleína y titular con la solución de NaOH.

Realizar esta valoración se realiza por triplicado



$$MOLARIDAD = \frac{GRAMOS DE BIFTALATO * 1000}{ML NaOH * 204.229}$$

Gramos de biftalato= peso real del estándar corregido por pureza

mL NaOH = mililitros de hidróxido de sodio gastados en la titulación

204.229 = mili equivalentes del biftalato de potasio

Bitácora: Indicar la bitácora donde se registra la solución

Solución NaOH 0.5 M

Preparación:

Medir 27mL de una solución de NaOH (1+1), transferir a un matraz volumétrico que contiene aproximadamente 500ml de agua destilada libre de CO₂ (previamente hervida durante 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente), agitar para disolver y aforar.

Estandarización:

Pesar aproximadamente 2.5g de biftalato de potasio (previamente seco a 120°C durante dos horas) en un matraz erlenmeyer de 250ml, agregar 50ml de agua libre de CO₂ y agitar hasta disolver el estándar, adicionar dos gotas de fenolftaleína y titular con la solución de NaOH.

Realizar esta valoración se realiza por triplicado

$$MOLARIDAD = \frac{GRAMOS DE BIFTALATO * 1000}{ML NaOH * 204.229}$$

Gramos de biftalato= peso real del estándar corregido por pureza

mL NaOH = mililitros de hidróxido de sodio gastados en la titulación

204.229 = mili equivalentes del biftalato de potasio

Bitácora: indicar la bitácora donde se registra la solución.



Solución HCl 0.5M

Preparación:

Medir 43ml de ácido clorhídrico, transferir a un matraz volumétrico de 1l que contiene aproximadamente 500ml de agua destilada libre de CO₂ (previamente hervida durante 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente), agitar para disolver y aforar.

Estandarización:

Medir 40ml de una solución de NaOH 0.5M previamente valorada con estándar biftalato de potasio, transferir a un matraz erlenmeyer de 250ml y agregar 2 gotas de fenolftaleína y titular con la solución de HCl.

Realizar esta valoración por triplicado

Bitácora: indicar la bitácora donde se registra la solución.

7.- Muestras

El % de proteína se calculó de la siguiente manera para cada nivel:

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25$$

Entonces para tener un 10% de proteína:

$$\%N = \frac{10}{6.25} = 1.60\%$$

Se divide entre la concentración de nitrógeno en el estándar para obtener los gramos de lisina que se deben pesar

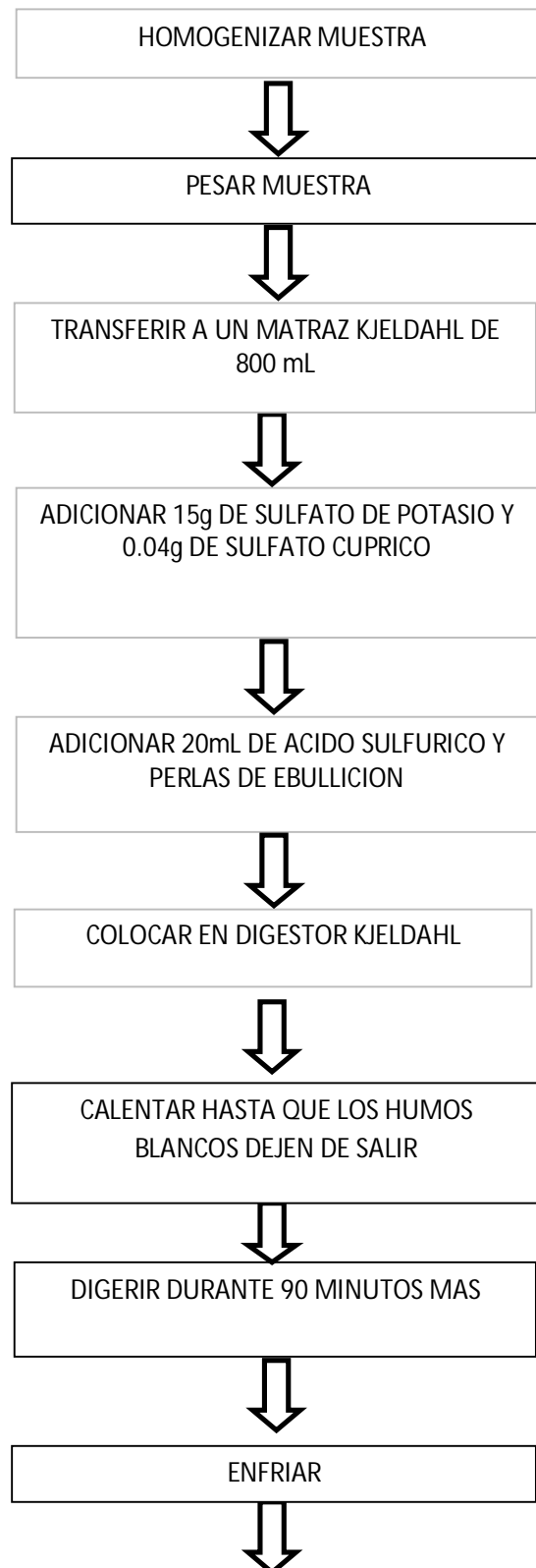
$$\text{g lisina} = \frac{1.60}{15.20} = 0.1053 \text{ g de lisina}$$

