

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS**

MAESTRÍA EN BROMATOLOGÍA



**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAR PROTEINA CRUDA EN HARINA DE
QUINUA POR MICRO KJELDAHL**

POR: Lic. CLAUDIA SONIA ZENTENO SAN MIGUEL

LA PAZ – BOLIVIA
NOVIEMBRE, 2019

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen, a importantes actores en mí vida, que en los momentos exactos supieron mostrarme los caminos correctos, dándome lecciones que solo aprendería con mis errores.

A mis padres Ismael (†) y Sonia, que fueron, son y serán luz, guía y apoyo a lo largo de mi vida, porque me enseñaron responsabilidad, el amor por lo que hago y que el cansancio es una recompensa por el trabajo bien hecho.

A mi amado hijo Renato y mi esposo Boris por ser la razón por la que me levanto todas las mañanas y ser mi inspiración para hacer las cosas cada día mejor. ¡¡¡¡¡LOS AMO MUCHO!!!!

A dos seres, mis compañeros Momo y Bingo (†) que me acompañaron horas de horas en la elaboración del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

¡¡¡¡¡Fueron muchos y difíciles los momentos que me tocaron vivir en estos tiempos, fueron muchos y bellas las emociones que se me permitieron sentir en este camino, instantes que jamás habría vivido si tú no me los habrías obsequiado!!!! Gracias a ti que me guías desde lo alto, a ti que me apoyas y fortaleces mi alma día tras día, a ti mi **Señor** que me regalaste la oportunidad de ser quien soy, de llegar hasta donde me encuentro hoy, a ti que me impulsaste y brindaste todo tu amor.

Como no agradecer a las personas más importantes de mi humilde vida, mis padres, no existen palabras para expresar todo el amor y agradecimiento a estos dos seres maravillosos, que pelearon cada batalla conmigo, sufrieron a mi lado y lo más importante ¡Jamás me dejaron caer! Permaneciendo siempre junto a mí, para sostenerme, impulsarme y apoyarme. Todo lo que ahora soy se los debo a ustedes, los amo y les entrego mi triunfo, porque también es suyo, GRACIAS.

A mis hermanas que siguieron de cerca cada instante de mi largo camino, que pidieron por mí, confiaron en mí y sobre todo que me regalaron con tan solo una palabra de aliento: amor, esperanza y fe. GRACIAS HERMANITAS.

A mi hijito Renatito, la personita más linda y tierna quien con tan solo su presencia logra devolverme las fuerzas que en muchos momentos me faltan. Todo lo que soy y todo logro que encuentre en este nuevo camino a seguir, es para ti, que eres el motor de mi vida.

A mi esposo Boris, que, de no ser por ti, todo habría sido mucho más difícil. Luchamos, lloramos, reímos siempre juntos. Gracias por ser la persona que estuvo a mi lado día tras día, minuto a minuto, tú que contemplaste de cerca cada sacrificio y jamás me faltaste. GRACIAS.

A la Doctora Eliana Rocha Giardina, tutora del presente trabajo, una gran persona, amiga y sobre todo una gran profesional, por haberme brindado su tiempo y sus conocimientos, por sus consejos, los cuales no solo me ayudaron en mi vida profesional, sino también me inculcaron un sentido de responsabilidad con nuestro país. GRACIAS OVI.

A la Doctora Romina Segurondo Loza, por todo el apoyo, cariño y amistad que siempre me brindó, sobre todo en los malos momentos. GRACIAS ROMY.

RESUMEN

El presente trabajo validó el método para determinar el contenido de proteína cruda en harina quinua por micro Kjeldahl

Los laboratorios de ensayo utilizan la norma ISO/IEC 17025:2017. *Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Calibración y Ensayo*. Los parámetros que se evaluaron fueron: Rango lineal, Límite de detección, Límite de cuantificación, Repetibilidad, Reproducibilidad interna o precisión intermedia, Exactitud, Reproducibilidad, Sesgo, Especificidad, Robustez e Incertidumbre.

La metodología analítica validada en el presente trabajo está establecida en la norma ISO 20483 – 2013. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de proteína cruda en cereales y leguminosas la cual fue aplicada a la matriz de harina de quinua.

