



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO PARA LA  
VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS: UNA  
MIRADA A LAS DIRECTRICES DE ALGUNAS  
ÁREAS DE ESPECIALIDAD**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO**

**P R E S E N T A:**

**ASAEL GARCÍA CRUZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 PROF: AGUEDA ELENA CENICEROS GOMEZ**

**VOCAL: PROF: NORMA RUTH LÓPEZ SANTIAGO**

**SECRETARIO PROF: XOCHQUETZAL GONZALEZ RODRIGUEZ**

**SUPLENTE 1 PROF: ALLAN NOE DOMINGUEZ ROMERO**

**SUPLENTE 2 PROF: ERIKA IVONNE VILLAGRANA MACIAS**

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. NORMA RUTH LÓPEZ SANTIAGO**

---

**SUSTENTANTE: ASael GARCÍA CRUZ**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por todo lo aprendido en mi estancia académica, por los conocimientos adquiridos y las grandes amistades que me llevo.

A la Facultad de Química por formarme como profesional, pero sobre todo como ser humano.

A la Dra. Norma Ruth López Santiago por su gran apoyo, por todo el conocimiento que me ha transmitido y por el tiempo dedicado en este trabajo.

A los miembros del jurado por su tiempo, dedicación y sus valiosas aportaciones que hicieron en este trabajo.

Al Dr. Filiberto Rivera Torres por su valiosa amistad y por sus enseñanzas a lo largo de estos años.

A mi familia que me ha ayudado desde siempre, por todo el amor y el ímpetu para seguir adelante.

A todos mis amigos, en especial los que fui conociendo durante la carrera, que con risas y lágrimas pudimos afrontar innumerables retos y que sin ellos yo no sería la persona que soy ahora.

# CONTENIDO

Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	viii
Lista de abreviaturas y acrónimos	x
Resumen	xiii
Introducción	xiv
OBJETIVO GENERAL	xv
OBJETIVOS PARTICULARES	xv
CAPÍTULO 1. LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	16
1.1 Los métodos analíticos	16
1.2 Definición general	18
1.3 Importancia de la VMA	20
1.3.1 ISO 17025	21
1.3.2 Importancia de la VMA a nivel productivo	22
1.3.3 Importancia a nivel académico	22
CAPÍTULO 2. Guías de validación	26
2.1 Conceptos generales	26
Documentación	29
2.2 Guías de validación generales	31
2.3 Guía del área de especialidad “Alimentos”	33
2.4. Guía del área de especialidad “Farmacia”	36
2.5 Guía del área de especialidad Bioanalíticos	38
2.6 DISCUSIÓN GENERAL DEL APARTADO	40
CAPÍTULO 3. CASOS DE APLICACIÓN	42
3.1 Ejemplo de método del área de Alimentos	42
Caso A: “Validación de metodología analítica para la determinación de sodio por espectroscopía de absorción atómica en matrices cárnicas”	42

3.2 Casos del área de especialidad “Farmacia”	48
3.3 Casos del área de especialidad “Bioanálíticos”	54
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL	60
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS	71
Anexo I	77

## Lista de Figuras

Figura 1. Clasificación de métodos analíticos.....	18
Figura 2. Tesis de validación de métodos analíticos por tema.....	23
Figura 3. Tesis de validación de métodos analíticos en el periodo de 1984-julio de 2019 .....	24
Figura 4.Diagrama experimental para la determinación de sodio en matrices cárnicas por espectroscopía de absorción atómica .....	43
Figura 6.Diagrama experimental método EPA 8080 Plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados por cromatografía de gases.....	46
Figura 7.Diagrama experimental de la prueba de Levofloxacino .....	53
Figura 8.Diagrama experimental del método (Bradford, y otros, 2017) .....	58



## Lista de Tablas

Tabla 1. Definiciones de validación de método analítico .....	19
Tabla 2. Casos en que debe validarse un método analítico .....	19
Tabla 3. Laboratorios con Certificado ISO 9001:2015 dentro de la UNAM .....	25
Tabla 4 Laboratorios acreditados con ISO 17025:2017 dentro de la UNAM y entidad a la que pertenecen .....	25
Tabla 5. Parámetros de desempeño y su definición .....	26
Tabla 6. Criterios para el desempeño de los parámetros de validación .....	28
Tabla 7. Documentación o registros del proceso de validación de acuerdo a distintas guías de validación .....	30
Tabla 8. Parámetros de desempeño que utilizan diferentes guías de validación para métodos cuantitativos. ....	31
Tabla 9. Parámetros de validación para métodos cualitativos y cuantitativos de guías generales de VMA.....	32
Tabla 10. Parámetros cualitativos descritos en la guía Eurachem.....	33
Tabla 11. Parámetros de desempeño y documentación presente en Guidelines for the Validation of chemical Methods in Food, feed, Cosmetics, and Veterinary Products .....	35
Tabla 12.. Nivel de confianza para pruebas de falsos positivos y falsos negativos .....	35
Tabla 13. Nivel de validación y número de pruebas recomendadas para métodos de cromatografía .....	36
Tabla 14. Criterio para los parámetros de validación de acuerdo con ICH Q2(R1) .....	37
Tabla 15. Parámetros de validación de acuerdo con Bioanalytical Method Validation-Guidance for Industry. ....	39
Tabla 16. Parámetros presentes en las distintas guías de validación que cuentan con criterio de aceptación se muestran a continuación, los demás criterios pueden o no estar presentes en las guías pero no se menciona un criterio de aceptación.....	41
Tabla 17. Parámetros de acuerdo con Validación de metodología analítica para la determinación de sodio por espectroscopia de absorción atómica en matrices cárnicas .....	44
Tabla 18. Parámetros de validación presentes en Validación parcial de un método de detección de pesticidas organoclorados en vinaza, por cromatografía de gases .....	47

Tabla 19. Parámetros de validación presentes en la FEUM .....	49
Tabla 20. Parámetros de validación de acuerdo con ICH .....	52
Tabla 21.. Parámetros de validación de la guía C-Path Points to consider document: Scientific and Regulatory Considerations for the Analytical validation of Assays Used in the Qualification of Biomarkers in Biological Matrices .....	54
Tabla 22. Criterios para reproducibilidad en laboratorios .....	56
Tabla 23. Parámetros de validación de acuerdo a la guía Analytical validation of protein biomarkers for risk of spontaneous preterm birth .....	57
Tabla 24. Criterios de evaluación presentes en las guías .....	59

## Lista de abreviaturas y acrónimos

<b>AOAC</b>	Asociación Oficial de Químicos Analíticos (del inglés Association of Official Analytical Chemists)
<b>ASTM</b>	Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales (del inglés American Society for Testing and Materials)
<b>BQL</b>	Límite bajo de cuantificación (por sus siglas en inglés)
<b>CAC</b>	Comisión del Codex Alimentarius
<b>CCs</b>	Ensayos cromatográficos (por sus siglas en inglés)
<b>CGCI</b>	Coordinación de Gestión para la Calidad de la Investigación
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>CV<sub>H</sub>/DER<sub>H</sub></b>	Coeficiente de variación de Horwitz
<b>CV<sub>RI</sub>/DER<sub>RI</sub></b>	Coeficiente de variación obtenido cuando se unifican todos los datos
<b>DE</b>	Desviación Estándar
<b>DER</b>	Desviación Estándar Relativa
<b>DGN</b>	Dirección General de Normas
<b>DIN</b>	Instituto Alemán de Normalización (del alemán Deutsches Institut für Normung)
<b>EMA</b>	Entidad Mexicana de Acreditación
<b>EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental (del inglés Environmental Protection Agency)
<b>FAO</b>	Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés Food and Agriculture Organization)
<b>FDA</b>	Administración de Medicamentos y Alimentos (del inglés Food and Drug Administration)
<b>FEUM</b>	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

<b>FIL-IDF</b>	Federación Internacional de Lechería
<b>GVMA</b>	Guías de Validación de Métodos Analíticos
<b>HQC</b>	Intervalo alto del límite bajo de cuantificación (por sus siglas en inglés)
<b>IEC</b>	Comisión Electrotécnica Internacional (del inglés International Electrotechnical Commission)
<b>IS</b>	Estándares internos (por sus siglas en inglés)
<b>ISO</b>	Organización Internacional de Normalización (del inglés International Organization for Standardization)
<b>IPPC</b>	Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (del inglés International Plant Protection Convention)
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés International Union of Pure and Applied Chemistry)
<b>LBAs</b>	Ensayos de unión de ligandos (por sus siglas en inglés)
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>LLOQ</b>	Límite inferior de cuantificación (por sus siglas en inglés)
<b>MR</b>	Material de referencia
<b>MRC</b>	Material de referencia certificado
<b>MSF</b>	Médicos Sin Fronteras
<b>OC</b>	Plaguicidas organoclorados
<b>OCDE</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (del inglés Organization for Economic Co-operation and Development)
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal (Conocida Originalmente como Oficina Internacional de Epizootias)
<b>OMC</b>	Organización Mundial del Comercio

<b>QC/QCs</b>	Muestras de control de calidad (por sus siglas en inglés)
<b>Se</b>	Medida de error dada por la desviación estándar de regresión lineal ( $S_{y/x}$ ) o desviación estándar de la ordenada al origen ( $S_a$ )
<b>UIT</b>	Unión Internacional de Telecomunicaciones
<b>ULOQ</b>	Límite superior de cuantificación
<b>UNE</b>	Asociación Española de Normalización
<b>USP</b>	Farmacopea de Estados Unidos (del inglés United States Pharmacopeia)
<b>VIM</b>	Vocabulario Internacional de Metrología
<b>VMA</b>	Validación de Métodos Analíticos

## Resumen

En este trabajo se llevó a cabo una revisión de algunas guías de validación de métodos analíticos con énfasis en los parámetros de desempeño desde la perspectiva de distintas áreas de especialidad.

Se analizó la importancia de la selección de los parámetros de desempeño en la validación de un método analítico considerando los recomendados en guías emitidas por instancias de reconocido prestigio International Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Food and Drug Administration, Instituto de Salud Pública de Chile, entre otras.

Dentro de los temas analizados se encuentran las generalidades de “La Validación de Métodos Analíticos”, la importancia que tiene la validación de métodos en distintos sectores. Se llevó a cabo un análisis de los parámetros de desempeño sugeridos en cada guía que dependiendo del área de especialidad son seleccionados u omitidos. La revisión que se realizó incluye las guías generales del sector farmacéutico, alimenticio y bioanalítico, dentro de estas áreas de especialización se registra el tipo de método (cualitativo o cuantitativo), los parámetros presentes en la guía, así como los criterios de aceptación de dichos parámetros (no todas las guías especifican), analito de interés, matriz, nombre y clave del método, entidad que lo emite y se compara mediante tablas los distintos parámetros que se describen en las guías.

Finalmente, por cada sector se estudian dos casos de aplicación en donde se copila la información en tablas y además se incorpora un breve diagrama experimental del método publicado, generalmente una guía no dice cuando un término se usa de manera adecuada o incorrectamente.

## Introducción

La normalización y las regulaciones técnicas han sido una prioridad de las políticas de competencia internacional durante mucho tiempo para los laboratorios, esto no ha pasado desapercibido y hoy en día estas regulaciones están completamente estandarizadas, lo que permite una mejor gestión de la calidad de los laboratorios lo que repercute en reducir los gastos y una optimización de los procedimientos, y consecuentemente mejores resultados.

Para asegurar la confiabilidad de los resultados es imperante que los laboratorios cuenten con métodos validados, en este sentido la validación de métodos analíticos (VMA) es transcendental en los análisis químicos, de ahí la importancia de tener bien definidos los parámetros de validación para cada método analítico. El proceso de validación de un método tiene como objetivo el demostrar que este es adecuado para su propósito.

En la literatura existen diversas guías para llevar cabo la VMA, en estas incluyen directrices sobre los diferentes parámetros de desempeño del método, de acuerdo con el área de especialidad de la institución que emita la guía de validación. Las características clásicas para evaluar el desempeño de un método son la precisión, los límites de detección y cuantificación, la recuperación, robustez, selectividad, especificidad y la veracidad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar las directrices dictadas en guías de validación de áreas de especialidad para la estimación de los parámetros de desempeño necesarios para efectuar la validación de métodos analíticos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Distinguir la importancia de la validación de métodos analíticos en distintas áreas de especialidad.
- Identificar las directrices dictadas desde distintas áreas de especialidad para la estimación de los parámetros de desempeño necesarios para efectuar la validación de métodos analíticos.
- Contrastar la información encontrada en las distintas guías de las áreas de especialidad.



## CAPÍTULO 1. LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Cada día se efectúan numerosas pruebas, mediciones y exámenes en laboratorios de todo el mundo ¿el por qué? hay innumerables razones por las que se requiere de un resultado de medición, por ejemplo, para valorar bienes con fines comerciales; apoyar la asistencia sanitaria; controlar la calidad de agua potable, alimentos y piensos<sup>1</sup>; analizar la composición elemental de una aleación para confirmar su idoneidad para su uso en la construcción de aviones; el análisis forense de fluidos corporales en las investigaciones criminales. Prácticamente todos los aspectos de la sociedad se apoyan, de alguna manera, en el trabajo analítico (Morillas, 2016). Básicamente, estamos hablando de determinaciones que pueden resultar costosas, no sólo por ellas en sí, sino por las decisiones que se toman a partir de sus resultados. Así, es bien sabido que un dado producto puede traer cuantiosas pérdidas si el error es por defecto, o grandes reclamos si el mismo es por exceso. Y en lo relacionado a la protección de la salud y el medio ambiente, los errores pueden ser tan graves como para comprometer la vida de las personas (Cubrellati & Di Risio, 2009). Es por eso por lo que, en todo el mundo, existe una creciente inquietud acerca de la forma de realizar las determinaciones analíticas, lo que implica cada vez mayores esfuerzos a fin no sólo de llevarlas a cabo correctamente, sino de que se pueda demostrar que los resultados obtenidos son confiables (Cubrellati & Di Risio, 2009).

### 1.1 Los métodos analíticos

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de muestra.

Los métodos analíticos se clasifican de forma general en normalizados y no normalizados.

---

<sup>1</sup> Alimento seco que se le da al ganado, ejemplo: zacate

- Un método normalizado es apropiado para el ensayo dentro de su alcance, lo publican organismos de normalización internacional, nacional o regional como lo es ISO, Comisión Electrotécnica Internacional (por sus siglas en inglés IEC), Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales (por sus siglas en inglés ASTM), Instituto Alemán de Normalización (por sus siglas en alemán DIN), Dirección General de Normas (DGN), etc..., o por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos como la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (por sus siglas en inglés AOAC), Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF), Agencia de Protección Ambiental (por sus siglas en inglés EPA), Farmacopea de Estados Unidos (por sus siglas en inglés USP), etc... (ISP, 2010).
- Los métodos no normalizados son alternativas que demuestran o estiman el mismo analito tal cual se mide utilizando el método normalizado (Vega, 2011).

Otra clasificación de los métodos analíticos es en cualitativos o cuantitativos. Un método cualitativo es aquel que permite determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra o matriz; mientras que un método cuantitativo permite determinar la concentración de un analito presente en una muestra (ISP, 2010).

Otra clasificación deriva del tipo de análisis de que efectúa:

- Métodos químicos o clásicos, que se basan en reacciones químicas, como son el análisis volumétrico y análisis gravimétrico.
- Métodos fisicoquímicos o instrumentales, con fundamento en las interacciones físicas, como son los métodos espectrofotométricos, métodos electroanalíticos y métodos cromatográficos.

En la Figura 1 se presenta un esquema de la clasificación por tipo de análisis.

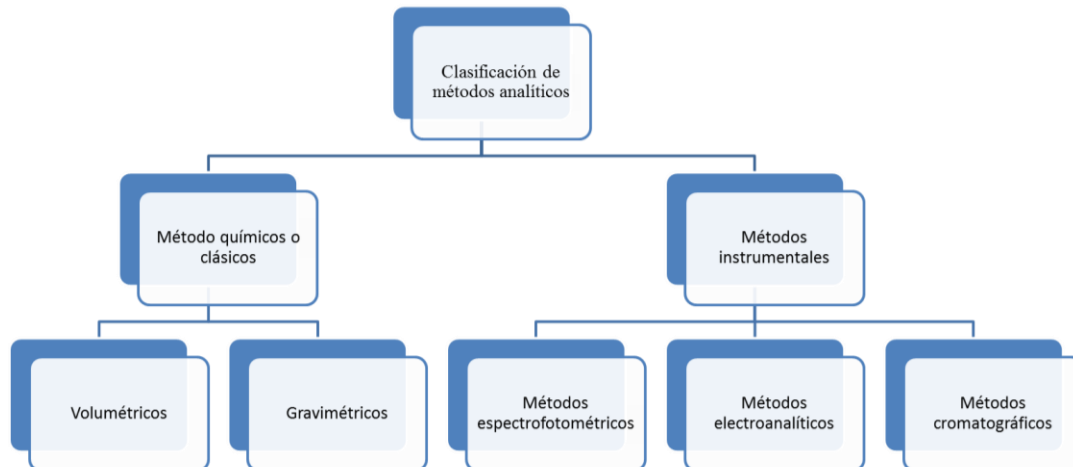


Figura 1. Clasificación de métodos analíticos

## 1.2 Definición general

La validación de métodos analíticos (VMA), es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada (CNQFB, 2002).