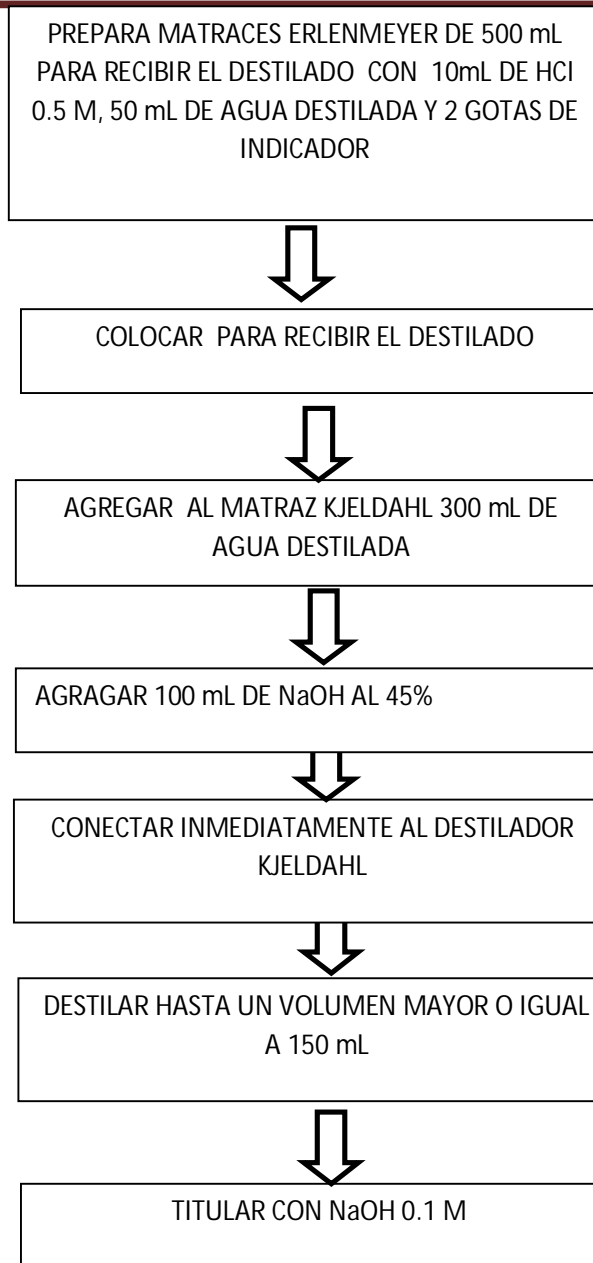
Estos gramos se diluyen en sacarosa para obtener un gramo de muestra y la cantidad de sacarosa se obtiene restando 1g menos los gramos de lisina

$$\text{g sacarosa} = 1 - 0.1053 = 0.8947 \text{ g de sacarosa}$$



8.- METODO EXPERIMENTAL







9.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

9.1 Intervalo de trabajo

Se pesaron por triplicado muestras que contengan .1053g de lisina y 0.8947g de sacarosa, .2105g de lisina y .7895g de sacarosa, .3158g de lisina y .6892g de sacarosa, .4210g de lisina y .5790g de sacarosa, .5263g de lisina y .4737 g de sacarosa.

