



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN EL
ANÁLISIS GENERAL DE ALIMENTOS**

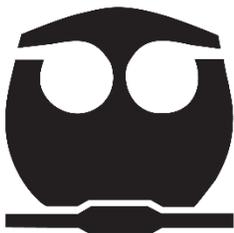
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

HÉCTOR CHÁVEZ VELAZCO



CIUDAD DE MÉXICO, 2020



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Sandoval Guillén Bertha Julieta

VOCAL: Profesor: García Iñarritu Ana Elena

SECRETARIO: Profesor: López Santiago Norma Ruth

1er. SUPLENTE: Profesor: Díaz Carrillo María Esther

2° SUPLENTE: Profesor: Flores Ávila Carolina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 3B EDIFICIO A,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

NORMA RUTH LÓPEZ SANTIAGO

SUPERVISOR TÉCNICO:

CAROLINA FLORES ÁVILA

SUSTENTANTE:

HÉCTOR CHÁVEZ VELAZCO

Agradecimientos

A la UNAM por abrirme sus puertas hace ya varios ayeres y haberme brindado conocimiento.

A la Facultad de Química y sus profesores por haberme forjado como científico.

A la Mtra. Norma Ruth López Santiago por el tiempo dedicado, por el conocimiento transmitido, por el apoyo otorgado, por el último gran aprendizaje, por ser una excelente profesora y persona, ¡gracias!

*A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo a través del proyecto **PE201618 “Enseñanza de la validación de métodos analíticos”**.*

A los miembros del jurado Mtra. Bertha Julieta Sandoval Guillén y a la QFB Ana Elena García Iñarritu por el tiempo brindado a la revisión del presente trabajo y por sus valiosas aportaciones.

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| LISTA DE TABLAS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS..... | x |
| RESUMEN | xiii |
| INTRODUCCIÓN | xiv |
| OBJETIVOS | xv |
| OBJETIVO GENERAL | xv |
| OBJETIVOS PARTICULARES | xv |
| CAPÍTULO 1. El análisis de alimentos | 1 |
| 1.1 Normatividad mexicana en materia de alimentos | 2 |
| 1.2 La validación de métodos analíticos | 8 |
| 1.3 Importancia de la validación..... | 9 |
| 1.4 Importancia a nivel productivo | 10 |
| 1.5 Importancia a nivel académico | 15 |
| CAPÍTULO 2. La validación de métodos analíticos | 20 |
| 2.1 ¿Cuándo validar un método?..... | 20 |
| 2.2 Guías de validación en alimentos | 21 |
| CAPÍTULO 3. Parámetros de validación | 25 |
| 3.1 Ecuación de Horwitz | 26 |
| 3.2 Aplicabilidad | 28 |
| 3.3 Límite de detección (LD)..... | 31 |
| 3.4 Límite de cuantificación (LC)..... | 33 |
| 3.5 Precisión..... | 35 |
| 3.6 Recuperación | 44 |
| 3.7 Sesgo | 47 |
| 3.8 Intervalo de trabajo y linealidad | 49 |
| 3.9 sensibilidad | 53 |

| | |
|---|----|
| 3.10 Incertidumbre | 56 |
| 3.11 Selectividad | 62 |
| 3.12 Robustez | 63 |
| CAPÍTULO 4. Aplicación de la validación | 67 |
| CAPÍTULO 5. Documentación | 78 |
| CONCLUSIONES | 82 |
| BIBLIOGRAFÍA | 84 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Métodos de análisis más empleados en las NOM | 7 |
| Figura 2. Distribución de laboratorios de ensayo en el área de alimentos acreditados por la EMA en México hasta julio del 2019 | 12 |
| Figura 3. Laboratorios de ensayo en el área de alimentos acreditados en diferentes sectores..... | 13 |
| Figura 4. Tesis de validación de métodos analíticos en el periodo 1984-julio de 2019 .. | 15 |
| Figura 5. Tesis desarrolladas en los diferentes campus de la UNAM | 16 |
| Figura 6. Tesis de validación de métodos analíticos por carrera | 17 |
| Figura 7. Tesis de validación de métodos analíticos por tema | 18 |
| Figura 8. Técnicas analíticas empleadas..... | 19 |
| Figura 9. Proceso de validación de métodos..... | 24 |
| Figura 10. Trompeta de Horwitz..... | 27 |
| Figura 11. Factores cruzados analista – día..... | 38 |
| Figura 12. Distribución F para la precisión intermedia..... | 40 |
| Figura 13. Factores anidados analista – día..... | 41 |
| Figura 14. Distribución para la precisión intermedia, factor analista | 42 |
| Figura 15. Distribución para la precisión intermedia, factor día..... | 42 |
| Figura 16. Distribución F para la reproducibilidad | 44 |
| Figura 17. A) Intervalo de trabajo del instrumento B) Intervalo de trabajo del método | 51 |
| Figura 18. Regresión lineal para la determinación de azufre total en combustibles | 51 |
| Figura 19. A) Regresión lineal para intervalo de 3-1,000 mg/kg B) Gráfico de residuales para intervalo de 3-1,000 mg/kg | 52 |
| Figura 20. A) Regresión lineal para intervalo de 1,000-10,000 B) Gráfico de residuales para intervalo de 1,000-10,000 mg/kg | 52 |
| Figura 21. A) Regresión lineal para intervalo de 10,000-50,000 B) Gráfico de residuales para intervalo de 10,000-50,000 mg/kg | 53 |
| Figura 22. Curva de calibración para cuantificación de P en forma de P ₂ O ₅ | 54 |
| Figura 23. Curva de Ringbom | 55 |
| Figura 24. Diagrama de flujo para la determinación de fibra cruda en alimentos para animales | 57 |
| Figura 25. Diagrama causa-efecto para la determinación de fibra en alimentos para animales | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 26. Diagrama causa-efecto simplificado..... | 59 |
| Figura 27. Determinación de humedad en harina..... | 69 |
| Figura 28. Determinación de acidez en leche en polvo..... | 71 |
| Figura 29. Determinación de plomo en agua mineral..... | 73 |
| Figura 30. Determinación de vitamina A en fórmula para lactantes..... | 75 |
| Figura 31. Determinación de fluoruros en agua mineral..... | 77 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. NOM que incluye límites permisibles pero no el método a utilizar | 3 |
| Tabla 2. NOM que no incluyen métodos sin embargo indica cual utilizar y donde se encuentran | 4 |
| Tabla 3. NOM que incluyen la totalidad de los métodos de análisis | 5 |
| Tabla 4. NOM que incluyen solo algunos métodos desarrollados, para el resto de las determinaciones indica que método aplicar y donde se encuentran | 6 |
| Tabla 5. Definiciones de validación | 8 |
| Tabla 6. Métodos más verificados por NOM..... | 14 |
| Tabla 7. Parámetros de desempeño a evaluar | 21 |
| Tabla 8. Principales guías y textos de apoyo a la VMA..... | 23 |
| Tabla 9. Clasificación de métodos analíticos según la CAC | 25 |
| Tabla 10. Intervalo mínimo aplicable para LM establecidos | 31 |
| Tabla 11. Valores calculados del LD para LM establecidos | 32 |
| Tabla 12. Determinación experimental del LD | 32 |
| Tabla 13. Valores calculados del LC para LM establecidos | 34 |
| Tabla 14. Valores calculados del RSDR para LM establecidos | 36 |
| Tabla 15. Determinación experimental de la precisión | 36 |
| Tabla 16. Concentración de un analito en jamón | 37 |
| Tabla 17. Concentración de un analito en cerveza | 39 |
| Tabla 18. ANDEVA de dos factores para la estimación de la precisión intermedia | 39 |
| Tabla 19. Concentración de un analito en una bebida | 41 |
| Tabla 20. ANDEVA de dos factores para la estimación de la precisión intermedia | 41 |
| Tabla 21. Concentración de un analito en agua embotellada | 43 |
| Tabla 22. ANDEVA de un factor para la estimación de la reproducibilidad | 43 |
| Tabla 23. Valores de recuperación recomendados para concentraciones establecidas .. | 45 |
| Tabla 24. Determinación experimental de la recuperación | 45 |
| Tabla 25. Evaluación de la recuperación | 46 |
| Tabla 26. Determinación experimental del sesgo..... | 47 |
| Tabla 27. Determinación agroquímicos por CG..... | 49 |
| Tabla 28. Determinación experimental del intervalo de trabajo y lineal | 50 |

| | |
|--|----|
| Tabla 29. Determinación experimental de la sensibilidad | 54 |
| Tabla 30. Determinación de P2O5 mediante espectrofotometría UV-Visible..... | 55 |
| Tabla 31. Resultados de un estudio colaborativo para la determinación de fibra | 60 |
| Tabla 32. Determinación experimental de la selectividad | 62 |
| Tabla 33. Determinación de la selectividad en atún | 63 |
| Tabla 34. Determinación experimental de la robustez | 64 |
| Tabla 35. Diseño experimental Plackett Burman..... | 64 |
| Tabla 36. Representación de la obtención de los efectos para la prueba de robustez.... | 64 |
| Tabla 37. Resultados del ensayo de robustez..... | 65 |
| Tabla 38. Determinación de la robustez | 66 |
| Tabla 39. Recomendaciones para evaluar los parámetros de desempeño de acuerdo al tipo de método..... | 67 |
| Tabla 40. Metodología según el tipo de prueba..... | 67 |
| Tabla 41. Recomendaciones para evaluar los parámetros de desempeño de acuerdo al tipo de prueba | 68 |
| Tabla 42. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en gravimetría | 69 |
| Tabla 43. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en volumetría..... | 70 |
| Tabla 44. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en AA..... | 72 |
| Tabla 45. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en CLAR..... | 74 |
| Tabla 46. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en UV- Visible..... | 76 |
| Tabla 47. Ejemplo de un informe de la validación de un método para la determinación de histamina en productos de la pesca mediante kit enzimático..... | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|---------|--|
| AA | Absorción Atómica |
| ANDEVA | Análisis de varianza |
| AOAC | Asociación Oficial de Químicos Analíticos (del inglés Association of Official Analytical Chemists) |
| APHA | Asociación Americana de Salud Pública (del inglés American Public Health Association) |
| AQP | Análisis Químico Proximal |
| CAC | <i>Codex Alimentarius Commission</i> |
| CCMAS | Comité sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras |
| CENAM | Centro Nacional de Metrología |
| CG | Cromatografía de Gases |
| CLAR | Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución |
| CMN | Catálogo Mexicano de Normas |
| CNQFB | Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos |
| CONAGUA | Comisión Nacional del Agua |
| DER | Desviación Estándar Relativa |
| DGN | Dirección General de Normas |
| DOF | Diario Oficial de la Federación |
| ELISA | Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés Enzyme linked Immunosorbent Assay) |
| EMA | Entidad Mexicana de Acreditación |

| | |
|-------|--|
| EPA | Agencia de Protección del Medio Ambiente (del inglés Environmental Protection Agency) |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (del inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations) |
| FDA | Administración Alimentos y Medicamentos (del inglés Food and Drug Administration) |
| FES | Facultad de Estudios Superiores |
| IPN | Instituto Politécnico Nacional |
| ISO | Organización Internacional de Normalización (del inglés International Organization for Standardization) |
| IUPAC | Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés International Union of Pure and Applied Chemistry) |
| gl | Grados de Libertad |
| kg | Kilogramos |
| LFMN | Ley Federal sobre Metrología y Normalización |
| LC | Límite de Cuantificación |
| LD | Límite de Detección |
| NATA | Asociación Nacional de Autoridades de Prueba (del inglés National Association of Testing Authorities) |
| NMX | Norma Mexicana |
| MR | Materiales de Referencia |
| MRC | Material de Referencia Certificado |

| | |
|---------|---|
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| ONN | Organismos Nacionales de Normalización |
| PCR | Reaccion en Cadena de la Polimerasa |
| PROFECO | Procuraduría Federal del Consumidor |
| SE | Secretaría de Economía |
| SINEC | Sistema Integral de Normas y Evaluación de la Conformidad |
| SS | Secretaría de Salud |
| UACV | Universidad Autónoma del Centro de Veracruz |
| UAEM | Universidad Autónoma del Estado de México |
| UANL | Universidad Autónoma de Nuevo León |
| U-ERRE | Universidad Regiomontana |
| UNE | Normalización Española |
| VIM | Vocabulario Internacional de Metrología |
| VMA | Validación de Métodos Analíticos |

RESUMEN

El presente trabajo se enfoca en la Validación de Métodos Analíticos (VMA) en el área de alimentos. Se documentó la trascendencia en la VMA tanto en el sector educativo como en el industrial, por medio de una revisión en el catálogo de la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) de los laboratorios de ensayo acreditados en la rama de alimentos y se encontró una amplia actividad en gran parte de la república por parte del sector privado, gubernamental y académico en el área de alimentos, respecto al sector académico una búsqueda en *Tesiunam* reveló la vigencia que tiene el tema de validación a nivel académico como tema recurrente de tesis.

Así mismo en este trabajo se presenta una revisión de algunas de las principales guías de validación publicadas, las cuales proporcionan herramientas necesarias para una primera aproximación al tema las cuales se encuentran incluidas en este trabajo tales como definiciones, criterios de aceptación, los procedimientos experimentales que se deben realizar, tratamiento de datos, además se adaptaron algunos ejemplos de experimentos para mostrar cómo debe ser el tratamiento de datos así como recomendaciones para la documentación lo cual ayuda a dar respuesta a preguntas como ¿Qué es validación? ¿Qué validar? ¿Cómo hacerlo? ¿Cómo tratar los datos?, ¿Cómo reportar?, logrando de esta forma un trabajo que da respuesta a las principales dudas que surgen en un validador principiante, completando de alguna manera las carencias presentes en las diferentes guías de apoyo.

Finalmente se muestra cómo asignar parámetros de desempeño a los métodos indicados en la normatividad mexicana contemplando las recomendaciones para la verificación de métodos, procedimiento experimental y tipo de método.

INTRODUCCIÓN

La alimentación es una actividad que han realizado los seres vivos desde su aparición, si bien esto se realiza de manera natural, la finalidad es obtener energía para realizar sus actividades diarias. El estilo de vida que se tomó como sociedad a lo largo de la historia ha llevado a la población a dividir sus actividades socio-económicas en áreas y a desenvolverse en cada una de ellas, el área de alimentos es una de ellas. Los ritmos de vida tan acelerados han causado la aparición de una amplia gama de productos, algunos inclusive listos para su consumo (Oliva & Fragoso, 2013), lo que conlleva una gran responsabilidad, ya que hay que asegurar a los consumidores que la ingesta de dichos productos no repercutirá con daños en su salud. Para promover el cuidado de la ciudadanía a nivel mundial se han generado normatividades que especifican los requerimientos que deben cumplir los alimentos para que su consumo, producción y/o cultivo.

Algunas de las especificaciones implican el uso de métodos de análisis sin embargo, en muchos casos no hay métodos estandarizados que cubran el análisis de alimentos necesarios, por lo cual los laboratorios se ven en la necesidad de desarrollar, modificar o usar métodos de análisis fuera de su ámbito de aplicación para los cual se debe demostrar que generan resultados confiables, es decir que están validados (Morrillas, 2016).

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, así como las normas emitidas por la Organización Internacional de Estandarización (ISO por sus siglas en inglés International Organization for Standardization), ISO 17025 y la ISO 9000 definen la validación de formas diferentes, sin embargo, las diferencias conceptuales no son significativas, las tres exigen provisión de evidencia objetiva del cumplimiento de requisitos para un uso o aplicación prevista (Lazos & Hernández, 2004).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Generar una herramienta para apoyar el aprendizaje de la validación de métodos analíticos enfocada al área de alimentos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Mostrar el impacto de la Validación de Métodos Analíticos en la industria y la vida académica.
- Conjuntar las herramientas de diferentes guías de validación para que ayuden a responder ¿Qué es validación? ¿Qué validar? ¿Cómo hacerlo? ¿Cómo tratar los datos? ¿Cómo reportar? ¿Cómo documentar?
- Ejemplificar cómo establecer los parámetros de desempeño con algunos métodos del análisis de alimentos.

CAPÍTULO 1. EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

La alimentación es una necesidad de vital importancia, es incuestionable, también es relevante saber cómo es la alimentación, es decir conocer la calidad de los alimentos que se ingieren, sobre todo por los problemas asociados a ellos, ya sean alergias (INFOSAN, 2006), carencias, excesos nutricionales (FAO, 2002), o enfermedades transmitidas por los alimentos (FAO, 2009), debido a esto los alimentos deben ser estudiados. Por otra parte para su consumo son sometidos a constantes cambios y debido a esto se debe estudiar la composición de los mismos y los efectos que provocan en ellos los diferentes procesos y de esta manera ir descubriendo las conexiones que existen entre la estructura de los diferentes compuestos y sus propiedades así como su capacidad de deterioro en función de su composición química. Los resultados de la caracterización de los alimentos provienen de múltiples ensayos a los que son sometidos utilizando diferentes métodos de evaluación, los cuales pueden agruparse en función de los objetivos que persigan y los principios en que se fundamentan, estos son el análisis fisicoquímico, análisis microbiológico y análisis sensorial (Fernández, 2004).

Para asegurar el bienestar social en ámbitos de salud y competencia, internacionalmente se han desarrollado normas las cuales buscan la reducción de los problemas asociados a los alimentos y los diferentes sectores industriales, mediante el establecimiento de límites permisibles y métodos de análisis, en México los bienes y servicios se deben apegar al cumplimiento de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), dichas NOM se encuentran respaldadas por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización (LFMN), la cual menciona distintos tipos entre las que se encuentran las NOM y las Normas Mexicanas (NMX) (SE, 2011).

1.1 Normatividad mexicana en materia de alimentos

Las NOM son disposiciones técnicas expedidas por dependencias de la administración pública federal, cuyo objetivo es establecer especificaciones que deben cumplirse de manera obligatoria en su alcance de aplicación y vigencia, de acuerdo a lo establecido en el Artículo 52 de la LFMN (LFMN, 2018). Existe una gran variedad de NOM que establecen desde cuarentenas para evitar plagas en algodón y reglas para el etiquetado de productos de perfumería y productos preenvasados hasta requisitos para la eficiencia energética de refrigeradores y lineamientos para el derecho de paso entre concesionarios ferroviarios (Orozco, 2010).

De acuerdo al artículo 51 de la LFMN a diferencia de las NOM, las NMX son de aplicación voluntaria, a excepción de los casos en que particulares manifiesten que sus productos son conformes con las mismas, su campo de aplicación es determinado por la propia norma y puede ser nacional, regional o local (LFMN, 2018). El hecho de ser voluntaria no quiere decir que pueda descartarse su uso, ya que constituyen una referencia para determinar la calidad de los productos y servicios de que se trate (SE, 2011), las NMX se publican en el Diario Oficial de la Federación (DOF) en su totalidad o fragmentos, algunas de ellas son emitidas por la Secretaría de Economía (SE) y otras por Organismos de Normalización Nacional (ONN) por lo cual se debe pagar para tener acceso a ellas (Huerta, 1998).

La SE, a través de la Dirección General de Normas (DGN), desarrolló un sistema de consulta vía Internet de las NOM y NMX, para ampliar la difusión de la normalización. El Catálogo Mexicano de Normas (CMN) contiene el texto completo de las NOM vigentes en México, el listado de las NMX expedidas por la SE y ONN, así como los proyectos publicados para consulta pública y normas de emergencia. El CMN era revisado y actualizado permanentemente con la información publicada en el DOF, sin embargo el catálogo ofrece un enlace que redirecciona al nuevo catálogo en el sitio web Sistema Integral de Normas y Evaluación de la Conformidad (SINEC). Se debe considerar que

existen una mayor cantidad de normas sin embargo, se realizó una búsqueda en ambos sitios web buscando exclusivamente las NOM que incluyen especificaciones que implican realizar análisis en alimentos (SE, 2019), (SINEC, 2019) .

El primer catálogo (SE, 2019) cuenta con sus últimos registros hasta 2018, en el catálogo SINEC (SINEC, 2019) se pudo encontrar registros de NOM con fechas del 2019, sin embargo se encontraron algunas diferencias en cuanto a las actualizaciones de los últimos dos años en el catálogo del SINEC las cuales fueron ratificadas con el DOF (DOF, 2019). Se pudo encontrar que las NOM de yogurt y de productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso, se encuentran en el SINEC y DOF, mientras que en el primer catálogo se encuentra como proyecto lo cual es normal debido al cambio de catálogo, las NOM correspondientes a leche en polvo y queso se encuentran como proyecto en el primer catálogo mientras que en el SINEC no aparecen y estas ya ha sido publicada en el DOF lo cual indica problemas en la actualización del SINEC.

Se encontraron un total de 46 NOM en un periodo comprendido entre 1993 y julio del 2019, el listado fue distribuido en cuatro tablas. La Tabla 1 contiene solo una NOM la cual incluye límites permisibles, pero no indica que métodos usar y tampoco donde se encuentran.

Tabla 1. NOM que incluye límites permisibles pero no el método a utilizar

| Norma | Nombre |
|--------------------------|--|
| NOM-127-SSA1-1994 | Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. |

La Tabla 2 contiene las NOM que no incluyen ningún método desarrollado sin embargo, indica cuales usar y donde se encuentran, esto puede ser en otras NOM pero para el resto exige usar métodos contenidos en NMX, ISO y Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, por sus siglas en ingles Association of Official Analytical Chemists).

Tabla 2. NOM que no incluyen métodos sin embargo indica cual utilizar y donde se encuentran

| Norma | Nombre |
|----------------------------------|--|
| NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018 | Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-222-SCFI/SAGARPA-2018 | Leche en polvo o leche deshidratada-materia prima-especificaciones, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018 | Queso-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-199-SCFI-2017 | Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-070-SCFI-2016 | Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. |
| NOM-193-SCFI-2014 | Crema-Denominaciones, especificaciones, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-142-SSA1/SCFI-2014 | Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. |
| NOM-182-SCFI-2011 | Vainilla de Papantla, extractos y derivados-Especificaciones, información comercial y métodos de ensayo (prueba). |
| NOM-169-SCFI-2007 | Café Chiapas-Especificaciones y métodos de prueba. |
| NOM-168-SCFI-2004 | Bebidas alcohólicas- Bacanora -Especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. |
| NOM-149-SCFI-2001 | Café Veracruz-Especificaciones y métodos de prueba. |
| NOM-144-SCFI-2000 | Bebidas alcohólicas-Charanda-Especificaciones. |

La Tabla 3 contiene las NOM que incluyen la totalidad de los métodos de análisis que se emplearán.

Tabla 3. NOM que incluyen la totalidad de los métodos de análisis

| Norma | Nombre |
|-------------------------------|---|
| NOM-189-SCFI-2017 | Chile habanero de la Península de Yucatán (<i>Capsicum Chinense</i> Jacq.) Especificaciones y métodos de prueba. |
| NOM-080-SCFI-2016 | Arroz del Estado de Morelos. |
| NOM-201-SSA1-2015 | Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias. |
| NOM-210-SSA1-2014 | Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. |
| NOM-186-SSA1/SCFI-2013 | Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba. |
| NOM-131-SSA1-2012 | Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba. |
| NOM-155-SCFI-2012 | Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-218-SSA1-2011 | Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. |
| NOM-243-SSA1-2010 | Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. |
| NOM-242-SSA1-2009 | Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. |
| NOM-173-SCFI-2009 | Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-247-SSA1-2008 | Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. |
| NOM-159-SCFI-2004 | Bebidas alcohólicas-Sotol-Especificaciones y métodos de prueba. |
| NOM-230-SSA1-2002 | Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. |
| NOM-086-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. |
| NOM-092-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. |
| NOM-110-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. |
| NOM-111-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. |
| NOM-113-SSA1-1994 | Bienes y servicios Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. |
| NOM-116-SSA1-1994 | Bienes y Servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa. |
| NOM-117-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica. |
| NOM-040-SSA1-1993 | Bienes y servicios. Sal yodada y sal yodada fluorurada. Especificaciones sanitarias. |

La Tabla 4 contiene las NOM que contienen solo algunos métodos completos sin embargo, para el resto de los análisis a efectuar indica cual usar y donde se encuentran, esto puede ser en otras NOM pero para el resto exige usar métodos contenidos en NMX, ISO y AOAC.

Tabla 4. NOM que incluyen solo algunos métodos desarrollados, para el resto de las determinaciones indica que método aplicar y donde se encuentran

| Norma | Nombre |
|-------------------------------|--|
| NOM-213-SSA1-2018 | Productos y servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. |
| NOM-002-SAGARPA-2016 | Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad de los fructanos de agave. |
| NOM-003-SAGARPA-2016 | Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad del jarabe de agave. |
| NOM-159-SSA1-2016 | Productos y servicios. Huevo y sus productos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Método de prueba. |
| NOM-183-SCFI-2012 | Producto lácteo y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-190-SCFI-2012 | Mezcla de leche con grasa vegetal-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-188-SCFI-2012 | Mango Ataulfo del Soconusco, Chiapas (<i>Mangifera caesia</i> Jack ex Wall)-Especificaciones y métodos de prueba. |
| NOM-194-SSA1-2004 | Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. |
| NOM-158-SCFI-2003 | Jamón - Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba. |
| NOM-187-SSA1/SCFI-2002 | Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. |
| NOM-130-SSA1-1995 | Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometido a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. |

Las normas se pueden clasificar en horizontales y verticales y con esto puede explicar las diferencias y similitudes que existen entre ellas, las normas horizontales son aquellas regulaciones que afectan a todos los productos alimenticios sin importar que se trate de productos totalmente diferentes, las normas verticales se centran en productos individuales y grupos específicos de productos (Chico, 2010). Un claro ejemplo de norma horizontal es la NOM-251-SSA1-2009 la cual contiene prácticas de higiene para el procesamiento de alimentos, ejemplos de normas verticales son las NOM de las Tablas 1, 2, 3 y 4, por esa razón es normal encontrar que algunas NOM de productos

específicos indiquen que sus métodos de análisis se encuentran contenidos en otras NOM. La Figura 1 se elaboró a partir de las NOM incluidas en la Tabla 3 y parte de la Tabla 4 que contienen métodos de análisis totalmente desarrollados, incluyendo solo métodos instrumentales y microbiológicos. Se puede observar mayor presencia de métodos microbiológicos lo que implica que el análisis microbiológico es exigido en gran cantidad de productos para la determinación de microorganismos y de algunas vitaminas. Las volumetrías son empleadas mayoritariamente para la detección de acidez al igual que en la etapa final de Kjeldahl. Los métodos gravimétricos son utilizados para la determinación de humedad y grasa. La Espectrometría Absorción Atómica (AA) es empleada para la detección de metales. La Espectrofotometría UV-Visible, Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento (CLAR) y Cromatografía de Gases (CG) son métodos utilizados para la detección de una amplia gama de analitos al igual que los métodos potenciométricos. En otros se encuentran métodos como Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés Enzyme linked Immunosorbent Assay), bioensayos y turbidimetría entre otros.