Hoy en día no existe un convenio entre organizaciones con una sola definición de la validación de métodos, así que existen varias interpretaciones, en la Tabla 1, se mencionan las guías publicadas por instituciones internacionales en las que se encuentran las emitidas por ISO, IUPAC, VIM, Eurachem y FDA.

Si bien las definiciones de VMA varían entre instituciones y estándares internacionales, existe un consenso en que la validación de un método analítico debe existir evidencia que confirme que se ha cumplido con los requisitos previamente especificados para el uso del método. Para futuras referencias de este trabajo utilizaremos la definición dada por ISO/IEC 17025:2017: “Aportación de evidencia objetiva de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto”.

**Tabla 1. Definiciones de validación de método analítico**

Institución	Definición
IUPAC	La validación del método hace uso de un conjunto de pruebas que prueban cualquier supuesto en el que se basa el método analítico y establecen y documentan las características de desempeño de un método, demostrando así si el método es adecuado para un propósito analítico particular (Thompson, 2002).
VIM-CEM	Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto (JCGM, 2012).
ISO 9000:2015	Confirmación, mediante la aportación objetiva, de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista (ISO, 2015).
Eurachem	Es el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas (Morillas, 2016).
ISO/IEC 17025:2017	Aportación de evidencia objetiva de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto (ISO, 2017).
FDA	Es un proceso mediante el cual un laboratorio confirma mediante examinación, y proporciona evidencia objetiva, que los requisitos particulares para usos específicos son cumplidos (FDA, 2019).

Elaboración propia con información de (Thompson, 2002; JCGM, 2012; ISO, 2015; Morillas, 2016; ISO, 2017; FDA, 2019).

La magnitud en que un laboratorio tiene que realizar la validación de un método nuevo, modificado o desconocido, depende en cierta medida del estado actual del método y de la competencia del laboratorio. En la Tabla 2 se mencionan algunos casos de cuando es requerido validar un método analítico (Thompson, 2002).

**Tabla 2. Casos en que debe validarse un método analítico**

Método de Análisis	Validación
Desarrollado internamente, incluyendo el uso de métodos estandarizados aplicados fuera del alcance.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deber ser completa.</li> <li>• El laboratorio debe obtener todos los parámetros de desempeño del método.</li> </ul> <p><i>En caso de que decida omitir alguna que fundamentar por qué.</i></p>
Publicados en la literatura científica, pero la publicación carece de información acerca de los parámetros de desempeño.	Validación interna completa.
Publicado en la literatura científica con especificaciones de los parámetros de desempeño más importantes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El laboratorio verificará su capacidad de utilizar el método de análisis con respecto a las características de desempeño especificadas.</li> <li>• El laboratorio documentará que el método es adecuado a su propósito.</li> </ul>
Método normalizado por una de las organizaciones de normalización: AOC, ISO, NOM	El laboratorio verificará su capacidad para cumplir con los parámetros de desempeño especificadas.

Elaboración propia con información de (Thompson, 2002)

### 1.3 Importancia de la VMA

La validación de métodos es un proceso por el cual un laboratorio demuestra con aportación de evidencia objetiva de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto (ISO, 2017), pero ¿cómo repercute la validación de métodos analíticos en el mundo?

Una vez terminada la Segunda Guerra Mundial en diversos países empezaron a estandarizar los métodos de ensayo; estandarizar o normalizar un método de análisis particular permite la creación de normas o estándares que establecen las características comunes que deben de cumplir los productos en diferentes partes del mundo (Secretaría de Economía, 2018), las normas establecen un criterio objetivo que aplica a un producto, un proceso, un sistema, una persona o un servicio (Pérez Munguía, 2014). Mientras más estandarizado esté un producto, más posibilidades hay para incrementar su economía de escala al comercializarse en más mercados, lo que conlleva una importante reducción de costos y el incremento de la eficiencia productiva de las empresas, al volverlas más competitivas (Pérez Munguía, 2014).

Durante muchos años, los expertos técnicos han trabajado para la homologación internacional de las normas. La Organización Internacional de Normalización (ISO), la Comisión Internacional Electrotécnica (IEC) y la Unión Internacional de Telecomunicaciones (UIT) desempeñan un papel importante en estos trabajos. Sus actividades han tenido un efecto importante sobre el comercio, en particular en los productos industriales (OCDE, 2018). En el contexto del acuerdo OMC/MSF, es importante mencionar las organizaciones específicas como OIE, IPPC y la Comisión Codex Alimentarius (CAC) establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) que también producen normas y de igual manera están siendo utilizadas a nivel mundial (ISO-ONU, 2010).

La Organización Internacional para la Normalización (ISO por sus siglas en inglés), es una federación de los organismos nacionales de normalización de 165 países (junio de 2021), uno por país, de todas las regiones del mundo, incluyendo países

desarrollados y en desarrollo (ISO-ONUDI, 2010). Esta organización creada en 1947 tiene el objetivo de brindar herramientas para facilitar las transacciones a nivel internacional tanto de objetos, bienes y servicios como de desarrollos científicos, actividades intelectuales, tecnológicas y económicas. Desde su fundación, ya se han elaborado más de 19 500 normas ISO que abarcan casi todos los ámbitos de la fabricación y tecnología. La familia de las ISO se clasifica en varias series que pretenden estandarizar temas variados de los cuales resaltaremos dos normas en específico: ISO 9001 e ISO 17025 (EAFIT, 2021).

La VMA surge como una medida para estandarizar procesos y optimizar los resultados, dando así mejores productos y cumpliendo con las normativas nacionales e internacionales.

### **1.3.1 ISO 17025**

La norma ISO/IEC 17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” menciona que el laboratorio debe usar métodos y procedimientos apropiados para todas las actividades de laboratorio y, cuando sea apropiado, para la evaluación de la incertidumbre de medición, así como también las técnicas estadísticas para el análisis de datos. El laboratorio debe asegurarse que se utiliza la última versión vigente de un método, a menos que no sea apropiado o posible (ISO, 2017).

La 17025 indica que en la validación de un método analítico se deben evaluar las características de desempeño que demuestren que este es adecuado para su uso previsto, asimismo indica que los parámetros obtenidos deben ser coherentes con los requisitos especificados (ISO, 2017).

Las características de desempeño pueden incluir, pero no deben limitarse a: el intervalo de medición, la exactitud, la incertidumbre de medición de los resultados, el límite de detección, el límite de cuantificación, la selectividad del método, la linealidad, la repetibilidad o la reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo y el sesgo (ISO, 2017).

### **1.3. 2 Importancia de la VMA a nivel productivo**

Los laboratorios de pruebas y calibración juegan un papel muy importante dentro de una organización, ya que son elementos de apoyo para determinar o verificar las propiedades de los productos, de acuerdo con criterios establecidos. En México, los estándares de producción han sido desarrollados por las dependencias gubernamentales, contando con el apoyo de la iniciativa privada, quienes, a final de cuentas, son los interesados directos de aplicar dichos estándares. La firma de tratados y convenios comerciales internacionales ha hecho necesario que los países tiendan a armonizar sus normas (Hernández, 2001).

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos deben de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados (UNODC, 2010).

El que una organización posea métodos de validación analíticos conlleva grandes beneficios a nivel productivo entre los que podemos encontrar (González, 2009):

- Aumento en los índices de satisfacción de los clientes y servicios basados en certidumbre y confiabilidad.
- Dar confianza en los resultados de estudios y una mayor seguridad al momento de efectuar los estudios.
- Optimizar los procesos, dando como resultado una disminución en los costos, desperdicios, repetición de pruebas, gastos extras de insumos y reactivos.
- Satisfacer las demandas del cliente en tiempos de atención y nivel de servicio.
- Inducir a que los proveedores de servicios, equipos y reactivos aumenten sus estándares de calidad en servicio, atención y producto e ir fomentando una cultura de calidad global y no aislada.

### **1.3.3 Importancia a nivel académico**

Como se describe en la tesis de “Chávez Velazco-La validación de métodos analíticos en el análisis general de alimentos” (Chávez Velazco, 2020), tal es la

importancia de la VMA en la cotidianidad de la vida profesional de un químico, que de acuerdo con la investigación, el número de trabajos de titulación por tesis encontrados en TESIUNAM, en el periodo de 1984 a julio de 2019, fue de 509 con dicho tema. En la Figura 2 se presenta el número de tesis de validación por tema. En la Figura 3 se presentan las tesis de VMA a partir de 1988 a julio de 2019. Así mismo de las 509 tesis encontradas 401 tesis se enfocan 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 los resultados entre métodos u optimizar algunos ya desarrollados.

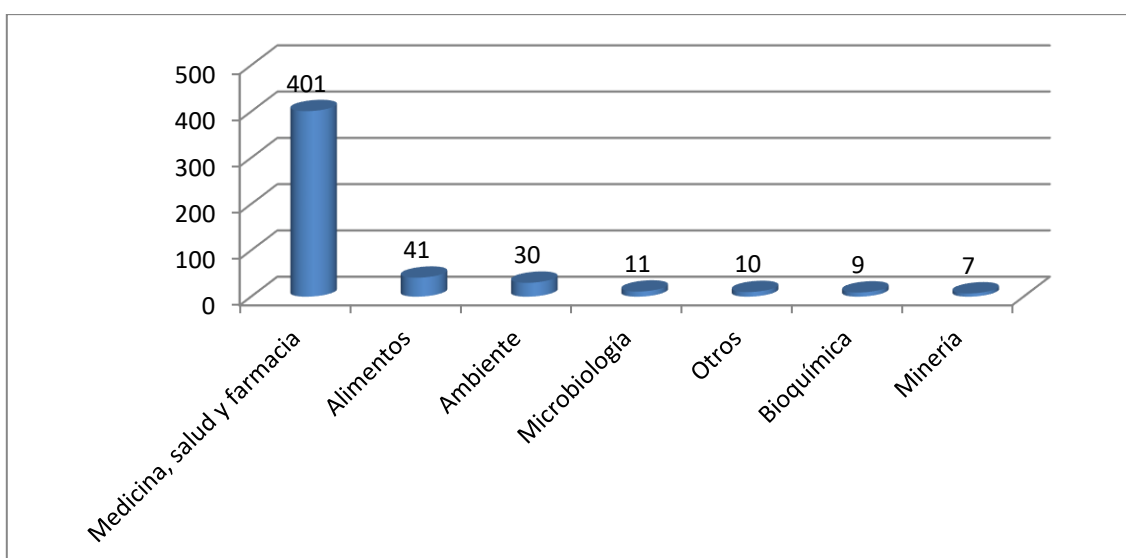


Figura 2. Tesis de validación de métodos analíticos por tema  
Ilustración tomada de (Chávez Velazco, 2020).

Por otra parte, la VMA es parte fundamental al momento de buscar establecer una acreditación a certificación por alguna organización de estandarización reconocida nacional o internacionalmente como lo es EMA o ISO.

La UNAM es pionera en nuestro país en la certificación y acreditación de laboratorios universitarios con las normas de la Organización Internacional de Normalización (ISO) y cuenta con más de 300 laboratorios certificados actualmente, siendo uno de los programas de gestión de la calidad en laboratorios más grandes del mundo. La Coordinación de Gestión para la Calidad de la Investigación (CGCI), perteneciente a la Coordinación de Investigación Científica de la UNAM, tiene como



objetivo apoyar la implementación de normas y modelos de calidad en los laboratorios universitarios con la finalidad de demostrar su calidad ante terceros.

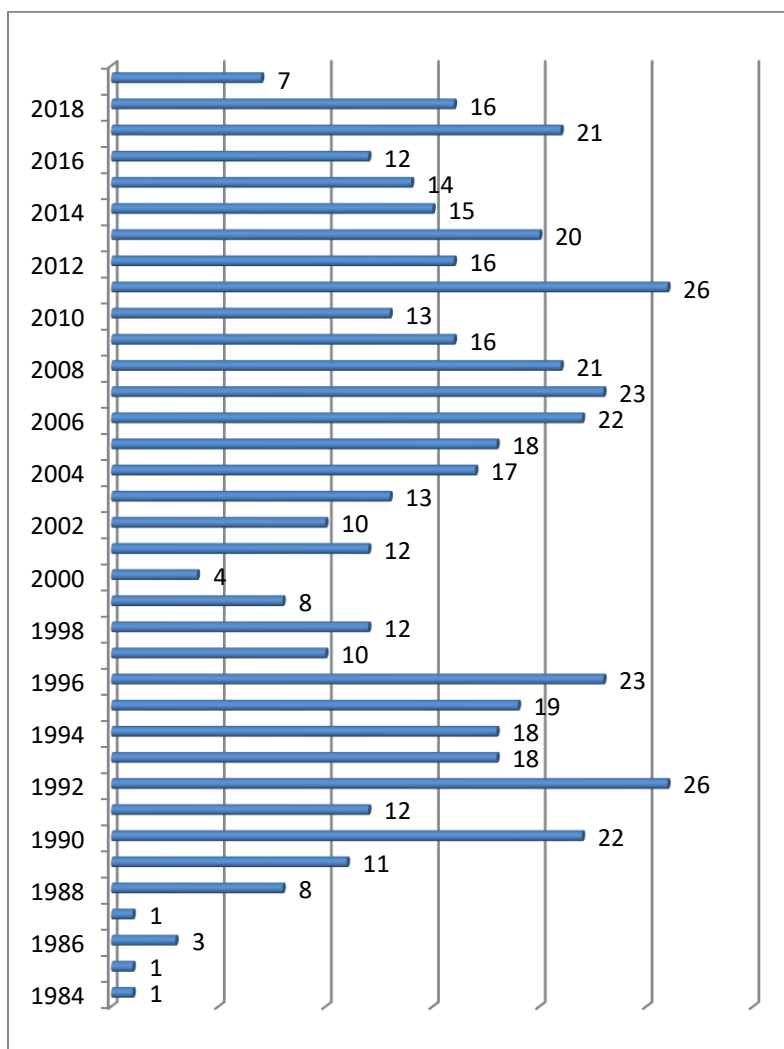


Figura 3. Tesis de validación de métodos analíticos en el periodo de 1984-julio de 2019  
Ilustración tomada de (Chávez Velazco, 2020).

La CGCI ha apoyado la certificación internacional ISO 9001 y la acreditación ISO 17025, convirtiendo al programa en uno de los más grandes del mundo para una institución de enseñanza a nivel superior (CGCI UNAM, 2021).

En la Tabla 3 se muestra el número de laboratorios con Certificado ISO 9001:2015 y la entidad a la que pertenecen.

Tabla 3. Laboratorios con Certificado ISO 9001:2015 dentro de la UNAM

Entidad	Número de laboratorios con Certificado ISO 9001:2015
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada	4
Coordinación de la Investigación Científica	2
Coordinación de Innovación y Desarrollo	1
Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León	1
Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia	4
Facultad de Ciencias	1
Facultad de Estudios Superiores Acatlán	5
Facultad de Estudios Superiores Aragón	23
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán	102
Facultad de Estudios Superiores Iztacala	1
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza	40
Facultad de Ingeniería	52
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	26
Facultad de Odontología	10
Facultad de Química	13
Instituto de Biología	4
Instituto de Biotecnología	5
Instituto de Ciencias del Mar	3
Instituto de Física	1
Instituto de Geofísica	1
Instituto de Ingeniería	2
Instituto de Investigaciones Biomédicas	1
Instituto de Neurobiología	6
Instituto de Química	14

Elaboración propia con información de (CGCI UNAM, 2021)

En la Tabla 4 se muestran el número de laboratorios que están acreditados con ISO 17025:2017 y la entidad a la que pertenecen.

Tabla 4 Laboratorios acreditados con ISO 17025:2017 dentro de la UNAM y entidad a la que pertenecen

Entidad	Número de laboratorios Acreditados con ISO 17025
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán	1
Facultad de Química	14 (11 por parte de la USAI, uno por la Unidad de Metrología, uno por LABQA y uno por UNIPREC)
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT)	1

Elaboración propia con información de (CGCI UNAM, 2021)

## CAPÍTULO 2. Guías de validación

### 2.1 Conceptos generales

Las guías de VMA proporcionan una guía orientación a como efectuar el proceso de la validación de métodos analíticos, como: **selección de parámetros de desempeño**, ecuaciones de cálculo y estadística a efectuar y la preparación de la **documentación de validación** (UNODC, 2010). Algunas incluso contienen orientación para establecer los criterios de aceptación de los parámetros de validación (CNQFB, 2002; ISP, 2010).

#### Parámetros y criterios de desempeño

La selección de los parámetros de desempeño es uno de los requisitos importantes en la validación. Los parámetros de desempeño de un método de análisis son las cualidades funcionales y las medidas estadísticas del grado de confiabilidad exhibido por el método bajo condiciones de operación específicas (AOAC, 2002), ISO 17025:2017 incluye para la validación de métodos analíticos los parámetros de desempeño mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros de desempeño y su definición

Parámetro de desempeño	Definición
Selectividad	Es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar (Morillas, 2016).
Límite de detección	Concentración o cantidad real del analito presente en el material objeto de análisis que llevará, con una probabilidad $(1-\beta)$ , a la conclusión de que la concentración o cantidad del analito es mayor en el material analizado que en el material testigo (ISP, 2010).
Límite de cuantificación	La mínima concentración que puede ser determinada con aceptable precisión bajo condiciones de reproducibilidad y exactitud (INAB, 2019).
Linealidad	El término linealidad aplicado a un método analítico, se refiere al tramo de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración; la representación gráfica de este tramo (concentraciones frente a respuestas) debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable (CENAM-EMA, 2008).

Elaboración propia con información de (Thompson, 2002), (CENAM-EMA, 2008), (ISP, 2010), (JCGM, 2012), (Morillas, 2016), (INAB, 2019).