Se trabajó en tres niveles de concentración, los resultados de validación demostraron que el método es lineal dentro del rango 0,36 a 7,47 g/100 de nitrógeno con un coeficiente de correlación de $r = 1$, y de acuerdo a los cálculos estadísticos se demostró que el método presenta una excelente linealidad.

La precisión en la que se evaluó la repetibilidad del método, empleando condiciones, método, muestra, equipo y analista en condiciones idénticas y la precisión intermedia obteniéndose en todos los niveles valores de %CV >0 concluyéndose que el método analítico es preciso dentro del rango de trabajo de 0,36 a 7,47 g/100g de nitrógeno para los tres niveles de estudio. La exactitud se evaluó por el porcentaje de recuperación (%R), obteniéndose valores de recuperación independientes entre 97 a 99% demostrándose la exactitud del método, seguidamente se determinó el límite de detección LD = 0,11 g/100 y el límite de cuantificación LC = 0,36 g/100g de nitrógeno. Se determinó que el método es específico y selectivo se trabajó con los datos del intervalo lineal, en este

caso el modelo es lineal y la pendiente es constante en todo el rango de trabajo desde 0,36 a 7,47 g/100g de nitrógeno.

La robustez se evaluó cambiando tres variables, tiempo de digestión, concentración del titulante y condiciones ambientales al momento de la titulación.

PALABRAS CLAVE: Validación, nitrógeno, proteína, harina de quinua, Kjeldahl

SUMMARY

The present work validated the method to determine the raw protein content in quinoa flour by micro Kjeldahl

Test laboratories use the ISO / IEC 17025: 2017 standard. General Requirements for the Competition of Calibration and Testing Laboratories. The parameters that were evaluated were: Linear range, Limit of detection, Limit of quantification, Repeatability, Internal reproducibility or intermediate precision, Accuracy, Reproducibility, Bias, Specificity, Robustness and Uncertainty.

The analytical methodology validated in the present work is established in ISO 20483 - 2013 standard. Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content in cereals and legumes which was applied to the quinoa flour matrix.

It worked in three levels of concentration, the validation results showed that the method is linear within the range 0.36 to 7.47 g / 100 of nitrogen with a correlation coefficient of $r = 1$, and according to statistical calculations It was shown that the method has excellent linearity.

The precision in which the repeatability of the method was evaluated, using conditions, method, sample, equipment and analyst in identical conditions and the intermediate precision obtaining values of % CV >0 at all levels, concluding that the analytical method is accurate within the range Working from 0.36 to 7.47 g / 100g of nitrogen for the three levels of study. Accuracy was evaluated by the percentage of recovery (% R), obtaining independent recovery values between 97 to 99% demonstrated the accuracy of the method, then the detection limit $LD = 0.11$ g / 100 and the limit of quantification were determined $LC = 0.36$ g / 100g of nitrogen. It was determined that the method is specific and selective, we worked with the data

of the linear interval, in this case the model is linear and the slope is constant throughout the working range from 0.36 to 7.47 g / 100g of nitrogen.

The robustness was evaluated by changing three variables, digestion time, concentration of the titrant and environmental conditions at the time of the degree.

KEY WORDS: Validation, nitrogen, protein, quinoa flour, Kjeldahl.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	II-1
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	II-6
3.	JUSTIFICACIÓN.....	II-6
4.	OBJETIVOS	II-8
4.1	OBJETIVO GENERAL	II-8
4.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	II-8
5.	HIPOTESIS	II-8
6.	MARCO TEORICO.....	II-9
6.1	CULTIVO DE GRANOS ANDINOS	II-9
6.2	QUINUA.....	II-9
6.2.1	Harina de quinua	II-11
6.2.2	Proteína.....	II-11
6.2.3	Fundamentos teóricos de la determinación de proteína	II-12
6.3	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	II-14
6.3.1	Método y herramientas de análisis estadístico	II-15
6.4	CARACTERISTICAS DE LA VALIDACIÓN	II-18
6.4.1	Parámetros de validación/verificación	II-19