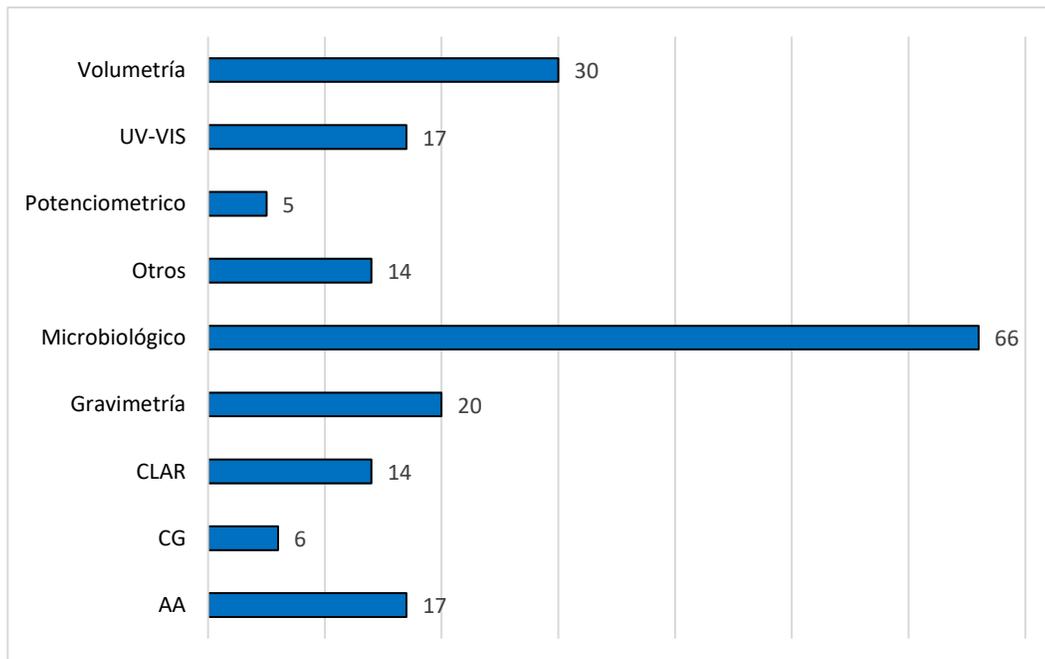


Figura 1. Métodos de análisis más empleados en las NOM
Elaboración propia a partir de la información de (SINEC, 2019)

1.2 La validación de métodos analíticos

La Tabla 5 contiene diferentes definiciones del concepto de validación de tres documentos internacionales y uno nacional. A pesar de que se trata del mismo vocablo, se pueden observar diferencias en las definiciones validación de ISO debido a que la ISO 17025 incluye a la verificación como parte de la definición, en el caso de la definición del Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) la definición es más extensa al incluir el concepto de verificación que es definido como *“aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados”* (VIM, 2012), por su parte la NOM-059 de buenas prácticas de fabricación de medicamentos, que aunque no es aplicable a alimentos, contiene una definición más extensa, las diferencias encontradas en todas las definiciones no son significativas ya que en todas se exige el aporte de evidencia del cumplimiento de requisitos para una aplicación prevista. En términos referentes a la validación las definiciones no siempre son uniformes por lo cual es recomendable mantener la atención en el concepto y no tanto al término que lo define (Lazos & Hernández, 2004).

Tabla 5. Definiciones de validación

| Definición | Referencia |
|--|-------------------|
| <i>“Verificación (aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados), cuando los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto”</i> | (ISO 17025, 2017) |
| <i>“Confirmación, mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para una utilización o una aplicación específica prevista”</i> | (ISO 9000, 2015) |
| <i>“La evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación científicas de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, a lo largo del todo el ciclo de vida de un producto, cuya finalidad es demostrar la funcionalidad, consistencia y robustez de un proceso dado en cuanto a su capacidad para entregar un producto de calidad”</i> | (NOM-059, 2015) |
| <i>“La verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto”</i> | (VIM, 2012) |

1.3 Importancia de la validación

La producción industrial de alimentos comienza desde la recepción de materia prima, desde ese momento se comienzan a realizar análisis para verificar que se haya cumplido con lo establecido en la normatividad, desde la temperatura y la ausencia de contaminantes físicos, si bien estos análisis son realizados con termómetros y de manera sensorial, hay algunos que involucran un trabajo más a detalle en el laboratorio, un claro ejemplo de esto son las conocidas pruebas de plataforma aplicadas a los productos lácteos (Mallqui, 2014). Después de aprobar la entrada de la materia prima los análisis continúan no solamente enfocados a la materia prima sino además de todo lo que involucra su procesamiento como el verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza de las instalaciones y personal mediante el análisis microbiológico (FAO, 1992). Al finalizar el procesamiento y obtener el producto terminado se deben realizar los análisis pertinentes de acuerdo al producto para asegurar su calidad e inocuidad además del Análisis Químico Proximal (AQP) para verificar que se cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación (Melo & Suárez, 2014). La cantidad de análisis realizados para el procesamiento de un producto alimenticio es extenso, hay que recordar que existen una gran cantidad de laboratorios que realizan análisis con distintos giros, demostrando de alguna manera, la influencia del trabajo analítico en la vida diaria. De los análisis realizados se obtienen resultados que deben ser lo suficientemente confiables para la toma de decisiones sin embargo, en muchas ocasiones esas decisiones no son tomadas por el mismo laboratorio, hay que recordar que existen laboratorios a los cuales acuden clientes que confían plenamente en los resultados proporcionados, es en este punto cuando cada laboratorio debe demostrar que cuenta con un dominio técnico que los clientes no tienen y debe aplicar métodos que brinden esa confianza, es decir métodos validados (Morrillas, 2016).

1.4 Importancia a nivel productivo

Al momento de seleccionar laboratorios para realizar calibraciones y ensayos, se debe asegurar que sean técnicamente competentes y sean capaces de proporcionar resultados confiables, en este sentido los laboratorios pueden someterse a certificaciones y acreditados. La certificación es definida como *“procedimiento por el cual se asegura que un producto, proceso, sistema o servicio se ajusta a las normas o lineamientos o recomendaciones de organismos dedicados a la normalización nacionales o internacional”* (LFMN, 2018). De acuerdo a la definición los laboratorios pueden certificarse bajo una norma internacional como la norma de gestión de calidad ISO 9001, sin embargo dichas normas no evalúan la competencia técnica del mismo (IAAC, 2007).

Desde mediados de los años 90's, la acreditación ha tomado gran importancia para la importación y exportación de productos, la Acreditación se define como *“el acto por el cual una entidad de acreditación reconoce la competencia técnica y confiabilidad de los organismos de certificación, de los laboratorios de prueba, de los laboratorios de calibración y de las unidades de verificación para la evaluación de la conformidad”* (LFMN, 2018). A diferencia de la certificación, durante la acreditación se aplican los requisitos de competencia técnica además de elementos relevantes de sistemas de gestión de calidad, tomando como referencia la ISO/IEC 17025, la cual indica el uso de métodos validados y/o previamente verificados (Delgado, 2009).

En México la acreditación es otorgada por la EMA la cual cuenta con un catálogo de laboratorios acreditados catalogados en “calibración”, “ensayo”, “clínicos”, “investigación” entre otros. Una búsqueda en el catálogo de la EMA para “laboratorios de ensayo” reveló que hay 162 laboratorios acreditados en el área de alimentos, lo cual implica la validación y/o verificación de los métodos de análisis empleados, los laboratorios acreditados pertenecen a empresas, entidades gubernamentales y universidades, dichos laboratorios se encuentran distribuidos en 25 estados de la república siendo la Ciudad de

México, Jalisco y el Estado de México los estados con la mayor presencia de estos, tal y como se puede observar en la Figura 2 (EMA, 2019).

La Figura 3 muestra los laboratorios de ensayo acreditados en el área de alimentos en diferentes sectores, de los 162 laboratorios acreditados 135 (83%) pertenecen al sector industrial, Sigma alimentos destaca en esta actividad ya que cuenta con seis laboratorios acreditados distribuidos en la república, el resto de las empresas cuentan con una menor cantidad de laboratorios acreditados, tres como máximo. Las entidades gubernamentales cuentan con 22 (14%) laboratorios acreditados donde se puede encontrar la CONAGUA (Comisión Nacional del Agua), PROFECO (Procuraduría Federal del Consumidor), y la SS (Secretaría de Salud) por mencionar algunos, se incluye en esta categoría a LICONSA ya que es una compañía paraestatal, un hecho interesante es que cuenta con diez laboratorios acreditados, siendo así la compañía con el mayor número de laboratorios acreditados. Por su parte las universidades UACV (Universidad del Centro de Veracruz), UAEM (Universidad Autónoma del Estado de México), IPN (Instituto Politécnico Nacional), UANL (Universidad Autónoma de Nuevo León) y U-ERRE (Universidad Regiomontana) han logrado la acreditación de un total de cinco (3%) laboratorios (EMA, 2019), la UNAM también ha logrado la acreditación de laboratorios sin embargo estos se encuentran en otras secciones del catálogo de la EMA, por lo que no se incluyen en la Figura 2 y 3. LabUNAM reporta que la UNAM cuenta con 15 acreditaciones de las cuales 11 pertenecen a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la industria de la Facultad de Química en los laboratorios de Microscopía, Espectroscopía (2), Análisis Térmico, Resonancia (2), Difracción de Rayos x (2), Análisis Elemental, Espectrometría de Masas y Reología. Tres acreditaciones más pertenecen a la Facultad de Química en el laboratorio de Biogeoquímica Ambiental, la Unidad de Metrología y la Unidad de Diagnóstico Preclínico. Una acreditación pertenece al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (UNAM, 2019A).

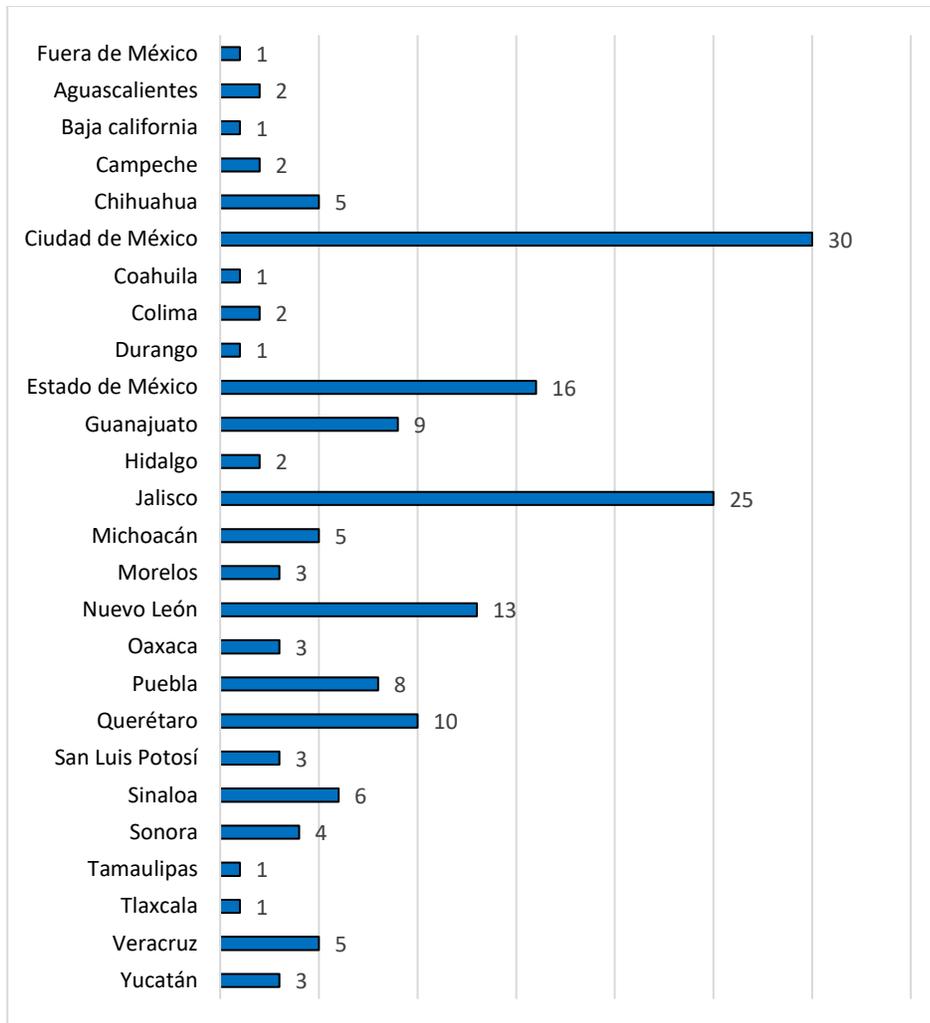


Figura 2. Distribución de laboratorios de ensayo en el área de alimentos acreditados por la EMA en México hasta julio del 2019
 Elaboración propia a partir de la información de (EMA, 2019)

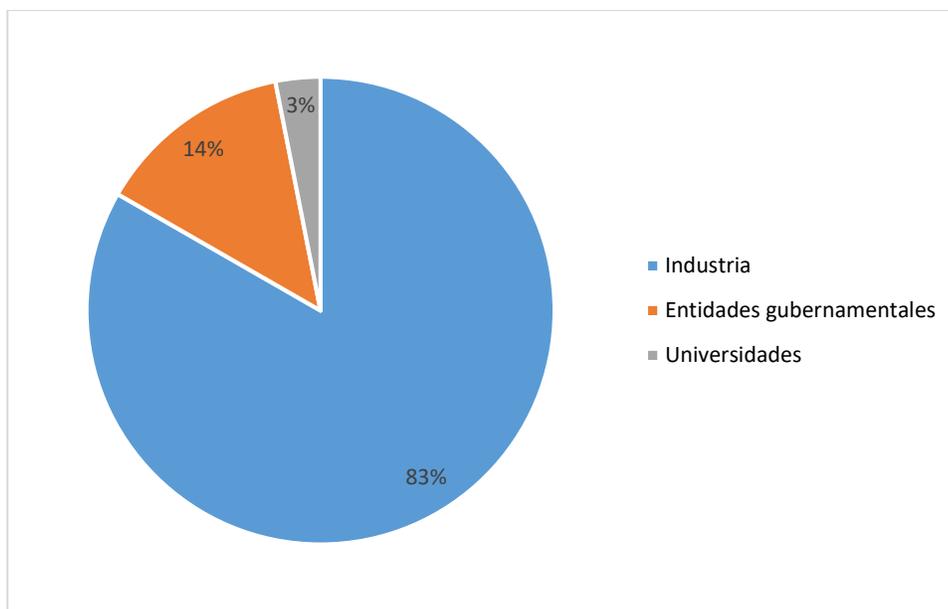


Figura 3. Laboratorios de ensayo en el área de alimentos acreditados en diferentes sectores
 Elaboración propia a partir de la información de (EMA, 2019)

Respecto al catálogo de la EMA los laboratorios han validado/verificado 2795 métodos, los cuales son en mayor medida NOM (50.6%) y en menor medida en los métodos de las NMX (15.4%), AOAC (8.6%), Asociación Americana de Salud Pública (APHA, por sus siglas en inglés American Public Health Association) (7.5%), Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés Environmental Protection Agency) (2.9%), ISO (1.9%), Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) (1.1%), UNE (Normalización Española) (0.3%) y CODEX ALIMENTARIUS (0.2%). El resto de los métodos (11.5%) son métodos desarrollados por el mismo laboratorio y métodos que el mismo laboratorio indica ser una modificación o adaptación de algún método emitido por algunos de los organismos mencionados anteriormente, los cuales de acuerdo a las recomendaciones son métodos que deben someterse a validación (ver sección 2.1) (EMA, 2019).

La Tabla 6 contiene los 20 métodos más verificados de las NOM por los laboratorios acreditados, se puede observar que hay una mayor inclinación

hacia el área microbiológica ya que dentro de los 20 métodos más verificados, 12 son métodos microbiológicos, de algunas NOM se han verificado más de un método tal y como ocurre en la NOM-201-SSA1-2015, la cual ha presentado métodos de análisis verificados diferentes a los microbiológicos como lo son la espectrofotometría UV-Visible y la potenciometría, el resto de los métodos que no se incluyen en la lista pertenecen a técnicas de CLAR, CG, Turbidimetría, ELISA, comparación visual, microscopía y métodos cualitativos (EMA, 2019).

Tabla 6. Métodos más verificados por NOM

| NOM | Laboratorios acreditados | Subrama | Determinación |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| NOM-210-SSA1-2014 | 231 | Microbiológico | Coliformes, <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> |
| NOM-092- SSA1-1994 | 103 | Microbiológico | Bacterias aerobias |
| NOM-113- SSA1-1994 | 95 | Microbiológico | Coliformes |
| NOM-111- SSA1-1994 | 91 | Microbiológico | Mohos y levaduras |
| NOM-201-SSA1-2015 | 66 | UV – Vis | Nitritos, Nitratos, Boro y cianuros |
| NOM-243-SSA1-2010 | 55 | Microbiológico | Coliformes, bacterias aerobias, mohos, levaduras, <i>Salmonella spp.</i> , <i>Vibrio cholerae</i> y <i>S. aureus</i> |
| NOM-116- SSA1-1994 | 46 | Gravimétrico | Humedad |
| NOM-247-SSA1-2008 | 36 | Microbiológico | Coliformes, bacterias aerobias, mohos, levaduras, niacina <i>Salmonella spp.</i> , <i>S. aureus</i> y ácido fólico |
| NOM-117- SSA1-1994 | 35 | AA | Cd, As, Pb, Cu, Fe, Zn, Sn y Hg |
| NOM-086-SSA1-1994 | 34 | Gravimétrico | Grasa |
| NOM-242-SSA1-2009 | 28 | Microbiológico | <i>Vibrio cholerae</i> , mesófilos anaerobios, mesófilos aerobios, termófilos anaerobios, termófilos aerobios y coliformes |
| NOM-114- SSA1-1994 | 27 | Microbiológico | <i>Salmonella</i> |
| NOM-115- SSA1-1994 | 26 | Microbiológico | <i>Staphylococcus aureus.</i> |
| NOM-130- SSA1-1995 | 21 | Microbiológico | Mesófilos anaerobios, mesófilos aerobios, termófilos anaerobios y termófilos aerobios |
| NOM-112- SSA1-1994 | 18 | Microbiológico | Coliformes |
| NOM-201-SSA1-2015 | 18 | Potenciométrico y UV-vis | Fluoruros |
| NOM-086-SSA1-1994 | 17 | Volumetría | Reductores |
| NOM-155-SCFI-2012 | 17 | Volumetría | Acidez y reductores |
| NOM-131-SSA1-2012 | 14 | Microbiológico | Vitaminas B3, B9, Bacterias aerobias y coliformes |
| NOM-201-SSA1-2015 | 14 | Microbiológico | Mesófilos aerobios, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y esporas de <i>Clostridium</i> |

1.5 Importancia a nivel académico

Tal es la importancia de la VMA en la cotidianidad de la vida profesional de un químico, que el número de trabajos de titulación por tesis encontrados en TESIUNAM en el periodo de 1984 hasta julio de 2019 fue de 509 con dicho tema (UNAM, 2019B), la Figura 4 revela que la VMA es tema frecuente de tesis a partir de 1988, manteniéndose como un tema vigente en la actualidad.

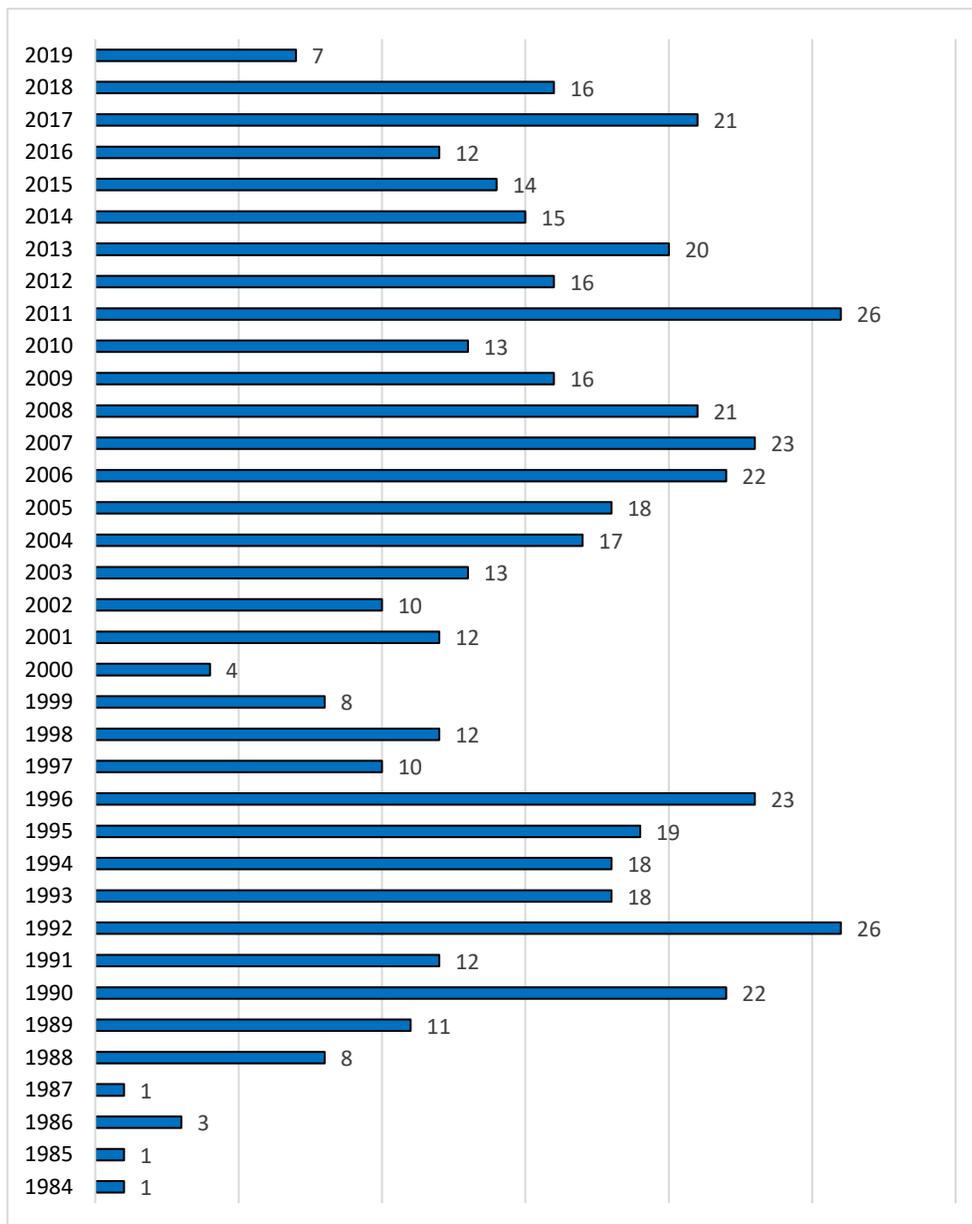


Figura 4. Tesis de validación de métodos analíticos en el periodo 1984-julio de 2019
Elaboración propia a partir de la información de (UNAM, 2019B)

Las 509 tesis encontradas se clasificaron por campus, carrera, tema y método, como se puede observar en la Figura 5, los registros en TESIUNAM indican que el 53.4% de estos trabajos se desarrollan en la Facultad de Química, seguida de la Facultad de Estudios Superiores (FES) campus Zaragoza y Acatlán con 129 y 68 tesis registradas correspondientes al 25.3% y 13.4% respectivamente, posteriormente con un 7.1% se encuentran otras facultades y universidades como la Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia, FES Iztacala y la Facultad de Medicina así como la Universidad del Valle de México, la Universidad Autónoma de Guadalajara, la Salle, la Universidad Femenina de México y la Universidad Motolina cuyo tema fue desarrollado con programas incorporados a la UNAM, finalmente en la categoría de Institutos se encuentran registradas cuatro tesis correspondientes al 0.8%, los Institutos involucrados son el Instituto de Geología, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y el Instituto de Biotecnología (UNAM, 2019B).

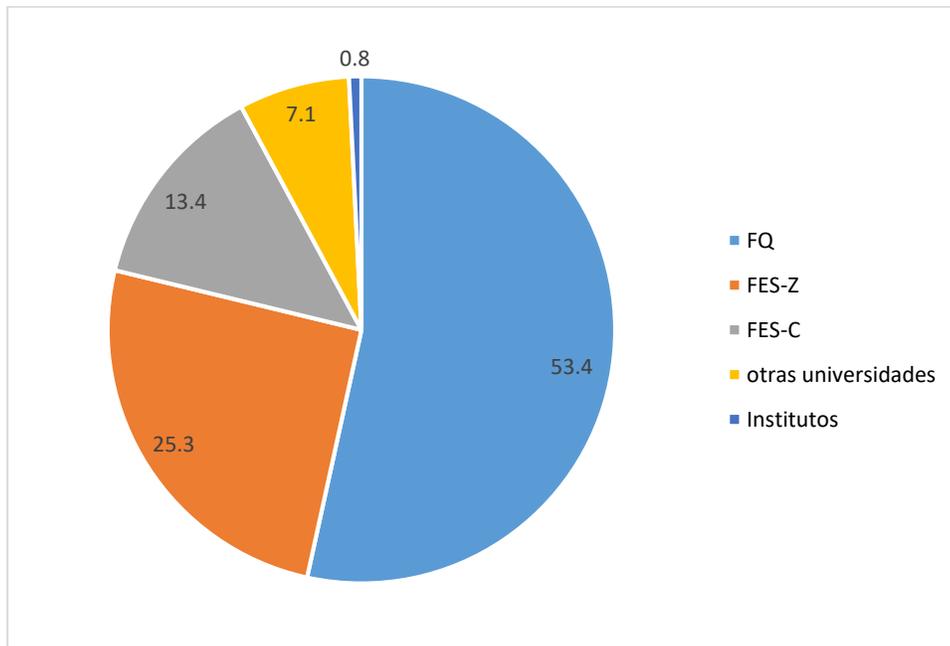


Figura 5. Tesis desarrolladas en los diferentes campus de la UNAM
Elaboración propia a partir de la información de (UNAM, 2019B)

La Figura 6 representa la distribución de los trabajos de tesis de VMA por carrera. Se encontró que el 97.4% de las tesis que son desarrolladas en licenciatura, la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo es la que genera la mayor cantidad de estas tesis contando con 419, correspondientes al 82.3%, posterior a esto se encuentra la carrera de Químico con 26 tesis correspondientes al 5.1%, en menor medida se encuentra la carrera de Química de Alimentos contando con 22 tesis correspondientes al 4.3%, a la par con el mismo número de tesis se encuentra la categoría de “otros”, con carreras como ingeniería de alimentos, médico, Médico Veterinario Zootecnista, Odontología y Biología, los posgrados cuentan con 13 tesis correspondientes al 2.6% perteneciendo 12 tesis a Maestrías y una a Doctorado, finalmente se encuentra Ingeniería Química con 7 tesis correspondientes al 1.4% (UNAM, 2019B).