Tabla 5. Parámetro de desempeño y su definición (continuación)

Parámetro de desempeño	Definición
Repetibilidad	Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo (ISP, 2010).
Sensibilidad	Es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (por ejemplo, una concentración de analito), es decir, el gradiente de la curva de respuesta (Morillas, 2016).
Exactitud	Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando, se dice que una medición es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida (JCGM, 2012).
Veracidad/ Sesgo	Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia (JCGM, 2012).
Recobro/ Recuperación	Detección de una cantidad conocida de un parámetro analítico agregado a una muestra e incluido en todo el método de análisis (INAB, 2019).
Precisión	La precisión es el grado de coincidencia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión se puede establecer en términos de repetibilidad y reproducibilidad (Thompson, 2002).
Reproducibilidad	Es la precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítems idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros (ISP, 2010).
Robustez	Es 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 (ISP, 2010).
Incertidumbre	La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo. Una estimación de la incertidumbre debe tener en cuenta todos los efectos reconocidos que operan en el resultado (Morillas, 2016).

Elaboración propia con información de (ISP, 2010) , (Morillas, 2016)

Existen diversas definiciones para los parámetros de desempeño y dependiendo del método los criterios también tienen diversos valores y definiciones, en la Tabla 6 se mencionan los criterios de aceptación de distintas guías de validación.

Tabla 6. Criterios para el desempeño de los parámetros de validación

Parámetro	Guía	Criterio
Selectividad	CNQFB	La respuesta del método solo se deberá al analito
	ISP	Comparación de las lecturas obtenidas por un mínimo de 3 testigos reactivos, 3 blancos de matriz y 3 muestras o estándares de concentración conocido del analito de interés, observar si existen variaciones, si se encuentran diferencias significativas deberán ser identificadas y en lo posible eliminadas.
	LD	CNQFB LD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión: $LD = (3.3 \times S_{y/x})/b_1$ , $r^2 \geq 0.98$ , IC ( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero.
LD	ISP	6 mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco, $LD = 2t_{(1-\alpha; u)} \times S_0$ ; sí: $t(0.05, \infty) \rightarrow 1.645$ $LD = 3.29 \times S_0$
	Morillas	$3S'_0$ , 10 lecturas. *
	LC	CNQFB LC con base en la curva de calibración en la desviación estándar de regresión: $LC = (10 \times S_{y/x})/b_1$ , $r^2 \geq 0.98$ , IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero.
LC	ISP	6 mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración cercano al blanco, $LC = 10S_0$
	Morillas	$LC = k_Q \times S'_0$ , donde $k_Q$ usualmente es 10 pero se usan comúnmente otros valores como 5 o 6 (basado en criterios de "adecuación al uso")
	Linealidad	CNQFB $r^2 \geq 0.98$ , IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero
Linealidad	ISP	4 niveles de concentración como mínimo, $r^2 \geq 0.99$
	Exactitud	CNQFB IC( $\mu$ ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97-103% método químico o espectrofotométrico
Veracidad/Sesgo	ISP	$s = X - X_a$ **; para evaluar el sesgo, se debe realizar la prueba t, en la cual $t_{calc} < t_{crit}$ ; $t_{calc} = \frac{ X_a - X }{S \sqrt{n}}$ ***
	Morillas	Puede expresarse en términos absolutos $b = \bar{x} - x_{ref}$ o en términos relativos en porcentaje $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$ , donde $\bar{x}$ es la media de los resultados y $x_{ref}$ es un valor de referencia.

Elaboración propia con información de (CNQFB, 2002), (ISP, 2010), (Morillas, 2016).

\* $S'_0$  se puede calcular de las siguientes formas, si los resultados se corregirán por el blanco durante el uso de rutina entonces usamos  $S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$  de no ser así entonces se calcula  $S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$ , donde n es el número de réplicas de observaciones promediadas cuando se dan resultados para los que cada réplica es obtenida siguiendo el total del procedimiento de medición y  $n_b$  es el número de observaciones blanco usados para calcular la corrección del blanco

\*\* Donde s es el sesgo, X es la lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas,  $X_a$  es el valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado

\*\*\* Donde  $X_a$  valor esperado o valor certificado en concentración, X el promedio de valores leídos u observados en concentración, S la desviación estándar, n el número de lecturas

Tabla 6. Criterios para el desempeño de los parámetros de validación (Continuación)

Parámetro	Guía	Criterio
Recobro/Recuperación	CNQFB	DER del porcentaje de recobro: $\leq 3\%$ en método químico o espectrofotométrico.
	ISP	$R = \left(\frac{C_e - C_o}{C_a}\right) *$ $\%R = (R) \times 100$ , $t_{calc} = \frac{ 100 - \%R }{S \sqrt{n}}$ **
	Morillas	Se puede calcular como recuperación relativa de adiciones $R'(\%) = \frac{\bar{x}' - x}{x_{adición}} \times 100$ ***; o también como recuperación relativa (recuperación aparente) en porcentaje $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100$ .
Sensibilidad	CNQFB	pendiente (m) de la recta de calibración (cercano a 1)
	Morillas	gradiente de la curva de respuesta (debe ser cercano a 1)
	ISP	El criterio de aceptabilidad para la precisión se puede hacer en base a coeficiente de variación de Horwitz: $CV_h\% = 2^{(1-0.5) \log C}$ . ****
Repetibilidad	CNQFB	mismos valores que en Recobro/Recuperación
	ISP	al menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones, el $CV_r\%$ obtenido deber ser $< (CV_h\%/2)$
Reproducibilidad	CNQFB	$CV \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos
	ISP	En el caso de la reproducibilidad interlaboratorio $CV_R\% < CV_h\%$ , para la reproducibilidad interna $CV_{Ri}\% < (2CV_h\%/3)$ . *****
Robustez	CNQFB	$ d_i  \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos
	ISP	Se aplica el Test de Youden y Steiner, $(X - \bar{x}) < \sqrt{2}S$
	Morillas	Se evalúa a través del diseño experimental Plackett-Burman
Incertidumbre	ISP	$k=2$ , nivel de confianza 95%
	Morillas	$k=2$ , nivel de confianza 95%

Elaboración propia con información de (CNQFB, 2002; ISP, 2010; Morillas, 2016)

\* Donde  $C_e$  es la concentración de analito de la muestra enriquecida,  $C_o$  es la concentración de analito medida en la muestra sin indicador,  $C_a$  es la concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida.

\*\* Donde  $R$  es el porcentaje de recuperación,  $S$  la desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación,  $n$  el número de lecturas.

\*\*\* Donde  $\bar{x}'$  es el valor medio de la muestra adicionada y  $x_{adición}$  es la concentración añadida.

\*\*\*\* Donde  $C$  es el valor nominal del analito expresado en potencia de 10, ejemplo  $1\text{ppm} = 1\text{mg/L} = 10^{-6}$ .

\*\*\*\*\* Se sugiere realizar 3 mediciones de un Material de Referencia una vez por cada semana o el comportamiento de la curva de calibración en 3 días distintos.

## Documentación

La documentación es otra parte que se tiene que tomar en cuenta ya que nos ayuda a tener altos estándares de calidad, un mejor control de los procedimientos de validación, además refuerzan y sirven como consulta para la mejora de los MVA, estos registros pueden llegar a consultarse en una auditoria, misma que sirve para evaluar el desempeño de un laboratorio o una organización. En la Tabla 7 se

muestra los registros que se deben de preservar en una VMA de acuerdo con distintas guías, cabe mencionar que no todas las guías hacen referencia a como documentar.

Tabla 7. Documentación o registros del proceso de validación de acuerdo a distintas guías de validación

Documento	Guía	Registro
Reactivos y Materiales	Eurachem	-Número de registro CAS (Chemical Abstract Service) -Materiales de Referencia Certificados (MRC) -Composición requerida (detalles de concentración o de otra cantidad)
	CCAYAC	-Indicar los materiales a utilizar separando como material de uso general y material volumétrico. -Indicar el nombre de los reactivos a utilizar y su grado de pureza o concentración, detallar la preparación de las soluciones. -Almacenamiento. -Certificados de análisis o pureza. -Formatos de verificación de material
	CNQFB	-Sustancia de referencia, cantidad del producto, clave (para uso interno), fecha de adquisición, pureza, fecha de caducidad (se debe contar con lineamientos que aseguren la no-utilización de sustancias caducas), riesgo potencial de manejo, indicaciones especiales. -Procedencia (USP, BP, etc.), -Cantidad empleada y remanente, fecha de empleo y analista que lo utiliza
Personal	Eurachem	-Los analistas deben estar debidamente calificados y autorizados. -Registro de bitácoras
Equipos	CNQFB	Responsabilidades del personal a cargo de la validación.
	Eurachem	-Pruebas preliminares o de comprobación para el buen funcionamiento de equipos -Requerimientos mínimos de funcionamiento y verificación -Documentos de calibración
	CCAYAC	-Descripción general -Certificados de trazabilidad -Certificados de calibración
Procedimiento	Eurachem	-Referencia del método empleado -Porción de ensayo (Preparación a partir de la muestra, masa o volumen requerido) -Prueba blanco (condiciones y limitaciones) -Determinación o prueba (incluir el número de medidas y descripción detallada de las etapas)
	CCAYAC	-Nombre y clave del método que se pretende validar. -Indicar el tipo de productos para los cuales aplica la validación. -Registro de los datos obtenidos en cada corrida. -Bases de datos utilizados. -Gráficos de control.
	CNQFB	-Registro de los resultados de las corridas. -Condiciones de operación al momento de ejecutar el procedimiento. -Formulas y procedimientos de cálculo.
Muestra	Eurachem	-Muestreo realizado -Información necesaria para la preparación de la muestra de laboratorio (detalles de almacenamiento, pretratamiento y eliminación de residuos)
	CCAYAC	-Cantidades de muestra para efectuar la validación. -Condiciones de almacenamiento

Elaboración propia con información de (CNQFB, 2002; Vega, 2011; Morillas, 2016;)

## 2.2 Guías de validación generales

Hoy en día existen distintas guías de VMA, dictadas por instituciones internacionales y nacionales, la gran mayoría de las guías se apega a las recomendaciones dictadas por ISO, AOAC, IUPAC, etc.; por lo que dentro de las guías de VMA generales existen varias similitudes, pero también distinciones sobre que parámetros de desempeño utilizar. En la Tabla 8 se encuentran los parámetros de desempeño que utilizan distintas guías de validación.

Tabla 8. Parámetros de desempeño que utilizan diferentes guías de validación para métodos cuantitativos.

Parámetro	IUPAC	EURACHEM	CODEX	UNODC	AOAC	ISP
Selectividad	X	X	X	X	X	X
Linealidad	X	X	X	X	X	X
Sensibilidad	X	X				X
Exactitud	X	X		X	X	X
Precisión	X	X	X	X	X	X
Límite de detección	X	X	X	X	X	X
Límite de cuantificación	X	X	X	X	X	X
Repetibilidad	X	X	X	X	X	X
Reproducibilidad	X	X	X	X	X	X
Robustez	X	X	X	X		X
Recobro	X	X	X	X	X	X
Veracidad	X	X	X			X
Incertidumbre	X	X	X	X	X	X

Elaboración propia con información de (Thompson, 2002) (AOAC, 2002) (ISP, 2010) (UNODC, 2010) (Morillas, 2016) (CODEX, 2017)

Las pruebas cualitativas se utilizan para identificar un elemento o compuesto específico (analito) en función de la respuesta de un material. La característica más importante de una prueba cualitativa es su capacidad para identificar de manera confiable el analito en presencia de otras sustancias. Comúnmente los parámetros que se manejan para métodos cualitativos son menos extensos que para los métodos cuantitativos, pero no por eso menos rigurosos (AOAC INTERNATIONAL, 2007). En la Tabla 9 se muestra los parámetros de validación recomendados en distintas guías para métodos cuantitativos y cualitativos, cabe mencionar que no todas las guías incluyen los mismos parámetros y tampoco los mismos criterios para evaluarlos.



Tabla 9. Parámetros de validación para métodos cualitativos y cuantitativos de guías generales de VMA

Parámetro	IUPAC		EURACHEM		CODEX	
	Cuantitativo	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo
Selectividad	X	X	X	X	X	X
Linealidad	X		X		X	
Sensibilidad	X	X	X	X		
Exactitud	X		X	X		
Precisión	X		X	X	X	X
LD	X		X	X	X	
LC	X		X	X	X	X
Repetibilidad	X		X		X	
Reproducibilidad	X		X		X	
Robustez	X		X		X	
Recobro	X		X		X	X
Veracidad	X		X	X	X	X
Incertidumbre	X		X		X	

Elaboración propia con información de (Morillas, 2016) (Thompson, 2002) (CODEX, 2017)

Los análisis cualitativos siguen los principios básicos del análisis cuantitativo, pero es necesario aplicar conceptos singulares, tanto al describir las propiedades del método como para la interpretación de los resultados.

Los resultados se expresan en una escala nominal, que es inferior a la expresión de los resultados en una escala de proporción. El uso del análisis cualitativo en lugar del cuantitativo tiene el propósito de detección utilizando métodos de bajo coste o para concentraciones del analito próximas al límite de detección (Morillas, 2016), Tabla 10.

Algunas de las recomendaciones que hacen las guías de VMA respecto a la selección de los métodos es seguir estándares ya establecidos por instituciones como AOAC, Eurachem, FAO, FDA, etc., y ajustar los parámetros de acuerdo con las necesidades del cliente y del laboratorio en donde se desarrollen los estudios, esta recomendación se da porque, en principio, siguen los requisitos determinados por ISO en especial ISO 17025. AOAC menciona que la validación no sustituye al desarrollo de métodos ni a la optimización de estos. Sin embargo, si algunos de los

requisitos de validación ya se han realizado durante la fase de desarrollo, no es necesario repetirlos en la fase de validación (AOAC, 2002).

Tabla 10. Parámetros cualitativos descritos en la guía Eurachem.

Parámetro	Definición y ecuación de cálculo
Precisión	La precisión no puede ser expresada como una desviación estándar o desviación estándar relativa, pero puede ser expresada como tasas de verdaderos y falsos positivos y negativos.
	Índice de falsos positivos (IFP)      Índice de falsos negativos (IFN) $IFP = \frac{\text{Falsos positivos (100)}}{\text{Total positivos conocidos}}$ $IFN = \frac{\text{Falsos negativos (100)}}{\text{Total negativos conocidos}}$
Sensibilidad diagnóstica	Es la proporción de muestras con una determinada condición, por ejemplo: concentración superior a la concentración de corte, que proporciona resultados positivos al análisis. La sensibilidad diagnóstica es una característica fundamental del método cualitativo, que expresa su capacidad para detectar pequeñas cantidades del analito en una muestra, de manera que se obtenga la respuesta binaria Si/No para un nivel de probabilidad predefinido.
Especificidad diagnóstica	$SD = \frac{\text{número de muestras verdaderos positivos}}{\text{número total de muestras con condición}}$
	Es la proporción de muestras sin condición alguna, por ejemplo: concentración inferior a la concentración de corte, que dan resultados negativos al análisis cualitativo.
Límite de corte (límite de detección de la prueba)	$ED = \frac{\text{Número de muestras verdaderos negativos}}{\text{número total de muestras sin condición}}$
	El límite de detección se define de manera análoga a como se hace en análisis cuantitativo; la concentración de un analito que proporciona una señal que se puede distinguir estadísticamente del valor medio de la señal de muestras blanco pertinentes. El límite de corte se encuentra donde la tasa de falsos positivos, para concentraciones superiores al límite, es baja. Con un nivel de probabilidad dado P(x)

Fuente: (Morillas, 2016)

Eurachem señala que los parámetros y criterios de validación que se deben considerar son Precisión, Sensibilidad diagnóstica, Especificidad diagnóstica y Límite de corte (que se relaciona con el límite de detección).

### 2.3 Guía del área de especialidad “Alimentos”

Para garantizar que los métodos químicos empleados para el análisis de alimentos y piensos cumplan con los más altos estándares de rendimiento analítico apropiados para los propósitos previstos, FDA ha establecido criterios por los cuales todos los métodos químicos del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria

(FVM por sus siglas en inglés) deben ser evaluados y validados. La guía que lleva por nombre “**Guideline for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products**” emitida en 2019 se encarga de establecer dichos criterios, la guía define cuatro niveles estándar de rendimiento para su uso en la validación de métodos regulatorios analíticos, en la Tabla 11 se describen los criterios para la validación de métodos analíticos para analitos químicos en alimentos y piensos (FVM-FDA, 2019), para un nivel de concentración de 0.001mg/kg, el nivel del método y puede definirse para la combinación de analito(s)/matriz(es) de muestra como un nivel máximo, nivel mínimo, nivel normativo o rango de concentración según el uso previsto, los niveles del método incrementan en orden de magnitud por lo que también cambian los criterios de desempeño, los cuales pueden verse en el Anexo 1.