6.4.2	Validación de métodos	II-21
6.5	INTERVALO DE TRABAJO	II-22
6.5.1	Intervalo lineal	II-23
6.6	LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN	II-24
6.7	PRECISION	II-26
6.7.1	Condiciones de los estudios de precisión	II-27
6.7.2	Resultados obtenidos.....	II-29
6.8	EXACTITUD	II-30
6.8.1	Veracidad	II-31
6.8.2	Sesgo	II-32
6.9	ESPECIFICIDAD.....	II-33
6.10	ROBUSTEZ	II-34
6.11	ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA EN BASE A DATOS DE VALIDACIÓN	II-36
6.11.1	Estimación de incertidumbre en base al componente aleatorio.....	II-36
6.11.2	Estimación de la incertidumbre en base al componente sistemático y aleatorio	II-37
7.	METODOLOGÍA.....	II-37

7.1	EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA.....	II-37
7.2.	PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINA CRUDA EN HARINA DE QUINUA.....	II-42
7.2.1.	Preparación de las muestras	II-42
7.2.2.	Desarrollo	II-43
7.3.	DETERMINACION DE PARAMETROS DE VALIDACION.....	II-49
7.3.1.	Rango lineal	II-49
7.3.2.	Límites de detección y cuantificación	II-54
7.3.3.	Precisión y repetibilidad.....	II-54
7.3.4.	Exactitud.....	II-58
7.3.5.	Especificidad y selectividad.....	II-60
7.3.6.	Robustez	II-61
7.3.7.	Incertidumbre de medida.....	II-62
8.	RESULTADOS.....	II-64
8.1	RANGO LINEAL	II-64
8.2	LÍMITE DE DETECCIÓN LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	II-70
8.3	REPETIBILIDAD	II-71
8.4	REPRODUCIBILIDAD INTERNA O PRECISIÓN INTERMEDIA ..	II-74

8.5	EXACTITUD	II-80
8.6	ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD.....	II-84
8.7	ROBUSTEZ	II-84
8.8	INCERTIDUMBRE.....	II-86
9.	DISCUSIONES.....	II-88
10.	CONCLUSIONES.....	II-92
11.	RECOMENDACIONES.....	II-93
12.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	II-94

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°1	Categoría para la realización de validación/verificación	15
CUADRO N°2	Verificación de métodos.....	16

INDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO N°1	Variación de contenido de proteína de 555 accesiones de quinua.....	6
GRAFICO N°2	La recta.....	65
GRAFICO N°3	Evaluación de linealidad.....	66

INDICE DE TABLAS

TABLA N°1	Factores de conversión de nitrógeno a proteína.....	44
TABLA N°2	Niveles para el estudio del rango lineal.....	46
TABLA N°3	Niveles para el estudio de precisión y repetibilidad.....	51
TABLA N°4	Niveles para el estudio de exactitud.....	54
TABLA N°5	Modelo factorial incompleto para tres niveles.....	57
TABLA N°6	Variables de análisis de robustez.....	58

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1 Método de ensayo determinación de nitrógeno en harina de quinua –
cálculo de proteína cruda

ANEXO N°2 Procedimiento de validación de métodos de ensayo y estimación de la
incertidumbre de medida

ANEXO N°3 Informe de validación/verificación de métodos de ensayo

1. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un alimento ancestral de los andes sudamericanos y a pesar de ser reconocida como un cultivo de altura, posee una amplia variabilidad genética, encontrándose en diversas zonas agroecológicas de la región y ligada a diversos sistemas productivos. Su grano posee características intrínsecas sobresalientes, entre ellas su versatilidad para la elaboración de comidas y su gran valor nutritivo.

La quinua, además de ser un alimento de alta calidad nutritiva, es también, por sus características genéticas y fisiológicas, un cultivo llamado a alcanzar preponderancia ante los eventos que se vienen presentando a consecuencia del cambio climático, pues por su rusticidad y por su alta variabilidad genética está llamada a ser desarrollada en condiciones climáticas diversas y ya ha sido probada y es cultivada con éxito en países de los cinco continentes. (Juan Risi, 2015).

La quinua al tratarse de un alimento con alto valor proteico en relación a otros pseudo cereales, es un alimento de alto consumo a nivel mundial. Por otra parte, los granos andinos se diferencian en cuanto a sus fracciones proteicas del trigo, la cebada y el arroz, porque tiene mayor cantidad de albuminas y globulinas. (Rojas, 2010)

Bolivia al ser uno de los países productores y exportadores de quinua debe garantizar que el producto a ser exportado, cuente con la certificación que acredite que los parámetros de control de calidad, en este caso la proteína sea aceptado internacionalmente, para satisfacer la demanda del consumidor, en cuanto a disponer de un alimento sano, seguro y accesible.