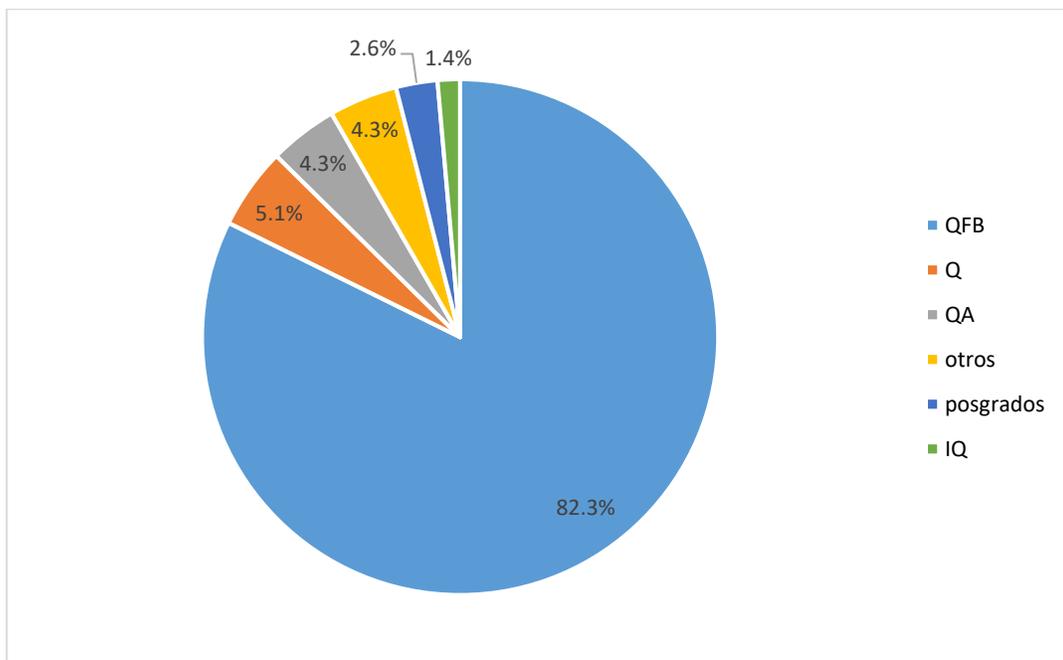


Figura 6. Tesis de validación de métodos analíticos por carrera
 Elaboración propia a partir de la información de (UNAM, 2019B)

Los Figura 7 representa los temas en los cuales la VMA se ha desarrollado con mayor frecuencia, 401 tesis han tomado un enfoque orientado a la

medicina, salud y farmacia, gran parte de ellas validan y desarrollan métodos para la determinación de algún principio activo dentro de una formulación farmacéutica, otras buscan comparar entre métodos y en menor medida el estudio teórico de la validación. El resto de las tesis han tomado diferentes enfoques, pero no menos importantes, en alimentos algunas buscan determinar vitaminas, las que se encuentran en ambiente buscan determinar contaminantes del aire, agua y suelo, en microbiología se busca la validación de métodos actualizados, en la categoría de otros se encuentran algunas orientadas a la enseñanza de la validación y otras enfocadas en salud animal, finalmente en minería se busca determinar residuos altamente contaminantes resultantes de los procesos (UNAM, 2019B).

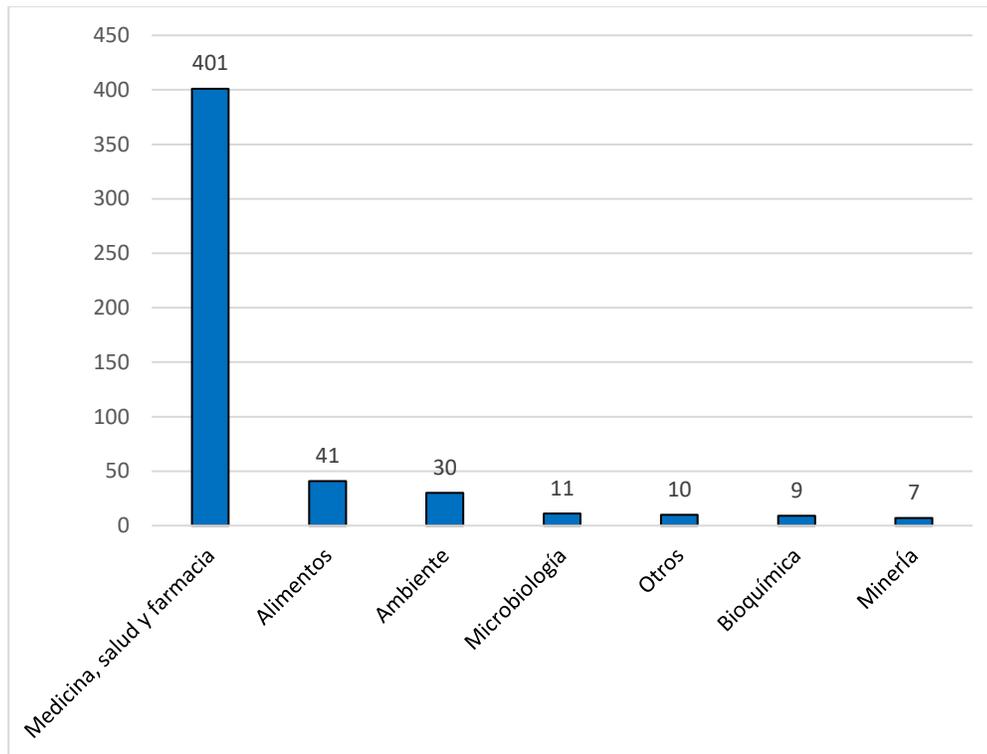


Figura 7. Tesis de validación de métodos analíticos por tema
Elaboración propia a partir de la información de (UNAM, 2019B)

La Figura 8 representa las diferentes técnicas analíticas que fueron utilizadas en el desarrollo de las tesis, siendo CLAR acoplada a diferentes tipos de detectores y la Espectrofotometría UV- Visible las más empleadas y las que

cubrieron una mayor cantidad de temas, el resto de las tesis que no se incluyen en el gráfico desarrollaron temas que no incluyen técnicas de análisis instrumental (UNAM, 2019B).

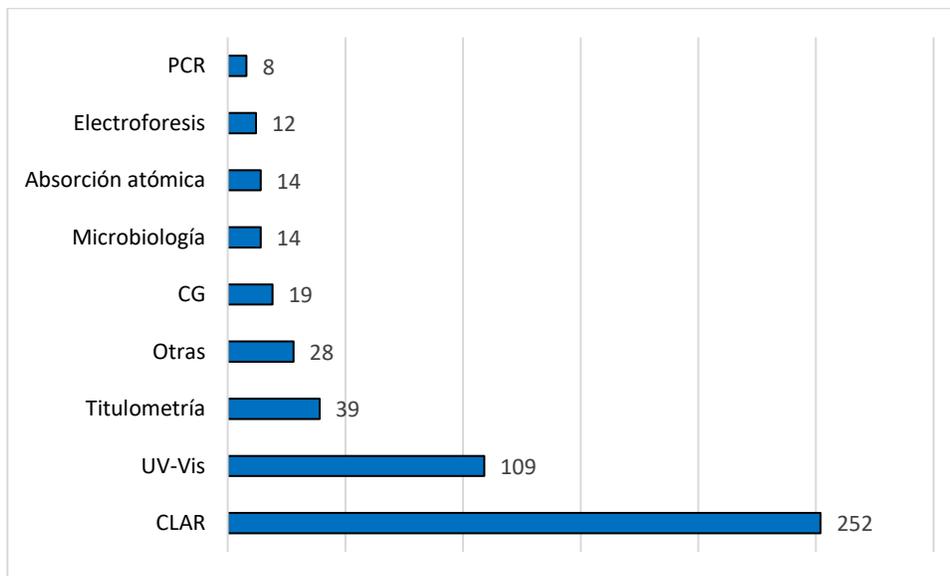


Figura 8. Técnicas analíticas empleadas
Elaboración propia a partir de la información de (UNAM, 2019B)

CAPÍTULO 2. LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1 ¿Cuándo validar un método?

Ha quedado clara la definición de VMA y la importancia que esta tiene en la vida diaria, sin embargo, surge una nueva interrogativa, ¿Cuándo validar un método?, antes de dar respuesta a esta interrogativa se debe definir a que se le conoce como método normalizado:

Un método normalizado es un método analítico desarrollado y validado por un organismo de normalización AOAC, ISO, EPA u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente.

(OGA, 2007).

Los métodos normalizados son métodos desarrollados y validados previamente por un ONN u otro organismo reconocido, por lo que ya establecen el procedimiento de análisis para su aplicación rutinaria en los laboratorios previa verificación del mismo bajo sus condiciones. Cabe resaltar que existe una controversia respecto a la validación debido a que cabe la interpretación de que cuando un método se incluye en una norma es denominado método normalizado, no es ya necesaria su validación solo su verificación (también conocida como validación secundaria) (Lazos & Hernández, 2004).

Una vez aclarado que es un método normalizado se procede a dar respuesta a la interrogativa, se debe validar un método analítico cuando se esté trabajando con métodos (ISO 17025, 2017):

- No normalizados.
- Desarrollados por el mismo laboratorio.
- Normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación.

- Normalizados ampliados o con modificaciones de los mismos.

Además de considerar los puntos mencionados, se debe validar un método cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos, uno recién desarrollado y uno existente (Morrillas, 2016).

2.2 Guías de validación en alimentos

La VMA es un tema complejo y en muchas ocasiones a los laboratorios que se encuentran en proceso de acreditación les es difícil establecer la diferencia entre validación y verificación. La validación es la evaluación rigurosa de los parámetros de desempeño seleccionados para un método que se encuentra en proceso de normalización, una vez que se ha validado se elabora el procedimiento normalizado especificando los parámetros a evaluar. En la verificación se evalúan los parámetros que están especificados en el método normalizado, para observar si éste cumple con los requisitos en el medioambiente de trabajo (Delgado, 2009). La Tabla 7 se presentan los parámetros de desempeño a evaluar recomendados por distintas organizaciones según se trate de una validación o verificación.

Tabla 7. Parámetros de desempeño a evaluar

| Parámetro | Validación (EMA, 2018) | Verificación (EMA, 2018) | Validación (CCAYAC-P-058, 2011) | Verificación (CCAYAC-P-058, 2011) | Validación (FAO, 2005) | Verificación (FAO, 2005) | Verificación (CODEX) |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| Recuperación | X | X | X | X | X | X | X |
| Límite de detección | X | X | X | X | X | | X |
| Límite de cuantificación | X | X | X | X | X | | X |
| Reproducibilidad | X | X | X | X | X | X | X |
| Repetibilidad | X | X | X | X | X | | |
| Intervalo lineal y de trabajo | X | X | X | X | X | X | |
| Incertidumbre | X | X | X | X | X | | |
| Sesgo | X | | X | X | X | | |
| Sensibilidad | X | | X | | X | | |
| Selectividad | X | | X | | X | X | |
| Robustez | X | | X | | X | X | |

X: evaluar

Debido al uso de métodos analíticos en la vida diaria y la importancia que implica la validación de los mismos, diversas dependencias que se dedican al desarrollo de métodos de análisis como la AOAC, CODEX, EPA y FDA han emitido guías y textos de apoyo (una o más) para la VMA al igual que la Eurachem, FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación por sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations) y el CNQFB (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos), algunas guías y textos se encuentran contenidas en la Tabla 8.

Recientemente algunas publicaciones han propuesto diagramas de flujo, para proporcionar una mejor orientación de cómo realizar la VMA, tal y como lo expone (Morrillas, 2016) y (Srivastava, 2017). La Figura 9 es un diagrama de flujo propuesto por la Eurachem para llevar a cabo la validación. Al ser necesaria la ejecución de un análisis para la detección de analitos en particular, se deben establecer los requisitos analíticos que definirán los parámetros de desempeño a evaluar (ver capítulo 3). Para dar respuesta a los requisitos se debe identificar algún método existente (se debe considerar la existencia de métodos obligatorios por normatividad) o si es necesario desarrollar uno o modificar otro. Posteriormente se evalúa el desempeño del método y si se adecua al uso, se elabora el informe de validación y es posible usar el método. En caso de que el método no tenga un desempeño adecuado y por lo cual no sea adecuado al uso, no es caso perdido, ya que es posible continuar con el desarrollo y reestablecer los requisitos analíticos hasta que el método demuestra su capacidad de cumplir el requisito (Morrillas, 2016).

Respecto a los alimentos se puede encontrar información de parámetros de validación en el *Procedural manual* de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC por sus siglas en inglés) en su vigésimo séptima y más reciente edición, en el describen los fundamentos jurídicos y el funcionamiento práctico de la comisión y de sus órganos auxiliares, así como la importancia que tiene conocer el manual para poder participar eficazmente en la labor de la comisión.

Tabla 8. Principales guías y textos de apoyo a la VMA

| Dependencias | Guía | Contenido |
|-----------------|--|---|
| AOAC | AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. | Definiciones y características de los parámetros de desempeño aplicables a métodos microbiológicos, incluye algunas fórmulas y ejemplos (AOAC INTERNATIONAL, 2012). |
| | Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements | Incluye definiciones, recomendaciones para la evaluación, formulas e intervalos calculados con la ecuación de Horwitz (AOAC INTERNATIONAL, 2016). |
| | AOAC INTERNATIONAL Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. | Definiciones, formulas y algunos criterios de aceptación (AOAC INTERNATIONAL, 2002). |
| CNQFB | Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. | Definiciones, clasificación de métodos, parámetros de desempeño a estudiar de acuerdo a la función, metodologías, formulas y criterios de aceptación (CNQFB, 2002). |
| CODEX | Procedural Manual. | Establecimiento de valores numéricos a los parámetros de desempeño de acuerdo al LM, formulas y ejemplos (CAC, 2019). |
| | Guidelines on analytical terminology. | Definiciones de los parámetros de desempeño (CAC, 2009). |
| EPA | Validation and Peer Review of U.S. Environmental Protection Agency Chemical Methods of Analysis. | Definiciones de los parámetros de desempeño, importancia de estudios interlaboratorio (FEM, 2005). |
| | Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis. | Definiciones y características de los parámetros de desempeño aplicables a métodos microbiológicos, incluye algunas fórmulas (FEM, 2009). |
| Eurachem | La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. | Panorama general de la VMA, definiciones de los parámetros de desempeño, herramientas de validación, metodología recomendada y fórmulas (Morrillas, 2016). |
| FAO | Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América del Sur. | Definiciones, BPL (buenas prácticas de laboratorio) y algunas fórmulas (FAO, 2005). |
| FDA | Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program. | Definiciones, herramientas de validación, parámetros aplicables a métodos cuantitativos y cualitativos y Criterios de aceptación (FDA, 2015). |

El CODEX ha sido organizado en secciones las cuales han variado conforme la edición, siendo siete en la vigésimo séptima edición y un apéndice, en la primera sección se aclara que las normas y textos afines del Codex no sustituyen ni son una solución alternativa a la legislación nacional, que las leyes y procedimientos administrativos de cada país contienen disposiciones que es necesario cumplir sin embargo, el objeto de su publicación es que sirva de guía y fomente la elaboración y el establecimiento de definiciones y requisitos aplicables a los alimentos para facilitar su armonización y así facilitar el comercio internacional, la protección a la salud del consumidor y asegurar la aplicación de prácticas equitativas en el comercio de los alimentos (CAC, 2019).

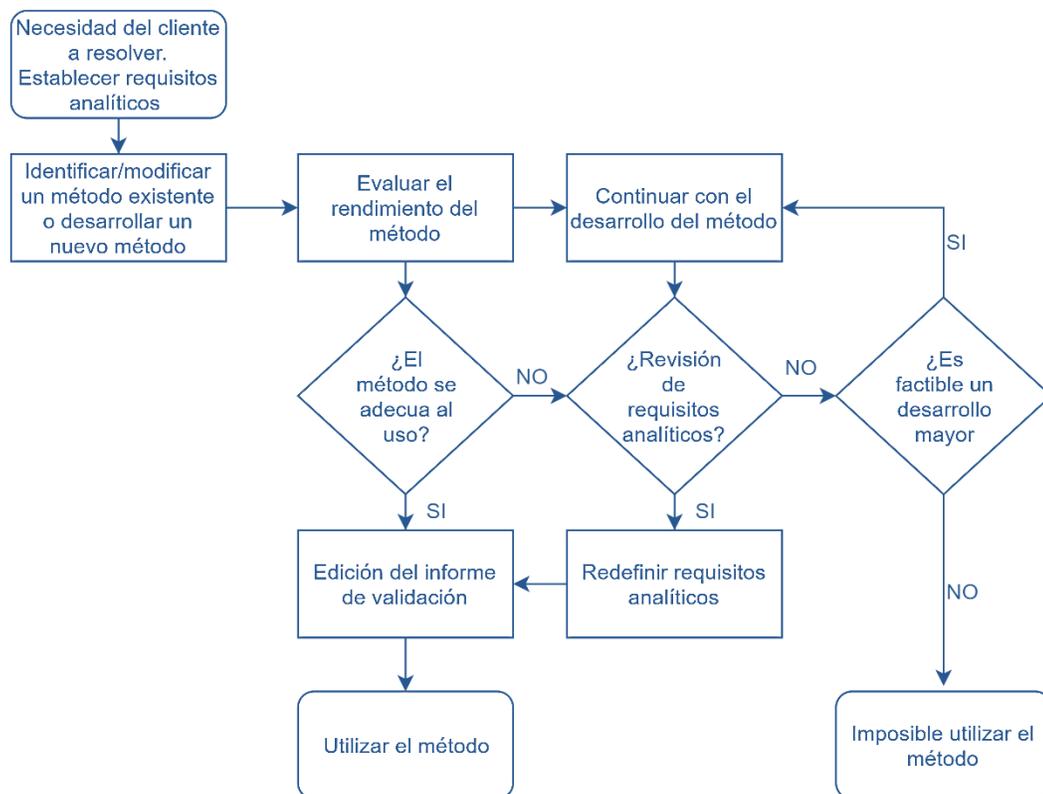


Figura 9. Proceso de validación de métodos
Adaptada de (Morrillas, 2016)

CAPÍTULO 3. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Para el desarrollo del presente capítulo se tomó como principal referencia la sección dos del *Procedural Manual* (CAC, 2019), dentro de la sección dos del se pueden encontrar criterios generales que deben seguir los comités del Codex para la elaboración de normas de la institución, indica que se debe tener preferencia sobre aquellos métodos oficiales de análisis elaborados por organizaciones internacionales que se ocupan de un alimento o un grupo de alimentos, también indica que se debe tener preferencia sobre los métodos de análisis que puedan aplicarse uniformemente a varios grupos de productos y no solo a uno, de la misma manera indica que se dará preferencia a los métodos de análisis cuya seguridad haya sido establecida en relación con los parámetros de desempeño. La CAC señala que en el caso de los métodos de análisis tipo II Y III (Tabla 9) se podrán identificar criterios y cuantificar valores para incorporarlos en la norma Codex con que se esté trabajando (CAC, 2019).

Tabla 9. Clasificación de métodos analíticos según la CAC

| Método | Definición |
|--|---|
| Métodos de definición (Tipo I) | Método que determina un valor al que puede llegarse sólo mediante la aplicación del método en cuestión y que, por definición, es el único método para establecer el valor aceptado del parámetro medido. Ejemplos: Recuento de mohos de Howard, índice Reichert-Meissl, pérdida por desecación, sal en la salmuera por densidad. |
| Métodos de referencia (Tipo II) | Se utilizan cuando no se aplican los métodos del Tipo I. Se seleccionan de entre los métodos del Tipo III (según se definen más adelante). Se recomendará su uso en casos de controversia y para fines de verificación. Ejemplo: Método potenciométrico para haluros. |
| Métodos alternativos aprobados (Tipo III) | Son los que satisfacen todos los criterios exigidos por el Comité sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras para los métodos que pueden emplearse para fines de control, inspección o reglamentación. Ejemplo: Métodos de Volhard o método de Mohr para cloruros. |
| Métodos provisionales (Tipo IV) | Son los que se han empleado tradicionalmente o han comenzado a emplearse recientemente pero respecto de los cuales el Comité sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras no ha determinado todavía todos los criterios que deben satisfacer para su aceptación. Ejemplo: cloro por fluorescencia de rayos X, determinación de la presencia de colores sintéticos en alimentos. |

Fuente: Adaptada de (CAC, 2019).

3.1 Ecuación de Horwitz

Es posible asignar valores numéricos a los parámetros de aplicabilidad, el Límite de Detección (LD), el Límite de Cuantificación (LC), la precisión y la recuperación (ver sección 3.2-3.6) haciendo uso de ecuaciones sencillas (aplicabilidad y precisión conllevan el uso de la ecuación de Horwitz) y conociendo el LM, el LM tiene diversos significados como nivel máximo, nivel mínimo, nivel regulado o grado de concentración (CAC, 2019) esto debido a la concentración que se haya establecido tenga el analito de interés en el producto por ejemplo, para la leche pasteurizada entera se ha establecido por normatividad una concentración “mínima” de grasa de 30g/L por lo cual sería llamado nivel mínimo, mientras que para la leche pasteurizada descremada se ha establecido una concentración “máxima” de grasa de 5g/L por lo cual sería llamado nivel máximo, existen diversas formas de llamar al LM a pesar de que se trata de la misma sustancia (NOM-155, 2012). El uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayo ha tomado gran relevancia, algunas entidades como el Codex Alimentarius y la Asociación Nacional de Autoridades de Prueba (NATA, por sus siglas en inglés National Association of Testing Authorities), reconocen a la ecuación de Horwitz como un constituyente relevante en la estimación de la incertidumbre analítica (Rivera & Rodríguez, 2010). En 1980 Horwitz, Kamps y Boyer comprobaron, a través de un estudio estadístico con una serie de datos provenientes de ensayos de interlaboratorios organizados por la AOAC, que a medida que la concentración del analito disminuía la Desviación Estándar Relativa (DER) aumentaba comportándose como en la Figura 10 (Rivera & Rodríguez, 2010).

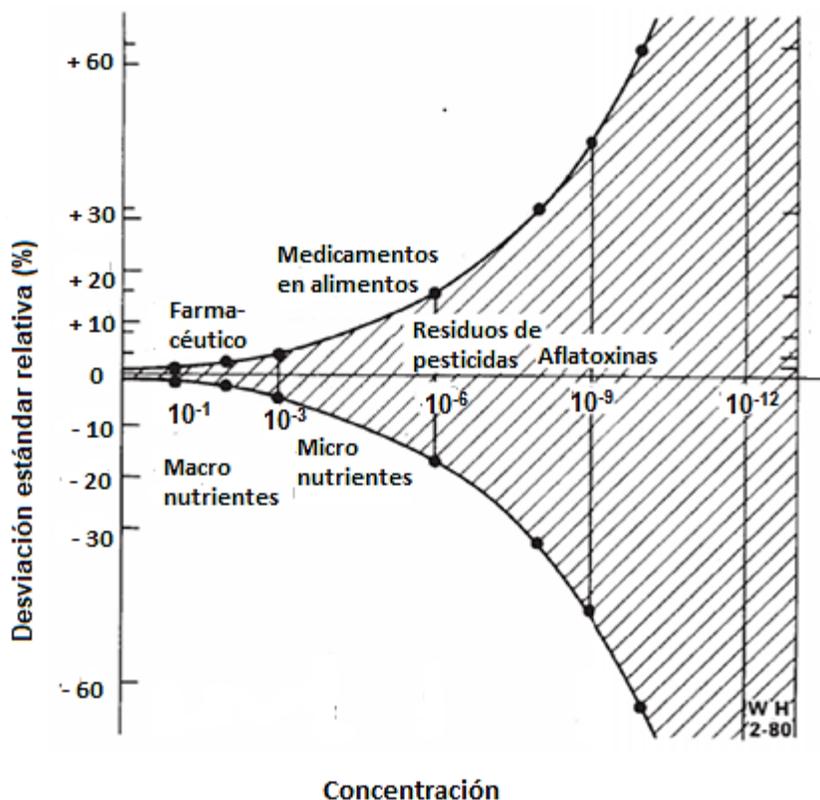


Figura 10. Trompeta de Horwitz
Tomada de: (Rivera & Rodríguez, 2010).