Para pruebas cualitativas la guía presenta una tabla donde se indican el número de muestras que se deben contabilizar con el analito presente para cierto nivel de confianza y cierta tasa de falsos negativos y falsos positivos. El muestreo de número de aceptación cero es un enfoque estadístico comúnmente utilizado para aprobar una hipótesis (o criterio) para la frecuencia de artículos defectuosos en una población (por ejemplo, tasas de FN o FP con pruebas repetidas). Para este enfoque, todas las muestras analizadas deben tener la respuesta correcta para aceptar la hipótesis (es decir, aceptar solo cuando se observen cero respuestas “defectuosas”). El número mínimo de muestras que deben analizarse depende de los criterios para la tasa de defectos y el nivel de confianza estadística:  $n = \frac{\log(p)}{\log(1-\alpha)}$

Donde  $1-\alpha$  es el nivel de confianza y  $p$  es la tasa máxima aceptable de defectos por muestra (ejemplo, tasa FN o FP). Los tamaños de muestra para evaluar los criterios seleccionados para las tasas de FN o FP con diferentes niveles de confianza se proporcionan en la Tabla 12.

Tabla 11. Parámetros de desempeño y documentación presente en *Guidelines for the Validation of chemical Methods in Food, feed, Cosmetics, and Veterinary Products*

<b>Nombre y clave del método</b>	<b><i>Guideline for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products</i></b>
<b>Entidad que lo emite</b>	<b>FDA</b>
<b>Alcance</b>	Aplican a los laboratorios de FDA cuando desarrollan y participan en la validación de métodos reguladores analíticos para analitos químicos en alimentos, piensos y cosméticos.
<b>Analito</b>	Gluten, microtoxinas, ingredientes/aditivos de suplementos dietéticos, residuos de medicamentos veterinarios, aditivos de color, etc.
<b>Matriz</b>	Suplementos dietéticos, residuos de medicamentos veterinarios, aditivos de color, etc.
<b>Tipo de método</b>	<b>Cromatográfico, cuantitativo y cualitativo</b>
<b>Requisitos de validación</b>	Cuantitativo
<b>Parámetros de desempeño</b>	<b>Criterio de aceptación para un nivel de 0.001mg/kg</b>
<b>Linealidad</b>	0.0006-0.0014 mg/kg
<b>LD (mg/kg)</b>	0.0002 mg/kg
<b>LC (mg/kg)</b>	0.0004 mg/kg
<b>Reproducibilidad</b>	DER ≤ 44% *
<b>Repetibilidad</b>	DER ≤ 22%
<b>Recuperación</b>	40-120%
<b>Incertidumbre</b>	t de Studen con $\alpha=0.05$ y 95% de confianza
<b>Documentación requerida</b>	Responsables del proceso de validación, recolección de los datos crudos, técnicas estadísticas para el tratamiento de datos, ajustes que se le hagan al método, preparación de la muestra, datos de la curva de calibración, preparación del estándar stock, condiciones de trabajo de los equipos, MRC.

Elaboración propia con información de (FVM-FDA, 2019) Solo se ejemplifica una magnitud de concentración  $10^{-9}$ mg/kg para revisar el resto de la tabla consultar el anexo. Donde RSD representa la desviación estándar relativa

Tabla 12.. Nivel de confianza para pruebas de falsos positivos y falsos negativos

FN o FP	Nivel de confianza			
	80%	90%	95%	99%
<1%	161	230	299	459
<2%	80	114	149	228
<5%	32	45	59	90
<10%	16	22	29	44

Elaboración propia con información de (FVM-FDA, 2019)

La justificación del tamaño de la muestra es que cuando la probabilidad de una respuesta de prueba defectuosa (incorrecta) es  $p$  para cada muestra, entonces  $(1 - \alpha)^n$  es la probabilidad de que  $n$  muestras tengan la respuesta correcta.

En la Tabla 13 se muestran algunas recomendaciones para los ensayos de validación de métodos de cromatografía que incluyen valores para métodos cuantitativos y cualitativos.

Tabla 13. Nivel de validación y número de pruebas recomendadas para métodos de cromatografía

	Nivel I: Emergencia/ Uso limitado	Nivel II: Validación por un solo laboratorio	Nivel III: Validación Multi- Laboratorios	Nivel IV: Estudio completo colaborativo
<b>Número de laboratorios participantes</b>	1	1	≥2	8 cuantitativo 10 cualitativo
<b>Número de matrices</b>	≥1	≥3 se recomienda cuando esté disponible	≥3 se recomienda cuando esté disponible	≥3 se recomienda cuando esté disponible
<b>Número de niveles de pico de analitos para al menos una fuente de matriz</b>	≥2 niveles de picos + 1 blanco de matriz	≥3 niveles de picos + 1 blanco de matriz	≥2 niveles de picos + 1 blanco de matriz	≥2 niveles de picos + 1 blanco de matriz
<b>Replicas necesarias por fuente de matriz en cada nivel probado por el laboratorio</b>	≥2 (cuantitativo) ≥2 (cualitativo)	≥2 (cuantitativo) ≥3 (cualitativo)	≥2 (cuantitativo) ≥3 (cualitativo)	≥2 (cuantitativo) ≥3 (cualitativo)
<b>Replicas requeridas en cada nivel analizado por laboratorio si solo una fuente de matriz es utilizada</b>	≥4 (cuantitativo) ≥6 (cualitativo)	≥6 (cuantitativo) ≥9 (cualitativo)	≥3 (cuantitativo) ≥6 (cualitativo)	≥2 (cuantitativo) ≥6 (cualitativo)

Elaboración propia con información de (FVM-FDA, 2019)

## 2.4. Guía del área de especialidad “Farmacia”

Para el área de farmacia FDA emitió la guía **“Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry”** en 2015, en ella se brinda orientación sobre procedimientos analíticos y métodos de validación para respaldar la documentación de la identidad, concentración, calidad, pureza y potencia de las sustancias farmacéuticas y los productos farmacéuticos (FDA, 2015). Los parámetros que sugiere usar la guía se encuentran en la siguiente tabla y están basados en ICH Q2(R1) por lo que tomaremos en cuenta estos criterios, Tabla 14.

Tabla 14. Criterio para los parámetros de validación de acuerdo con ICH Q2(R1)

<b>Nombre y clave del método</b>	<b>ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and methodology (Q2(R1)) for developing and validating analytical methods.</b>	
<b>Entidad que lo emite</b>	<b>FDA</b>	
<b>Alcance</b>	Las recomendaciones aplican a las sustancias y los productos farmacéuticos incluidos en las solicitudes de nuevos medicamentos (NDA), abreviadas solicitudes de nuevos medicamentos (ANDAs), solicitudes de licencias biológicas (BLA) y los suplementos de estas solicitudes, también se aplican a las sustancias farmacológicas y productos farmacéuticos.	
<b>Analito</b>	No específica	
<b>Matriz</b>	No específica	
<b>Tipo de método</b>	<b>Cromatográfico, pero no se limita a esta técnica, cuantitativo y cualitativo</b>	
<b>Requisitos de validación</b>	Cuantitativo	
<b>Parámetros de desempeño</b>	Criterio de aceptación	
<b>Selectividad</b>	La discriminación de un procedimiento puede ser confirmado por la obtención de resultados positivos (quizás en comparación con un material de referencia conocido) de muestras que contienen el analito, junto con resultados negativos de muestras que no contienen el analito.	
<b>Linealidad</b>	Un mínimo de 5 niveles de concentración, cubrir al menos del 70 – 130% de la concentración del analito	
<b>LD</b>	$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$	Donde $\sigma$ es la desviación estándar de la respuesta y S la pendiente de la curva de calibración.
<b>LC</b>	$LC = \frac{10\sigma}{S}$	Donde $\sigma$ es la desviación estándar de la respuesta y S es la pendiente de la curva de calibración.
<b>Exactitud</b>	Debe evaluarse utilizando un mínimo de 9 determinaciones sobre un mínimo de 3 niveles de concentración que cubren el rango especificado. Debe informarse como porcentaje de recobro mediante el ensayo de la cantidad conocida de analito agregado en la muestra o como la diferencia entre la media y el valor verdadero aceptado junto con los intervalos de confianza	
<b>Reproducibilidad</b>	No específica, determinado mediante un ensayo entre laboratorios	
<b>Repetibilidad</b>	Un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el intervalo especificado del procedimiento o un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración de prueba	
<b>Robustez</b>	No específica. Depende del tipo de procedimiento de estudio. Sugiere cambios en las pruebas.	
<b>Documentación requerida</b>	Parámetros de operación de los equipos, Grado químico de los reactivos y estándares, Preparación de los estándares y muestras, Datos crudos (porcentajes, concentraciones, valores de señales del análisis), cálculos y formulas del tratamiento de datos, MRC.	

Elaboración propia con información de (ICH, 2005)

En cuanto a la selección de métodos la guía sugiere estudios de comparabilidad para seleccionar el método analítico que mejor se adecue a las necesidades del ensayo, estos estudios deben demostrar que:

- El nuevo método, junto con cualquier medida de control adicional, es equivalente o superior al método original para el propósito previsto.
- El nuevo procedimiento analítico no es más susceptible a los efectos de matriz que el procedimiento original.

## **2.5 Guía del área de especialidad Bioanalíticos**

**Para esta área FDA emitió la guía “Bioanalytical Method Validation-Guidance for Industry”** en 2018 y aplica a los procedimientos bioanalíticos como los ensayos cromatográficos (CCs, por sus siglas en inglés) y ensayos de unión de ligandos (LBAs, por sus siglas en inglés) que determinan cuantitativamente los niveles de fármacos, sus metabolitos, proteínas terapéuticas y biomarcadores en productos biológicos como la sangre, suero, plasma orina y tejidos como la piel (FDA, 2018). Los parámetros y criterios de validación se presentan en la siguiente tabla, Tabla 15.

Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry no presenta parámetros para métodos cualitativos. Los criterios de aceptación se aplican para dos tipos de ensayos, el primero para métodos cromatográficos (CCs) y el segundo para métodos de unión de ligandos (LBAs), por lo que se hace la diferencia y se describe en la Tabla 15.

Tabla 15. Parámetros de validación de acuerdo con *Bioanalytical Method Validation-Guidance for Industry*.

<b>Nombre y clave del método</b>	<b>Bioanalytical Method Validation-Guidance for Industry</b>	
<b>Entidad que lo emite</b>	<b>FDA</b>	
<b>Alcance</b>	Estudios bioanalíticos: biodisponibilidad, bioequivalencia, farmacocinética.	
<b>Analito</b>	Fármacos, incluidos productos biológicos y sus metabolitos, biomarcadores.	
<b>Matriz</b>	Biológicas	
<b>Tipo de método</b>	<b>Cromatográfico(CCs) y ensayos de unión de ligandos(LBAs)</b>	
<b>Requisitos de validación</b>	Cuantitativo	
<b>Parámetros de desempeño</b>	<b>Criterio de aceptación Método</b>	
	<b>CCs</b>	<b>LBAs</b>
<b>Selectividad</b>	Analizar muestras en blanco de la matriz biológica apropiada de al menos seis fuentes individuales. Las calibraciones en blanco y cero deben estar libres de interferencias en los tiempos de retención del analito y estándares internos (IS por sus siglas en inglés). Las muestras enriquecidas deben ser de $\pm 20\%$ LC. La respuesta de los IS en el blanco no debe exceder el 5% de las respuestas de IS promedio de los calibradores y muestras de control de calidad (QC por sus siglas en inglés).	Realizar análisis de muestras en blanco en la matriz de $\geq 10$ fuentes individuales. Para $\geq 80\%$ de las fuentes, la matriz no enriquecida debe ser menor al LC y las muestras enriquecidas deben ser $\pm 20\%$ en LC.
<b>Linealidad</b>	Al menos 6 calibradores distintos de cero y debe cubrir un 75%, los calibradores distintos de cero deben tener $\pm 15\%$ del valor teórico excepto en LC donde el calibrador debe tener $\pm 20\%$ de las concentraciones nominales en cada corrida.	Al menos 6 calibradores distintos de cero y debe cubrir un 75%, los calibradores distintos de cero deben tener $\pm 20\%$ del valor teórico excepto en LC donde el calibrador debe tener $\pm 25\%$ de las concentraciones nominales en cada corrida.
<b>Sensibilidad</b>	La respuesta del analito en LC debe ser $\geq 5$ veces la respuesta del analito del calibrador cero. La precisión debe ser $\pm 20\%$ de la concentración nominal (de $\geq 5$ repeticiones en al menos 3 corridas). La precisión debe ser de $\pm 20\%$ DER	La exactitud debe ser $\pm 25\%$ de la concentración nominal (de $\geq 3$ repeticiones en al menos 6 corridas). La precisión debe ser $\pm 25\%$ DER (de $\geq 3$ repeticiones en al menos 6 corridas). El error total debe ser $\leq 40\%$
<b>LC  </b>	$\geq 67\%$ de QCs debe ser $\pm 15\%$ del valor nominal, $\geq 50\%$ de QCs por nivel debe ser $\pm 15\%$ del valor nominal	$\geq 67\%$ de QCs debe ser $\pm 20\%$ del valor nominal, $\geq 50\%$ de QCs por nivel debe ser $\pm 20\%$ del valor nominal
<b>Exactitud</b>	Dentro de las corridas y entre corridas $\pm 15\%$ de la concentración nominal; excepto $\pm 20\%$ en LC	Dentro de las corridas y entre corridas $\pm 20\%$ de la concentración nominal; excepto $\pm 25\%$ en LC
<b>Precisión</b>	Dentro de las corridas y entre corridas $\pm 15\%$ DER, excepto $\pm 20\%$ DER en LC	Dentro de las corridas y entre corridas $\pm 20\%$ DER, excepto $\pm 25\%$ DER en LC
<b>Documentación requerida</b>	Idoneidad del sistema (Fechas, tiempos, controles de calidad), Certificados de análisis o pureza para reactivos y estándares de referencia, Preparación de muestras y estándares de referencia, Procedimiento metodológico (cualquier cambio del método original debe ser reportado, así como las condiciones en que se lleva a cabo el análisis), configuración de los equipos para realizar el análisis, cartas de calibración, MRC.	

Elaboración propia con información de (FDA, 2018). LC significa límite de cuantificación, IS significa estándares internos, QC significa muestras de control de calidad.



## 2.6 DISCUSIÓN GENERAL DEL APARTADO

Las guías proporcionan una visión de los parámetros que se deben contemplar o evaluar en una validación de métodos analíticos, en estos casos las guías tienen distintos enfoques de validación:

Para alimentos la guía presenta criterios definidos para la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad, repetibilidad, recobro e incertidumbre, para selectividad la guía contempla una serie de analitos y matrices que se pueden estudiar pero no se limitan solo a ellos, para sensibilidad señala que se debe calcular como el gradiente de la curva de calibración en un nivel cercano a LC; exactitud, sesgo, precisión y robustez solo se menciona una breve descripción pero no señala algún criterio de aceptación.

En farmacia se presentan criterios definidos para linealidad, selectividad, LD, LC, exactitud, repetibilidad, para la reproducibilidad no señala un criterio, menciona que se determina mediante ensayos de varios laboratorios, para robustez no existe un criterio definido, pero sugiere algunos cambios en los ensayos para que se determine este parámetro, incertidumbre no especifica algún criterio de aceptación.

Por último, para los métodos bioanalíticos se presentan criterios definidos para selectividad, lineal, sensibilidad, LC, exactitud, precisión, para LD, veracidad, repetibilidad, robustez no hace referencia alguna, para recobro y reproducibilidad solo se menciona una breve descripción del concepto, para incertidumbre solo se maneja CV% y desviación estándar, en la Tabla 16 se presenta el resumen de los parámetros de validación de las guías del área de especialidad.

Tabla 16. Parámetros presentes en las distintas guías de validación que cuentan con criterio de aceptación se muestran a continuación, los demás criterios pueden o no estar presentes en las guías pero no se menciona un criterio de aceptación.

Parámetro	Alimentos	Farmacia	Bioanalíticos
Selectividad	NA	X	X
Sensibilidad	NA	NA	X
Linealidad	X	X	X
LD	X	X	NA
LC	X	X	X
Exactitud	NA	X	X
Veracidad/ Sesgo	NA	NA	NA
Recobro	X	NA	NA
Precisión	NA	NA	X
Repetibilidad	X	X	NA
Reproducibilidad	X	X	NA
Robustez	NA	X	NA
Incertidumbre	X	NA	NA

Elaboración propia con información de (FDA, 2015), (FDA, 2018), (FDA, 2019). NA (No Aplica)

## CAPÍTULO 3. CASOS DE APLICACIÓN

Como se denota en el apartado anterior, los parámetros de validación que se consideran en las guías de las áreas de especialidad para validar un método cambian y también lo hacen los criterios de aceptación, ahora es importante conocer los parámetros presentes en distintos casos de aplicación y posteriormente analizar la relación que existe a partir de las guías de cada área. En este segmento se presentan dos casos de aplicación para cada área de especialidad, de igual manera se utilizan las mismas tablas para contener la información más importante y se agrega el procedimiento de validación de acuerdo con cada guía, existen casos donde no se encuentra el procedimiento de validación por falta de información en las guías.

### 3.1 Ejemplo de método del área de Alimentos

#### ***Caso A: “Validación de metodología analítica para la determinación de sodio por espectroscopía de absorción atómica en matrices cárnicas”***

***Para ejemplificar la validación de un método del área de alimentos se seleccionó el método “Validación de metodología analítica para la determinación de sodio por espectroscopía de absorción atómica en matrices cárnicas”,*** emitido por ANMAT y publicado en 2019, en el cual la muestra es preparada y analizada por ICP, en la figura 4 se encuentra el procedimiento experimental, el desarrollo fue realizado en base a la metodología oficial AOAC 968.08 (Espectrofotometría de absorción atómica de flama para minerales, 1996), el objetivo de la validación es evaluar los parámetros necesarios para la validación del procedimiento en la determinación de sodio en matrices cárnicas mediante espectroscopía de absorción atómica, el método cumple para la determinación de sodio en matrices cárnicas.