El objetivo fundamental que persigue el control de calidad, en torno a la cantidad de proteína en la quinua es en favor de los productores de quinua, quienes, al tener un producto rico en proteínas, estese hace más codiciado en el mercado externo, debido a

que las zonas de producción boliviana cuentan con suelos ricos en minerales otorgando un aporte particular de proteína en el producto boliviano.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La población en general busca alimentos que cubran sus necesidades nutricionales, la quinua al ser un pseudo cereal con alto valor proteico se ha convertido en una alternativa dentro de la alimentación boliviana y fuera de nuestras fronteras como en países europeos.

Los productores de quinua y las entidades reguladoras como son: Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG) y el programa de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs -UVCCIA); deben realizar el control de calidad de los productos ya sea para la venta local o para la exportación, y los laboratorios deben brindar resultados confiables.

Debido a esta necesidad es que los laboratorios tienen que implementar sistemas de gestión de la calidad para poder responder a esta demanda y entregar resultados confiables a través de la validación de sus métodos de ensayo.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los laboratorios de ensayo deben demostrar su competencia técnica a través de la implementación de un sistema de gestión de la calidad que asegure que los resultados que emite son confiables.

La validación de los métodos permite demostrar que los resultados son exactos, precisos y confiables.

La validación de los métodos de ensayo se considera cuando estos requieren demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. La determinación de proteína cruda en harina quinua se realizó utilizando un método

normalizado con una matriz que esta fuera de su alcance de acuerdo a la norma *ISO 20483 – 2013 Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de proteína cruda en cereales y leguminosas*, por tratarse de una matriz que no está considerada dentro de su alcance se realizó la validación completa del mismo.

Por otra parte, el Laboratorio de Control de Alimentos (LCA) del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) al ser un laboratorio acreditado tiene previsto la ampliación de su alcance de acreditación, existe la necesidad de los productores de quinua de contar con métodos validados para poder exportar sus productos.

De acuerdo a la Norma ISO/IEC 17025 - 2017; los laboratorios deben verificar y validar todos los métodos que se utilicen en el laboratorio, tanto los normalizados y los no normalizados utilizados fuera de su alcance.

Se debe considerar que la quinua al ser el alimento de mayor consumo a nivel internacional y al ser Bolivia uno de los países exportadores más grandes de Sud América, se pretende colaborar con los exportadores a través resultados analíticos confiables que les garantice que su producto cumple con requisitos de calidad. De la misma forma asegurar que el consumo de este alimento rico en proteínas es controlado para el consumo del mercado interno.

Por lo expuesto anteriormente, este trabajo pretende responder de cierta manera a las necesidades de los laboratorios de Control de Alimentos (LCA) de contar con métodos analíticos precisos y exactos de esta manera brindar a sus clientes: Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria – SENASAG y el programa de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs – UVCCIA) del Ministerio de Salud, resultados confiables los cuales son de uso oficial para la obtención del registros sanitario, exportación e importación de alimentos.

El CODEX ALIMENTARIUS á solicitado a Bolivia presidir el comité de elaboración de la normativa para regular los requisitos físico químicos para la quinua, es así que el interés a nivel mundial de contar con métodos validados en esta matriz.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el método analítico para la determinación de proteína cruda en harina de quinua por micro Kjeldahl en el Laboratorio de Control de Alimentos (LCA) del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA).

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer un método analítico para la cuantificación de proteína en harina quinua.
- Determinar las características de desempeño: Rango lineal, Límite de detección, Límite de cuantificación, Repetibilidad, Reproducibilidad interna o precisión intermedia, Exactitud, Sesgo, Especificidad, Robustez e Incertidumbre, para la cuantificación de proteína cruda en harina quinua por micro Kjeldahl.
- Evaluar cada una de las características de desempeño analítico para la validación del método de ensayo.
- Elaborar un procedimiento para la validación de métodos de ensayo.

5. HIPOTESIS

El método analítico de micro Kjeldahl utilizado para la cuantificación de proteína cruda en harina de quinua es exacto y preciso.