nivel	%proteína deseado	%nitrógeno	g lisina	g sacarosa
1	10	1.6	0.1053	0,8947
2	20	3.2	0.2105	0.7895
3	30	4.8	0.3158	0.6842
4	40	6.4	0.4210	0.5790
5	50	8	0.5263	0.4737

9.1.2.- Determinar el contenido de proteína con el método AOAC 983.15 capítulo 4 alimentos para animales 18° edición por un mismo analista bajo las mismas condiciones. Recibiendo el destilado en alícuotas de HCl 0.5M como se muestra en la siguiente tabla:

nivel	%proteína deseado	%nitrógeno	g lisina	g sacarosa	mL HCl 0.5M
1	10	1.6	0.1053	0.8947	10
2	20	3.2	0.2105	0.7895	10
3	30	4.8	0.3158	0.6842	15
4	40	6.4	0.4210	0.5790	15
5	50	8	0.5263	0.4737	20

9.1.3.- Se determinó la cantidad de proteína en cada muestra a través de la siguiente fórmula:



$$\%N = \frac{((MHCL * VHCL) - (MNaOH * Vbco) - (MNaOH * VNaOH))}{PESO MTRA} * 1.4007$$

% PROTEINA= % NITROGENO*FACTOR

Dónde:

M_{HCl}: Molaridad real del ácido estandarizado utilizado para recibir el destilado.

V_{HCl}: Cantidad en ml de ácido estandarizado utilizado para recibir el destilado

M_{NaOH}: molaridad real de la base estandarizada utilizada para titular el destilado

V_{bco}: ml de base estándar utilizados para titular un mililitro de ácido estandarizado menos los mililitros de base estándar necesarios para titular el blanco de reactivos llevado a través del método y destilado en un mililitro de ácido estandarizado.

V_{NaOH}: mililitros de base estandarizada necesarios para titular la muestra.

1.4007: miliequivalentes del nitrógeno * 100 para pasar a porcentaje

Factor: un concentrado de proteínas puras contiene 16% de nitrógeno entonces

Factor= 100/16 = 6.25

9.1.4.- Se graficaron los valores de proteína obtenidos (y) vs los valores de proteína teóricos (x), se confirmó de manera visual la existencia de linealidad.

9.1.5.- Se calcularon la pendiente y la ordenada al origen y se calcularon los datos de y[^] para cada valor de proteína.

9.1.6.- Se calcularon los valores residuales por diferencia entre el valor de proteína obtenido menos la proteína ajustada y[^] y se confirmó una distribución aleatoria de los datos.

9.2 Límite de detección y cuantificación

No aplica



9.3 Recuperación y sesgo

9.3.1 Se calculó la recuperación con los datos obtenidos en el intervalo de trabajo

9.3.2 Para obtener el sesgo se hizo la diferencia del % de proteína añadido menos el % de proteína recuperado.

9.4 Repetibilidad y reproducibilidad

9.4.1 Se prepararon muestras con 10, 30 Y 50% de proteína nueve réplicas de cada nivel.

9.4.2 Se analizaron las muestras por triplicado en dos días diferentes (días 1 y 2) y por dos analistas diferentes (analista 1 y 2), utilizando los mismos equipos y método y obtener el % de recobro. Utilizar los resultados obtenidos en la prueba de intervalo de trabajo para los niveles de 10, 30 y 50% de proteína, como los datos para el analista 1 día 1.

9.4.3 Reportar los intervalos de coeficiente de variación (CVr y CVR) obtenidos a partir de los tres niveles de % de proteína.

9.4.4 Calcular el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (s) de los resultados de % de recobro de cada analista, para cada día y cada nivel de % de proteína.