A partir de esto fue posible establecer la DER bajo condiciones de reproducibilidad (ecuación 1) donde $PRSD_R$ es la desviación estándar de la reproducibilidad prevista o calculada (DER en nomenclatura Codex) y C es el coeficiente de concentración. En 2006 Horwitz aclaró que la trompeta de Horwitz no es aplicable para determinados métodos analíticos donde los analitos dependen de detalles específicos del método como humedad, cenizas y fibra, tampoco es aplicable para analitos indefinidos como polímeros, enzimas y varias biomoléculas y métodos físicos como densidad, viscosidad y peso drenado (Rivera & Rodríguez, 2010).

$$PRSD_R(\%) = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (1)$$

En 1999 Michael Thompson transformó la ecuación (1) en una forma equivalente ecuación (2), conocida como la ecuación de Horwitz - Thompson (Rivera & Rodríguez, 2011).

$$PRSD_R(\%) = 100 * \frac{S_R}{c} = 2C^{(-0.1505)} \quad (2)$$

Thompson reportó que para concentraciones menores de 120 µg/kg la PRSD_R según lo predicho por la ecuación de Horwitz es menos aplicable y sugirió usar un valor fijo de 22% (ecuación 3) (Van den & Mol, 2017).

$$PRSD_R(\%) = 22\% \quad (3)$$

La DER ha sido propuesto para evaluar el desempeño de las pruebas interlaboratorio para lo cual se diseñó la relación HorRat (ecuación 4), en la práctica los valores aceptables oscilan entre 0.5 y 2, un valor menor a 0.5 puede indicar promedios no reportados o excelente entrenamiento, valores superiores a dos indican la no homogeneidad de las muestras, necesidad de mejorar el método, necesidad de mejorar el entrenamiento, operaciones bajo el límite de cuantificación o un método no satisfactorio (Rivera & Rodríguez, 2010).

$$\frac{RSD_R}{PRSD_R} \quad (4)$$

También se ha indicado que si el valor de Si HorRat es << 1, se sospecha que el ensayo de colaboración no fue realizado correctamente y proporciona valores de precisión que son demasiado optimistas debido a menos participantes. Si HorRat está cerca de 1, la precisión del método en términos de reproducibilidad está cerca al valor predicho. Si HorRat es >> 1, el método analítico es indudablemente sospechoso debido a deficiencias de método o debido a interferencias, contaminaciones o no homegeneidad de la muestra (Haustein, 2015).

3.2 Aplicabilidad

En el sector alimenticio se utiliza el término de aplicabilidad como sinónimo de alcance, es definido como las concentraciones del analito para las cuáles el método de análisis se puede usar satisfactoriamente, la aplicabilidad contempla las interferencias que pueden presentarse a bajas y altas

concentraciones al momento de realizar un análisis, el método debe ser aplicable en la matriz, categoría de producto o alimento especificado (Morrillas, 2016). La aplicabilidad se trabaja como un intervalo por encima y del LM establecido, y por debajo del mismo (pero por encima del LD Y LC los cuales de acuerdo al *Procedural manual* pueden ser usados para establecer el límite inferior ver sección 3.3 y 3.4), de dicho intervalo el límite superior pocas veces actuara como factor limitador. El intervalo de concentración mínimo aplicable debe equivaler a un intervalo que contenga una fracción importante de la variación esperada en los resultados similar al LM especificado, esto como consecuencia de la incertidumbre de la medición (CAC, 2019).

- Para un $LM \geq 10^{-7}$, el intervalo mínimo aplicable debe ser: $LM \pm 3s_R$
- Para un $LM < 10^{-7}$, el intervalo mínimo aplicable debe ser: $LM \pm 2s_R$

Las expresiones anteriores ayudan a establecer valores numéricos al Intervalo mínimo aceptable, se debe contemplar el LM y la desviación estándar de la reproducibilidad (s_R), los números que acompañan a la desviación estándar se conocen como factor de cobertura, un factor de cobertura de 2 equivale a un nivel de confianza del 95% aproximadamente, un factor de cobertura de 3 equivale a un nivel de confianza del 99% aproximadamente. Se recomienda aplicar un factor de cobertura de 3 a los coeficientes de concentración iguales o mayores que 0.1 mg/kg. Cuando las concentraciones sean inferiores a 0.1 mg/kg, se aconseja emplear un factor de cobertura de 2, ya que el factor de cobertura de 3 dificultaría la identificación de determinados analitos debido al bajo nivel en el que se encuentran (CAC, 2019).

Cuando se conoce el LM la DER puede calcularse basándose en la ecuación (2) de Horwitz-Thompson, siempre y cuando los coeficientes de concentración sean $\geq 10^{-7}$ (≥ 0.1 mg/kg) (CAC, 2019). Retomando la ecuación (2)

$$PRSD_R(\%) = 100 * \frac{s_R}{c} = 2C^{-0.1505} \quad (2)$$

Donde:

PRSD_R: la desviación estándar relativa “prevista”

s_R: la desviación estándar prevista

c: es el LM

C: coeficiente de concentración del LM (C_{LM})

Tras reestructurar la ecuación en lo que respecta a s_R, se obtiene la ecuación siguiente:

$$S_R = \frac{c * 2C^{-0.1505}}{100} \quad (5)$$

Al sustituir

$$S_R = \frac{LM * 2C_{LM}^{-0.1505}}{100} \quad (6)$$

Finalmente para un LM ≥ 10⁻⁷ (0.1 mg/kg), el intervalo mínimo aplicable debe ser:

$$LM \pm 3 \frac{LM * 2C_{LM}^{-0.1505}}{100} \quad (7)$$

Para coeficientes de concentración < 10⁻⁷ (0,1 mg/kg), se aplica la teoría de Thompson (ecuación 3), esto es,

$$PRSD_R(\%) = 22\% \quad (3)$$

Al igualar con la ecuación de Horwitz y Thompson se obtiene

$$22 = 100 * \frac{S_R}{c} \quad (8)$$

Tras reestructurar la ecuación en lo que respecta a s_R, se obtiene la ecuación siguiente

$$S_R = 0.22 * LM \quad (9)$$

Finalmente para un LM < 10⁻⁷ (0.1 mg/kg), el Intervalo mínimo aplicable debe ser:

$$LM \pm 2(0.22 * LM) \quad (10)$$

Realizar el cálculo para establecer el Intervalo mínimo aplicable es muy sencillo, basta con utilizar las ecuaciones (7) y (10), la Tabla 10 incluye algunos valores calculados para LM específicos.

Tabla 10. Intervalo mínimo aplicable para LM establecidos

| LM | mg/kg | | | | | g/kg | | |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1 | 10 |
| C_{LM} | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻³ | 10 ⁻² |
| Intervalo mínimo aplicable | 0.0006- 0.0014 | 0.006- 0.014 | 0.03- 0.17 | 0.52- 1.48 | 6.6- 13.3 | 76- 124 | 0.83- 1.2 | 8.8- 11 |

Fuente: Adaptada de (CAC, 2019)

3.3 Límite de detección (LD)

El Límite de detección, es la concentración o cantidad de analito en el material a analizar que es más grande que el blanco (CAC, 2009). Una definición más clara la proporciona el CENAM (Centro Nacional de Metrología) y EMA, se trata de la concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas (CENAM & EMA, 2008A). En términos generales, el LD es aquella concentración que proporciona una señal significativamente diferente del blanco y ruido de fondo (Miller & Miller, 2002).

El LD es un parámetro que puede resultar afectado por cambios menores del sistema analítico tales como temperatura, pureza de los reactivos, efectos de matriz y condiciones instrumentales, por lo tanto, es importante que este parámetro sea siempre verificado por laboratorios que hayan adoptado métodos previamente validados (UNODC, 2010). Cabe aclarar que existe una diferencia entre el LD del método y el LD del instrumento, el cual puede basarse en el análisis de una muestra omitiendo el paso de preparación o en una relación señal ruido (Morrillas, 2016). Es posible establecer el valor del LD conociendo el LM, el LD no debe ser más de una décima parte del LM especificado para niveles iguales o mayores que 0,1 mg/kg, y no más de una

quinta parte del LM especificado por debajo de 0,1 mg/kg, tal y como se indica en las expresiones 11 y 12, la Tabla 11 presenta valores calculados para LM específicos (CAC, 2019).

- Respecto de un $LM \geq 0,1 \text{ mg/kg}$, $LD \leq LM \cdot 1/10$. (11)
- Respecto de un $LM < 0,1 \text{ mg/kg}$, $LD \leq LM \cdot 1/5$. (12)

Tabla 11 Valores calculados del LD para LM establecidos

| LM | mg/kg | | | | | | g/kg | |
|--------------------|--------|-------|------|-----|----|-----|------|------|
| | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1 | 10 |
| LD (\leq mg/kg) | 0.0002 | 0.002 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1000 |

Fuente: Adaptada de (CAC, 2019)

Experimentalmente el LD se obtiene a partir de los resultados de entre 6 y 15 réplicas de medida (10 para casos de validación), las medidas replicadas deben ser de muestras blanco, es decir matrices que no contengan cantidades detectables del analito o de muestras de ensayo con una baja concentración del analito, el uso de blancos es ideal para los casos de espectrometría y espectroscopia atómica y muestras fortificadas cercanas del LD para técnicas como la cromatografía, cuando no se dispone de muestras blanco es posible usar blancos de reactivos. Una vez realizadas la replicas se obtiene de los datos la desviación estándar S_0 la cual es ajustada S'_0 y es usada para calcular el LD, la Tabla 12 muestra la determinación experimental (Morrillas, 2016).

Tabla 12. Determinación experimental del LD

| Qué hacer | Cuántas veces | Cálculos | Notas |
|-------------------------------|---------------|---------------------------------|---|
| Mediciones de muestras blanco | 10 | Calcular la desviación estándar | Ajustar la desviación estándar haciendo uso de la ecuación 13 (cuando no se requiere corrección de los resultados por uso de blanco) o 14 (cuando se necesita requiere corrección de los resultados por uso de blanco), finalmente calcular el LD utilizando la ecuación (15). La desviación estándar se expresa en unidades de concentración sin embargo, cuando se expresa en ambito de señal se debe utilizar la ecuacion (16). |

Fuente: adaptada de (Morrillas, 2016)

$$S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad (13)$$

$$S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} \quad (14)$$

$$LD = 3(S'_0) \quad (15)$$

$$LD = y_B + (3S'_0) \quad (16)$$

Donde

S'_0 : desviación estándar ajustada

S_0 : desviación estándar

n_b : número de observaciones del blanco

n : número de réplicas

y_B : señal del blanco

Se presenta un ejemplo del cálculo en el cual se analiza una muestra blanco y se hacen diez mediciones independientes. El promedio reportado de las mediciones es de 2 mg/kg y una desviación estándar de 1 mg/kg. El procedimiento se realiza una vez y se indica que los resultados deben corregirse por una única muestra blanco (Morrillas, 2016). Al ser necesaria la corrección se emplea la ecuación (14) para calcular la desviación estándar ajustada y posteriormente la (15) para calcular el LD (también es posible calcular el LC a partir de la desviación estándar ajustada obtenida, ver sección 3.4).

$$S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{1}} = 1.4 \frac{mg}{kg}$$

$$LD = 3(S'_0) = 4.2 \frac{mg}{kg}$$

3.4 Límite de cuantificación (LC)

Se define como una característica de rendimiento del método, generalmente expresada en términos de señal o valor de medición, que producirá estimaciones con una DER específica, comúnmente 10% o 6% (CAC, 2009).

También se define como aquel valor de concentración mínimo que puede obtenerse con una imprecisión aceptable (CENAM & EMA, 2008A).

Es posible establecer el valor del LC conociendo el LM. El LC no debe ser más de una quinta parte del LM especificado para niveles iguales o mayores que 0,1 mg/kg, y no debe ser más de dos quintas partes del LM especificado por debajo de 0,1 mg/kg tal y como se indica en las expresiones 17 y 18, la Tabla 13 muestra valores calculados para LM específicos (CAC, 2019).

- Respecto de un $LM \geq 0,1 \text{ mg/kg}$, $LC \leq LM \cdot 1/5$ (17)
- Respecto de un $LM < 0,1 \text{ mg/kg}$, $LC \leq LM \cdot 2/5$ (18)

Tabla 13. Valores calculados del LC para LM establecidos

| LM | mg/kg | | | | | | g/kg | |
|--------------------|--------|-------|------|-----|----|-----|------|------|
| | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1 | 10 |
| LC (\leq mg/kg) | 0.0004 | 0.004 | 0.02 | 0.2 | 2 | 20 | 200 | 2000 |

Fuente: Adaptada de (CAC, 2019)

La determinación experimental del LC es idéntica a la determinación experimental del LD (ver sección 3.3), en cuanto a los cálculos la similitud solo llega hasta la obtención de la desviación estándar ajustada, al final esta debe multiplicarse por un factor k_Q , cuyo valor es usualmente de 10 (ecuación 19) para la obtención del LC. El valor por defecto para k_Q es 10 y si la desviación estándar casi constante a bajas concentraciones este multiplicador corresponde a una DER de 10 %. Los multiplicadores 5 y 6 ha sido usados ocasionalmente lo cual corresponde a valores de DER de 20 % y 17 % respectivamente (Morrillas, 2016).

$$LC = k_Q(s'_0) \quad (19)$$

Se presenta un ejemplo en el cual se analiza una muestra blanco y diez mediciones independientes de una muestra blanco. El promedio reportado de las mediciones es de 2 mg/kg y una desviación estándar de 1 mg/kg. El procedimiento se realiza dos veces y se indica que los resultados deben

corregirse por una dos muestras blanco (Morrillas, 2016). Al ser necesaria la corrección se emplea la ecuación (14) para calcular la desviación estándar ajustada y posteriormente la (19) para calcular el LC (también es posible calcular el LD a partir de la desviación estándar ajustada).

$$S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{2}} = 1 \frac{mg}{kg}$$

$$LC = 10(S'_0) = 10 \frac{mg}{kg}$$

3.5 Precisión

Se define como la cercanía del acuerdo entre los resultados independientes de prueba/medición obtenidos bajo condiciones estipuladas (CAC, 2009). Considerar la precisión surge debido a que las determinaciones analíticas que se realizan con materiales y condiciones idénticas de trabajo, en general, no arrojan los mismos resultados, lo cual es atribuible a los inevitables errores aleatorios de cada proceso de determinación tales como el analista, equipo y calibración del mismo, medio ambiente y tiempo que separa a las mediciones dado que dichos factores no pueden ser controlados completamente (Fernández, 2004). El valor numérico de la precisión en condiciones de reproducibilidad se obtiene al comparar la DER obtenida (RSD_R) con la DER prevista ($PRSD_R$). Según Horwitz, el valor HorRat debería ser ≤ 2 (ecuación 4) (ver sección 3.1) obteniéndose la expresión (20), entonces se calcula la $PRSD_R$ con la ecuación de Horwitz y Thompson y se multiplica por dos, así la RSD_R debe ser igual o menor a ese valor. La Tabla 14 contiene los valores de precisión calculados para LM establecidos (CAC, 2019). Para concentraciones menores de 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ la $PRSD_R$ usa un valor fijo de 22% (ver sección 3.1), por lo cual la RSD_R toma un valor fijo de 44.

$$\frac{RSD_R}{PRSD_R} \leq 2 \quad (4)$$

$$RSD_R \leq 2 * PRSD_R \quad (20)$$

Tabla 14. Valores calculados del RSDR para LM establecidos

| LM | mg/kg | | | | | g/kg | | | | |
|------------------------|-------|------|-----|----|----|------|----|----|-----|------|
| | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1000 |
| RSD _R (%) ≤ | 44 | 44 | 44 | 32 | 22 | 16 | 12 | 8 | 6 | 4 |

Fuente: Adaptada de (CAC, 2019)

Existen tres formas de precisión: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, es posible establecer el criterio de aceptación para las tres haciendo uso de la ecuación (21), el factor $\sqrt{2}$ refleja la diferencia entre dos mediciones, t es la t de Student a dos colas para determinados Grados de libertad (gl), para un número relativamente grande de gl la $t \approx 2$ a un nivel de confianza del 95% por lo que se emplea la ecuación (22) (Morrillas, 2016).

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r \quad (21)$$

$$r = 2.8 \times s_r \quad (22)$$

La Tabla 15 contiene la descripción para la determinación de las tres formas de precisión, se debe medir Materiales de Referencia (MR), muestras excedentes de ensayo o blancos de muestra adicionados a diversas concentraciones en todo el intervalo de trabajo (Morrillas, 2016).

Tabla 15. Determinación experimental de la precisión

| Determinación | Cuántas veces | Cálculos |
|--|--|---|
| Repetibilidad | 6-15 réplicas para cada material. | Determinar la desviación estándar de los resultados para cada material. |
| Precisión intermedia | 6-15 réplicas para cada material. | Determinar la desviación estándar de los resultados para cada material. |
| Repetibilidad y precisión intermedia simultanea | 6-15 grupos de medidas duplicadas obtenidas bajo condiciones de repetibilidad en días/equipos diferentes para cada material. | Calcular la desviación estándar de repetibilidad de los resultados de ANDEVA (Análisis de Varianza) para cada material. Calcular la desviación estándar entre grupos de los resultados de ANDEVA y combinarla con la desviación estándar de repetibilidad para cada material. |
| Reproducibilidad | 6-15 grupos de medidas duplicadas obtenidas bajo condiciones de repetibilidad en diferentes laboratorios para cada material. | Calcular la desviación estándar de repetibilidad de los resultados de ANDEVA para cada material. Calcular la desviación estándar entre laboratorios de los resultados de ANDEVA y combinarla con la desviación estándar de repetibilidad para cada material. |

Fuente: adaptada de (Morrillas, 2016)

- **Repetibilidad**

La repetibilidad es una medida de la variación en los resultados cuando la medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo (Morrillas, 2016). Se presenta un ejemplo adaptado para el estudio de la repetibilidad.

Ejemplo

Un analista capacitado llevo a cabo la determinación del contenido de un analito en jamón, analizó seis muestras, preparadas de manera independiente, con el método analítico que está que está validando en un solo día, bajo las mismas condiciones, equipo, materiales, laboratorio, entre otros, en un intervalo de tiempo razonablemente corto, la Tabla 16 se presentan los resultados de las determinaciones. Se obtuvo la DER la cual se contrasta con el especificado en el método cuyo valor es de 2.00 %, como la DER calculada es inferior al criterio establecido, se considera que el método es reproducible (Hernández, 2018).

Tabla 16. Concentración de un analito en jamón

| Repetición | Concentración |
|----------------------------|---------------|
| 1 | 0.689 |
| 2 | 0.687 |
| 3 | 0.684 |
| 4 | 0.691 |
| 5 | 0.694 |
| 6 | 0.692 |
| Media | 0.6895 |
| Desviación estándar | 0.0036 |
| DER (%) | 0.5249 |

Fuente: Elaboración propia con datos de (Hernández, 2018)

- **Precisión intermedia**

La precisión intermedia es una medida de la variación de los resultados en un laboratorio pero usando condiciones diferentes tales como distintos

analistas, intervalos de tiempo prolongados etcétera (Morrillas, 2016). A continuación se presenta un ejemplo adaptado para la determinación de la precisión intermedia.

Ejemplo 1

En un laboratorio se llevó a cabo la determinación de un analito en cerveza con el método que se está validando, la determinación fue realizada por dos analistas, ambos trabajando en dos días consecutivos, por lo cual se requiere saber si el método satisface el criterio de aceptación de precisión intermedia. El diseño de experimentos de factores cruzados es el adecuado para llevar a cabo el estudio de precisión intermedia ya que el número de analistas y de días presentan el número máximo de combinaciones (Figura 11). La Tabla 17 contiene los valores de las determinaciones y algunos datos que sirven de apoyo para realizar los cálculos del análisis de varianza (ANDEVA), la Tabla 18 contiene el ANDEVA (Hernández, 2018).

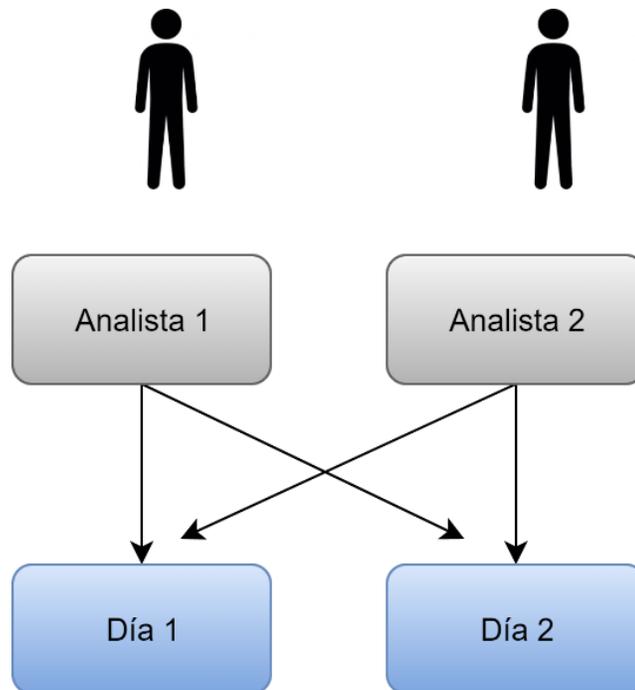


Figura 11. Factores cruzados analista – día
Elaboración propia

Tabla 17. Concentración de un analito en cerveza

| Día | Analista 1 | Analista 2 |
|---|------------|------------|
| Día 1 | 0.511 | 0.511 |
| | 0.508 | 0.512 |
| | 0.514 | 0.514 |
| Día 2 | 0.513 | 0.511 |
| | 0.512 | 0.510 |
| | 0.510 | 0.515 |
| Analistas (l) | 2 | |
| Días (j) | 2 | |
| Repeticiones (k) | 3 | |
| Nivel de significancia (α) | 0.05 | |

Fuente: Elaboración propia, con datos de (Hernández, 2018)

Tabla 18. ANDEVA de dos factores para la estimación de la precisión intermedia

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------|
| Día | 8.3E-08 | 1 | 8.3E-08 | 1.6E-02 |
| Analista | 2.1E-06 | 1 | 2.1E-06 | 4.0E-01 |
| Interacción AD | 7.5E-07 | 1 | 7.5E-07 | 1.5E-01 |
| Dentro del grupo | 4.1E-05 | 8 | 5.2E-06 | |
| Total | 4.4E-05 | 11 | | |

Elaborado en Excel, nivel de confianza 95%

Con los valores de F de tablas se establece una zona de no rechazo (Figura 12), en la cual el factor analista y la interacción se encuentran en la zona de no rechazo, mientras que el factor día se encuentra en la zona de rechazo por lo cual, se concluye que no se presenta interacción entre los factores, hay precisión intermedia entre analistas pero no entre los días de trabajo. Para la interacción el valor de F cae dentro de la zona de no rechazo.

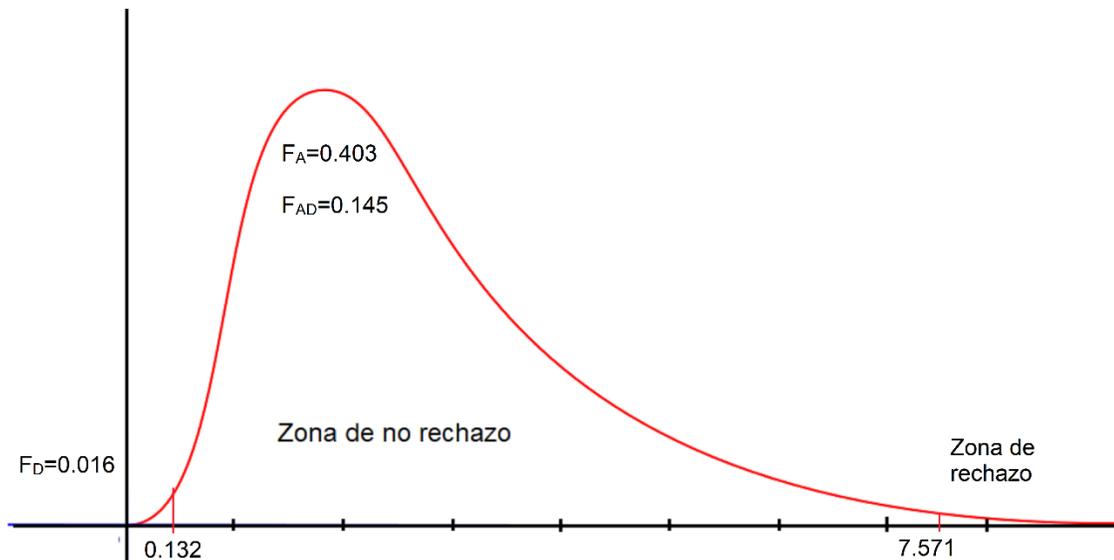


Figura 12. Distribución F para la precisión intermedia

Fuente: Adaptado de (Hernández, 2018)

Ejemplo 2

Determinación de la precisión intermedia utilizando un diseño de experimentos de factores anidados. En un laboratorio se llevó a cabo la determinación de un analito en una bebida mediante un método a validar, la determinación fue realizada por dos analistas, uno de ellos trabajando martes y miércoles y otro jueves y viernes, por lo cual se requiere saber si el método presenta precisión intermedia. En este caso el diseño experimentos de factores anidados es el adecuado para llevar a cabo el estudio de precisión intermedia, debido a que el factor día depende del factor analista, ya que cada uno trabajó en días diferentes (Figura 13). La Tabla 19 contiene los valores de las determinaciones (no incluye unidades) y algunos valores que sirven de apoyo para realizar los cálculos de la ANDEVA de dos factores la cual se encuentra en la Tabla 20.

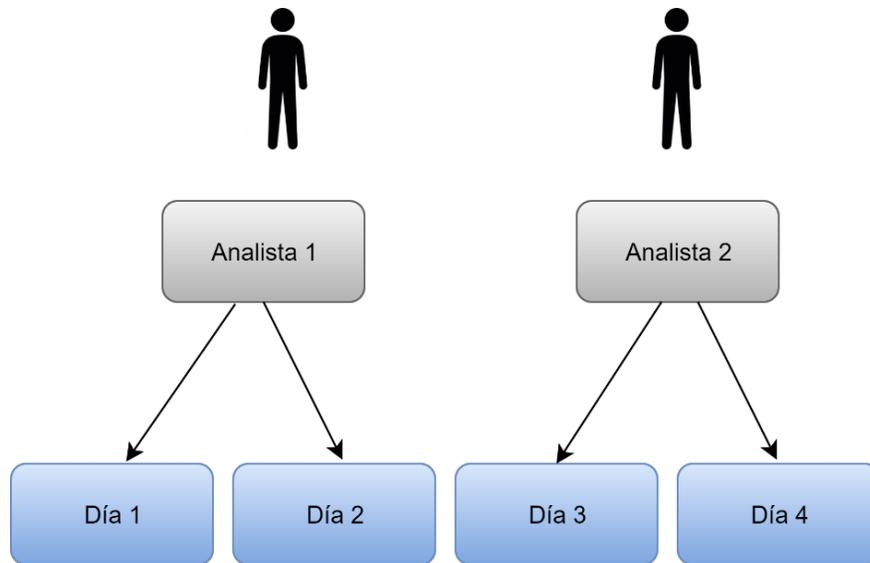


Figura 13. Factores anidados analista – día
Elaboración propia

Tabla 19. Concentración de un analito en una bebida

| Día | Analista 1 | Analista 2 |
|-----------------------------------|------------|------------|
| Día 1 | 0.511 | 0.512 |
| | 0.511 | 0.512 |
| | 0.514 | 0.513 |
| Día 2 | 0.513 | 0.511 |
| | 0.512 | 0.510 |
| | 0.513 | 0.512 |
| Número de analistas (i) | 2 | |
| Días (j) | 2 | |
| Determinaciones (k) | 3 | |
| Alfa (α) | 0.05 | |

Fuente: adaptado de (Hernández, 2018)

Tabla 20. ANDEVA de dos factores para la estimación de la precisión intermedia

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------|
| Analista | 1.3E-06 | 1 | 1.3E-06 | 1.1E+00 |
| Día | 3.3E-07 | 2 | 1.6E-06 | 1.4E+00 |
| Dentro del grupo | 9.3E-06 | 8 | 1.2E-06 | |
| Total | 0.000014 | 11 | | |

Fuente: adaptado de (Hernández, 2018)

A partir de los valores de F de tablas se establece una zona de no rechazo tanto para el analista (Figura 14) como para el día (Figura 15), en ambos

casos el valor de F calculado cae dentro de la zona de no rechazo por lo cual se concluye que el método presenta precisión intermedia.