6. MARCO TEORICO

6.1 CULTIVO DE GRANOS ANDINOS

Los granos andinos por sus características agronómicas y de adaptabilidad ecológica a las condiciones adversas de zona andina, así como por su alto valor nutritivo, no solo tienen importancia económica sino también tienen gran importancia social, ecológica, nutricional y funcional (real y potencial). (Carrasco, 2010)

6.2 QUINUA

La quinua es considerada un producto alimenticio, categorizada dentro la familia de los pseudo cereales, conocida por gran parte de la población boliviana y requerida por muchos países del mundo debido a sus altos valores nutricionales. Su historia es amplia, cuenta con una data milenaria. La importancia de este producto desde el punto de vista de los valores nutricionales ha cobrado el interés de la población mundial de países como Estados Unidos y el continente europeo entre los más importantes, logrando que su requerimiento incentive el incremento de la producción de quinua habitual.

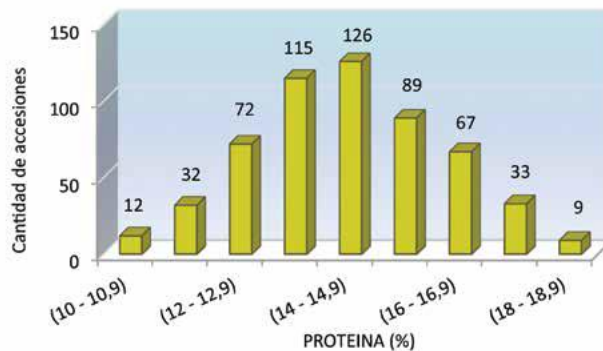
Bolivia cuenta con el banco de granos más grande del mundo. Una fundación custodia este que es el tesoro dorado de quechuas y aimaras. Quienes lo conocen le calculan unos 10 mil años de variedades resguardadas y aseguran que por ella no existiría el hambre en el altiplano. Más bien, hombres muy fuertes dejaron el legado de su cultivo y su consumo a sus descendientes andinos. La quinua es originaria de las alturas de los andes y conservada por quechuas y aimaras, el banco de genotipos de quinua cuenta con sus 3,121 variedades, lo que permite resguardar las variedades silvestres como también, las variedades modificadas con el transcurrir del tiempo, se pueden evidenciar variedades múltiples tanto en tamaño como en colores variados.

Por otra parte, los granos andinos se diferencian en cuanto a sus fracciones proteicas del trigo, la cebada y el arroz, porque tienen mayor cantidad de albuminas y globulinas. La

composición de aminoácidos en las diferentes fracciones proteicas es variable. Las proteínas solubles, albuminas y globulinas, tienen mayor contenido de aminoácidos esenciales especialmente lisina, que proteínas insolubles (prolaminas y gluteinas); por ello su valor biológico es superior. La lisina es el primer aminoácido limitante del trigo y de casi todos los cereales comunes. (Rojas, 2010)

Las proteínas se encuentran en todos los tejidos de los granos, pero las mayores concentraciones se encuentran en el germen y las capas exteriores. En el caso de los granos andinos (quinua, cañahua, amaranto), el nitrógeno de las semillas representa entre el 25 y 30% de su peso total; esto ayuda a comprender por qué las proteínas de estos granos andinos se diferencian en cuanto a sus fracciones. (Rojas, 2010).

Gráfico N°1 Variación del contenido de proteína de 555 accesiones de quinua



Fuente: (Juan Risi, 2015)

Se debe considerar que se han realizado estudios en los cuales se identifica los porcentajes de proteína presentes en la quinua, pero de igual manera se evidencia que no existen datos que validen estos resultados, haciéndolos veraces para futuras publicaciones.