A continuación se describe el procedimiento de validación del método, la metodología está basada en AOAC 968.08 de métodos espectroscopía de absorción atómica.

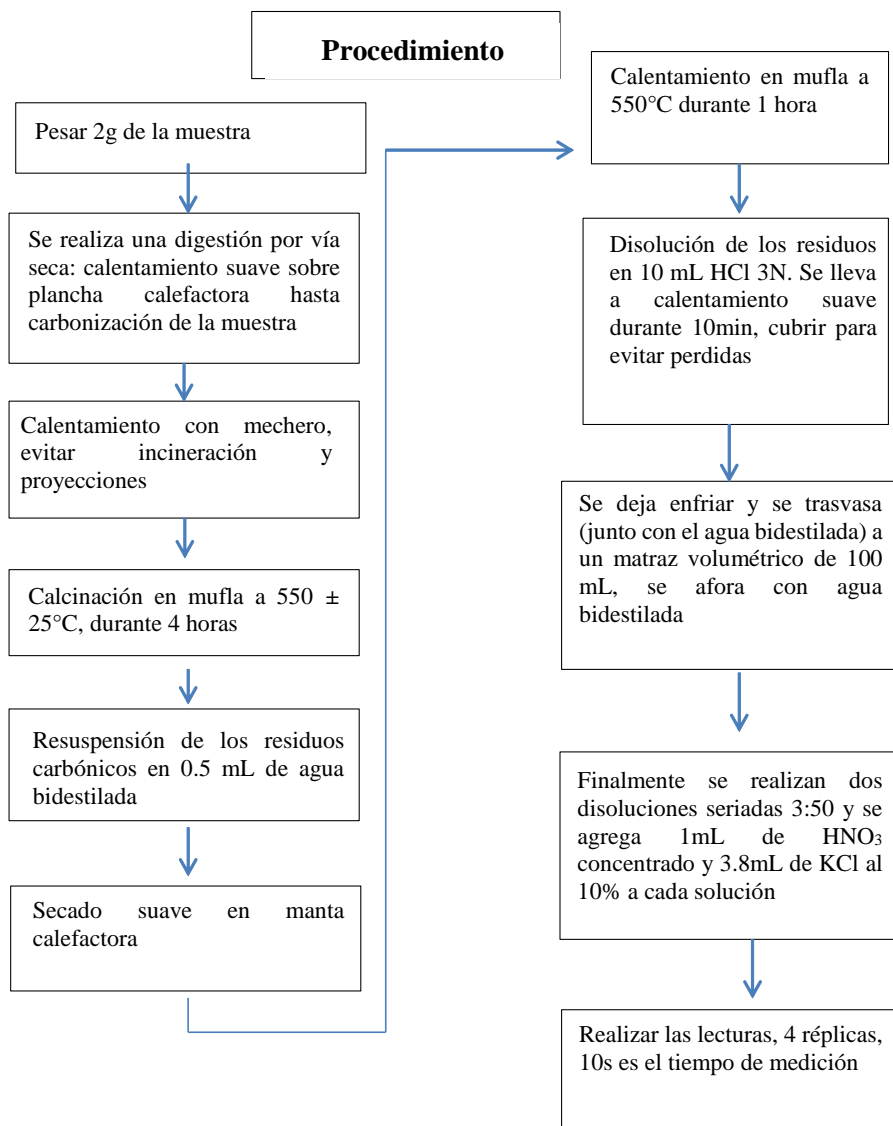


Figura 4. Diagrama experimental para la determinación de sodio en matrices cárnicas por espectroscopía de absorción atómica

Los parámetros seleccionados para la validación del procedimiento son linealidad, veracidad, precisión, límite de cuantificación y límite de detección, se establecieron los parámetros con base en la Guía para la Validación de Métodos de Ensayo del Organismo Argentino de Acreditación, en la Tabla 17 se muestra un resumen.

Tabla 17. Parámetros de acuerdo con Validación de metodología analítica para la determinación de sodio por espectroscopia de absorción atómica en matrices cárnicas

<b>Nombre y clave del método</b>	<b>Validación de metodología analítica para la determinación de sodio por espectroscopia de absorción atómica en matrices cárnicas</b>
<b>Entidad que lo emite</b>	<b>Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica</b>
<b>Alcance</b>	Productos cárnicos
<b>Analito</b>	Sodio
<b>Matriz</b>	Matrices Cárnicas
<b>Tipo de método</b>	<b>Espectrofotometría de absorción atómica</b>
<b>Requisitos de validación</b>	<b>Cuantitativo, método normalizado.</b>
<b>Parámetros de desempeño</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
<b>Linealidad</b>	4 niveles de concentración (0.25-0.50-0.75-1.00ppm) y nivel de confianza 95% y 6 replicas $r^2=0.9989$
<b>LD</b>	3 veces la señal/ruido del promedio de lecturas de los blancos reactivo
<b>LC</b>	10 veces la señal/ruido del promedio de lecturas de los blancos reactivo
<b>Repetibilidad</b>	$DER_R < \frac{DER_H}{3}$
<b>Reproducibilidad</b>	$DER_{RI} = < \frac{2}{3} DER_H$
<b>Veracidad</b>	$t_{crit}(n-1=17; \text{dos colas})$ $t_{calc} < t_{crit}$
<b>Robustez</b>	Ensayo t de Student con $t_{calc} < t_{crit}$ , seis muestras pareadas con 5 grados de libertad, dos colas, $\alpha=0.05$
<b>Incertidumbre</b>	95 % nivel de confianza, calculada a partir del criterio t de Student.
<b>Documentación requerida</b>	Método de referencia, equipos y condiciones de trabajo, reactivos y muestra (preparación y tratamiento para análisis), procedimiento experimental, datos en crudo de las corridas, cálculos y ecuaciones utilizadas.

Elaboración propia con información de (ANMAT, 2018)

La linealidad fue determinada por la correlación entre la concentración del analito y la señal respuesta obtenida en un determinado intervalo de concentraciones, la veracidad esta expresada en términos de sesgo a través de la prueba t de student, la precisión depende sólo de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado y el criterio de aceptabilidad se realiza en base a la comparación del coeficiente de variación porcentual obtenido y el coeficiente de variación de Horwitz, la precisión se estudia a través de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, LC y LD fueron calculados estadísticamente y luego se comprobó que el método puede detectar dichos valores, para la prueba de

robustez se estudió el efecto de la alineación del haz de luz, por tratarse de un ajuste manual y dependiente del analista (los parámetros analizados fueron: altura del mechero, posición horizontal del mechero y rotación del mechero, ver Tabla 20) y se utilizó la prueba *t* de Student (para muestras pareadas) con un intervalo de confianza del 95%, la incertidumbre fue calculada a través de la incertidumbre expandida (Figura 5), lo que corresponde al 4% de los valores esperados para las matrices cárnicas. Una vez analizado el MR (material de referencia) y estimada la incertidumbre del método, se compara el resultado de la medida con el valor certificado.

**Caso B: “Validación parcial de un método de detección de pesticidas organoclorados en vinaza, por cromatografía de gases, método de referencia EPA 8080.”**

Para este caso el objetivo del trabajo fue validar un método que permita cuantificar, en forma confiable, el contenido de los plaguicidas organoclorados en vinazas, la validación consistió en establecer parámetros de desempeño desde la inyección de extractos, hasta la extrapolación de los resultados a muestras de vinaza mediante evaluaciones de recuperación. El método fue elaborado en el Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial de la Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología de la Universidad Nacional de Tucumán. La validación es parcial, lo que quiere decir que no abarca la determinación de incertidumbre de la medición, el método de referencia responde a la denominación EPA 8080 (1996) Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyl by Gas Chromatography.

A continuación, se presenta el diagrama experimental del método para la determinación plaguicidas organoclorados, entre los que se encuentran Diclro-difenil-tricloroetano (DDT), dieldrina, aldrina, endrina, clordano, heptacloro, mírex, hexaclorohexanos; la metodología está basada en el método EPA 8080 y desglosada de manera general.

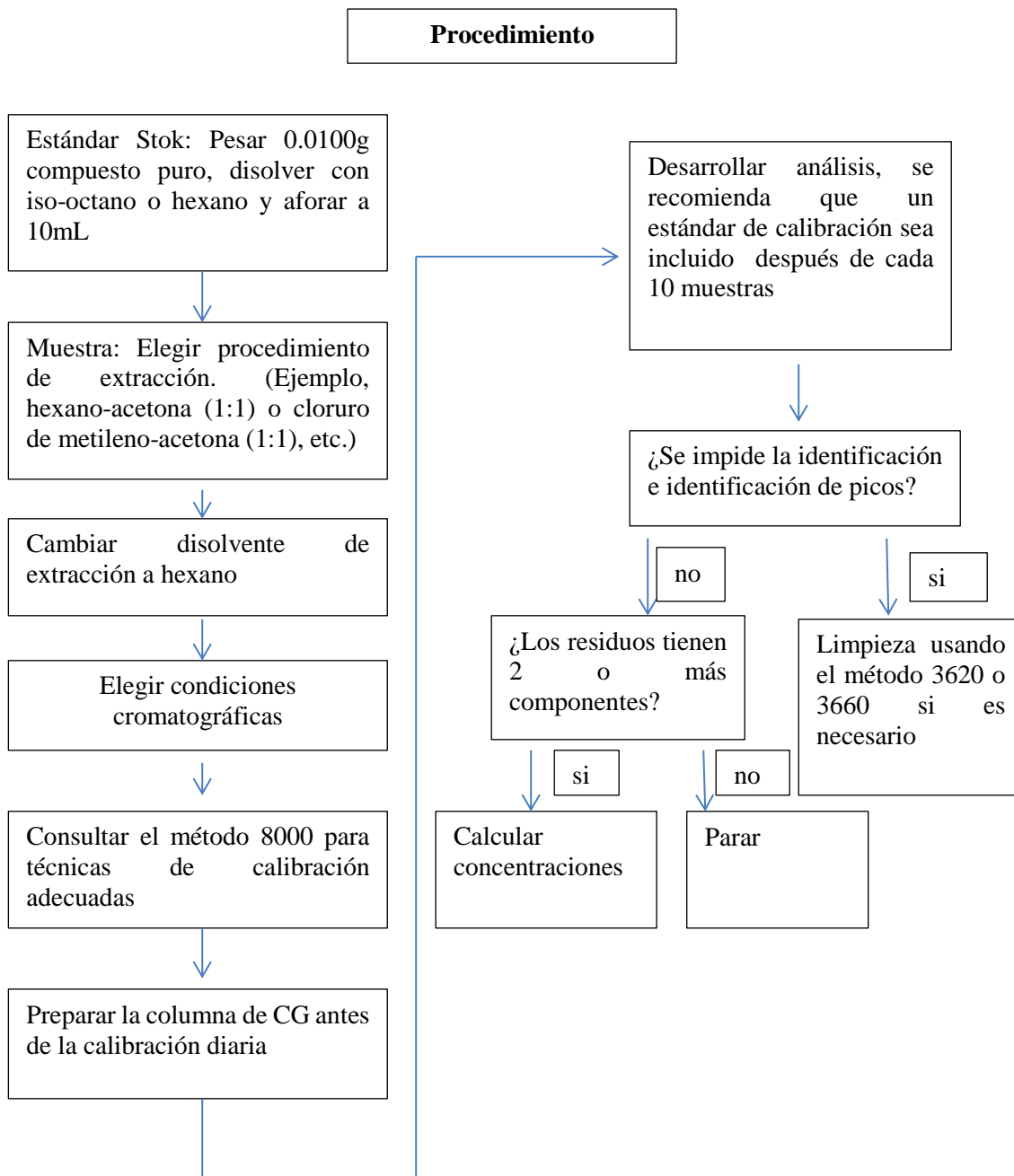


Figura 5. Diagrama experimental método EPA 8080 Plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados por cromatografía de gases

En la Tabla 18 se presenta un resumen de los requisitos y parámetros seleccionados para llevar a cabo la validación parcial de detección de pesticidas organoclorados en vinazas, los parámetros y criterios son los mismos para todos los analitos.

Tabla 18. Parámetros de validación presentes en Validación parcial de un método de detección de pesticidas organoclorados en vinaza, por cromatografía de gases

<b>Nombre y clave del método</b>	<b>EPA 8080 Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyl by Gas Chromatography (1996)</b>
<b>Entidad que lo emite</b>	<b>EPA</b>
<b>Alcance</b>	Plaguicidas organoclorados (OC) pertenecientes a la "Docena Sucia" en vinazas
<b>Analito</b>	DDT, dieldrina, aldrina, endrina, clordano, heptacloro, mírex, hexaclorohexanos y toxafeno.
<b>Matriz</b>	Vinazas
<b>Tipo de método</b>	<b>Cromatográfico</b>
<b>Requisitos de validación</b>	Cuantitativo
<b>Parámetros de desempeño</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
<b>LD (µg/L)</b>	Se calcula $2t_{(n-1)}S$
<b>LC (µg/L)</b>	10S
<b>Precisión</b>	DER% < 10%, n=7, 3 niveles de concentración, Para precisión intermedia: DER% < 10%, n=10
<b>Repetibilidad</b>	CV% < 10%
<b>Recuperación</b>	$t_{calc} = \frac{(100 - \%R)}{DS\sqrt{n}}$ al 95% nivel de confianza, Intervalo 80-120%
<b>Sesgo</b>	$t_{calc}$ , n=7 y 3 niveles de concentración, $t_{calc} < t_{crit}$ , $t_{crit} = 3.143$ para $\alpha = 0.01$ y 6 G.L.,
<b>Intervalo lineal y de trabajo (µg/L)</b>	3 niveles de concentración, n=7, coeficiente de correlación 0.999 y 0.99 para trazas
<b>Documentación requerida (Menciona o hace referencia)</b>	Condiciones de trabajo de los equipos, cartas de calibración, MRC, Preparación de las soluciones stock, preparación de la muestra, Parámetros de estudio, Registro de datos crudo, Procesamiento de los datos (software).

Elaboración propia con información de (Chaile & Ferreyra, 2019)

En conclusión se validó un método cromatográfico para la determinación de plaguicidas organoclorados pertenecientes a la Docena Sucia, en muestras de vinazas, el límite de detección y cuantificación que fueron calculados para los extractos son apropiados y se encuentran dentro de los criterios de aceptación, se demostró la linealidad del método para cada plaguicida y las desviaciones de repetitividad y reproducibilidad son menores al 10DER% como indica el método de referencia. El sesgo fue aceptable en todos los casos, se demostró estadísticamente que no existen diferencias significativas entre el valor medido por el método y el valor del material de referencia certificado.



### 3.2 Casos del área de especialidad “Farmacia”

**Caso A) para farmacia.** La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos es el documento legal instituido por la Ley General de Salud donde se establecen los métodos de análisis y los requisitos sobre la identidad, pureza, potencia y otras características de calidad que garanticen que los fármacos (principios activos), aditivos, medicamentos (preparados farmacéuticos), radiofármacos y productos biológicos sean eficaces y seguros.

Como información extra, pero no menos importante, la FEUM clasifica en 4 categorías los métodos de validación:

- Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés (conservadores, solventes, etc.).
- Categoría II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite.
- Categoría III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objetivo de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución en capsulas, liberación controlada en tabletas, entre otras).
- Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés.

Para la validación de un método analítico, la FEUM recomienda que se deban presentar los siguientes parámetros de validación, cabe recalcar que solo se muestran los parámetros que son considerados para este trabajo y FEUM no se limita a los parámetros mostrados en la Tabla 19.

Tabla 19. Parámetros de validación presentes en la FEUM

<b>Nombre y clave del método</b>	<b>FEUM duodécima edición.</b>
<b>Entidad que lo emite</b>	<b>Secretaría de Salud, México.</b>
<b>Alcance</b>	Insumos para la salud
<b>Analito</b>	No específica
<b>Matriz</b>	Fármacos, aditivos, medicamentos, productos biológicos.
<b>Tipo de método</b>	<b>Diversos tipos</b>
<b>Requisitos de validación</b>	Cuantitativo
<b>Parámetros de desempeño</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
<b>Linealidad</b>	5 niveles de concentración por triplicado. Para la cuantificación de un fármaco: cubrir de 80 a 120% del contenido de marbete Para la cuantificación de una impureza: cubrir de 50 a 120% de la especificación Para uniformidad de contenido: cubrir de 70 a 130% de la concentración declarada en el marbete Para pruebas de disolución: mínimo $\pm 20\%$ de la especificación
<b>Selectividad</b>	Evidencia de que la respuesta analítica del método sea debida únicamente al analito.
<b>LD</b>	$LD = 3.3 \frac{Se}{b}$ ó superior a 3 veces la señal-ruido
<b>LC</b>	$LC = 10 \frac{Se}{b}$ ó superior a 10 veces la señal-ruido
<b>Repetibilidad</b>	Se evalúa: En el caso de exactitud: con el coeficiente de variación del porcentaje de recobro del analito En el caso de la linealidad: con el coeficiente de variación del porcentaje de recobro del analito o con el coeficiente de variación de la relación concentración recuperada contra concentración adicionada
<b>Recuperación</b>	Se determina: $\frac{\text{concentración recuperada}}{\text{concentración adicionada}} (100)$ Pruebas por sextuplicado a placebos o muestras
<b>Sesgo</b>	Se determina a partir de la diferencia entre el valor de la media aritmética del porcentaje de recobro y el valor verdadero aceptado (100%)
<b>Precisión</b>	$n \geq 6$ , que representen el 100% de concentración o cantidad de analito, medir la respuesta dentro de una misma corrida analítica, Determinar %CV
<b>Documentación requerida</b>	Número de registro de la muestra, fecha de solicitud de la prueba, fecha de inicio y término del análisis, nombre y firma del analista, descripción de la muestra recibida, referencias de las especificaciones y una descripción completa de los métodos de prueba a los que se sometió la muestra, identificación del equipo utilizado (calificación, verificación o calibración), resultados de las pruebas realizadas (media y desviación estándar).