Figura 14. Distribución para la precisión intermedia, factor analista
Fuente: Adaptado de (Hernández, 2018)

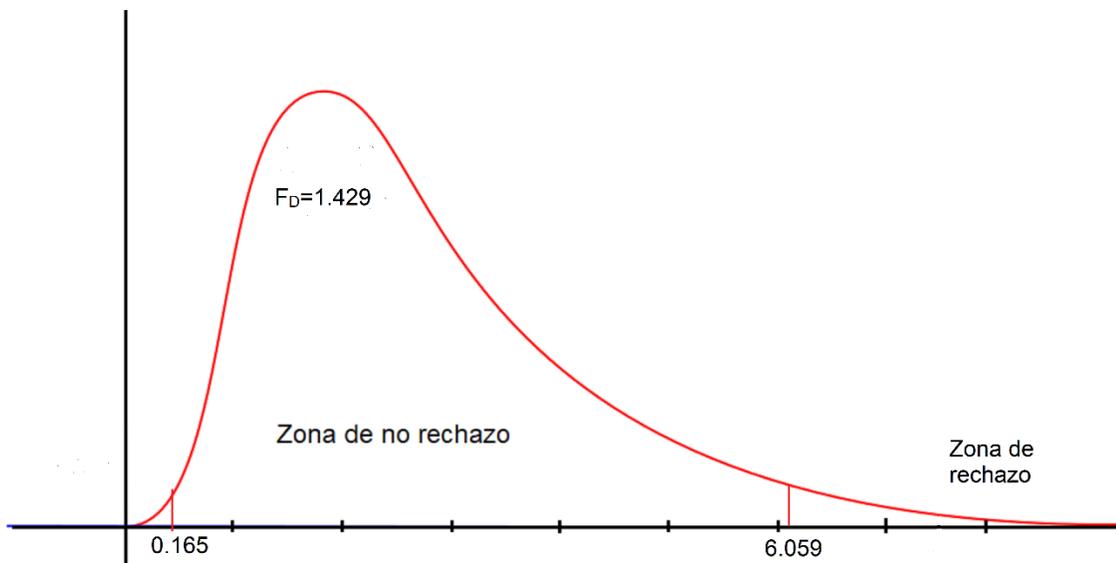


Figura 15. Distribución para la precisión intermedia, factor día
Fuente: Adaptado de (Hernández, 2018)

- **Reproducibilidad**

La reproducibilidad es una medida de la variación en los resultados entre laboratorios usando el mismo método, aunque también pueden ser la variación entre laboratorios empleando diferentes métodos midiendo una misma magnitud (Morrillas, 2016). A continuación se muestra un ejemplo para el cálculo de la reproducibilidad.

Ejemplo

Se llevó a cabo la determinación del contenido de un analito en agua embotellada en dos laboratorios diferentes, usando el mismo método, el uso de una ANDEVA de un factor permite estudiar la variación debida al laboratorio. La Tabla 21 contiene los resultados de las determinaciones (no se indican las unidades) y algunos valores que sirven de apoyo para realizar el ANDEVA incluido en la Tabla 22 (Hernández, 2018).

Tabla 21. Concentración de un analito en agua embotellada

| Lectura | Laboratorio A | Laboratorio B |
|---|---------------|---------------|
| 1 | 0.689 | 0.687 |
| 2 | 0.687 | 0.679 |
| 3 | 0.684 | 0.688 |
| 4 | 0.691 | 0.685 |
| 5 | 0.694 | 0.691 |
| 6 | 0.692 | 0.698 |
| Número de determinaciones (k) | 6 | 6 |
| Numero de laboratorios (i) | 2 | |
| Valor de significancia (α) | 0.05 | |

Fuente: adaptado de (Hernández, 2018)

Tabla 22. ANDEVA de un factor para la estimación de la reproducibilidad

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------|
| Laboratorio | 6.75E-06 | 1 | 6.75E-06 | 0.254 |
| Réplicas | 2.65E-04 | 10 | 2.65E-05 | |
| Total | 2.72E-04 | 11 | | |

Elaborado en Excel

Los valores de F de tablas permiten establecer una zona de no rechazo (Figura 16), en la cual la F calculada se encuentra dentro de la zona de no rechazo, por lo que se concluye que el método analítico es reproducible.

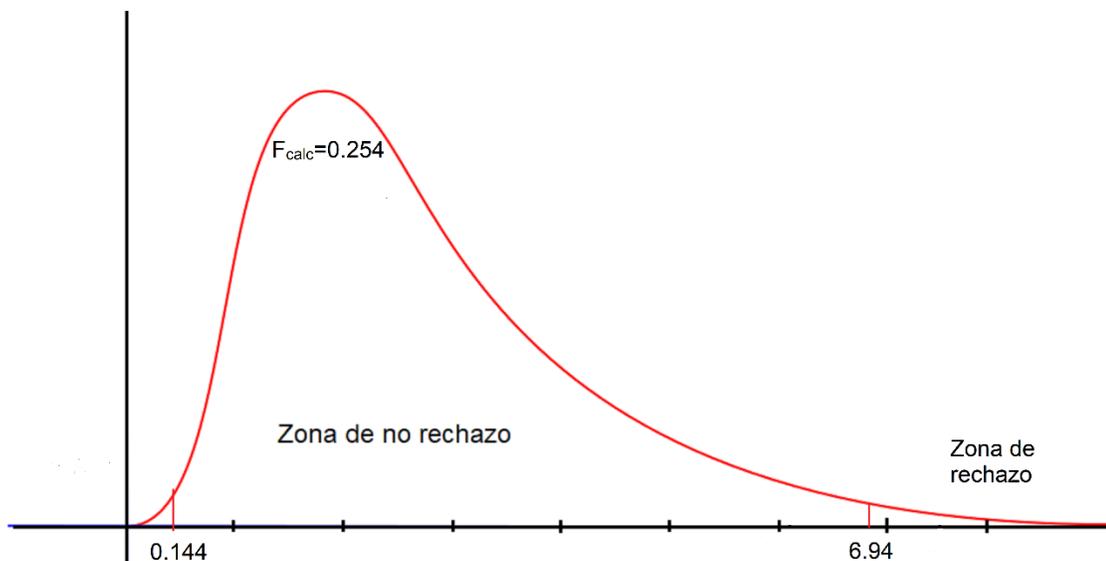


Figura 16. Distribución F para la reproducibilidad

Fuente: Adaptado de (Hernández, 2018)

3.6 Recuperación

La ejecución de métodos analíticos inicia con la recolección de las muestras, prosigue con pasos intermedios y culmina con el reporte de los resultados, los pasos intermedios en ocasiones conllevan pasos de extracción de compuestos de interés, una forma de determinar cuánto analito de interés se está recuperando, al someterlo a pasos de manipulación es el porcentaje de recuperación (Escalona, 2004). La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés International Union of Pure and Applied Chemistry) define la recuperación en el Gold book como la fracción de la cantidad total de una sustancia recuperable siguiendo un procedimiento químico (IUPAC, 2019). Entonces el hecho de que la recuperación sea relevante o no dependerá del procedimiento del método por ejemplo, en un método que no se requiera la extracción del analito, la recuperación no será pertinente (CAC, 2019).

La recuperación es definida como la proporción de la cantidad de analito, presente, agregado o presente y agregado a la porción analítica del material de prueba, que se presenta para medición (CAC, 2009), la definición de la CAC está más relacionada a lo realizado experimentalmente. La CAC no indica una forma de calcular los valores de recuperación sin embargo proporciona los valores recomendados para LM establecidos, los cuales se encuentran en la Tabla 23.

Tabla 23. Valores de recuperación recomendados para concentraciones establecidas

| LM | µg/kg | | | mg/kg | | | | g/100g | | |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 10 | 100 | 1 | 10 | 100 | 1000 | 1 | 10 | 100 |
| Recuperación (%) | 40-120 | 60-115 | 80-110 | 80-110 | 80-110 | 90-107 | 95-105 | 97-103 | 98-102 | 98-102 |

Fuente: Adaptado de (CAC, 2019)

Es posible establecer la recuperación de diversas formas y esto dependerá de la forma en la que se realizó el procedimiento experimental ya sea por fortificación de muestras o por el uso de MRC, la Tabla 24 contiene la determinar la recuperación.

Tabla 24. Determinación experimental de la recuperación

| Qué hacer | Cuántas veces | Cálculos | Notas |
|--|---------------|----------------------------|--|
| Mediciones de muestras no fortificadas y fortificadas con el analito de interés en un intervalo de concentraciones | 10 | Calcular la media de ambas | Realizar el cálculo haciendo uso de la ecuación (23) |
| Mediciones del MRC | 10 | Calcular la media | Realizar el cálculo haciendo uso de la ecuación (24) |

Fuente: adaptado de (Morrillas, 2016)

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_A} * 100 \quad (23) \quad R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_R} * 100 \quad (24)$$

Donde

\bar{x}' : concentración promedio de la muestra fortificada

\bar{x} : concentración promedio de la muestra sin fortificar

x_A : concentración añadida

x_R : concentración del material de referencia

Se presenta un ejemplo del cálculo de precisión. En un estudio para validar un método para la determinación de un metal en trigo mediante AA se utilizaron muestras fortificadas en diferentes concentraciones, por triplicado, se reportaron los valores de la Tabla 25. Al tratarse de muestras fortificadas se hace uso de la ecuación (23) con los valores de concentración reportados, se observa que el valor de recuperación reportado coincide con el calculado (Suarez, Evelia, Linares, Francisco, & Hernández, 2009).

$$R'(\%) = \frac{\bar{X}' - \bar{X}}{X_A} * 100 = \frac{0.064 - 0.012}{0.050} * 100 = 104\%$$

Tabla 25. Evaluación de la recuperación

| Concentracion inicial del metal en la muestra mg/dL | Concentración del patrón de metal añadido mg/dL | Concentracion promedio de la muestra + patron añadido mg/dL | Recuperacion (%) |
|---|---|---|------------------|
| 0.012 | 0.050 | 0.064 | 104 |
| 0.012 | 0.100 | 0.111 | 99 |
| 0.012 | 0.150 | 0.161 | 99.33 |

Fuente: Adaptado de (Suarez, Evelia, Linares, Francisco, & Hernández, 2009).

Se presenta un ejemplo de cálculo utilizando un MR. Se desea determinar el porcentaje de recuperación para la cuantificación de glucosa por el método GOD-PAP, un método espectrofotométrico enzimático para la detección de glucosa en sangre (Kovalent, 2011), se realizaron 10 lecturas de suero control de concentración de 106 mg/dL, y se obtuvo una media de 109.45 mg/dL. El porcentaje de recuperación se calcula con la ecuación (24) debido a que se utilizó un MRC, indica que el porcentaje de recuperación debe encontrarse dentro de lo establecido por el fabricante para que sea aceptado (CENAM & EMA, 2008A).

$$R(\%) = \frac{\bar{X}}{X_R} * 100 = \frac{109.45}{106} = 103.2\%$$

3.7 Sesgo

Una de las principales características de un método que se debe conocer es si los resultados reflejan un valor verdadero para la propiedad o analito y si no es así, si puede cuantificarse y posiblemente corregir ese sesgo (Zagal & Sadzawka, 2007). El sesgo es definido como “*la diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero*” (CAC, 2009). La Tabla 26 contiene las recomendaciones para la determinación experimental del sesgo.

Tabla 26. Determinación experimental del sesgo

| Qué hacer | Cuántas veces | Cálculos | Notas |
|--------------------|---------------|-------------------------------------|---|
| Mediciones del MRC | 10 | Calcular la media de los resultados | Realizar el cálculo haciendo uso de la ecuación (25) para expresar el sesgo como un término absoluto o la ecuación (26) para expresarlo como valor relativo |

Fuente: adaptado de (Morrillas, 2016)

$$b = \bar{x} - x_R \quad (25)$$

$$b(\%) = \frac{\bar{x}}{x_R} * 100 \quad (26)$$

Donde

\bar{x} : concentración promedio de los resultados

x_R : concentración del material de referencia

Se presenta un ejemplo para la determinación del sesgo junto con el criterio de aceptación. En un laboratorio se determinó el sesgo en la validación de un método para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados y cipermetrina en tomate mediante CG, los resultados se reportan en la Tabla 27. Se evaluaron siete réplicas de muestras fortificadas, de acuerdo a las

recomendaciones la evaluación del sesgo debe hacerse mediante el análisis de MRC sin embargo, otras fuentes señalan que también puede realizarse a partir de muestras fortificadas, como en la determinación de la recuperación (CCAYAC-P-058, 2011). Se puede observar que el sesgo fue reportado como un término absoluto utilizando la ecuación (25), el criterio de aceptación fue establecido de acuerdo a la expresión (27) utilizando el estadístico t de Student, con n-2 grados de libertad y una alfa de 0.05 a dos colas, la t calculada fue obtenida mediante la ecuación (28), al cumplir el criterio de aceptación se concluye que no hay sesgo (Guerrero & Herrera, 2016).

$$b = \bar{x} - x_A = 81.0406 - 80 = 1.0406$$

$$t - \text{crítico} \leq t - \text{crítico student} \quad (27)$$

$$t_{calc} = \frac{(\bar{x} - x_A) * \sqrt{n}}{s} \quad (28)$$

Donde

\bar{x} : concentración promedio de los resultados

n: número de réplicas

x_A : concentración añadida

S: desviación estándar

$$t_{calc} = \frac{(81.0406 - 80) * \sqrt{7}}{2.5353} = 1.0859$$

Tabla 27. Determinación agroquímicos por CG

| Analito | [C] adicionada | Media de [C], n=7 (\bar{x}) | Desviación estándar | Sesgo | t calculada | t crítico |
|----------------------|-------------------|------------------------------------|------------------------|-------|----------------|--------------|
| Mocap | 80.00 | 81.04 | 2.54 | 1.04 | 1.09 | 2.57 |
| HCB | 2.00 | 1.83 | 0.27 | -0.17 | 1.72 | |
| Diazinón | 40.00 | 40.78 | 2.03 | 0.78 | 1.02 | |
| M-Paratión | 16.00 | 15.43 | 0.65 | -0.57 | 2.33 | |
| Fenclorfos | 5.71 | 5.45 | 0.31 | -0.26 | 2.20 | |
| Malatión | 24.00 | 24.50 | 1.26 | 0.50 | 1.04 | |
| E-Paratión | 5.72 | 6.02 | 0.35 | 0.30 | 2.32 | |
| Clorfenvinfos | 12.00 | 12.49 | 0.60 | 0.49 | 2.18 | |
| DEF | 8.00 | 7.89 | 0.36 | -0.11 | 0.84 | |
| Etión | 8.00 | 8.30 | 0.41 | 0.30 | 1.95 | |
| Clipermetrina | 50.00 | 51.06 | 1.78 | 1.06 | 2.11 | |

Fuente: adaptado de (Guerrero & Herrera, 2016)

3.8 Intervalo de trabajo y linealidad

El intervalo de trabajo es proporcionado por el método cuando se obtienen resultados con una incertidumbre aceptable, dicho intervalo se encuentra delimitado por el LC en el límite inferior, y por concentraciones que provocan anomalías en el intervalo superior. Existen dos intervalos de trabajo, el intervalo de trabajo del método se relaciona con la concentración de la muestra de laboratorio, el intervalo de trabajo del instrumento está definido en términos de la concentración de una muestra procesada presentada al instrumento para su medición, en ambos casos se debe considerar el intervalo lineal. La Tabla 28 contiene las recomendaciones experimentales para determinar el intervalo de trabajo, los pasos 1 y 2 deben ser aplicados en ese orden para el intervalo de trabajo del instrumento, el paso 3 es aplicable para el intervalo de trabajo del método (Morrillas, 2016).

Tabla 28. Determinación experimental del intervalo de trabajo y lineal

| Qué hacer | Cuántas veces | Cálculos |
|--|---------------|--|
| 1) Medir un blanco más patrones de calibración, a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés. | 1 | Graficar la respuesta en función de la concentración. Examinar visualmente para identificar el rango lineal aproximado y los límites superior e inferior del intervalo de trabajo del instrumento. |
| 2) Medir un blanco más patrones de calibración, 2-3 veces a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango lineal. | 1 | Graficar la respuesta en función de la concentración. Calcular las estadísticas de regresión apropiadas. Calcular y graficar los residuales. La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad |
| 3) Medir de acuerdo con el método documentado, un blanco más materiales de referencia o blancos de muestra adicionados 2-3 veces a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés. | 1 | Graficar la concentración medida en función de la concentración de las muestras de ensayo. Examinar visualmente para identificar el rango lineal aproximado y los límites superior e inferior del intervalo de trabajo. Calcular las estadísticas de regresión apropiadas. Calcular y graficar los residuales. La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad. |

Fuente: adaptado de (Morrillas, 2016)

En la Figura 17 se da un ejemplo de las gráficas obtenidas tras la aplicación del procedimiento experimental, la Figura 17 A representa el intervalo de trabajo del instrumento, la Figura 17 B representa el intervalo de trabajo del método, se puede observar en ambos casos que el intervalo lineal es considerado para el establecimiento del intervalo de trabajo. Como criterio de aceptación para considerar el intervalo de trabajo se establece un valor de $r > 0.98$ para cuantificación de residuos e impurezas y $r > 0.99$ para cuantificación de contenido e ingrediente activo, para considerar el intervalo de lineal se debe observar un comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica y se debe observar datos aleatorios en el gráfico de residuales (CCAYAC-P-058, 2011).

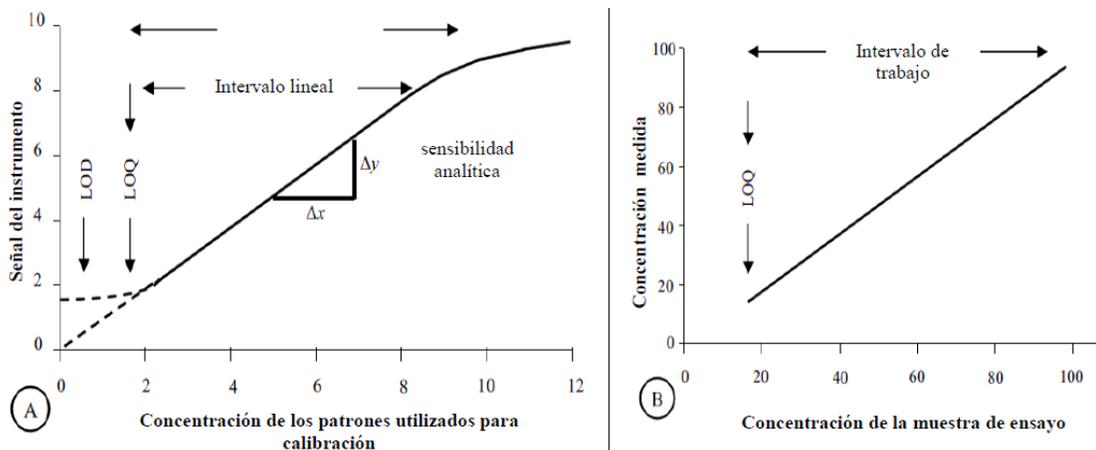


Figura 17. A) Intervalo de trabajo del instrumento B) Intervalo de trabajo del método
Tomada de (Morrillas, 2016)

Se muestra un ejemplo del cálculo. En la validación de un método de análisis para la determinación de azufre en combustibles, usando espectrometría de fluorescencia de rayos x, se determinó el intervalo de trabajo, se preparó una curva de calibración en el intervalo de 3–50,000 mg/kg, con quince puntos y se midió por triplicado, se obtuvo la gráfica de la figura 18, tras una regresión lineal se obtuvo un valor de $R^2=0.9965$ por lo que se considera de 3 – 50,000 mg/kg como intervalo de trabajo (Molina, Zapata, & Castro, 2010).

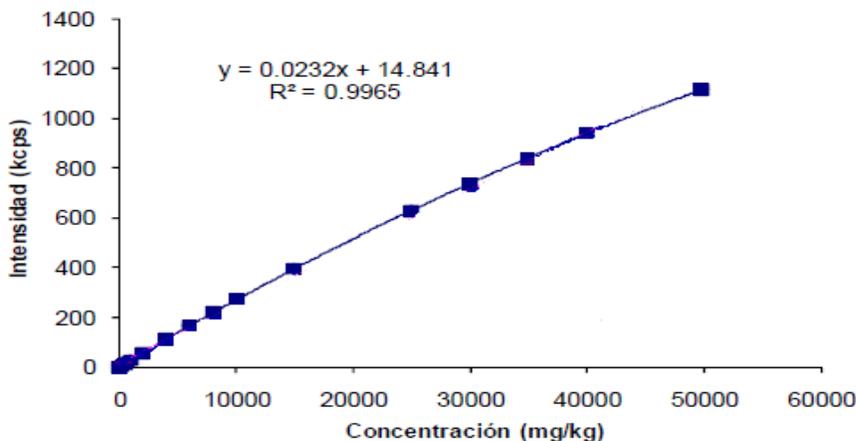


Figura 18. Regresión lineal para la determinación de azufre total en combustibles
Tomada de (Molina, Zapata, & Castro, 2010)

De acuerdo a lo observado en la Figura 18 se sugirieron tres intervalos lineales, de 3-1000 mg/kg (Figura 19A) de 1,000-10,000 mg/kg (Figura 20A) y

de 10,000-50,000 mg/kg (Figura 21A), para cada intervalo se realizó una regresión lineal y una gráfica de residuales, que es la diferencia entre el valor observado de la señal y el valor calculado de la señal pronosticado por la línea recta (Morrillas, 2016). Los tres coeficientes de relación son mayores a 0.99 sin embargo, el intervalo de 3-1000 mg/kg presenta el mayor valor además, la gráfica de residuales presenta una menor variación aunado a que la suma algebraica de los mismos es la más cercana a cero, lo cual es indicativo de un mejor ajuste de los puntos a la regresión lineal, por lo que se asigna el intervalo de 3-1000 mg/kg como el intervalo lineal (Molina, Zapata, & Castro, 2010).

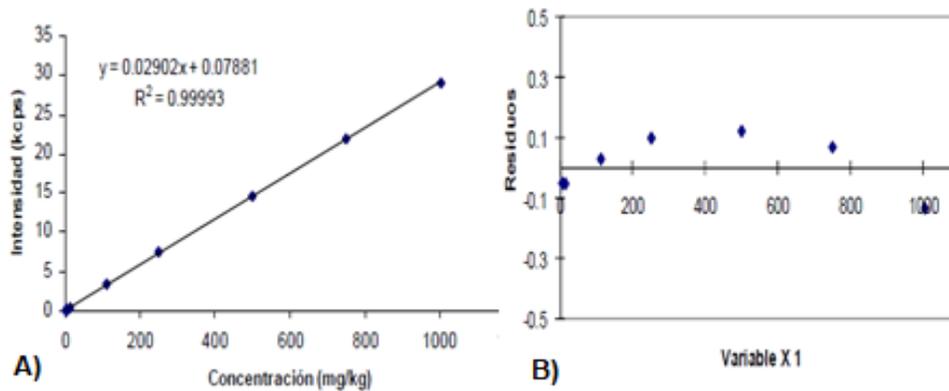


Figura 19. A) Regresión lineal para intervalo de 3-1,000 mg/kg B) Gráfico de residuales para intervalo de 3-1,000 mg/kg
Tomada de (Molina, Zapata, & Castro, 2010)

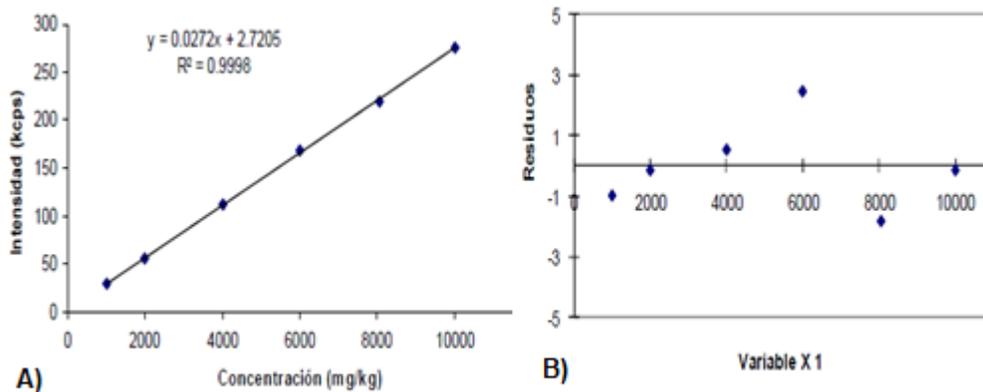


Figura 20. A) Regresión lineal para intervalo de 1,000-10,000 B) Gráfico de residuales para intervalo de 1,000-10,000 mg/kg
Tomada de (Molina, Zapata, & Castro, 2010)

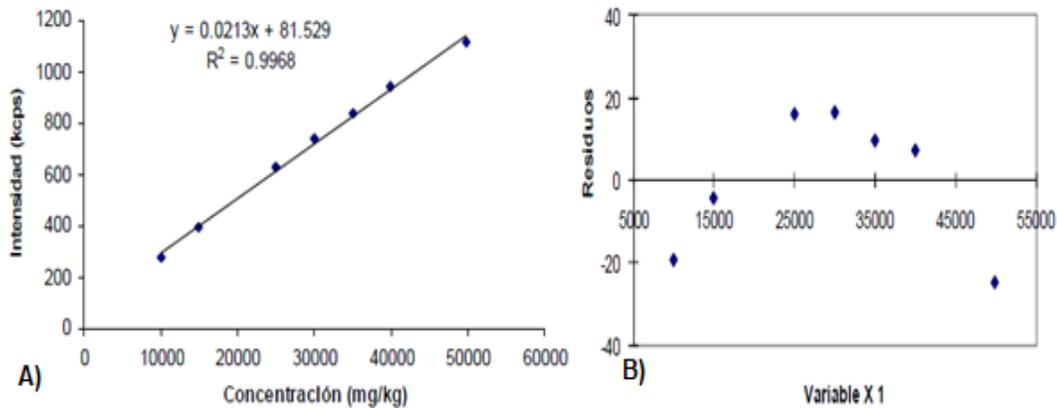


Figura 21. A) Regresión lineal para intervalo de 10,000-50,000 B) Gráfico de residuales para intervalo de 10,000-50,000 mg/kg
Tomada de (Molina, Zapata, & Castro, 2010)

3.9 sensibilidad

La sensibilidad es una medida de la respuesta del instrumento o del método completo a la concentración del analito (Zagal & Sadzawka, 2007). De acuerdo con el *CODEX* la sensibilidad es definida como “*el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición*” (CAC, 2009). El término de sensibilidad es utilizado con frecuencia para describir un método analítico sin embargo, se utiliza de manera incorrecta. La definición de sensibilidad más utilizada es la de sensibilidad de calibración la cual es la pendiente de la curva de calibración, si la curva de calibración es lineal, la sensibilidad es constante e independiente de la concentración, si no es lineal entonces la sensibilidad deja de ser constante y cambia con la concentración, la sensibilidad de calibración no indica que diferencias que pueden ser detectadas por diferencias en la concentración por lo cual el término de sensibilidad analítica es utilizado. La sensibilidad analítica es la proporción de la curva de calibración con respecto a la desviación estándar de la señal del analito a una concentración determinada, generalmente la sensibilidad analítica es función de la concentración (Skoog, 2015). La Tabla 29 contiene las recomendaciones para la determinación experimental de la sensibilidad.