6.2.1 Harina de quinua

La **harina de quinua**, es elaborada a través de un proceso de secado inicial, hasta que el grano tenga una humedad menor o igual a 11%. La quinua es entonces molida hasta lograr un producto “panificable”. La harina resultante es incorporada en fórmulas para la elaboración de pastas y productos de repostería, en diferentes proporciones, solos o mezclados con harinas de otros granos. En particular, se ha experimentado en la incorporación de quinua en la elaboración de pan para consumo interno, e incluso se llegó a dictar un Decreto Supremo que en su artículo primero especificaba que “se deberá incorporar en su componente, sólidos elaborados con harina de trigo, un mínimo de quince por ciento (15%) de cereales como ser soya, maíz, amaranto, cañahua y quinua, o combinaciones compuestas entre estos o en forma individual, para constituir harinas mixtas denominadas “Boliviarina” 14, el cual nunca llegó a implementarse realmente. (Juan Risi, 2015)

6.2.2 Proteína

Las proteínas son moléculas complejas imprescindibles para la estructura y función de las células. Su nombre proviene del griego proteos que significa fundamental, lo cual se relaciona con la importante función que cumplen con la vida.

Las proteínas se originan a partir de la unión de otras moléculas llamadas aminoácidos, se agrupan en largas cadenas y se mantienen estables por uniones químicas llamadas enlaces peptídicos.

Las proteínas pueden ser de varios tipos según las funciones que cumplen en el organismo, sin embargo, a grandes rasgos se clasifican en proteínas estructurales y proteínas con actividad biológica. Las proteínas que consumimos en la dieta pueden ser de cualquiera de los dos tipos sin dependientes de su origen se consideran proteínas alimentarias, el valor nutritivo de las proteínas viene dado por la mayor a menor presencia de los aminoácidos esenciales en su composición.

Las proteínas son macro moléculas complejas que pueden dar cuenta de más del 50% del peso seco de las células, en cuya estructura y función juegan un papel fundamental. Son múltiples las que se han aislado y purificado. Su peso molecular oscila entre 5000 y muchos millones de Dalton. (Fennema, 1993).

Se los considera biopolímeros que tiene en su estructura carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno, algunas tienen azufre, hierro, cobre, fósforo, zinc.

Las proteínas alimentarias son simplemente aquellas que resultan digeribles, no tóxicas, relativamente baratas y organolépticamente aceptables para los seres humanos.

Otro elemento esencial a tener en cuenta a la hora de valorar la importancia de la determinación de proteína en los alimentos es la influencia que estas tienen en las propiedades físico – químicas y tecnológicas de los alimentos. Así, por ejemplo, las propiedades y características de calidad de los pseudo cereales están íntimamente relacionadas con su contenido proteico. (Zumbado, 2004)

Por otra parte, las proteínas se encuentran frecuentemente combinadas física y químicamente con carbohidratos (glucoproteínas) y lípidos (lipoproteínas), los cuales influyen en las propiedades reológicas de los alimentos y materias primas. (Zumbado, 2004)

6.2.3 Fundamentos teóricos de la determinación de proteína

El nitrógeno es el elemento químico más sobresaliente que se encuentra en las proteínas y a pesar de no todo el nitrógeno de la materia orgánica proviene necesariamente de las proteínas, los métodos de determinación de proteínas totales usados hoy en día se fundamentan en la cuantificación de nitrógeno total.

El método aceptado universalmente como estándar para la determinación de nitrógeno total es el conocido como el método de Kjeldahl – Willfart – Gunnifg.

En 1883, el danés Kjeldahl trabajo en un método para determinar nitrógeno orgánico como parte de sus estudios sobre los cambios en las proteínas de los granos usados en la industria de bebidas. El método planteado por Kjeldahl considera tres etapas fundamentales, ellos son: **Digestión, Destilación y Valoración.** (Zumbado, 2004)

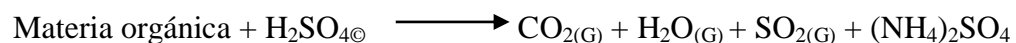
Para la etapa de digestión, Kjeldahl utilizo originalmente una solución de permanganato de potasio con el fin de oxidar toda la materia orgánica, pero los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. En 1885, Willfarth observo que, realizando la digestión con ácido sulfúrico concentrado y en caliente, se obtienen resultados satisfactorios. Cuando años más tarde Gunning sugirió la adición de sulfato de potasio para elevar el punto de ebullición de la mezcla y acortar así tiempos de digestión. De ahí que el método se conoce con el nombre de los tres autores, aunque en la actualidad aparece mayoritariamente reportado como método de Kjeldahl.

Los fundamentos de cada una de las etapas se describen a continuación.