9.4.5 Calcular el promedio de las medias individuales para cada nivel de % de proteína

9.4.6 Para determinar la repetibilidad del método (CVR), se calcula la desviación estándar de la repetibilidad (s_r) y se divide este resultado entre el promedio de las medias individuales (\bar{x}) de cada nivel de % de proteína



9.4.7 Para determinar la reproducibilidad del método (CVR), se calculó la desviación estándar de la reproducibilidad (sR) y se dividió este resultado entre el promedio de las medias individuales (\bar{x}) de cada nivel de % de proteína

Incertidumbre:

- 1.- Identificar todas las fuentes de incertidumbre.
- 2.- Determinar la incertidumbre estándar y la incertidumbre expandida



10.- RESULTADOS

INTERVALO DE TRABAJO:

Fecha de inicio: Indicar fecha de inicio

Fecha de término: Indicar fecha de término

Analista: Indicar el nombre del analista que realiza

Laboratorio: Indicar el nombre del laboratorio.

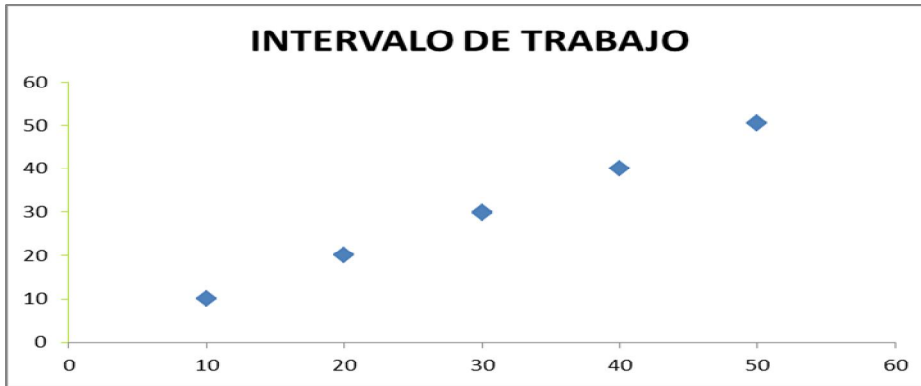
Analito: Indicar el analito q se cuantifica.

Matriz: Indicar la matriz a evaluar.

Unidades: Indicar las unidades en las que se reporta.

Bitácora: Indicar la bitácora y el o los folios donde se encuentra registrado

Nivel	% Proteína deseado	% Nitrógeno	g lisina	g sacarosa	mL HCl 0.5M	ml NaOH 0.1M
1	10	1.6	0.1053	0.8947	10	38.2
						38.5
						38.4
2	20	3.2	0.2105	0.7895	10	27.1
						26.9
						27.0
3	30	4.8	0.3158	0.6842	10	15.7
						15.6
						15.9
4	40	6.4	0.4210	0.5790	15	29.2
						29.1
						29.2
5	50	8	0.5263	0.4737	20	42.3
						42.1
						42.4



Al graficar el contenido de proteína teórico vs el % de proteína obtenido se observa que la grafica presenta linealidad visual por lo tanto se considera que el intervalo de trabajo cumple con el criterio de aceptación

Nivel	% Proteína deseado	%Nitrógeno agregado	% Proteína obtenido	Residual
1	10	1.6	10.24	0.15
			9.98	0.03
			10.07	0.03
2	20	3.2	19.96	-0.09
			20.14	0.09
			20.05	-0.04
3	30	4.8	29.94	-0.11
			30.03	0.12
			29.76	-0.11
4	40	6.4	40.01	-0.03
			40.10	-0.18
			40.01	-0.03
5	50	8	50.43	-0.03
			50.60	0.15
			50.34	-0.12



El grafico de residuales presenta un comportamiento aleatorio y no presenta tendencias por lo tanto cumple con el criterio de aceptación



RECUPERACIÓN Y SESGO

Fecha de inicio: Indicar fecha de inicio

Fecha de término: Indicar fecha de término

Analista: Indicar el nombre del analista que realiza

Laboratorio: Indicar el nombre del laboratorio.

Analito: Indicar el analito q se cuantifica.

Matriz: Indicar la matriz a evaluar.

Unidades: Indicar las unidades en las que se reporta.

Bitácora: Indicar la bitácora y el o los folios donde se encuentra registrado

Nivel	% Proteína deseado	%Nitrógeno agregado	% Proteína obtenido	% Recuperación
1	10	1.6	10.24	102.43
			9.98	99.80
			10.07	100.68
2	20	3.2	19.96	99.80
			20.14	100.68
			20.05	100.24
3	30	4.8	29.94	99.80
			30.03	100.09
			29.76	99.22
4	40	6.4	40.01	100.02
			40.10	100.24
			40.01	100.02
5	50	8	50.43	100.85
			50.60	101.20
			50.34	100.68

La recuperación se encuentra entre un 100 ± 10 % que es criterio de aceptación para un método volumétrico por lo tanto cumple con el criterio de recuperación.



REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Fecha de inicio: Indicar fecha de inicio

Fecha de término: Indicar fecha de término

Analista 1: Indicar el nombre del analista que realiza

Analista 2: Indicar el nombre del analista

Laboratorio: Indicar el nombre del laboratorio.

Analito: Indicar el analito q se cuantifica.

Matriz: Indicar la matriz a evaluar.

Unidades: Indicar las unidades en las que se reporta.

Bitácora: Indicar la bitácora y el o los folios donde se encuentra registrado

DIA	MUESTRA	NIVEL INFERIOR (10%)		NIVEL MEDIO (30%)		NIVEL SUPERIOR (50%)	
		ANALISTA	ANALISTA	ANALISTA	ANALISTA	ANALISTA	ANALISTA
		1	2	1	2	1	2
1	1	10.24	10.07	29.94	29.90	50.43	50.52
	2	9.98	10.33	30.03	29.77	50.60	50.79
	3	10.07	10.06	29.76	30.15	50.34	50.23
	PROMEDIO	10.10	10.18	29.91	29.94	50.46	50.51
	DESV. EST.	0.13	0.03	0.14	0.19	0.13	0.28
2	1	10.06	10.15	30.16	29.86	50.12	49.86
	2	10.13	9.90	30.13	30.12	49.96	50.13
	3	10.17	10.27	29.92	30.23	50.21	50.09
	PROMEDIO	10.12	10.11	30.07	30.07	50.10	50.03
	DESV. EST.	0.05	0.19	0.13	0.19	0.13	0.29

\bar{X}	10.11	10.13	29.99	30.00	50.28	50.27
Sr	0.09	0.15	0.15	0.18	0.23	0.33
C. V. r	0.90	1.54	0.49	0.62	0.45	0.66
SR	0.01	0.01	0.007	0.007	0.007	0.007
C. V. R	0.14	0.14	0.02	0.02	0.01	0.01



Los coeficientes de variación son menores a 2% para ambos analistas en diferentes días por lo tanto cumplen con criterio de repetibilidad

Los coeficientes de variación de los promedios de ambos analistas son menores al 2% para los tres niveles de concentración por lo tanto cumplen con el criterio de reproducibilidad.



CONCLUSIONES:

- Se identificaron y se mostró como evaluar los parámetros de desempeño aplicables al método Kjeldahl AOAC 984.13 Capítulo 4, alimentos para animales 18ª edición.
- Para fines de mostrar cómo se realiza la evaluación de estos parámetros se colocaron datos teóricos que ilustran como debe presentarse un informe de resultados, sin embargo el presente trabajo en 100% documental.
- Fueron determinados los parámetros que causan incertidumbre en la cuantificación de proteínas en alimentos para animales y se planteó el modelo matemático para su determinación.
- Se detectaron las principales fuentes de incertidumbre en la determinación de proteínas por el método kjeldahl.



BIBLIOGRAFIA:

- AOAC 936.16, APENDICE NORMATIVO A.1.11
- AOAC 984.13 CAPITULO 4, ALIMENTOS PARA ANIMALES 18ª EDICIÓN.
- BIOQUIMICA, ROBERT C. BONINSKI. EDITORIAL PEARSON EDUCACIÓN, MEXICO 1998.
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGIA (CENAM), GUIA PARA ESTIMAR LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGIA MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO SEGUNDA EDICION AGOSTO DE 1997.
- COMO HACER UNA TESIS, SALVADOR MERCADO H. SEGUNDA EDICION.
- CRITERIOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS FISICOQUIMICOS CCAYAC-P-058.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN (EMA), MANUAL DE PROCEDIMIENTOS. CITERIOS DE APLICACIÓN DE LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2006
- PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA, ABRAHAM WHITE Ph. P. EDITORIAL Mc GRAW-HILL, 2ª EDICION EN ESPAÑOL MEXICO 2000.