Tabla 29. Determinación experimental de la sensibilidad

| Qué hacer | Cuántas veces | Cálculos | Notas |
|---|---------------------------|--|--|
| Mediciones blancos de muestra o muestras adicionadas, mínimo cinco niveles de concentración | Cada nivel por triplicado | Graficar la respuesta analítica (y) contra la concentración adicionada (x) | Utilizar los datos obtenidos en la determinación del intervalo de trabajo. Reportar la relación entre el cambio de respuesta analítica por unidad de concentración |

Fuente: adaptado de (CCAYAC-P-058, 2011)

Se presenta un ejemplo para la determinación de la sensibilidad. En un estudio de validación para la cuantificación de fósforo mediante espectrofotometría UV-Visible se realizaron lecturas (Tabla 30) a partir de las cuales se elaboró una curva de calibración (Figura 22), el intervalo de 1.2 - 8.0 mgL⁻¹ asegura lecturas independientes de la concentración (Cáñez & García, 2015).

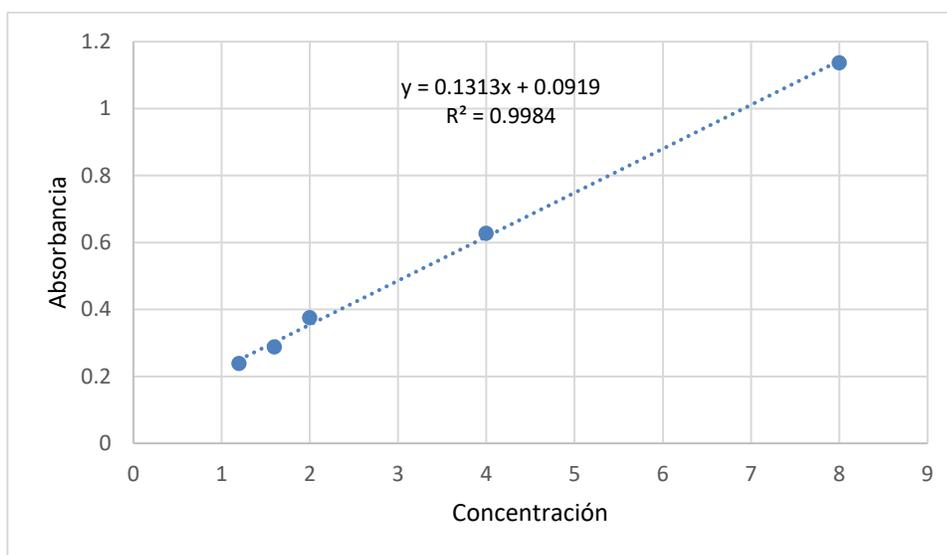


Figura 22. Curva de calibración para cuantificación de P en forma de P₂O₅
Adaptada de (Cáñez & García, 2015)

La sensibilidad analítica (m) reportada en la Tabla 30 fue calculada mediante la ecuación (29) al dividir la absorbancia (s) entre la concentración (c), por lo que se puede observar que la sensibilidad es $m=0.170\pm 0.038$ mgL⁻¹. El valor de sensibilidad obtenido permite una adecuada discriminación de los valores

de concentración con base en la lectura debido a que mientras la concentración disminuye la sensibilidad aumenta por el contrario, mientras la concentración aumenta la sensibilidad disminuye (Cáñez & García, 2015).

$$m = \frac{s}{c} \quad (29)$$

Tabla 30. Determinación de P₂O₅ mediante espectrofotometría UV-Visible

| P ₂ O ₅ (mgL ⁻¹) (C) | Λ ₆₆₀ (S) | Sensibilidad (m) |
|--|----------------------|------------------|
| 0.8 | 0.174 | 0.218 |
| 1.2 | 0.239 | 0.199 |
| 1.6 | 0.288 | 0.180 |
| 2.0 | 0.375 | 0.188 |
| 4.0 | 0.627 | 0.157 |
| 8.0 | 1.137 | 0.142 |
| 12.0 | 1.276 | 0.106 |
| Promedio | | 0.170 |
| Desviación | | 0.038 |

Fuente: adaptado de (Cáñez & García, 2015)

Con el propósito de tener más elementos confirmatorios se elaboró una curva de Ringbom (Figura 23) y mediante una inspección visual se determinó que en el intervalo de 1.2 - 4.0 mgL⁻¹ tiene la mejor relación lineal, por lo que se obtiene la mejor sensibilidad (Cáñez & García, 2015).

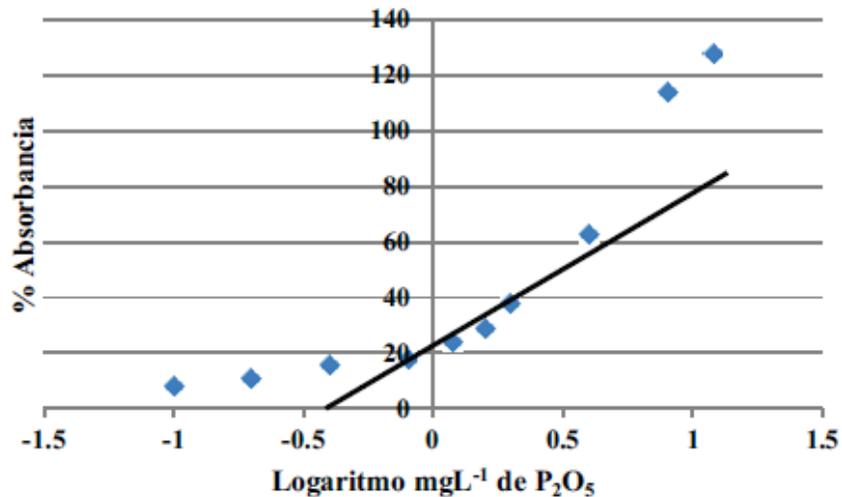


Figura 23. Curva de Ringbom

Tomada de: (Cáñez & García, 2015)

3.10 Incertidumbre

La incertidumbre es definida como *“un parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando”* (ISO/IEC, 2008), dicho parámetro puede ser una desviación estándar, un múltiplo de esta o la semiamplitud de un intervalo con un nivel de confianza determinado, el VIM introduce la siguiente definición, misma que es adoptada por el Codex *“parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza”* (VIM, 2012), los cambios en la definición no afectan materialmente al significado de la finalidad de la medida analítica (Eurachem & CITAC, 2012),

En la práctica la incertidumbre se evalúa habitualmente a partir de estudios de VMA, el cálculo de la incertidumbre se puede resumir en cuatro pasos. A continuación se presenta un ejemplo del cálculo de la incertidumbre en la determinación de fibra cruda en alimentos para animales mediante gravimetría, para el cual estaban disponibles datos de repetibilidad y reproducibilidad (Eurachem & CITAC, 2012).

Como primer paso se debe hacer una especificación clara y sin ambigüedades del mensurando, habitualmente concentración, para los métodos analíticos más exhaustivos es recomendable una descripción más detallada, como se muestra a continuación. La Figura 24 representa todos los pasos experimentales para la determinación de la fibra cruda, el procedimiento conlleva un proceso complejo de digestión, filtración, secado, calcinación y pesaje con el propósito de digerir la mayoría de los componentes dejando atrás todo el material no digerido. El material orgánico se calcina. La diferencia de peso entre orgánico/inorgánico seco y el peso del residuo calcinado es el contenido de fibra (Eurachem & CITAC, 2012).

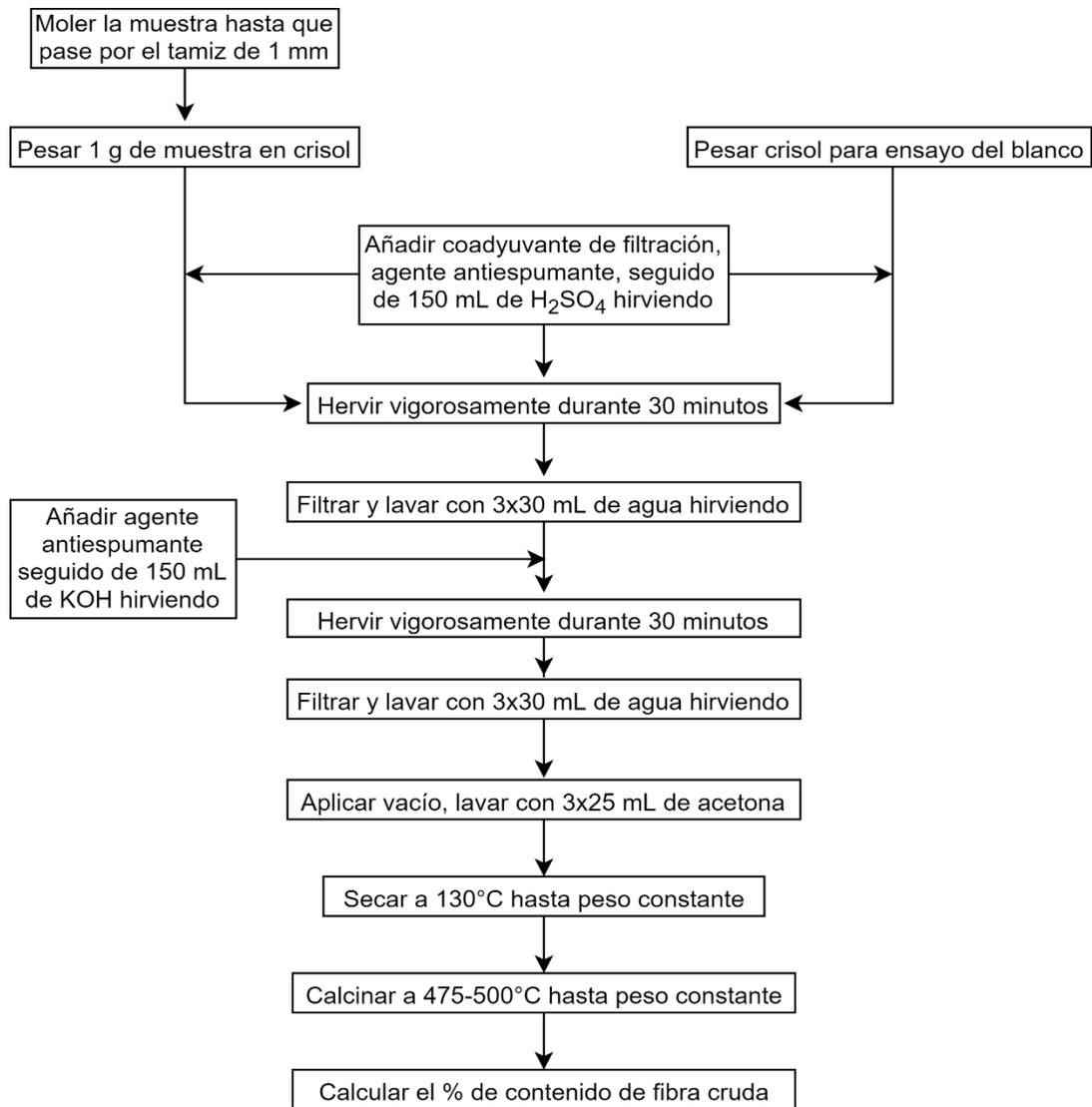


Figura 24. Diagrama de flujo para la determinación de fibra cruda en alimentos para animales

Adaptada de (Eurachem & CITAC, 2012)

Como paso número dos se deben identificar las fuentes de incertidumbre para lo cual es recomendable la elaboración de un diagrama de causa y efecto, como se muestra a continuación. Se identificaron varias fuentes de incertidumbre (Figura 25) las cuales fueron simplificadas (Figura 26) para eliminar la duplicación, esto junto con componentes poco significativas, en particular la calibración y linealidad de la balanza (Eurachem & CITAC, 2012).

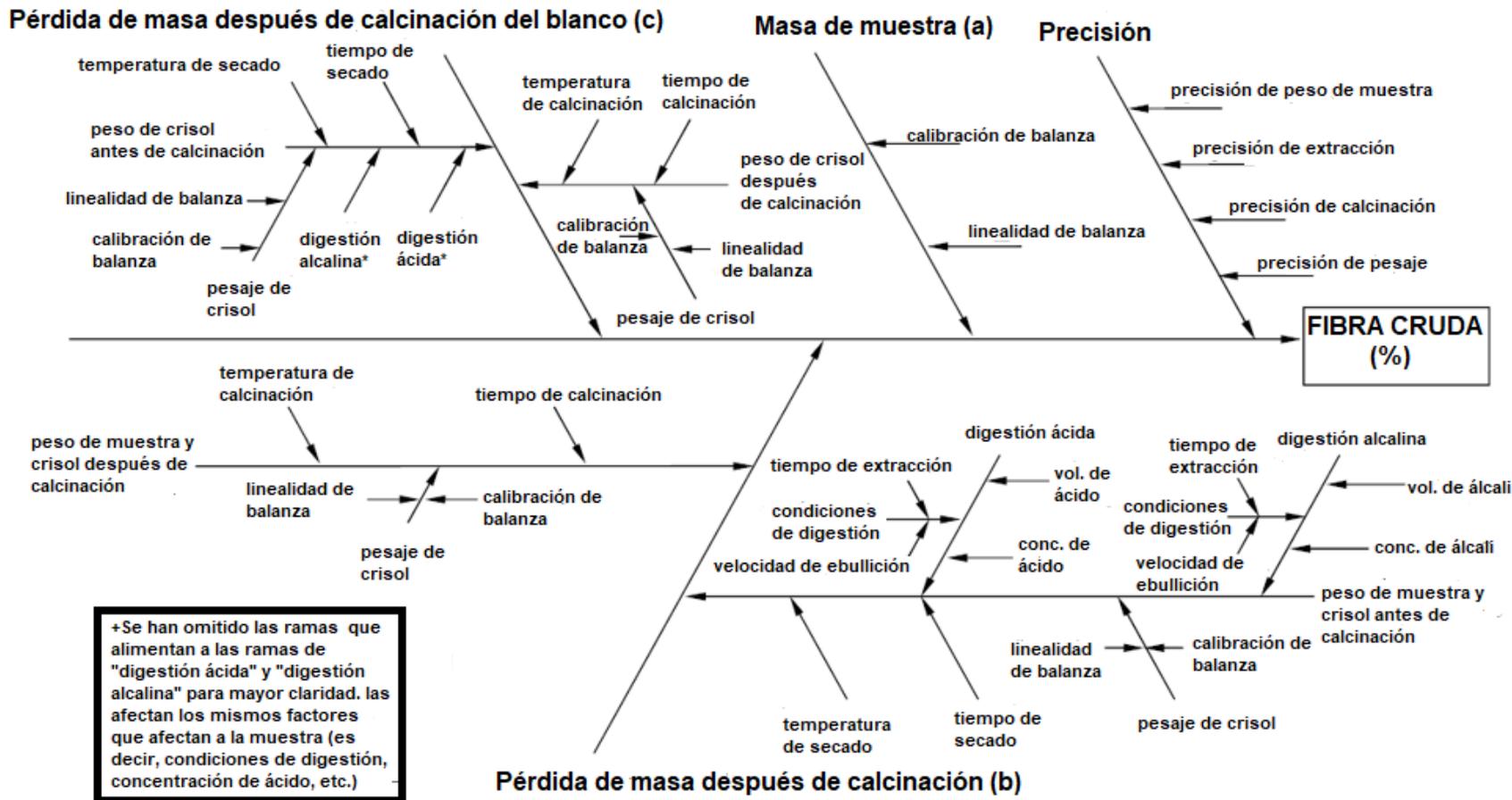


Figura 25. Diagrama causa-efecto para la determinación de fibra en alimentos para animales
Tomada de (Eurachem & CITAC, 2012)

Pérdida de masa después de calcinación del blanco (c)

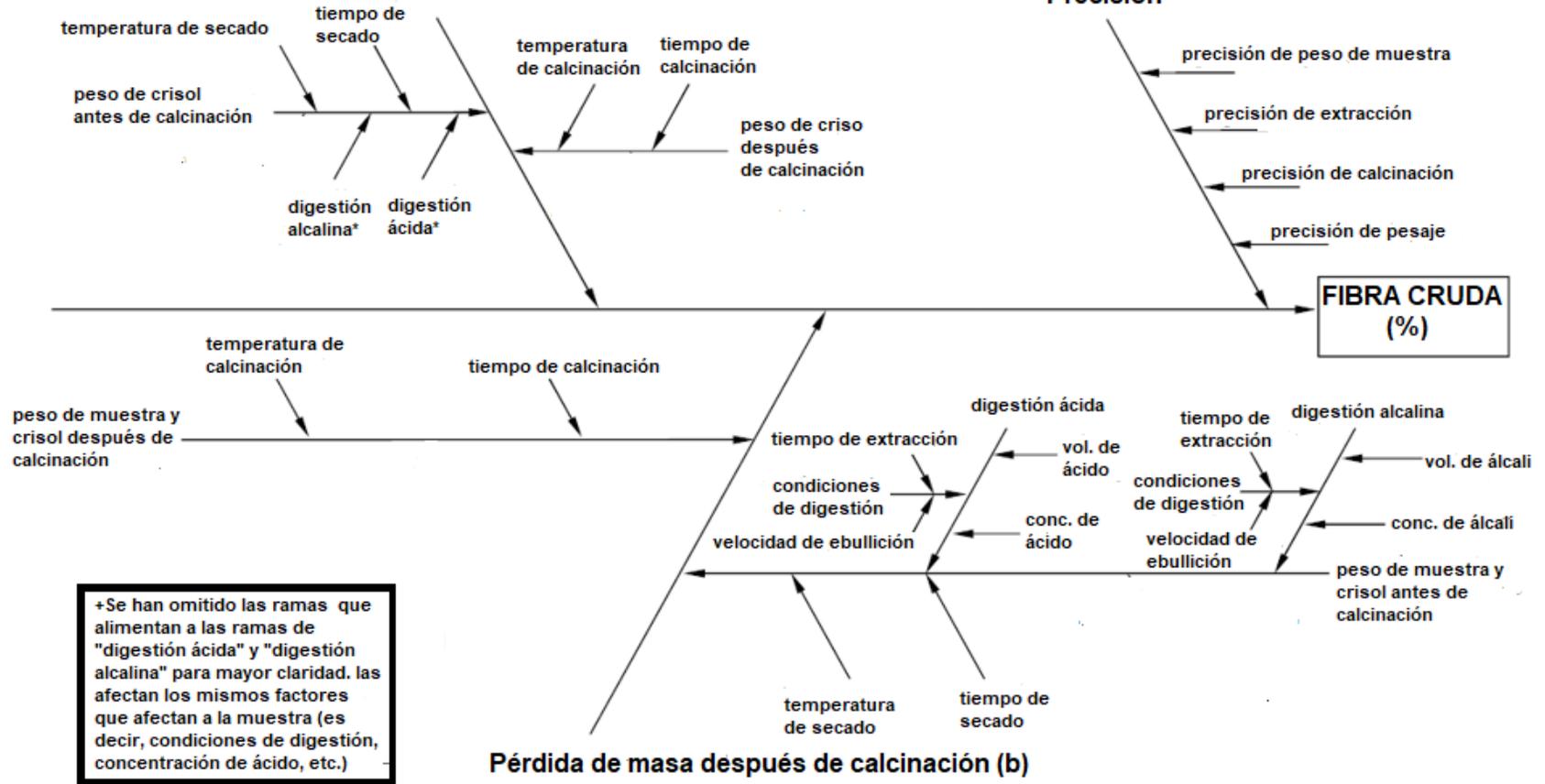


Figura 26. Diagrama causa-efecto simplificado
Tomada de (Eurachem & CITAC, 2012)

El tercer paso es cuantificar la incertidumbre asociada a cada una de las fuentes mencionadas en el paso dos, esto se puede hacer de dos formas, una es evaluando la incertidumbre asociada a cada fuente individual, para posteriormente combinarlas, la segunda es determinando directamente la contribución combinada a la incertidumbre de los resultados de algunas o todas las fuentes, la segunda forma es tratada a continuación. El método fue objeto de un estudio colaborativo en el cual se analizaron cinco alimentos diferentes, en la Tabla 31 se presentan los resultados de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos (Eurachem & CITAC, 2012).

Tabla 31. Resultados de un estudio colaborativo para la determinación de fibra

| Contenido de fibra (% m/m) | | | | |
|----------------------------|-------------------------------------|--|---|---|
| Muestra | Resultados del estudio colaborativo | | | Desviación estándar de repetibilidad "In-house" |
| | Media | Desviación estándar de la reproducibilidad | Desviación estándar de la repetibilidad | |
| A | 2.3 | 0.293 | 0.198 | 0.193 |
| B | 12.1 | 0.563 | 0.358 | 0.312 |
| C | 5.4 | 0.390 | 0.264 | 0.259 |
| D | 3.4 | 0.347 | 0.232 | 0.213 |
| E | 10.1 | 0.575 | 0.391 | 0.327 |

Fuente: tomado de (Eurachem & CITAC, 2012)

Los estimados de repetibilidad obtenida en los estudios in-house fueron similares a los obtenidos en estudios colaborativos, lo cual es indicativo de que la precisión del método en ese laboratorio es similar a la de los laboratorios que participaron en el estudio colaborativo por lo cual, es aceptable utilizar de desviación estándar de la reproducibilidad del estudio colaborativo como incertidumbre del método sin embargo, para completar la estimación de la incertidumbre se debe considerar si hay afectos no cubiertos asociados a cada una de las etapas del método (Eurachem & CITAC, 2012).

Para la temperatura y tiempo de calcinación se asumió que el efecto en la incertidumbre es insignificante, basándose en un estudio el cual se determinó la cantidad de fibra en diferentes combinaciones de tiempo y temperatura, en cuyos resultados no se observó una diferencia significativa en la cantidad de

fibra determinada. Para la pérdida de masa después de calcinación del blanco al no existir datos se asumió que no existe contribución a la incertidumbre, ya que las variaciones son pequeñas debido a que provienen principalmente de la pesada y se asume que están bien representadas en el estudio colaborativo. Para la concentración de reactivos y tiempos de digestión se realizó un estudio en el cual se determinaron valores muy pequeños de la incertidumbre frente a la desviación estándar de la reproducibilidad, por lo cual se decidió despreciarla. Para la temperatura y tiempo de secado se realizó un estudio pesando muestras replicadas de cuatro alimentos, a tres diferentes temperaturas, siendo pesadas después de tres y cuatro horas, en la mayoría de los casos la variación obtenida fue inferior a 2 mg (a valores inferiores de pesadas sucesivas el laboratorio lo define como peso constante), el intervalo ± 2 se convierte a incertidumbre estándar dividiéndolo entre $\sqrt{3}$ por lo tanto la incertidumbre es de 0.00115 g, el método especifica una masa de 1g por lo cual la incertidumbre correspondería a 0.115% m/m la cual ya no es despreciable frente a la desviación estándar de la reproducibilidad, dicha fuente de incertidumbre es independiente del contenido de fibra por lo cual habrá una contribución fija de 0.115% m/m (Eurachem & CITAC, 2012).

El cuarto paso consiste en combinar todas las incertidumbres para calcular la incertidumbre combinada como se muestra a continuación. La ecuación (30) es una expresión sencilla para el cálculo de la incertidumbre combinada. La ecuación (31) expresa a la incertidumbre expandida, la cual se obtiene de la incertidumbre combinada multiplicada por un factor de cobertura de 2, lo que implica un nivel de confianza del 95% (Eurachem & CITAC, 2012).

Incertidumbre combinada

$$u_c(y(p, q, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (30)$$

$$u_c(C_{fibra})(\%m/m) = \sqrt{(0.29)^2 + (0.115)^2} = 0.31$$

Reportar como:

$$Fibra\ total = 2.3 \frac{g}{100g}$$

$$incertidumbre\ combinada = 0.31 \frac{g}{100g}$$

Incertidumbre expandida

$$U = u_c * k \quad (31)$$

$$U(C_{fibra})(\%m/m) = 0.31 * 2 = 0.62$$

Reportar como:

$$Fibra\ total = (2.3 \pm 0.62) \frac{g}{100g}$$

La incertidumbre informada está calculada usando un factor de cobertura k de 2.

El cálculo de la incertidumbre es complejo, por la misma razón en muchas ocasiones queda fuera del alcance de algunas guías sin embargo, existe una guía completa dedicada a su estudio, para un mayor entendimiento se recomienda revisar la referencia (Eurachem & CITAC, 2012)

3.11 Selectividad

La selectividad es definida como “la capacidad de un método para determinar analitos específicos en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento análogo” (CAC, 2009). La selectividad de un método se investiga estudiando su habilidad para medir el analito de interés en muestras a las cuales se le agregaron interferencias (Morrillas, 2016), la Tabla 32 contiene la forma de determinar experimentalmente la selectividad.