Digestión:

Se emplea ácido sulfúrico concentrado y sulfato de cobre como catalizador, que con ayuda de calor y sulfato de potasio oxidan la materia orgánica hasta CO_2 y agua y transforman todo el nitrógeno amínico (NH_2) e imínico ($\text{N}=\text{NH}$) provenientes de proteínas y aminoácidos en ion amonio (NH_4).

La reacción general que tiene lugar es la siguiente:



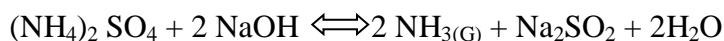
Varios catalizadores han sido empleados, entre ellos: mercurio, cobre y selenio.

Cuando la digestión termina, la solución queda transparente, libre de particular carbonosas. En el caso de haber empleado como catalizador el sulfato de cobre, la solución toma un color azul verdoso.

Destilación

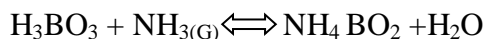
En la muestra digerida se trata con un álcali (NaOH 40% m/V) añadido en exceso, el cual reacciona descomponiendo el sulfato de amonio en amoníaco, que es volátil y se destila por arrastre con vapor.

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



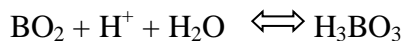
El amoníaco destilado se recoge en un erlenmeyer con una mezcla de indicadores (bromo cresol verde – rojo de metilo) y solución de ácido bórico.

La reacción que ocurre es:



Valoración

El borato de amonio formado se valora y utilizando como patrón valorante una solución estandarizada de ácido clorhídrico, según:



El punto final de la valoración estará a pH ácido, por la presencia de ácido bórico finalmente formado. (Zumbado, 2004)

6.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para poder cumplir con los criterios de validación establecidos por la Dirección Técnica de Acreditación (DTA) se tomaron en cuenta los criterios establecidos por esta institución.

La validación es la evidencia documental de que procedimientos analíticos conducirán, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. Otra definición de validación es “el procedimiento para demostrar que el método analítico es aceptable para el fin que se pretende”. (EURACHEM, 2016)

La validación de métodos analíticos es una actividad fundamental en los sistemas de calidad de los laboratorios. El proceso de validación, guarda una estrecha relación con la representatividad de los resultados, dependiendo del objetivo de los análisis y del tipo de muestra.

Existen dos tipos de validación: prospectiva y retrospectiva.

Una validación prospectiva es la que se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico, se lleva a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico. Es típico en los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método.

Una validación retrospectiva es la que se realiza para verificar la idoneidad del proceso analítico. La garantía de la calidad de un producto queda constatada a través de los datos analíticos del producto ya comercializado. Se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados.

6.3.1 Método y herramientas de análisis estadístico

Las medidas estadísticas que se utilizaron en la validación del método analítico para la cuantificación de proteína cruda por micro Kjeldahl, fueron:

a) Media

Media aritmética o promedio, es la cantidad total de la variable distribuida a partes iguales entre cada observación. En términos matemáticos, es igual a la suma de todos sus valores dividida entre el número de sumados.

$$X = \frac{n \sum xi}{n}$$

Donde:

xi = valor de una lectura

N = número de lecturas

b) Desviación estándar (s, S)

Es la medida de cómo se dispersan los valores de la media en la distribución de valores. La desviación estándar σ para toda la población de valores n está dada por:

En la práctica usualmente se analiza una muestra y no la población, la desviación estándar de la muestra está dada por el promedio de lejanía de los valores obtenidos respecto del promedio.

$$S = \frac{\sqrt{n \sum i = 1 (xi - X)^2}}{n - 1}$$

Donde:

xi = valor de lectura

X = promedio de totalidad de lecturas

n = número de lecturas

c) Coeficiente de variación (CV)

Desviación estándar dividida por la media. También es conocida como la desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje.

$$\%CV = \frac{S \times 100}{X}$$

Donde:

S = desviación estándar de las lecturas

X = promedio de la totalidad de lecturas.

d) Varianza

Es una medida de dispersión definida como el cuadrado de la desviación estándar.

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - X)^2}{n - 1}$$

Donde:

x_i = valor de una lectura

X = promedio de la totalidad de lecturas

n = número de lecturas

e) Prueba t – Student

Esta prueba permite comparar las medidas de dos grupos de datos y determinar si entre estos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas.