Elaboración propia con información de (FEUM, 2018)

El límite de detección se calcula de dos formas distintas (linealidad y señal-ruido), para linealidad es  $LD = 3.3 \frac{Se}{b}$ , donde  $b$  es la pendiente de la gráfica de concentración vs respuesta y  $Se$  es una medida de error de la respuesta analítica, puede ser la

desviación estándar de la regresión o la desviación estándar de la ordenada al origen; mientras que para señal-ruido, LD es la concentración cuya respuesta analítica sea 3 veces la señal-ruido.

Algo similar ocurre para LC, para el caso de linealidad LC es  $10\frac{Se}{b}$ , donde  $b$  es la pendiente de la gráfica de concentración vs respuesta y  $Se$  es una medida de error de la respuesta analítica, puede ser la desviación estándar de la regresión o la desviación estándar de la ordenada al origen; en el caso de la señal-ruido LC es la concentración cuya respuesta analítica es 10 veces la señal-ruido.

Para incertidumbre se describen distintos tipos de estimación que se pueden aplicar: incertidumbre tipo A e incertidumbre tipo B.

#### Incertidumbre tipo A

La incertidumbre tipo A es el método de evaluación de la incertidumbre mediante el análisis estadístico de una serie de observaciones, por ejemplo utilizando estadísticas muestrales de dispersión como son:

- a) La desviación estándar de repetibilidad, cuando se efectúan determinaciones analíticas al menos por duplicado bajo las mismas condiciones (por ejemplo una valoración al menos por duplicado), la precisión de un sistema o las pruebas de desempeño del sistema, entre otras.
- b) La desviación estándar de regresión, en los estudios de linealidad de un sistema durante la validación (aplicabilidad) o la verificación de métodos, de linealidad de detectores (calificación de instrumentos), o la linealidad de calibración (calibración de balanzas), entre otras.
- c) La reproducibilidad, cuando se efectúan estudios de precisión intermedia, lecturas al menos por duplicado, de al menos dos soluciones de referencia, en el mismo instrumento, en la misma o diferente corrida analítica, entre otras.

#### Incertidumbre tipo B

Método de evaluación de la incertidumbre utilizando las tolerancias a través de modelos distribucionales. Las distribuciones comúnmente utilizadas son:

- a) Distribución rectangular: la desviación estándar se estima aplicando la siguiente ecuación:  $S = \frac{|\pm T|}{\sqrt{3}}$ , donde T es la tolerancia. Esta distribución aplica a operaciones de medición cuyo principio de medición sea digital o dicotómico (balanzas digitales, materiales volumétricos, espectrofotómetros digitales, entre otros).
- b) Distribución triangular: la desviación estándar se estima aplicando la siguiente ecuación:  $S = \frac{|\pm T|}{\sqrt{6}}$ , donde T es la tolerancia. Esta distribución se aplica a operaciones de medición cuyo principio de medición sea analógico o con escala graduada (balanzas analógicas, materiales graduados, espectrofotómetros analógicos, entre otros).

**Caso B) para farmacia: “Development and validation of microbial bioassay for quantification of Levofloxacin in pharmaceutical preparations”**

Es un método elaborado por la División Microbiológica de la Comisión de Farmacopea de la India, aceptado y publicado en 2017 (Dafale & Semwal, 2015), el objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un bioensayo simple, sensible, preciso y rentable de difusión en agar de un nivel (5+1; 6 muestras se analizaron) para la estimación de la potencia y la bioactividad de levofloxacino en una preparación farmacéutica que aún no se ha informado en farmacopeas.

En la Tabla 20 se muestra los parámetros y criterios que fueron seleccionados para validar el método analítico.

Tabla 20. Parámetros de validación de acuerdo con ICH

<b>Nombre y clave del método</b>	Development and validation of microbial bioassay for quantification of Levofloxacin in pharmaceutical preparations, la validación se llevó a cabo de acuerdo a ICH, Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures, Methodology, Geneva, 1996, pp. 1
<b>Entidad que lo emite</b>	<b>IPC (Comisión de Farmacopea de la India)</b>
<b>Alcance</b>	Estimación de la potencia y la bioactividad de levofloxacino
<b>Analito</b>	Levofloxacino
<b>Matriz</b>	Tabletas
<b>Tipo de método</b>	Bioensayo microbiano
<b>Requisitos de validación</b>	Cualitativo
<b>Parámetros de desempeño</b>	Criterio de aceptación
<b>Linealidad</b>	Intervalo de 5 niveles de concentración Curva de calibración para $\log_{10}$ de concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de Levofloxacino vs zona de inhibición (mm), $r^2=0.9883$
<b>Exactitud</b>	Se evaluó al 80%, 100% y 120% de la concentración analítica nominal Precisión media de 101.23% con DER 0.72%
<b>Precisión</b>	Determinado por repetibilidad y precisión intermedia, la precisión intermedia del bioensayo se estimó realizando el análisis en el mismo laboratorio en 2 días (inter-día) con diferentes analistas (entre analistas). Precisión inter-día DER=1.05% Entre analistas DER=1.02
<b>Repetibilidad</b>	6 réplicas de muestras comerciales (Levoflox) a un nivel de concentración 100% vs estándar de referencia de Levofloxacino el mismo día por el mismo analista en las mismas condiciones, desviación estándar relativa (DER) 1.09%
<b>Robustez</b>	Para evaluar la robustez se modificaron algunos parámetros: disolvente (DER=0.47%), concentración de inóculo (DER=0.41%) y temperatura de incubación (DER=0.55%).
<b>Documentación requerida</b>	Químicos y reactivos, Equipos, Pruebas de cepas microbianas, Preparación de buffer fosfato, Preparación de medios microbiológicos, Preparación de soluciones estándar, Preparación de la muestra, Preparación de inóculos y su estandarización, Método de bioensayo, Análisis de espectroscopía FTIR (para determinar la presencia o ausencia de levofloxacino en la muestra comprimida), ensayo HPLC. Descripción breve de los resultados obtenidos en las pruebas y comparación con la literatura.

Elaboración propia con información de (Dafale & Semwal, 2015)

En la Figura 7 se ejemplifica el procedimiento de validación del método analítico.

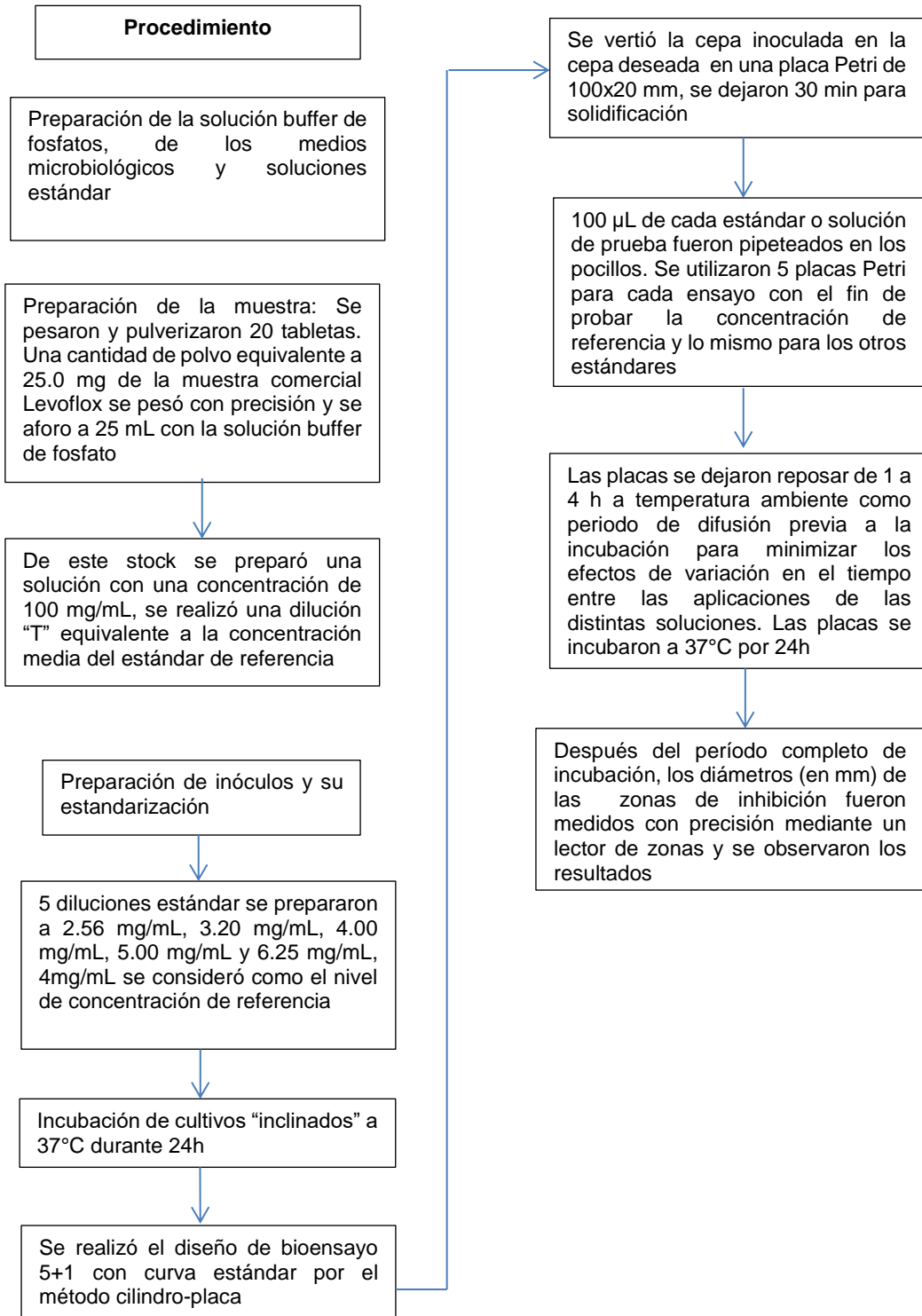


Figura 6. Diagrama experimental de la prueba de Levofloxacino

(Dafale & Semwal, 2015).



Se pueden formular criterios de rendimiento para juzgar la aceptabilidad del rendimiento de un ensayo comparando el TAE (la suma de todos los componentes sistemáticos de sesgo y varianza que afectan un resultado) observado con la especificación para el estándar de desempeño (PS) final.

PS se define por la cantidad de aTAE para el biomarcado en el nivel de decisión ( $X_c$ )

$$PS = aTAE \text{ en } X_c$$

- aTAE es la cantidad de error que se puede tolerar sin invalidar la utilidad clínica del resultado.
- El nivel de decisión es cualquier concentración del analito que sea crítica (es decir, diagnóstico y supervisión).
- TAE es la suma de todos los componentes sistemáticos de sesgo y varianza que afectan un resultado (es decir, la suma del valor absoluto del sesgo (B) y la precisión intermedia ( $P_I$ ) del ensayo de biomarcadores) Esto refleja la proximidad de los resultados de la prueba obtenidos por el ensayo de biomarcadores al valor real (concentración) del biomarcador.

$$TAE = B + P_I$$

El sesgo (B) en este caso es cualquier error sistemático que contribuye a la diferencia entre la media de un gran número de los resultados de pruebas y un valor de referencia aceptado.

La precisión intermedia ( $P_I$ ) es la variación dentro del laboratorio basada en diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

El rendimiento es aceptable cuando el TAE observado es menor que el PS. El rendimiento no es aceptable cuando el TAE observado es mayor que el PS.

Cuando las muestras de biomarcadores se analizan en múltiples laboratorios, tanto dentro como entre laboratorios debe evaluarse la reproducibilidad. La tabla 22 proporciona una guía para comparar los requisitos de la muestra para la reproducibilidad entre múltiples laboratorios y un laboratorio.



Tabla 22. Criterios para reproducibilidad en laboratorios

	Múltiples laboratorios	Un laboratorio
	Expectativas para una muestra de validación	
Controles	6	3
Duplicados	2	1-2
Replicados	5	1-5
Sitios	2-3	1
Operadores	2-3	1
Lotes de reactivos	2-3	1
Corridas	40	6
Días	20	2-3
Corridas por día	2	1

Elaboración propia con información de (C-Path, 2019)

Cuando se utiliza un único laboratorio para realizar la validación de biomarcadores, puede que no haya necesidad de demostrar la reproducibilidad entre laboratorios. Sin embargo, entre instrumentos la reproducibilidad puede ser aplicable. Estos números reflejan los estándares de diagnóstico y se muestran solo con fines comparativos. **Caso B) para métodos bioanalíticos: “Analytical validation of protein biomarkers for risk of spontaneous preterm birth”** presenta los resultados de validación de un ensayo de segunda generación para determinar la abundancia relativa de dos biomarcadores de proteínas encontrados en el suero materno que predicen el riesgo de un individuo de parto prematuro espontáneo. En el documento se describe la validación del ensayo de diagnóstico clínico de segunda generación para las proteínas distintivas IBP4 (Proteína 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina) y SHGB (globulina fijadora de las hormonas sexuales). En la Tabla 23 se muestran los parámetros y criterios de validación del método.

Tabla 23. Parámetros de validación de acuerdo a la guía *Analytical validation of protein biomarkers for risk of spontaneous preterm birth*

<b>Nombre y clave del método</b>	Analytical validation of protein biomarkers for risk of spontaneous preterm birth	
<b>Entidad que lo emite</b>	Estudio multidisciplinario Sera Prognostics, Caprion Biosciences, Integrated Diagnostics.	
<b>Alcance</b>	Determina la abundancia relativa de dos biomarcadores de proteínas que se encuentran en el suero materno y que predicen el riesgo de parto prematuro espontáneo de una persona.	
<b>Analito</b>	IBP4 y SHBG	
<b>Matriz</b>	Suero materno	
<b>Tipo de método</b>	Cromatografía	
<b>Requisitos de validación</b>	Cuantitativo	
<b>Parámetros de desempeño</b>	Criterio de aceptación	
<b>Selectividad</b>	Razón de transición = (pico cromatográfico del área cualitativa de transición / pico cromatográfico del área cuantitativa de transición) *100	
<b>Linealidad</b>	$r^2 > 0.99$	
<b>Precisión</b>	n=10 ≤20%DER n=6	
<b>LC</b>	Se calculó una relación de respuesta inversa dividiendo las áreas de los picos cromatográficos de la respuesta SIS por las áreas de los picos cromatográficos del péptido endógeno n=10 Precisión ≤20%DER	
	IBP4	SHBG
	Límite bajo 0.040 Límite alto 210	Límite bajo 0.011 Límite alto 291
<b>Repetibilidad</b>	≤20% DER	
<b>Documentación</b>	Validación de muestras y control de calidad del material; Reactivos y consumibles (condiciones de almacenamiento y proveedores); Métodos (Flujo de trabajo inicial y desarrollo de ensayos, diseño por lotes, Cromatografía de depleción de proteínas, digestión enzimática, desalación basada en extracción en fase sólida, Análisis LC-MS/MS, Riesgo de cálculo del parto prematuro espontáneo, precisión, comparación de métodos alternativos, linealidad y límites de cuantificación, especificidad analítica, prueba de interferencia endógena, estabilidad del analito), Condiciones de trabajo, programas y ecuaciones para el tratamiento de los datos.	

Elaboración propia con información de (Bradford, y otros, 2017)

El método validado tiene precisión entre lotes e intra-lotes que genera resultados aceptables a lo largo del tiempo, el método validado es de segunda generación que produce resultados precisos en relación con el método de referencia de primera generación. La respuesta del detector para cada uno de los péptidos es lineal en varios órdenes de magnitud y abarca el rango de respuestas esperadas para la población prevista. Se determinaron los límites de cuantificación, definiendo un rango de respuestas del analito con un desempeño aceptable. El nivel de

transferencia del analito en el método es insignificante. El método es resistente a las diferencias en la matriz de la muestra, los altos niveles de interferencia endógenas y el estrés que se produce durante los ciclos repetidos de congelación/descongelación y el almacenamiento a largo plazo. Los resultados demuestran el rendimiento aceptable del método y la robustez que proporciona cantidades relativas de proteínas séricas maternas necesarias para generar una determinación cualitativa del riesgo de un parto prematuro espontáneo de una mujer. En la Figura 8 se presenta un diagrama de la validación del método analítico.