Tabla 32. Determinación experimental de la selectividad

| Qué hacer | Cuántas veces | Cálculos |
|--|---------------|--|
| Analizar muestras de ensayo conteniendo interferencias sospechosas en presencia del analito de interés | 1 | Examinar el efecto de las interferencias |

Fuente: adaptado de (Morrillas, 2016)

Se presenta un ejemplo para la determinación de la selectividad. En un informe de validación para la determinación de histamina en productos de la pesca mediante un kit enzimático, se reporta la prueba de selectividad para lo cual se prepararon extractos sin histamina y extractos con 25 mg/kg de histamina con los diferentes interferentes de estudio, en una concentración de 1000 mg/kg, las concentraciones obtenidas se reportan en la Tabla 33. Los resultados obtenidos muestran que la agmatina causa interferencias con el kit por lo cual en las instrucciones del mismo se indica que si las muestras contienen agmatina los resultados no son confiables (CYTMA, 2017).

Tabla 33. Determinación de la selectividad en atún

| Histamina (mg/kg) | Compuestos reacción cruzada (1000 mg/kg) | Atún crudo (mg/kg) | Atún al natural (mg/kg) | Atún en aceite (mg/kg) |
|-------------------|--|--------------------|-------------------------|------------------------|
| 0 | Agua | 3.4 | 1.6 | 4.2 |
| | Tiramina | 3.4 | 1.8 | 4.2 |
| | Putrescina | 5.2 | 3.3 | 5.8 |
| | Agmatina | 65.8 | 60.2 | 52.7 |
| 25 | Agua | 28.2 | 25.6 | 28.9 |
| | Tiramina | 26.7 | 25.2 | 28.2 |
| | Putrescina | 28.7 | 29.4 | 29.8 |
| | Agmatina | 90.2 | 84.7 | 77.1 |

Fuente: adaptado de (CYTMA, 2017)

3.12 Robustez

La robustez es definida como *“Una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal”* (CAC, 2009). Un método analítico es robusto si los resultados no son afectados por variaciones en las condiciones experimentales tales como temperatura, pH, duración de la extracción, etcétera (Zagal & Sadzawka, 2007). La Tabla 34 contiene las recomendaciones para la determinación experimental de la robustez.

Tabla 34. Determinación experimental de la robustez

| Qué hacer | Cuántas veces | Cálculos |
|--|---|---|
| Identificar las variables que podrían tener un efecto en el desempeño del método. Establecer experimentos analizando MR o muestras de ensayo | Utilizar un diseño de Experimentos. Por ejemplo: Plackett-Burman. | Determinar el efecto de los cambios de condición en los resultados. Realizar pruebas de significancia para determinar si los efectos son significativos |

Fuente: adaptado de (Morrillas, 2016)

El método de Plackett Burman es un diseño experimental donde 7 variables combinadas (A,B,C,D,E,F,G) pueden ser evaluadas con solo ocho pruebas, cada una de las variables se evalúa a dos niveles (A,a,B,b,C,c...), el diseño experimental se puede observar en la Tabla 35 (Florez, Tobón, & Baena, 2002). Los resultados obtenidos de éstas pruebas aparecen expresados como (s,t,u,v,W,X,Y,Z), a partir de estos puede calcularse el efecto de cada una de las variables tal y como se indica en la Tabla 36 (ISPCH, 2010).

Tabla 35. Diseño experimental Plackett Burman

| Ensayo | Prueba | | | | | | Resultado |
|--------|--------|---|---|---|---|---|-----------|
| 1 | A | B | C | D | E | F | s |
| 2 | A | B | c | D | e | F | t |
| 3 | A | b | C | d | E | F | u |
| 4 | A | b | c | d | e | F | v |
| 5 | a | B | C | d | e | F | W |
| 6 | a | B | c | d | E | F | X |
| 7 | a | b | C | D | e | F | Y |
| 8 | a | b | C | D | E | F | Z |

Fuente: adaptado de (Florez, Tobón, & Baena, 2002)

Tabla 36. Representación de la obtención de los efectos para la prueba de robustez

| Factor | Diferencia | Efecto |
|--------|-----------------------------|--------|
| A-B | $(s+t+u+v)/4 - (W+X+Y+Z)/4$ | E_A |
| B-b | $(s+t+W+X)/4 - (u+v+Y+Z)/4$ | E_B |
| C-c | $(s+u+W+Y)/4 - (t+v+X+Z)/4$ | E_C |
| D-d | $(s+t+Y+Z)/4 - (u+v+W+X)/4$ | E_D |
| E-e | $(s+u+X+Z)/4 - (t+v+W+Y)/4$ | E_E |
| F-f | $(s+v+W+Z)/4 - (t+u+X+Y)/4$ | E_F |
| G-g | $(s+v+X+Y)/4 - (t+u+W+Z)/4$ | E_G |

Fuente: adaptado de (ISPCH, 2010)

La guía técnica número 1 del Instituto de Salud Pública de Chile presenta un ejemplo del estudio de robustez en un método turbidimétrico en el cual siete variables fueron modificadas (no se indica qué se determinó) obteniéndose los resultados de la Tabla 37 (ISPCH, 2010).

Tabla 37. Resultados del ensayo de robustez

| Análisis | T (°C) A | Cubeta Tipo B | Tiempo de agitación (s) C | Tiempo de lectura (s) D | Siliconado E | Volumen (mL) F | Estabilización (h) G | Resultados |
|----------|-------------|------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|-------------------------|------------|
| 1 | 22 | 1 | 60 | 30 | Si | 30 | 1 | 20.1 |
| 2 | 22 | 1 | 30 | 30 | No | 25 | 0 | 20.7 |
| 3 | 22 | 2 | 60 | 0 | Si | 25 | 0 | 22.0 |
| 4 | 22 | 2 | 30 | 0 | No | 30 | 1 | 21.3 |
| 5 | 15 | 1 | 60 | 0 | No | 30 | 0 | 22.3 |
| 6 | 15 | 1 | 30 | 0 | Si | 25 | 1 | 22.2 |
| 7 | 15 | 2 | 60 | 30 | No | 25 | 1 | 20.6 |
| 8 | 15 | 2 | 30 | 30 | Si | 30 | 0 | 21.1 |

Fuente: adaptado de (ISPCH, 2010)

Los resultados obtenidos permiten estimar la diferencia asociada a el efecto de cada variable utilizando las formulas las formulas de la Tabla 36.

$$E_A = \frac{20.1 + 20.7 + 22.0 + 21.3}{4} - \frac{22.3 + 22.2 + 20.6 + 21.1}{4} = 0.525$$

$$E_B = \frac{20.1 + 20.7 + 22.3 + 22.2}{4} - \frac{22.0 + 21.3 + 20.6 + 21.1}{4} = 0.075$$

$$E_C = \frac{20.1 + 22.0 + 22.3 + 20.6}{4} - \frac{20.7 + 21.3 + 22.2 + 21.1}{4} = 0.075$$

$$E_D = \frac{20.1 + 20.7 + 20.6 + 21.1}{4} - \frac{22.0 + 21.3 + 22.3 + 22.2}{4} = 1.325$$

$$E_E = \frac{20.1 + 22.0 + 22.2 + 21.1}{4} - \frac{20.7 + 21.3 + 22.3 + 20.6}{4} = 0.125$$

$$E_F = \frac{20.1 + 21.3 + 22.3 + 21.1}{4} - \frac{20.7 + 22 + 22.2 + 20.6}{4} = 0.175$$

$$E_G = \frac{20.1 + 21.3 + 22.2 + 20.6}{4} - \frac{20.7 + 22.0 + 22.3 + 21.1}{4} = 0.475$$

Como criterio de aceptación se indica que se debe cumplir con la expresión (30), la diferencia calculada para cada factor debe ser menor que la raíz de dos multiplicada por la desviación estándar de los resultados la cual fue de 0.813 para el presente ejemplo. La tabla 38 contiene los resultados de las diferencias para cada factor comparadas contra el criterio de aceptación, la variable que se estableció como sensible en el estudio de robustez no deberá modificarse y se debe mantener el valor establecido en el método.

$$\Delta_{factor} < \sqrt{2}S \quad (32)$$

$$\sqrt{2}S = 1.15$$

Tabla 38. Determinación de la robustez

| Efecto | Diferencia | $\sqrt{2}S$ | Comparación |
|--------|------------|-------------|------------------------|
| A | 0.525 | 1.15 | No sensible a variable |
| B | 0.075 | 1.15 | No sensible a variable |
| C | 0.075 | 1.15 | No sensible a variable |
| D | 1.325 | 1.15 | sensible a variable |
| E | 0.125 | 1.15 | No sensible a variable |
| F | 0.175 | 1.15 | No sensible a variable |
| G | 0.475 | 1.15 | No sensible a variable |

Fuente: adaptado de (ISPCH, 2010)

CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LA VALIDACIÓN

Con la finalidad de mostrar cómo asignar parámetros de desempeño a algunos métodos se presentan algunos ejemplos. La Tabla 39 muestra algunas recomendaciones para la selección de los parámetros de desempeño según se trate de un método normalizado y uno no normalizado, la Tabla 40 indica la metodología según el tipo de prueba (CCAYAC-P-058, 2011).

Tabla 39. Recomendaciones para evaluar los parámetros de desempeño de acuerdo al tipo de método

| Parámetro | Métodos normalizados | | Métodos no normalizados | |
|-------------------------------|----------------------|---------------|-------------------------|----------------|
| | Fisicoquímicos | Físicos | | Fisicoquímicos |
| | | Cuantitativos | Cualitativos | |
| Intervalo lineal y de trabajo | X | | X | |
| LD | X | | X | |
| LC | X | | X | |
| Recuperación | X | | X | |
| Sesgo | X | | X | |
| Repetibilidad | X | X | X | |
| Reproducibilidad | X | X | X | |
| Incertidumbre | X | X | X | |
| Sensibilidad | | | X | |
| Selectividad | | | X | |
| Robustez | | | X | |

X: evaluar

Fuente: Adaptado de (CCAYAC-P-058, 2011)

Tabla 40. Metodología según el tipo de prueba

| Tipo de prueba | Metodología |
|-----------------------|---|
| Espectrofotométrica | Espectrofotometría UV- Visible, Turbiedad, AA, Plasma inductivamente acoplado |
| Cromatográfica | CLAR, CG, CLAR – Masas, CG – Masas |
| Potenciométrica | pH, Conductimetría, Ión selectivo |
| Volumétrica | Valoraciones (manuales y automáticas) |
| Gravimétrica | Perdida por secado, ignición |
| Física (cuantitativa) | Materia extraña, Densidad relativa, Disolución, Desintegración, Índice de refracción, Rotación óptica, Polarimetría, Espectrometría de infrarrojo, Variación de volumen, Uniformidad de dosis, Osmolaridad, Temperatura de fusión, Color, Viscosidad, Temperatura, etc. |
| Física (cualitativa) | Inhibidores (formaldehído, sales cuaternarias, oxidantes, derivados clorados, etc) |

Fuente: Adaptado de (CCAYAC-P-058, 2011)

La Tabla 41 muestra los parámetros de desempeño a evaluar dependiendo del tipo de prueba (CCAYAC-P-058, 2011).

Tabla 41. Recomendaciones para evaluar los parámetros de desempeño de acuerdo al tipo de prueba

| Parámetro | Tipo de prueba | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Espectrofotométrica | Cromatografía | Potenciométrica | Volumétrica | Gravimétrica | Física |
| Intervalo lineal y de trabajo | SI | SI | SI | SI | SI | NO |
| LD | SI ^a | SI ^a | NO | NO | NO | SI ^b |
| LC | SI ^a | SI ^a | SI ^a | SI ^a | SI ^a | NO |
| Recuperación | SI | SI | NO | SI | SI | NO |
| Sesgo | SI | SI | SI | SI | SI | NO |
| Repetibilidad | SI | SI | SI | SI | SI | SI ^c |
| Reproducibilidad | SI | SI | SI | SI | SI | SI ^c |
| Incertidumbre | SI | SI | SI | SI | SI | SI ^c |
| Sensibilidad | SI ^d | SI ^d | SI ^{d,e} | SI ^e | SI ^d | NO |
| Selectividad | SI ^d | SI ^d | SI ^{d,e} | SI | SI | SI ^b |
| Ribustez | SI ^d | SI ^d | SI ^d | SI ^d | SI ^d | SI ^d |

a: solo para análisis de trazas

b: solo para métodos cualitativos

c: solo para métodos cuantitativos

d: solo aplica para métodos no normalizados

e: solo para análisis de aniones y cationes por ión selectivo

Fuente: Adaptado de (CCAYAC-P-058, 2011)

A. Ejemplo Método gravimétrico

Se presenta un ejemplo de un método Codex Tipo 1 (CODEX STAN 234, 1999), dicho método se encuentra en la normatividad mexicana y es aplicable para la determinación de humedad y sólidos totales en harina, por ejemplo de sorgo, Figura 27. En la Tabla 42 se muestran los parámetros que deben ser evaluados para la verificación del método sin embargo, el LD no es aplicable a métodos gravimétricos y el LC solo es aplicable a niveles traza, la repetibilidad es establecida por la misma NOM.

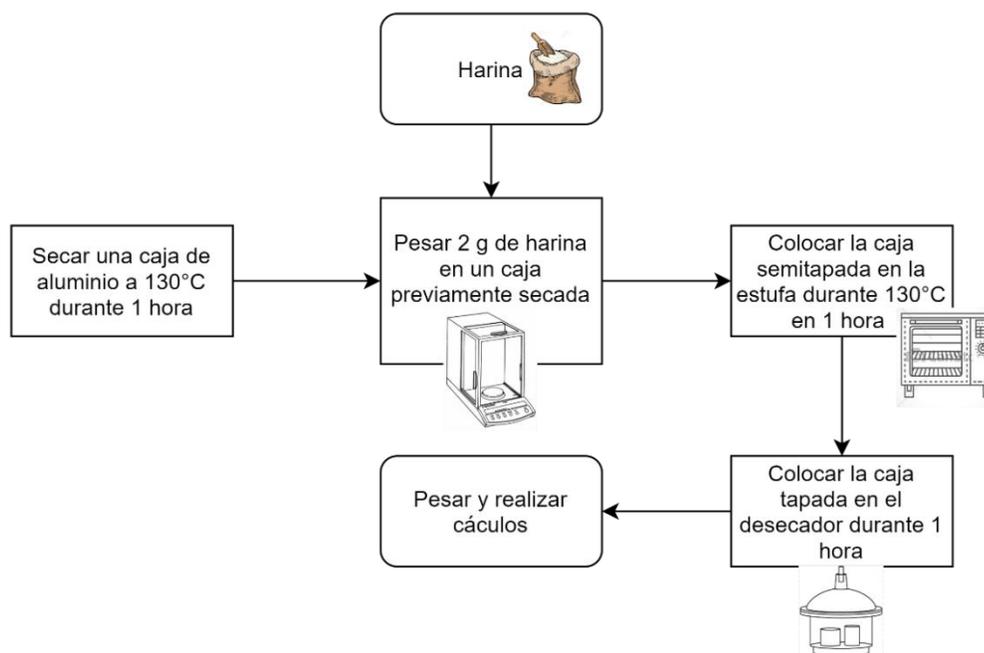


Figura 27. Determinación de humedad en harina
Elaboración propia

Tabla 42. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en gravimetría

| | |
|--------------------------------------|--|
| Tipo de método | I |
| Fundamento | Cuando un producto es sometido a secado en condiciones específicas, presenta una pérdida de peso, debido a la evaporación del agua que contiene, la cual se reporta como valor de humedad (NOM-247, 2008). |
| Sobre el LM | Se establece un valor que no debe ser superado |
| Análito | Agua |
| Matriz | Harina |
| Método | Gravimétrico |
| Norma | NOM-247-SSA1-2008 |
| LM | Límite máximo 15% |
| Recuperación | Evaluar |
| LD | No aplica |
| LC | No aplica |
| Reproducibilidad | Evaluar |
| Repetibilidad | La diferencia entre dos resultados sucesivos obtenidos en las mismas condiciones en la misma muestra no debe exceder de $\pm 0,2\%$. |
| Intervalo lineal y de trabajo | Evaluar |
| Incertidumbre | Evaluar |

B. Ejemplo 2. Método volumétrico

Se presenta un ejemplo de un método Codex Tipo 1 (CODEX STAN 234, 1999), dicho método se encuentra en la normatividad mexicana y es aplicable para la determinación de acidez en leche en polvo, Figura 28. En la Tabla 43 se muestran los parámetros que deben ser evaluados para la verificación del método. En este caso el LD no se consideran aplicable a métodos potenciométricos y volumétricos y el LC solo se considera aplicable a niveles traza.

Tabla 43. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en volumetría

| | |
|--------------------------------------|---|
| Tipo de método | II |
| Fundamento | La leche generalmente tiene una acidez de 1.3 a 1.7 g/L expresada en ácido láctico. La acidez normal de la leche se debe principalmente a su contenido de caseína (0.05-0.08%) y de fosfatos. También contribuyen a la acidez el dióxido de carbono (0.01%-0.02%), los citratos (0.01%) y la albúmina (menos de 0.001%). La acidez se mide con base a una titulación alcalimétrica con hidróxido de sodio 0.1N utilizando fenolftaleína como indicador o, en su caso, utilizando un potenciómetro para detectar el pH de 8.3 que corresponde al fin de la titulación (NOM-155, 2012) |
| Sobre el LM | Se establece un límite mínimo y máximo de acidez |
| Analito | Ácido láctico |
| Matriz | Leche en polvo |
| Método | Potenciométrico o volumétrico |
| Norma | NOM-155-SCFI-2012 |
| LM | Límite máximo 15% |
| Recuperación | Evaluar |
| LD | No aplica |
| LC | No aplica |
| Reproducibilidad | Evaluar |
| Repetibilidad | Evaluar |
| Intervalo lineal y de trabajo | Evaluar |
| Incertidumbre | Evaluar |

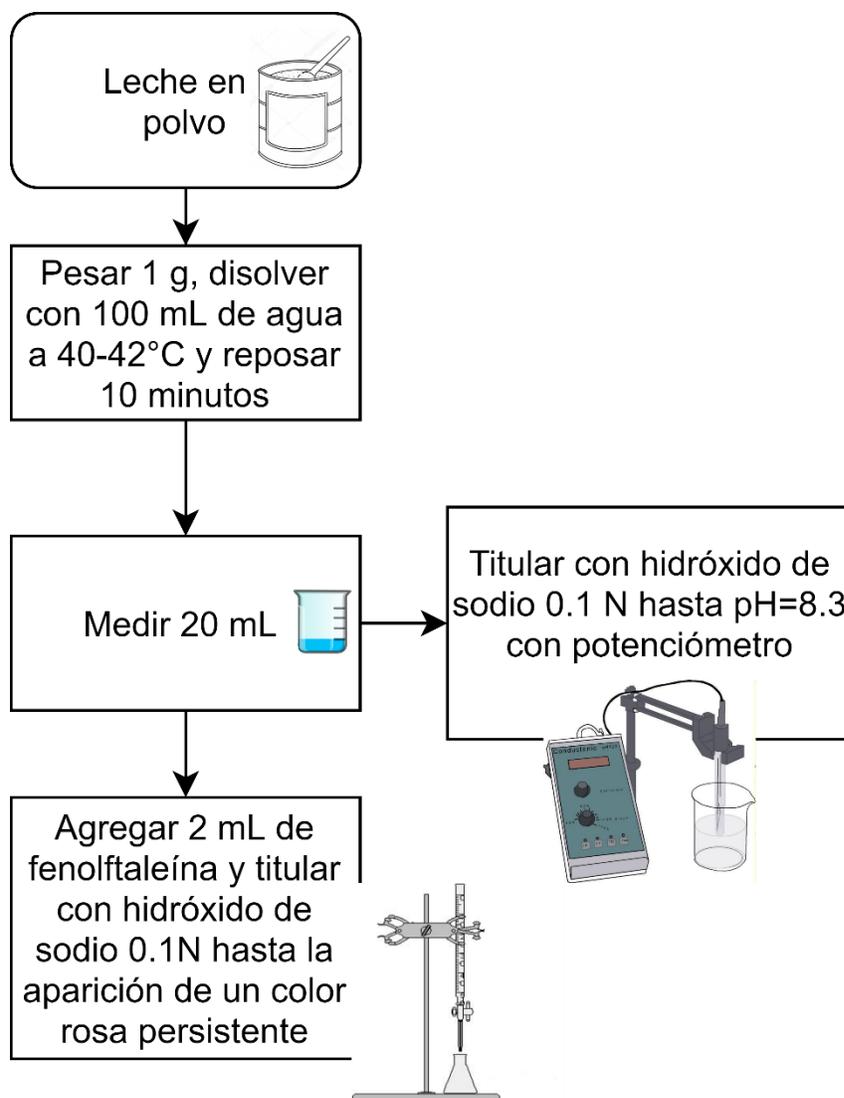


Figura 28. Determinación de acidez en leche en polvo
Elaboración propia

Ejemplo 3. Método basado en espectrometría

Se presenta un ejemplo de un método Codex Tipo 2 (CODEX STAN 234, 1999), dicho método se encuentra en la normatividad mexicana, Figura 29 y es aplicable para la determinación de plomo en agua mineral, la Tabla 44 contiene los parámetros de desempeño a evaluar, en este caso deben evaluarse todos los parámetros para la verificación.

Tabla 44. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en AA

| | |
|--------------------------------------|---|
| Tipo de método | II |
| Fundamento | El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el porcentaje de absorción. La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento (NOM-117, 1994). |
| Sobre el LM | Se establece un límite máximo de plomo |
| Analito | Plomo |
| Matriz | Agua mineral |
| Método | AA |
| Norma | NOM-201-SSA1-2002 |
| LM | 0.01 mg/kg |
| Recuperación | Evaluar |
| LD (\leq mg/kg) | Evaluar |
| LC (\leq mg/kg) | Evaluar |
| Reproducibilidad | Evaluar |
| Repetibilidad | Evaluar |
| Intervalo lineal y de trabajo | Evaluar |
| Incertidumbre | Evaluar |

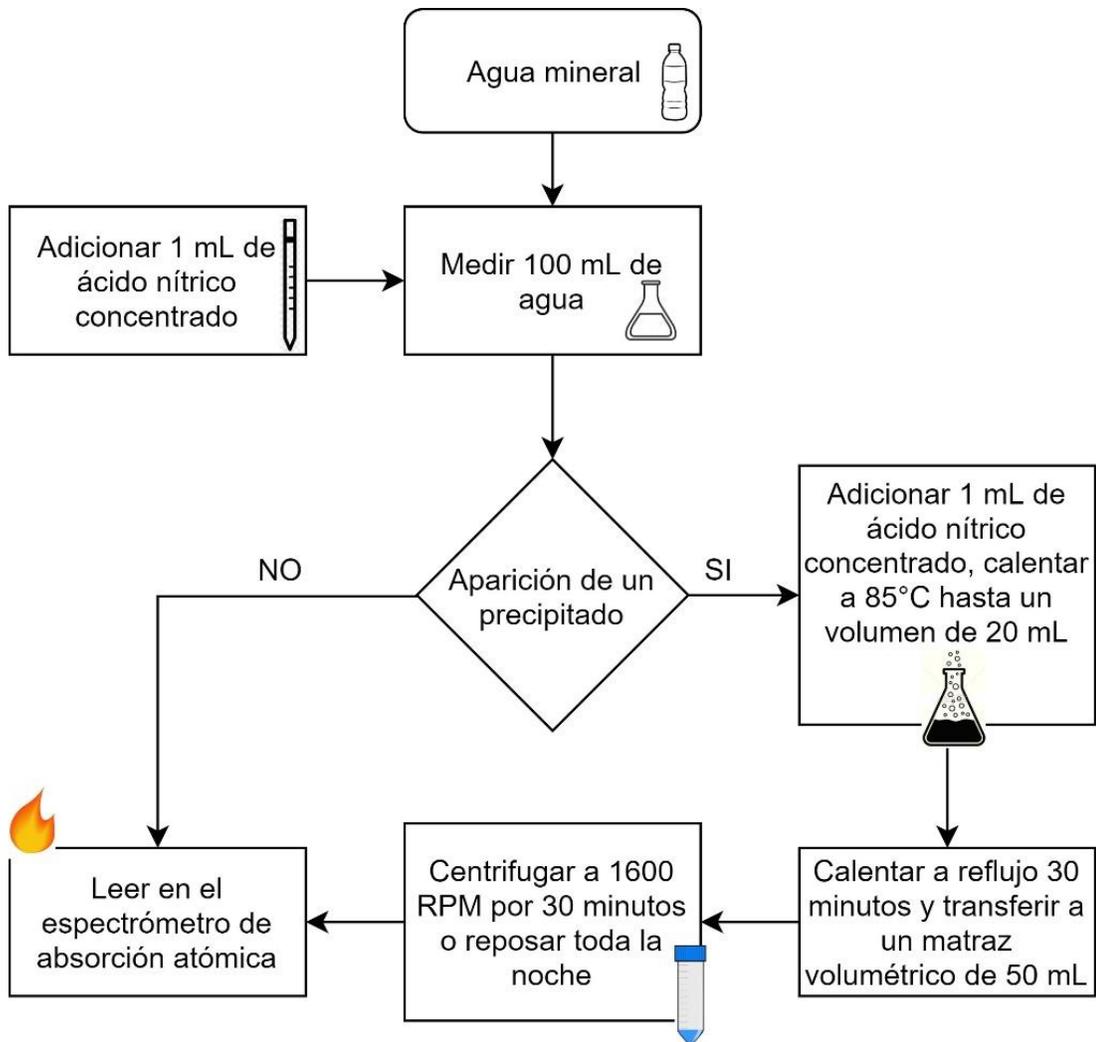


Figura 29. Determinación de plomo en agua mineral
Elaboración propia

Ejemplo 4. Método basado en CLAR

Se presenta un ejemplo de un método Codex Tipo 2 (CODEX STAN 234, 1999), dicho método se encuentra en la normatividad mexicana y es aplicable para la determinación de vitamina A en fórmula para lactantes, la Tabla 45 contiene los parámetros a evaluar, en este caso deben evaluarse todos los parámetros para una verificación, existe una restricción para el LD y LC debido a que estos deben estar presentes en niveles traza y la NOM aplicable indica su LM en unidades diferentes.

El LM indicado es un caso especial ya que se encuentra reportado por cada 100 kcal, por lo cual es necesario transformarlo a las unidades pertinentes para poder saber si el LC y LD son aplicables, “las fórmulas para lactantes deben proporcionar no menos de 60 kcal y no más de 70 kcal por 100 ml” (NOM-131, 2012), por lo cual se tomó el valor de 60 kcal para realizar el cálculo como se muestra a continuación, el factor de 1 L /0.13 kg se tomó del procedimiento experimental, en el cual se indica colocar 0.130 gramos de fórmula en 1 litro de agua (Figura 30). Se puede observar que el analito de interés se debe encontrar en niveles traza por lo que el LC y LD son aplicables.

$$\frac{60 \mu\text{g}}{100 \text{ kcal}} * \frac{60 \text{ kcal}}{0.1 \text{ L}} * \frac{1 \text{ L}}{0.13 \text{ kg}} = 2769 \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} = 2.7 \frac{\text{mg}}{\text{kg}}$$

Tabla 45. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en CLAR

| | |
|--------------------------------------|--|
| Tipo de método | II |
| Fundamento | Los lípidos son ésteres que en presencia de un álcali cáustico se hidrolizan liberando el material insaponificable, el cual es extraído con un disolvente orgánico. Posteriormente la vitamina A contenida en este material, es cuantificada por medio de CLAR (NOM-131, 2012) |
| Sobre el LM | Se establece un límite mínimo y un máximo de vitaminas |
| Analito | Vitamina A |
| Matriz | Fórmula para lactantes |
| Método | CLAR |
| Norma | NOM-131-SSA1-2012 |
| LM | Mínimo =60 µg/100 kcal ~ 2.7mg/kg Máximo 180 µg/100 kcal ~ 8.1mg/kg |
| Recuperación | Evaluar |
| LD (≤ mg/kg) | Evaluar |
| LC (≤ mg/kg) | Evaluar |
| Reproducibilidad | Evaluar |
| Repetibilidad | Evaluar |
| Intervalo lineal y de trabajo | Evaluar |
| Incertidumbre | Evaluar |

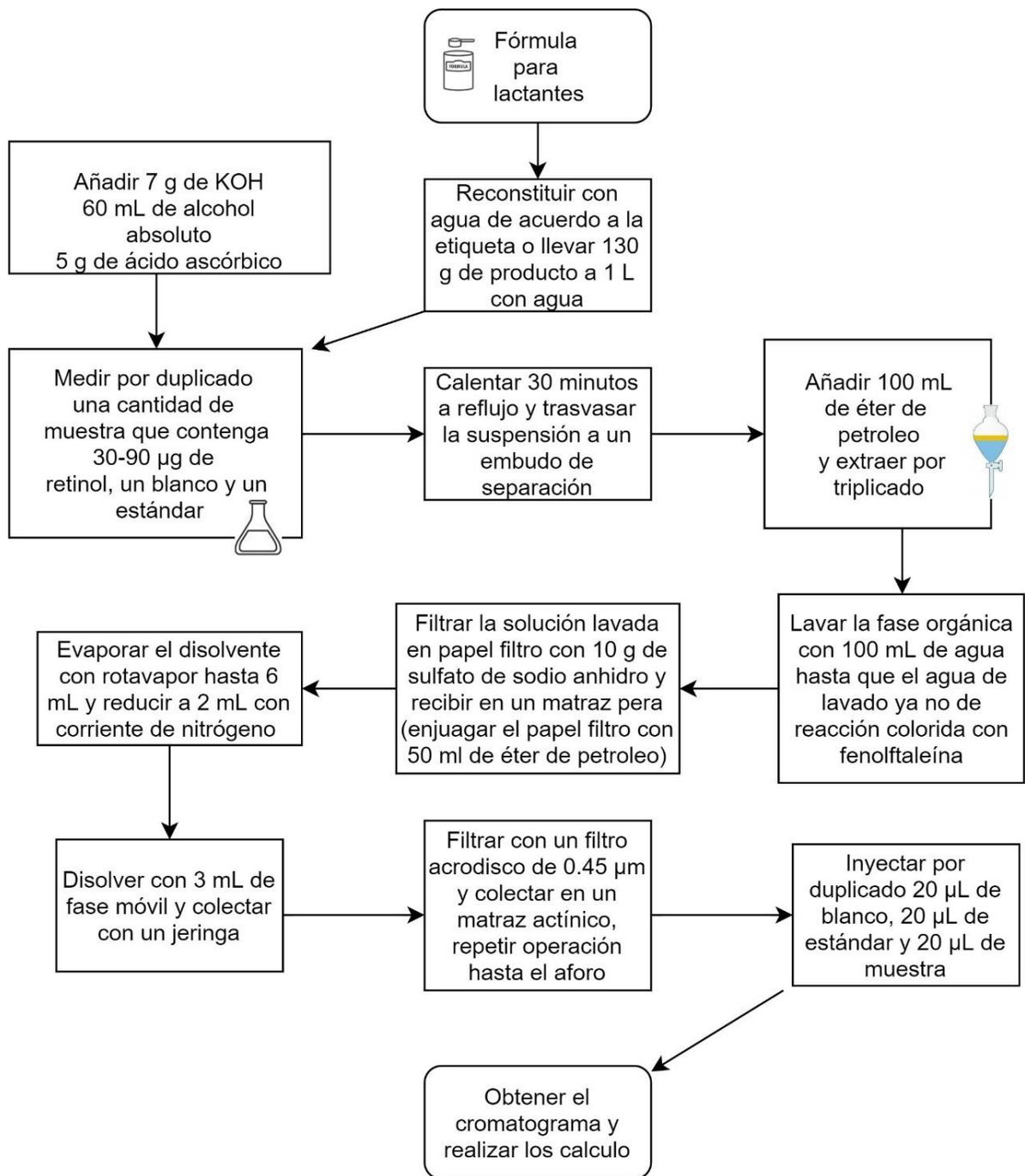


Figura 30. Determinación de vitamina A en fórmula para lactantes
Elaboración propia

Ejemplo 5. Método basado en espectroscopia

Se presenta un ejemplo de un método Codex Tipo 3 (CODEX STAN 234, 1999), dicho método se encuentra en la normatividad mexicana y es aplicable para la determinación de fluoruros en agua mineral, Figura 31, la Tabla 46 contiene los parámetros de desempeño a evaluar, en este caso deben evaluarse todos los parámetros para la verificación. .

Tabla 46. Parámetros de desempeño aplicables a la verificación de un método basado en UV- Visible

| | |
|--------------------------------------|--|
| Tipo de método | III |
| Fundamento | Se basa en la reacción entre el ion fluoruro y los iones zirconio en medio ácido para producir un compuesto colorido que es medido espectrométricamente a una longitud de onda de 570 nm (NOM-201, 2002) |
| Sobre el LM | Se establece un límite máximo de fluoruros. |
| Analito | Fluoruros |
| Matriz | Agua mineral natural |
| Método | UV-Visible |
| Norma | NOM-201-SSA1-2002 |
| LM | 1.5 mg/L |
| Recuperación | Evaluar |
| LD (\leq mg/kg) | Evaluar |
| LC (\leq mg/kg) | Evaluar |
| Reproducibilidad | Evaluar |
| Repetibilidad | Evaluar |
| Intervalo lineal y de trabajo | Evaluar |
| Incertidumbre | Evaluar |

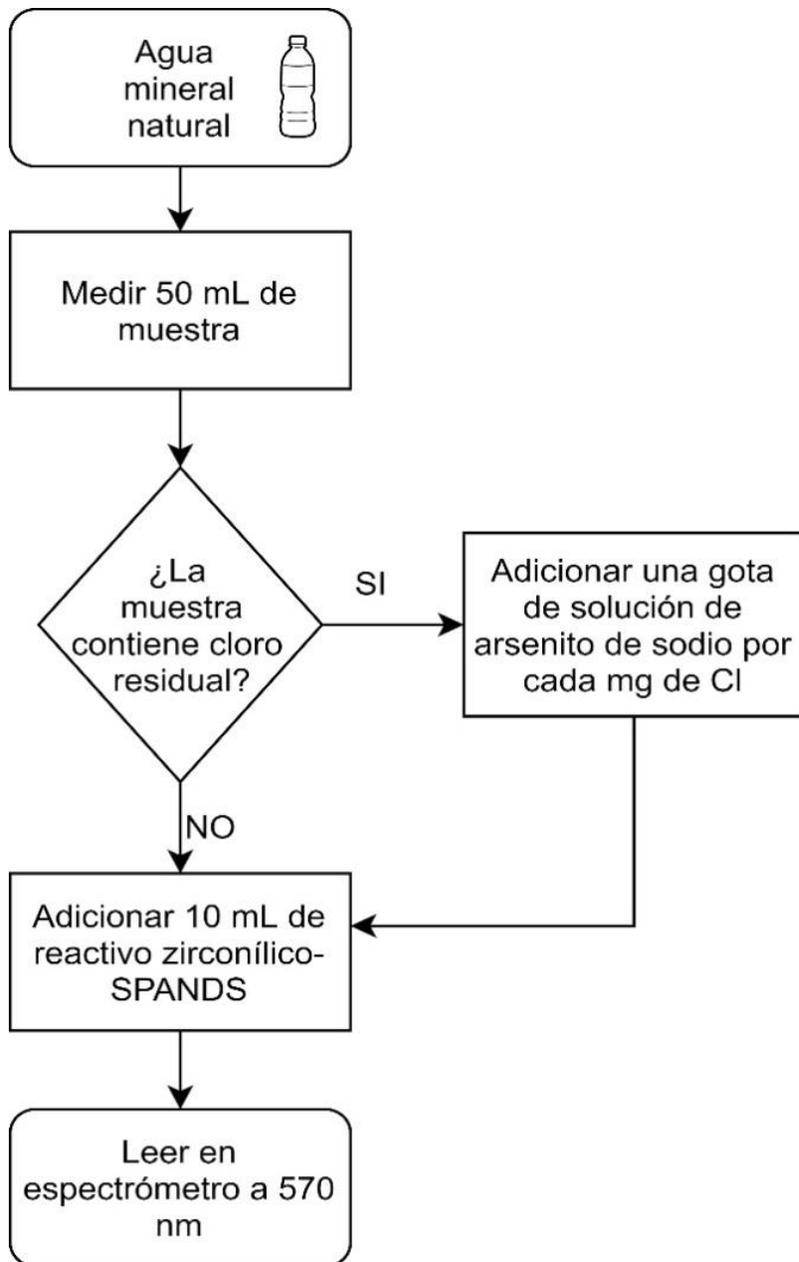


Figura 31. Determinación de fluoruros en agua mineral
Elaboración propia

CAPÍTULO 5. DOCUMENTACIÓN

Una vez completada la validación es importante reportar el procedimiento analítico, esto es necesario para fines relacionados con auditorías y evaluaciones, así como por requisitos reglamentarios además, permite su uso de una manera rutinaria y sin ambigüedades. Documentar un método es una tarea complicada, la información debe aparecer en el orden que se espera sea necesitada, se debe evitar asumir que el entendimiento será el mismo para los que lo han elaborado como para los usuarios, la utilidad del informe se puede comprobar proponiendo su uso por una persona con conocimientos técnicos solicitando su aplicación tal y como se ha escrito, si es resultado es favorable debe difundirse (Morrillas, 2016).

La calidad de la documentación tiene un efecto directo en el uso del método, debido a esto algunas entidades han establecido los requisitos mínimos que se deben cumplir al momento de elaborarla. La Junta Nacional de Acreditación de Irlanda (INAB, por sus siglas en inglés) establece que para cada trabajo de validación, el laboratorio debe elaborar un informe que como mínimo contenga los siguientes puntos.

- Una declaración sobre la escala de validación decidida
- Un protocolo para el trabajo de validación en cuestión (o una referencia al mismo)
- Resultados del trabajo de validación (o referencia al mismo)
- Una evaluación final de estos resultados
- Una declaración sobre la validez del método de análisis, cuando corresponda, la aprobación del método

Además el informe debe estar firmado por la persona responsable del método y debe conservarse en el laboratorio como parte de la documentación del método de análisis en cuestión (INAB, 2019).

Por su parte, la guía de validación de métodos analíticos del CNQFB indica que es crítico documentar los registros analíticos, dicha documentación debe estar ordenada y disponible, en responsabilidad del área de calidad, señala

que las actividades de la validación de un método analítico deben ser sustentadas por los siguientes documentos según se trate del plan de validación o del reporte de validación (CNQFB, 2002).

a) Protocolo

- Título
- Propósito u Objetivo
- Responsabilidades
- Plan de prueba describiendo los parámetros de desempeño que permitan verificar la aplicación analítica deseada
- Criterios de aceptación para cada parámetro
- Formato de registro de resultados

b) Reporte

- Título
- Resultados
- Análisis de resultados
- Confrontación contra los criterios de aceptación
- Conclusión

El *INAB* considera como documentación el informe de validación, el *CNQFB* considera tanto el plan de validación como el informe de validación, no obstante la *Eurachem* señala que un modelo sencillo es combinando el plan y el informe de validación mencionando los puntos que se indican a continuación.

- Identificar el método
- Fecha
- Quién realizó la validación
- Información sobre el alcance (breve)
- Descripción del método (sencilla)
- Estado del método (método de norma internacional, método desarrollado internamente, etc.)

- Analito de interés
- Unidad de medida
- Tipo de muestra
- Descripción del propósito (validación completa de un nuevo método, verificación del desempeño de un método normalizado, extensión del alcance del método, etc.)
- Características de desempeño a evaluar y breve explicación,
- Descripción de los experimentos a realizar, la evaluación de los resultados obtenidos y conclusiones derivadas de los mismos (cada característica de desempeño en secciones separadas del informe),
- Recapitulación del trabajo de validación y sus resultados
- Declaración sobre la adecuación al uso del método.

La misma *Eurachem* incluye un formato orientativo como referencia basado en la norma ISO 78-2 (Morrillas, 2016).

Un ejemplo de la documentación se presenta en la Tabla 47, es la adaptación de un extenso informe de la validación de un método para la determinación de histamina en productos de la pesca mediante kit enzimático, la adaptación no incluye los resultados ya que lo relevante es la forma en la que se documentó y los puntos considerados para ello. La documentación comienza con una introducción acerca de la VMA, seguida de lo resumido en los incisos 2-5 de la Tabla 47. Posterior a esto se encuentra la parte más extensa del informe en la cual se indican los parámetros que se evaluaron durante la validación del método, todos por separado, cada uno con su definición, breve descripción del procedimiento experimental, confrontación contra los criterios de aceptación y conclusión. La parte final del informe consta de un cuadro resumen de los parámetros evaluados, nombre y cargo de la persona que llevo a cabo la validación, la indicación de que el método fue aceptado, firma y fecha. El informe contiene como anexos criterios de aceptación tomados de la AOAC para la recuperación, cálculos de precisión basados en la ecuación de Horwitz y cálculos para la incertidumbre (CYTMA, 2017).

Tabla 47. Ejemplo de un informe de la validación de un método para la determinación de histamina en productos de la pesca mediante kit enzimático

| |
|---|
| *1) Introducción |
| 2) Nombre completo del método: Procedimiento para la determinación de histamina mediante la utilización de un kit enzimático y posterior medida en un analizador automático. |
| 3) Tipo de método: Cuantitativo |
| 4) Analito: Histamina Unidades: mg/kg Matriz: atún crudo, atún al natural, atún en aceite, sardina fresca, sardina en aceite, semiconserva de anchoa Rango: de 10 a 200 mg/kg |
| 5) Analito, rango y unidades: Histamina, rango de 10 a 500 mg/kg. Acreditación: PEE/1/119, acreditado por ENAC según UNE-EN ISO/IEC 17025 (Anexo Técnico nº 96/LE230) Matriz: Productos de la pesca, de la acuicultura y sus derivados Método: HPLC- detector UV |
| *6) Parámetros de desempeño |
| *7) Recapitulación del trabajo de validación |
| *8) Incluye el nombre y cargo de la persona que llevo a cabo la validación |
| *9) Indicación de que el método fue aceptado y la firma y fecha |
| *10) Firma y fecha |
| *11) Anexos |

*No incluido debido a la extensión

Fuente: adaptado de (CYTMA, 2017)

CONCLUSIONES

- El conocimiento de la VMA es de gran importancia para el análisis de alimentos, a nivel industrial se pudo observó la presencia de laboratorios acreditados en el área de alimentos en casi toda la república.
- A nivel educativo desde 1988 la VMA es un tema recurrente en los trabajos de titulación por tesis, demostrando que es una actividad que no pierde vigencia y su aplicación tiene un impacto real. En los trabajos de tesis se aborda la validación con diferentes enfoques, algunos de enseñanza para preparar egresados con conocimientos en el tema mediante la elaboración de material didáctico, aplicaciones para teléfonos inteligentes y videos en plataformas digitales.
- Para definir a la VMA se deben incluir en el sistema completo documentación, procedimientos, plan de validación, experimentos, revisión de resultados, informe de validación, todo bajo la definición clara del alcance de la misma.
- Los parámetros de validación buscan considerar todas las fuentes de error que pueden presentarse al momento de llevar a cabo alguna determinación, sean laboratorios, experimentaciones, instrumentos y analistas, para tales parámetros se asignan valores debidamente justificados, que cuantifican los errores en un valor numérico, que al estar debajo o por encima de él, según sea el caso, para asegurar la fiabilidad de los resultados.
- El decidir el alcance de la validación (completa o parcial) se deben tener en cuenta muchas consideraciones tales como la concentración de los analitos, procedimiento experimental e instrumentos, por mencionar algunos, siendo así la validación una tarea no cien por ciento matemática, ya que implica un gran criterio analítico.

- La VMA no es una tarea para una sola persona sino un trabajo en equipo, por lo cual los analistas deben contar con un grado de conocimiento técnico lo cual tendrá gran influencia en el éxito de esta tarea, la generación de un buen informe de validación tendrá un buen peso de la continuidad del éxito, ya que servirá para el uso rutinario del método, como prueba de lo realizado en los laboratorios y como guía para los nuevos analistas que se van incorporando al deber analítico.
- El generar una herramienta de este estilo permite tener un mejor entendimiento acerca de la VMA a los futuros validadores en el área de alimentos, no se considera una herramienta absoluta para el aprendizaje, pero sí útil, ya que este depende de las formas de adquisición de conocimiento de los usuarios.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC INTERNATIONAL. (2002). *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.
- AOAC INTERNATIONAL. (2012). *AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines or Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces*.
- AOAC INTERNATIONAL. (2016). *Appendix F: Guidelines for Standard Method*.
- CAC. (2009). *Directrices sobre la terminología analítica*.
- CAC. (2019). *Procedural Manual*. Rome.
- Cáñez, M., & García, A. (2015). Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XVII(I), 32-39.
- CCAYAC-P-058. (2011). *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*.
- CENAM, & EMA. (2008A). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.
- CENAM, & EMA. (2008A). Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean la técnica de gravimetría de masa.
- Chico, J. R. (2010). Derecho y trazabilidad: análisis de la normativa horizontal clave sobre seguridad alimentaria en España. *Contribuciones a las Ciencias Sociales*.
- CNQFB. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. . México*.
- CODEX STAN 234. (1999). *Métodos de análisis y de muestreo recomendados*.
- CYTMA. (2017). *Informe de validación del método de determinación de histamina en productos de la pesca mediante kit enzimático desarrollado por biosystems s.a.*
- Delgado, G. (2009). Validación y verificación de métodos de ensayos. Un dilema en los laboratorios de ensayos y en las auditorías de la acreditación. *Universitas*, 14-21.

- DOF. (2019). *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado Julio 10, 2019, de <https://www.dof.gob.mx/>
- EMA. (2018). *Manual de procedimientos criterios de aplicación de la norma iso/iec 17025 guía*.
- EMA. (2019). *Entidad Mexicana de Acreditación*. Recuperado agosto 15, 2019, de http://consultaema.mx:75/directorio_le/Principal.aspx
- Escalona, A. (2004). *Extracción en fase sólida (SPE) para tratamiento de muestras de alimentos para análisis por cromatografía*. Caracas.
- Eurachem, & CITAC. (2012). *Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas*. España.
- FAO. (1992). *Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. 12. La Garantía de la Calidad en el Laboratorio Microbiológico de Control de los Alimentos*. Roma.
- FAO. (2002). *Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo*. Roma.
- FAO. (2005). *Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América del Sur*. Bogotá.
- FAO. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. Roma.
- FDA. (2015). *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds*.
- FEM. (2005). *Validation and Peer Review of U.S. Environmental Protection Agency Chemical Methods of Analysis*.
- FEM. (2009). *Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis*.
- Fernández, H. Z. (2004). *Análisis Químico de los Alimentos - Métodos Clásicos*. Cuba: Universitaria.
- Florez, O., Tobón, G., & Baena, J. (2002). Validación de la técnica de análisis del tamaño de partículas mediante un microscopio de luz óptica asistido por un computador personal. *Vitae*, IX(1), 43-50.

- Guerrero, M., & Herrera, J. (2016). Desarrollo, validación y estimación de incertidumbre de un método cromatográfico para determinar residuos de plaguicidas organofosforados y cipermetrina en tomate. *Revista Agua y Conocimiento*, 11(1), 19-33.
- Haustein, M. (2015). *Horwitz Ratio: as an extended criterion for the assessment of the reproducibility in collaborative trials*. Dormagen, Germany.
- Hernández, V. (2018). *YouTube*. Recuperado Octubre 15, 2019, de CETA FES Zaragoza:
<https://www.youtube.com/watch?v=VJ69IWIEa2c&list=PLcqMUZDaIgtXJHZV0YswL82ISlexvtuly&index=4>
- Huerta, C. (1998). Las Normas Oficiales Mexicanas en el ordenamiento jurídico mexicano. *Revistas jurídicas UNAM*(92), 367-398.
- IAAC. (2007). *¿Acreditación de laboratorios o certificación ISO 9001?*
- INAB. (2019). *Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories (ISO 17025)*.
- INFOSAN. (2006). *Alergias alimentarias*.
- ISO 17025. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.
- ISO 9000. (2015). *Sistemas de gestión de calidad- Fundamentos y vocabulario*. Ginebra.
- ISO/IEC. (2008). *ISO Guide 98-3* (Primera ed.).
- ISPCH. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos*. Santiago.
- IUPAC. (2019). *Compendium of Chemical Terminology*. Recuperado Octubre 2, 2019, de <https://goldbook.iupac.org/>
- Kovalent. (2011). *GLUCOSA GOD-PAP*.
- Lazos, R., & Hernández, I. (2004). *La validación de métodos: un enfoque práctico. Simposio de metrología*.
- LFMN. (2018). *Ley Federal sobre Metrología y Normalización*.

- Mallqui, L. A. (2014). *Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos* (Segunda ed.). Perú: TEIA.
- Melo, G., & Suárez, R. (2014). *Elaboración de la tabla de composición química de alimentos industrializados que se expenden en la ciudades de Quito y Duale. parte 1*. Ecuador.
- Miller, J., & Miller, J. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica* (Cuarta ed.). Pearson educación: Madrid.
- Molina, I., Zapata, E., & Castro, E. (2010). Validación de un método de análisis de azufre total en combustibles usando espectrometría de fluorescencia de rayos x. *Simposio de metrología*.
- Morrillas. (2016). *La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (Primera ed.). España.
- NOM-040. (1993). *Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA1-1993, Productos y servicios. Sal yodada y sal yodada fluorurada. Especificaciones sanitarias*.
- NOM-059. (2015). *NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos*.
- NOM-117. (1994). *Norma oficial mexicana nom-117-ssa1-1994, bienes y servicios. método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica*.
- NOM-131. (2012). *NORMA Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación*.
- NOM-155. (2012). *NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*.
- NOM-201. (2002). *NORMA Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitaria*.
- NOM-247. (2008). *NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales,*

- OGA. (2007). *Política de Selección y Validación de métodos de ensayo*".
- Oliva, O., & Fragoso, S. (2013). Consumo de comida rápida y obesidad, el poder de la buena alimentación en la salud. *RIDE Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*, IV(7), 176-199.
- Orozco, L. (2010, Junio 3). *¿Qué son las Normas Oficiales Mexicanas (NOMs)?* Recuperado Noviembre 4, 2019, de nexos El juego de la suprema corte: <https://eljuegodelacorte.nexos.com.mx/?p=324>
- Rayo, K., & Rivera, T. (2014). *validacion del método analítico de cuantificación de ibuprofeno en tabletas de 600 mg por cromatografía líquida de alta resolución*.
- Rivera, C., & Rodríguez, M. d. (2010). *Uso de la Ecuación de Horwitz en Laboratorios de Ensayo NMX-EC-17025-IMNC-2006*. Chihuahua.
- Rivera, C., & Rodríguez, R. (2011). *Horwitz equation as quality benchmark in ISO/IEC 17025 testing laboratory*. Chihuahua.
- SE. (2011, Noviembre 17). *Clasificación de los diferentes tipos de Normas Oficiales Mexicanas*. Recuperado Noviembre 4, 2019, de http://www.protlcuem.gob.mx/swb/work/models/siam/posicionamiento/articulos_posicionamiento/Clasificaci%C3%B3n%20de%20los%20diferentes%20tipos%20de%20normas%20oficiales%20mexicanas.pdf
- SE. (2019). *Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas*. Recuperado Julio 7, 2019, de <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/inicio.do>
- SINEC. (2019). *Sistema Integral de Normas y Evaluación de la Conformidad*. Recuperado Julio 10, 2019, de <https://www.sinec.gob.mx/SINEC/>
- Skoog, D. (2015). *Fundamentos de química analítica* (Novena ed.). D.F.: Cengage learning.
- Srivastava, K. (2017). An updated review: Analytical Method Validation. *European Journal of Pharmaceutical*, IV(9), 774-784.
- Suarez, R., Evelia, A., Linares, L., Francisco, U., & Hernández, G. (2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en Química*, 4(2), 53-62.

- UNAM. (2019A). *LabUNAM*. Recuperado Julio 31, 2019, de <http://labunam.unam.mx/certificados.php>
- UNAM. (2019B). *TESIUNAM*. Recuperado 07 31, 2019, de <http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F?RN=659869900>
- UNODC. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Viena.
- Van den, H., & Mol, J. (2017). Determination of phomopsin-A in lupin seeds and lupin-derived products: results of an interlaboratory validation study.
- VIM. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y terminos asociados* (Tercera ed.). España.
- Zagal, E., & Sadzawka, A. (2007). *Implementación del Sistema para la validación de los análisis y mediciones de laboratorios en suelos y lodos*. .