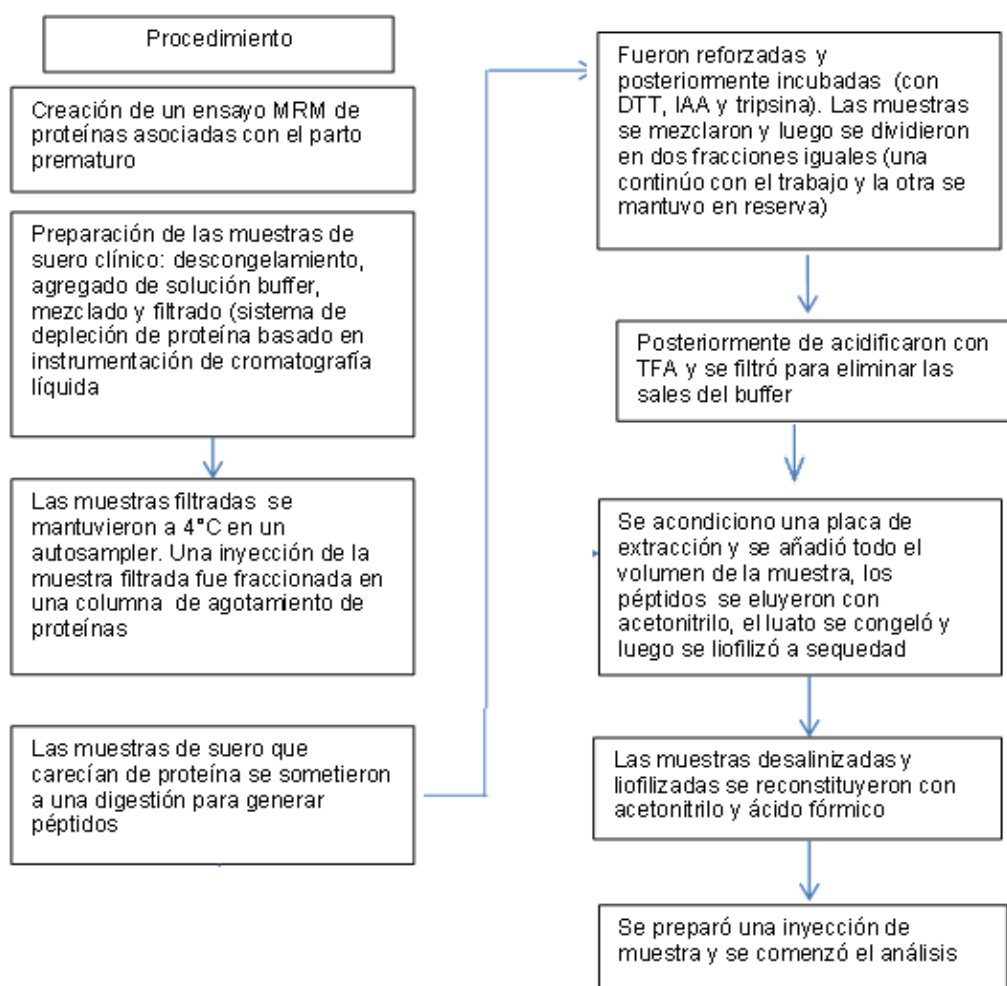


Figura 7. Diagrama experimental del método (Bradford, y otros, 2017)

En la Tabla 24 se presenta un resumen de los parámetros que se ejemplificaron en este capítulo y se aprecia los parámetros que más se repiten, los cuales son: Linealidad, Exactitud, Precisión, LD, LC y Repetibilidad, lo que implica una cierta

tendencia al momento de seleccionar los parámetros de validación de un método analítico, Eurachem señala que los parámetros de validación que son comúnmente evaluados son: Selectividad, LD, LC, Intervalo de trabajo, Sensibilidad, Veracidad (sesgo, recuperación), Precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad), Incertidumbre, Robustez; donde el intervalo de trabajo se puede interpretar como la linealidad en los otros métodos, la veracidad es un parámetro que se evalúa a través del sesgo y/o recuperación, para este caso recuperación es el parámetro que se puede visualizar con más frecuencia.

Los parámetros se seleccionan de acuerdo a las necesidades de los laboratorios, varios de estos métodos no utilizan o no evalúan selectividad, robustez, precisión intermedia, reproducibilidad, ya sea porque no es requerido para su estudio, porque el estudio ya es específico para un analito y solo se hacen modificaciones a los métodos de referencia, etc.

Tabla 24. Criterios de evaluación presentes en las guías

Área de especialidad Parámetro	Alimentos			Farmacia		Bioanalíticos		
	FDA	ANMAT	Vinaza	FDA	FEUM	FDA	C-Path	Biomarcadores
<b>Selectividad</b>				X		X		X
<b>Linealidad</b>	X	X	X	X	X	X		X
<b>Sensibilidad</b>						X	X	
<b>Exactitud</b>				X	X	X	X	
<b>Precisión</b>			X		X	X	X	X
<b>LD</b>	X	X	X	X	X		X	
<b>LC</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Repetibilidad</b>	X	X	X	X				X
<b>Reproducibilidad</b>	X	X		X			X	
<b>Robustez</b>				X				
<b>Recobro/ Recuperación</b>	X						X	
<b>Veracidad/ Sesgo</b>		X	X					
<b>Incertidumbre</b>	X	X						

Elaboración propia con información de (Dafale & Semwal, 2015), (FDA, 2015), (Bradford, y otros, 2017), (ANMAT, 2018), (FDA, 2018), (FEUM, 2018), (C-Path, 2019), (Chaile & Ferreyra, 2019), (FVM-FDA, 2019).

## CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL

Cada uno de los diferentes documentos de validación revisados ofrece una guía para la selección de los parámetros de desempeño para la validación de un método analítico, cada una desde su perspectiva y la importancia relativa que cada área de especialidad le da a cada uno de ellos.

Para un químico que recién se involucra en la validación de métodos pudiera ser motivo de confusión los términos metrológicos y técnicos utilizados para describir los procesos de evaluación de métodos ya que varían en los diferentes sectores de aplicación de las mediciones analíticas. Así mismo, generalmente las guías no señalan cuando un término se usa correcta o incorrectamente, debido a que en las actividades de validación de métodos y el desarrollo de métodos están estrechamente ligadas, factores como analito, matriz, disposición de equipos, toma de muestra, tratamiento de la muestra, estándares químicos, tipo de analito, rango de medición del analito y otros factores influyen en la selección de parámetros y metodología empleada en la validación de un método.

Como ya se ha mencionado los parámetros de validación justifican el alcance de un método analítico y proporcionan información que ayuda a identificar si un método es indicado para su uso previsto. En la tabla 27 se pueden observar los parámetros que fueron asignados para el estudio de métodos para temas generales y específicos, algunos de estos parámetros están mejor definidos por las guías.

Para **Alimentos** [ (FDA, 2019); (ANMAT, 2018); (Chaile & Ferreyra, 2019)] los criterios de los parámetros de validación fueron los siguientes:

- **Selectividad:** En la guía de FDA (FDA, 2019) no contempla un criterio pero presenta analitos y matrices en las que se puede aplicar, no descarta su uso para analitos y matrices que no estén contemplados (ANMAT, 2018) modifica una metodología reconocida internacionalmente AOAC 968.08 ya que se extiende a una matriz diferente a la que establece el método original, por consiguiente no se evaluó el termino de selectividad; por otra parte, en el ejemplo de Vinaza (Chaile & Ferreyra, 2019) tampoco se aplica un criterio, solo se basa en el método de referencia EPA 8080 (1996) en el cual se indica

que se deben realizar estudios de interferencia para identificar los límites en que el método es acertado en las determinaciones cuantitativas o cualitativas de un analito.

- **Sensibilidad:** definido por el gradiente de la curva de calibración para FDA. ANMAT y Vinaza no usan el parámetro para la validación del método, el método de referencia EPA 8080 señala que se deben realizar estudios de interferencia.
- **Linealidad:** FDA proporciona distintos intervalos de concentración, el ejemplo que se seleccionó para un nivel de método 0.001mg/kg un intervalo de 0.0006-0.004 mg/kg- la ANMAT fija al menos 4 niveles de concentración, 6 réplicas y un intervalo de confianza del 95%; Vinaza propone 3 niveles de concentración sin contar el cero, 7 ensayos y  $r^2=0.999$  y para trazas 0.99, el método de referencia EPA 8080 señala un mínimo de 5 niveles de concentración.
- **LD:** la FDA establece diversos intervalos de concentraciones pero no fija un cálculo o criterio para estimar LD la ANMAT se determinó por el promedio de las lecturas en blanco de reactivo y se multiplicó por 3; en Vinaza se estimó mediante el análisis de 10 muestras de blancos, se calculó el valor medio y desviación estándar y se determinó LD teniendo en cuenta los grados de libertad asociados N, número de mediciones,  $2t_{(N-1)}S$  con 99% de confianza, EPA 8080 establece el límite por la desviación estándar de 4 medidas de recobro.
- **LC:** la FDA establece diversos intervalos de concentraciones pero no fija un cálculo o criterio para estimar LC la ANMAT lo calculó mediante el promedio de lecturas de los blancos reactivos y lo multiplicó por 10; Vinaza de manera similar lo calculó como la concentración del analito correspondiente a la desviación estándar (DE) de 10 réplicas a nivel bajo de concentración, multiplicada por un factor K (el valor por defecto para K es 10), EPA 8080 no establece algún criterio.

- **Exactitud:** la FDA no fija un criterio de aceptación pero menciona que es la proximidad de la concordancia entre el resultado de una prueba y un valor de referencia aceptado, aplicado a los resultados de las pruebas (Precisión) incluye una combinación de error aleatorio y sistemático, cuando se aplica al método de prueba (Exactitud) se refiere a una combinación de veracidad y precisión. La ANMAT y Vinaza lo determinan a través del Sesgo, para EPA 8080 se calcula a partir del recobro para una o más mediciones de una muestra.
- **Veracidad/Sesgo:** la FDA no fija un criterio de aceptación pero menciona que el sesgo es la diferencia entre la expectativa del resultado de la prueba y el valor verdadero o de referencia aceptado. El sesgo es el error sistemático total, veracidad es el grado de concordancia del valor medio de una serie de mediciones con el valor real o el valor de referencia aceptado. La ANMAT lo determina mediante la prueba t de student para  $n=18$  y dos colas el criterio de aceptación es que  $t_{calc} < t_{crit}$  y un nivel de confianza del 95%; para Vinaza se calcula de igual forma con la prueba t de Student para 6 grados de libertad, el criterio de aceptación es el mismo que en ANMAT pero para un nivel de confianza del 99%, EPA 8080 no establece algún criterio.
- **Recobro/Recuperación:** FDA establece para un nivel de 0.001mg/kg un recobro de 40-120%. la ANMAT no usa el parámetro para la validación del método; para Vinaza se evaluó la recuperación mediante la prueba t de student con un nivel de confianza del 95%, el criterio de aceptación es que  $t_{calc} < t_{crit}$ , EPA 8080 establece que se realiza a partir de una medición de una muestra.
- **Precisión:** la FDA no fija un criterio de aceptación pero menciona que es la proximidad de la concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones específicas. Se describe mediante métodos estadísticos como desviación estándar o un límite de confianza de los resultados obtenidos. Se puede clasificar además como repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La ANMAT lo determina mediante

repetibilidad y reproducibilidad y Vinaza lo determina mediante reproducibilidad, EPA 8080 solo señala que es la desviación estándar esperada entre laboratorios de las mediciones a una concentración promedio.

- **Repetibilidad:** la FDA establece para un nivel de 0.001mg/kg una repetibilidad con  $DE \leq 22\%$  y también proporciona otros valores de desviación estándar para distintas concentraciones. la ANMAT determina que el método debe cumplir que  $DER_R < \frac{DER_H}{2}$ ; Vinaza considero valores aceptables con  $DER\% < 10\%$ , EPA 8080 no establece algún criterio.
- **Reproducibilidad:** la FDA establece para un nivel de 0.001mg/kg una reproducibilidad con  $DE \leq 44\%$  y también proporciona otros valores de desviación estándar para distintas concentraciones. La ANMAT establece (para reproducibilidad intralaboratorio) que el método debe cumplir  $DER_{Ri} < \frac{2}{3} DER_H$ , Vinaza no usa el parámetro para la validación del método, EPA 8080 no establece algún criterio.
- **Robustez:** la FDA no fija un criterio de aceptación pero menciona que es una medida de la capacidad de un procedimiento para no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberados en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. La ANMAT realizó un estudio de robustez mediante una prueba t de Student para 5 grados de libertad, dos colas y 95% el intervalo de confianza, el criterio de aceptación es  $t_{calc} < t_{crit}$ , mientras que Vinaza no usa el parámetro para la validación del método, EPA 8080 no establece algún criterio.
- **Incertidumbre:** la FDA establece un nivel de confianza de 95% ( $\alpha=0.05$ ). ANMAT determinó la incertidumbre expandida. Vinaza además de los criterios de t de student y %DER no menciona otro tipo de criterio para el cálculo de incertidumbre, EPA 8080 no establece algún criterio.

Para **Farmacia** se presenta FDA, 2015; FEUM, 2018; Dafale & Semwal, 2015; los criterios de los parámetros de validación son los siguientes:



- **Selectividad:** En la guía de la FDA (FDA, 2015) no se fija un criterio de aceptación pero señala que la selectividad se puede comparar con un método de referencia mediante la obtención y comparación de resultados positivos de muestras que contienen el analito, junto con resultados negativos de muestra que no contienen el analito. La FEUM (FEUM, 2018) no fija un criterio de aceptación pero la guía va dirigida para algunas sustancias farmacéuticas por lo que también cuenta con métodos generales de análisis que se pueden aplicar. La IPC (Dafale & Semwal, 2015) hace un estudio de selección de cepa microbiana, los criterios para la selección de cepas microbianas fueron bordes bien definidos y de gran tamaño para determinar su respuesta y susceptibilidad a levofloxacino, y una prueba del efecto de pH con un buffer de fosfato para el crecimiento significativo de la cepa.
- **Sensibilidad:** la FDA no hace referencia o mención en este caso, la FEUM no hace referencia y lo mismo ocurre con la IPC.
- **Linealidad:** la FDA establece un mínimo de 5 niveles de concentración y cubrir al menos del 70-130% de la concentración del analito, FEUM menciona que se debe incluir un intervalo de 5 niveles, por triplicado y también en función del método se debe considerar los siguientes intervalos cuantificación de un fármaco de 80 a 120% del contenido de marbete, cuantificación de una impureza de 50 a 120% de la especificación, uniformidad de contenido de 70 a 130% de la concentración declarada en el marbete, pruebas de disolución mínimo  $\pm 20\%$  de la especificación. El estudio de caso IPC estableció 5 niveles de concentración para la regresión lineal.
- **LD:** la FDA sugiere calcular como  $\frac{3.3\sigma}{S}$  donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta y S la pendiente de la curva de calibración, se puede también estimar como 3 veces la señal-ruido del analito vs muestra blanco, FEUM la determina con al menos tres niveles de concentración por triplicado, por el procedimiento de señal-ruido el LD es la concentración cuya respuesta

analítica es la inmediatamente superior a 3 veces la señal-ruido y en el caso de linealidad se calcula con la siguiente ecuación  $LD=3.3\frac{Se}{b}$ . El estudio IPC no hace referencia alguna.

- **LC:** la FDA sugiere calcular como  $\frac{10\sigma}{S}$  donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta y S la pendiente de la curva de calibración, se puede estimar también como 10 veces la señal-ruido del analito vs muestra blanco, la FEUM menciona que se determina con al menos tres niveles de concentración por triplicado, por el procedimiento de señal-ruido el LD es la concentración cuya respuesta analítica es la inmediatamente superior a 10 veces la señal-ruido y en el caso de linealidad se calcula con la siguiente ecuación  $LD=10\frac{Se}{b}$ . El estudio IPC no hace referencia alguna.
- **Exactitud:** la FDA señala que se debe evaluar utilizando un mínimo de 9 determinaciones sobre un mínimo de 3 niveles de concentración, la FEUM propone al menos determinar por sextuplicado a placebos o muestras, dichas muestras deben contener todos los componentes del producto y además se le debe adicionar la concentración del analito que represente el 100%, y se evalúa mediante el porcentaje de recobro. El estudio IPC evaluó la exactitud en 80%, 100% y 120% de la concentración nominal.
- **Veracidad/Sesgo:** la FDA no hace referencia o menciona en este caso, la FEUM solo menciona que la diferencia entre el valor de la media aritmética del porcentaje de recobro y el valor verdadero aceptado (100%) mide el sesgo del método, un método estadístico que demuestre que la magnitud del sesgo es cero indica que el método es exacto. El estudio IPC no usa el parámetro para la validación del método.
- **Recobro/Recuperación:** la FDA no hace referencia o menciona en este caso, la FEUM no fija un criterio de aceptación pero menciona que se calcula  $\frac{\text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}}$  (100) las pruebas son por sextuplicado a placebos o muestras, El estudio IPC no usa el parámetro para la validación del método.

- **Precisión:** la FDA menciona que la precisión de un procedimiento analítico expresa la proximidad de la concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras de una misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas, es usualmente expresada como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de medidas, la FEUM menciona que la precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar o como el coeficiente de variación, al menos por triplicado. El estudio IPC indica que la precisión fue determinada por la repetibilidad y precisión intermedia y expresada como la desviación estándar relativa.
- **Repetibilidad:** la FDA recomienda que se obtenga a través de un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el rango especificado del procedimiento o un mínimo de 6 determinaciones al 100% de concentración de prueba, la FEUM evalúa para el caso de exactitud con el coeficiente de variación del porcentaje de recobro del analito y en el caso de linealidad con el coeficiente de variación del porcentaje de recobro del analito y con el coeficiente de variación de la relación concentración recuperada contra concentración adicionada. El estudio IPC obtuvo la repetibilidad analizando 6 réplicas de muestras comerciales a un nivel de concentración del 100% contra el estándar de referencia el mismo día (Intra-día) por el mismo analista bajo la misma condición experimental.
- **Reproducibilidad:** FDA no señala algún criterio de aceptación, pero menciona que se determina mediante un ensayo entre laboratorios, FEUM dice que se determina por el análisis de por lo menos tres alícuotas, tomadas de una muestra homogénea, para ser analizadas en diferentes días (mínimo dos) por diferentes analistas (mínimo dos) y se evalúa por medio del coeficiente de variación de todos los resultados analíticos. El estudio ICP la estimó realizando el análisis en el mismo laboratorio en 2 días (entre días) con diferentes analistas (entre analistas).

- **Robustez:** la FDA no señala un criterio de aceptación pero sugiere que se realicen cambios durante las pruebas, la FEUM sugiere un estudio de robustez mediante el diseño de Placket Burman, entre algunos de los factores que sugiere estudiar se encuentra pH, de reactivo, Volumen, Flujo, Temperatura, el analista debe seleccionar entre 3 y 5 factores para llevar a cabo el estudio de robustez. El estudio IPC evalúa el disolvente, la concentración del inóculo y la temperatura de incubación, expresa los resultados mediante la desviación estándar relativa, no especifica un criterio de aceptación.
- **Incertidumbre:** la FDA no señala algún criterio de aceptación, solo menciona la desviación estándar de las mediciones, la FEUM no señala algún criterio pero menciona que debe expresarse de preferencia como incertidumbre combinada. El estudio ICP no señala algún criterio de aceptación pero determina la desviación estándar relativa de las mediciones.

Para **Bioanalíticos** FDA, 2018; C-Path, 2019; Bradford, y otros, 2017; los criterios de los parámetros de validación son los siguientes:

- **Selectividad:** En la guía de FDA (FDA, 2018) propone un análisis de (6, 10) muestras blanco y muestras con el analito de interés, además la señal de los estándares en blanco no debe exceder el 5% de los estándares promedio de muestras control. C-Path (C-Path, 2019) no menciona un criterio de aceptación pero destaca que los ensayos de recuperación del estándar de referencia se pueden utilizar como una medida de la selectividad si no hay otra opción disponible, Biomarcadores (Bradford, y otros, 2017) por su parte evalúa la capacidad del ensayo utilizando proporciones de transición, el método de espectrometría de masas tenía dos transiciones de masa para cada analito, si una muestra contenía una sustancia endógena o exógena que interfiera con la detección de una transición, entonces la relación de las respuestas de las dos transiciones era anormal, se determinó mediante una prueba t de student con un intervalo de confianza del 95% para n=7.

- **Sensibilidad:** la FDA lo define por la respuesta del analito en LC que debe ser  $\geq 5$  veces la respuesta del analito del calibrador cero y una precisión  $\pm 20\% \text{DER}$ . C-Path lo define a partir del límite menor de cuantificación y la curva estándar de calibración, definido entonces como 10 veces la señal-ruido de fondo media determinada utilizando muestras de matriz en blanco, Biomarkers no usa el parámetro para la validación del método.
- **Linealidad:** la FDA establece un mínimo de 6 niveles de concentración que se cubra el 75% del intervalo de concentraciones, los calibradores deben tener  $\pm 15\% \text{DER}$  y  $\pm 20\% \text{DER}$  del valor teórico para métodos CCs y LBAs respectivamente. C-Path no señala un criterio de aceptación, pero señala que se debe usar un mínimo de 5 niveles de concentración incluyendo un blanco, Biomarcadores determinó la linealidad para 10 niveles de concentración,  $n=413$  y  $r^2 > 0.99$
- **LD:** la FDA no hace referencia en este caso. C-Path establece como 3DE de señal-ruido de fondo media determinada utilizando muestras de matriz en blanco ( $n \geq 10$ ), Biomarcadores no usa el parámetro para la validación del método.
- **LC:** la FDA sugiere para  $\geq 67\%$  de controles de calidad debe  $\pm 15\% \text{DER}$  y  $\pm 20\% \text{DER}$  de la concentración nominal para CCs y LBAs respectivamente. C-Path lo define como 10 veces la señal-ruido de fondo media determinada utilizando muestras de matriz en blanco ( $n \geq 10$ ), Biomarcadores señala que el criterio de aceptación para los límites bajo y alto de cuantificación es  $\text{DER}\% \leq 20$  para  $n=6$ .
- **Exactitud:** la FDA señala que dentro de las corridas  $\pm 15\% \text{DER}$  y  $\pm 20\% \text{DER}$  para CC2 y LBAs respectivamente de la concentración nominal. C-Path no señala un criterio de aceptación pero la determina mediante  $\% \text{Exactitud} = \left( \frac{\text{Valor actual} - \text{Valor medido}}{\text{Valor actual}} \right) (100\%)$ , Biomarcadores no hace referencia alguna de este parámetro.

- **Veracidad/Sesgo:** la FDA no hace referencia o mención en este caso. C-Path solo menciona que es cualquier error sistemático que contribuye a la diferencia entre la medida de un gran número de los resultados de la prueba y un valor de referencia aceptado. Biomarcadores no usa el parámetro para la validación del método.
- **Recobro/Recuperación:** la FDA no hace referencia a un criterio de aceptación pero indica que la recuperación se refiere a la eficiencia de extracción de un proceso analítico, informado como un porcentaje de la cantidad conocida de un analito, C-Path señala como criterio de aceptación para LLOQ  $\pm 25\%CV$  y para ULOQ  $\pm 20\%CV$ , Biomarcadores no usa el parámetro para la validación del método.
- **Precisión:** la FDA señala dentro de las corridas y entre corridas  $\pm 15\%CV$  y  $\pm 20\%CV$  para CCs y LBAs respectivamente, C-Path señala para las muestras control al menos 3 niveles de concentración y 5 corridas por cada nivel y  $\pm 20\%CV$  del nivel reportado, Biomarcadores no hace referencia del parámetro.
- **Repetibilidad:** la FDA no hace referencia o mención para este caso, C-Path no menciona un criterio de aceptación y lo mismo ocurre con Biomarcadores.
- **Reproducibilidad:** la FDA solo menciona que es la precisión entre dos laboratorios como mínimo, representa la precisión del método bajo las mismas condiciones de operación durante un corto periodo de tiempo. C-Path no menciona un criterio de aceptación pero señala algunos controles que se deben de tener, Biomarcadores no señala un criterio de aceptación.
- **Robustez:** la FDA no hace referencia o mención para este caso, C-Path no señala un criterio de aceptación, Biomarcadores no usa el parámetro para la validación del método.
- **Incertidumbre:** la FDA no señala algún criterio de aceptación, solo menciona los valores ya mencionados de %DER. C-Path no fija un criterio de aceptación más allá de los ya mencionados y lo mismo ocurre con Biomarcadores.

## CONCLUSIONES

- Tomando como referencia la ISO/IEC 17025:2017 y la guía Eurachem se establecieron los principales parámetros a estudiar dentro de las distintas guías de VMA, se determinaron los principales parámetros y criterios que evalúan dichas áreas de especialidad, los cuales son: Linealidad, LC, LD, Repetibilidad, Exactitud y Precisión.
- La validación de un método analítico comprende un sistema conformado por el analito, la matriz, el método de estudio y los parámetros de validación, sin embargo los parámetros y criterios de aceptación definen el nivel de validación del método y por ello el alcance que este pueda tener.
- Los distintos enfoques de las guías hacen que la elección o discriminación de los parámetros y criterios sea más sencillo aunque en gran medida dependerán del objetivo de análisis.
- De acuerdo a los parámetros reportados por distintas guías podemos encontrar similitudes y discrepancias dentro de los criterios y parámetros de validación que son reportados, cabe destacar que la incertidumbre como parámetro de validación varía entre laboratorios pero regularmente se obtiene de la incertidumbre expandida, los criterios se pueden adaptar a los fines del estudio y con ellos ampliar una mejor validación en las distintas áreas.
- Los criterios que contenían las áreas de especialidad fueron presentados en un cuadro y posteriormente comparados, se encuentran similitudes entre ellos y sirven de partida para nuevos y distintos métodos analíticos.

## REFERENCIAS

- ANMAT. (2018). Validación de metodología analítica para la determinación de sodio por espectroscopía de absorción atómica en matrices cárnicas. ANMAT.
- AOAC. (2002). *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. Recuperado el 2 de agosto de 2021, de [members.aoac.org](https://members.aoac.org/members.aoac.org): [https://members.aoac.org/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/SLV\\_Guidelines\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf)
- AOAC. (24 de Febrero de 2012). AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. AOAC.
- AOAC INTERNATIONAL. (2007). How to meet ISO 17025 Requirements for Method Validation. Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos de América.
- Bradford, C., Severinsen, R., Pugmire, T., Rasmussen, M., Stoddard, K., Uemura, Y., y otros. (Enero de 2017). *Analytical validation of protein biomarkers for risk of spontaneous preterm birth*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2021, de [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2376999817300119): <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2376999817300119>
- Carro Díaz, A. M., & Lorenzo Ferreira, R. (2011). Química Analítica: materiales docentes Grado de Ingeniería Química 2º curso. Universidad de Santiago de Compostela. La Coruña, España: Servizode Publicacións e Intercambio Científico.
- CENAM-EMA. (Abril de 2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México.
- CGCI UNAM. (2021). *CGCI UNAM*. Recuperado el 11 de Junio de 2021, de Coordinación de Gestión para la Calidad de la Investigación: [calidad.unam.mx](http://calidad.unam.mx)



- Chaile, A., & Ferreyra, M. (2019). Validación parcial de un método de detección de pesticidas organoclorados en vinaza, por cromatografía de gases. *36(5)*, 210-22. Tucumán, Argentina: Revista Boliviana de Química.
- Chávez Velazco, H. (2020). La validación de métodos analíticos en el análisis general de alimentos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- CNQFB. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. Recuperado el 22 de Julio de 2021, de academia.edu: [https://www.academia.edu/7278632/GU%C3%8DA\\_DE\\_VALIDACI%C3%93N\\_DE\\_M%C3%89TODOS\\_ANAL%C3%8DTICOS](https://www.academia.edu/7278632/GU%C3%8DA_DE_VALIDACI%C3%93N_DE_M%C3%89TODOS_ANAL%C3%8DTICOS)
- Codex. (2009). GUIDELINES ON ANALYTICAL TERMINOLOGY (CAC/GL 72-2009) .
- CODEX. (2017). *GUIDELINES ON PERFORMANCE CRITERIA FOR METHODS OF ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD AND FEED*. Recuperado el 9 de agosto de 2021, de fao.org: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B90-2017%252FCXG\\_090e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B90-2017%252FCXG_090e.pdf)
- C-Path. (11 de Junio de 2019). *Points to consider document: Scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2021, de c-path.org: <https://c-path.org/wp-content/uploads/2019/06/evidconsid-whitepaper-analyticalsectionv2019.pdf>
- Cubrellati, R., & Di Risio, C. (2009). *Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas*. Buenos Aires, Argentina: CYTED.
- Dafale, N., & Semwal, U. (Febrero de 2015). *Development and validation of microbial bioassay for quantification of Levofloxacin in pharmaceutical*

*preparations*. Recuperado el 1 de Noviembre de 2021, de ScienceDirect.com:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177914000677>

EAFIT. (s.f.). *Boletin-1-NORMAS-ISO-Y-SU-COBERTURA.pdf*. Recuperado el 20 de Mayo de 2021, de Normas ISO y su cobertura:  
<https://www.eafit.edu.co/escuelas/administracion/publicaciones/panorama-contable/actualidad/Documents/Boletin-1-NORMAS-ISO-Y-SU-COBERTURA.pdf>

FAO. (2017). *GUIDELINES ON PERFORMANCE CRITERIA FOR METHODS OF ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD AND FEED. CODEX ALIMENTARIUS*. Recuperado el 4 de agosto de 2021, de [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B90-2017%252FCXG\\_090e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B90-2017%252FCXG_090e.pdf)

FDA. (2015). *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics-Guidance for Industry*. Recuperado el agosto de 2021, de [www.fda.gov: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf](https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf)

FDA. (2018). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. Recuperado el Agosto de 2021, de [fda.gov: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf](https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf)

FDA. (Octubre de 2019). *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds. Edition 3.0*. Estados Unidos de América.

FEUM. (2018). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Duodécima Edición*. México: Secretaría de Salud.

FVM-FDA. (17 de Octubre de 2019). *Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products. 3rd Edition*.

*Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products. 3rd Edition.* EU, EU, Estados Unidos: FDA Foods Program Regulatory Science Steering Committee (RSSC).

González, B. (2009). Validación y verificación de métodos de laboratorio aplicado al Banco de Sangre. *Asociación Mexicana de Medicina Transfusional, A. C.*, Vol. 2, Núm. 1, 20-29.

Hernández, A. (2001). Sistemas de calidad y acreditación aplicados a laboratorios de prueba. Sanfandila, Querétaro, México.

ICH. (2005). *ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)*. Recuperado el agosto de 2021, de database.ich.org: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

INAB. (6 de marzo de 2019). Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories (ISO 17025). The Irish National Accreditation Board.

ISO. (2015). ISO 9000. *Sistemas de gestión de la calidad-Fundamentos y vocabulario*. Ginebra, Suiza: Publicado por la Secretaría Central de ISO.

ISO. (Diciembre de 2017). ISO/IEC 17025. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Madrid, España: Publicado por AENOR INTERNACIONAL S.A.U. bajo licencia de la Asociación Española de Normalización.

ISO-ONU. (2010). *Organismos Nacionales de Normalización en Países de Desarrollo*. Obtenido de iso.org: [https://www.iso.org/files/live/sites/isoorg/files/archive/pdf/en/fast\\_forward-es.pdf](https://www.iso.org/files/live/sites/isoorg/files/archive/pdf/en/fast_forward-es.pdf)

ISP. (Diciembre de 2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Instituto de Salud Pública . Santiago, Chile.

- JCGM. (2012). Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. 3ª edición. España.
- LabUNAM. (2021). *LABORATORIOS CERTIFICADOS Y/O ACREDITADOS CON NORMAS O MODELOS INTERNACIONALES DE CALIDAD*. Obtenido de labunam.unam.mx: <http://labunam.unam.mx/certificados.php>
- Morillas, P. P. (2016). Guía Eurachem 1ª ed. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. España.
- OCDE. (2018). Normalización y competencia en México. México.
- Pérez Munguía, C. M. (19 de Mayo de 2014). *Estandarización y globalización*. Obtenido de Forbes México: <https://www.forbes.com.mx/estandarizacion-y-globalizacion/>
- Secretaría de Economía. (28 de Junio de 2018). *Qué es la Normalización o Estandarización*. Obtenido de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/se/articulos/que-es-la-normalizacion-o-estandarizacion>
- Secretaría de Gobernación. (2018). *Diario Oficial de la Federación*. Obtenido de dof.gob.mx: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5534255&fecha=09/08/2018](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5534255&fecha=09/08/2018)
- SENASICA. (Enero de 2015). Guía de Validación de Métodos para el Análisis de Residuos de Plaguicidas en Productos Vegetales. Tecámac, Estado de México, México.
- Thompson, M. (2002). Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods analysis (IUPAC Technical Report). *Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories, Budapest, Hungary, 4–5 November 1999, held under the sponsorship of IUPAC, ISO, and AOAC International* (págs. Vol. 74, No. 5, pp. 835-855). UK: Pure Appl. Chem.
- 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*. Obtenido de unodc.org:

[https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation\\_Manual\\_STNAR41\\_Ebook\\_S.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf)

Vega, G. (2011). *ACADEMIA, Guía CCAYAC*. Recuperado el 11 de Junio de 2021, de [https://www.academia.edu/36918128/Guia\\_CCAYAC\\_validaci%C3%B3n](https://www.academia.edu/36918128/Guia_CCAYAC_validaci%C3%B3n)

## Anexo I

Tabla AI Criterios de aceptación para métodos cuantitativos

ML	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1 g/kg	10 g/kg
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg		
ML Alternativo	1 ppb	10 ppb	100 ppb	1 ppm	10 ppm	100 ppm	0.1%	1%
Concentración de ML	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$
Rango mínimo aplicable	De 0.0006 a 0.0014 mg/kg	De 0.006 a 0.014 mg/kg	De 0.03 a 0.17 mg/kg	De 0.52 a 1.48 mg/kg	De 6.6 a 13.3 mg/kg	De 76 a 124 mg/kg	De 0.83 a 1.2 g/kg	De 8.8 a 11 g/kg
LD ( $\leq$ mg/kg)	0.0002	0.002	0.01	0.1	1	10	100	1000
LC ( $\leq$ mg/kg)	0.0004	0.004	0.02	0.2	2	20	200	2000
RSD <sub>r</sub>	22%	22%	11%	8%	6%	4%	3%	2%
PRSD <sub>R</sub>	22%	22%	22%	16%	11%	8%	6%	4%
RSD <sub>R</sub>	$\leq$ 44%	$\leq$ 44%	$\leq$ 44%	$\leq$ 32%	$\leq$ 22%	$\leq$ 16%	$\leq$ 12%	$\leq$ 8%
Recobro	40%-120%	60%-115%	80%-110%	80%-110%	80%-110%	90%-107%	95%-105%	97%-103%

Elaboración propia con información de (FVM-FDA, 2019), donde ML es nivel del método; RSD<sub>r</sub> refiere al grado de concordancia de los resultados cuando las condiciones se mantienen lo más constante posible dentro de un corto período de tiempo; PRSD<sub>R</sub> es la desviación estándar de reproducibilidad relativa pronosticada y se basa en la ecuación de Horwitz/Thompson; RSD<sub>R</sub> se refiere al grado de concordancia de los resultados cuando las condiciones de operación son lo más diferentes posible.