En la prueba t se pretende determinar el valor t de estudent calculado, obteniendo de las experiencias analíticas, y este valor posteriormente se compara con el llamado valor crítico, este valor critico se obtiene de las tablas de t student para un determinado porcentaje de confiabilidad (normalmente se utiliza el 95% de confianza, es decir, un valor de 0,05). Si no existen diferencias significativas entre 2 grupos, el t calculado debería ser inferior al t critico (o conocido también como t de tablas).

f) Test de Cochran

Determina que los resultados pertenecen a la misma población estadística mediante el calculo el C estadístico el cual una vez calculado es comparado con el valor tabulado existente en tablas en caso de incumplimiento se puede eliminar los datos anómalos.

g) Test de Grubbs

Se basa en la relación de la diferencia del valor individual con el promedio general. Con la dispersión se compara con el valor tabulado existente en tablas tanto para 95% y 99% de confianza. En caso de superar el 99% se considera el valor como outlier pero si está entre 95% y 99% se considera sospechoso.

6.4 CARACTERISTICAS DE LA VALIDACIÓN

La validación consiste en la evaluación del desempeño de los métodos de ensayo, de forma de demostrar que estos se ajustan a las condiciones operativas del laboratorio y se confirma su correcta aplicación en las condiciones mencionadas.

6.4.1 Parámetros de validación/verificación

De acuerdo al criterio DTA-CRI-011-2015 Estimación de la incertidumbre de las mediciones en laboratorios de ensayo, los métodos de ensayo se clasifican en:

Cuadro N°1 Categoría para la realización de validación/verificación.

Categoría	
I	Ensayos cualitativos o semi – cuantitativos, para los cuales no se solicita estimación de la incertidumbre de medición.
II	Métodos de ensayo reconocidos y validados, que especifican límites para los valores de las principales fuentes de incertidumbre, la forma de presentación de los resultados calculados y/o datos sobre el sesgo del método.
III	Métodos de ensayo químicos, ambientales y normalizados publicados en revistas científicas especializadas, métodos regulatorios y de consenso utilizado sin ninguna modificación para los que no se ha definido incertidumbre de medición. Para estos tipos de ensayo, se debe estimar la incertidumbre.
IV	Métodos desarrollados por el laboratorio, métodos no normalizados, métodos normalizados fuera del alcance previstos y métodos normalizados que hayan sufrido ampliaciones y modificaciones en su uso previsto primero requieren ser validados. Para estos métodos se debe realizar la estimación detallada a la incertidumbre de medición.

Fuente: (DTA-CRI-011-2015). Estimación de la incertidumbre de las mediciones en laboratorios de ensayo

Los métodos de ensayo presentan diferentes características, según estos podemos definir si los mismos deben ser verificados o validados.

Cuadro N°2 Verificación de Métodos.

	MÉTODO CUANTITATIVO	MÉTODO CUALITATIVO
VERIFICACIÓN	<p>Rango lineal (cuando sea aplicable)</p> <p>Límite de detección (cuando sea aplicable)</p> <p>Límite de cuantificación (cuando sea aplicable)</p> <p>Repetibilidad</p> <p>Reproducibilidad interna o precisión intermedia</p> <p>Sesgo</p>	<p>Sistema de control interno de calidad de las variables de control: personal, equipos, materiales, reactivos, instalaciones, condiciones ambientales y medios de control</p> <p>La participación en comparaciones Inter laboratorios y programas de ensayos de aptitud acordes con DTA-CRI-015 Políticas sobre comparaciones interlaboratorios y programas de ensayos de aptitud.</p>

VALIDACIÓN	Rango lineal	Especificidad,
	Límite de detección (cuando sea aplicable)	Límite de detección (sensibilidad),
	Límite de cuantificación (cuando sea aplicable)	Falsos positivos, Falsos negativos,
	Repetibilidad	Exactitud relativa (si fuera necesario).
	Reproducibilidad interna o precisión intermedia	
	Reproducibilidad	
	Sesgo	
	Especificidad (cuando sea aplicable)	
	Robustez (cuando sea aplicable)	
	Incertidumbre	

Fuente: Elaboración Laboratorio de Control de Alimentos (LCA)

Referencia: (Moya, 2017)

6.4.2 Validación de métodos

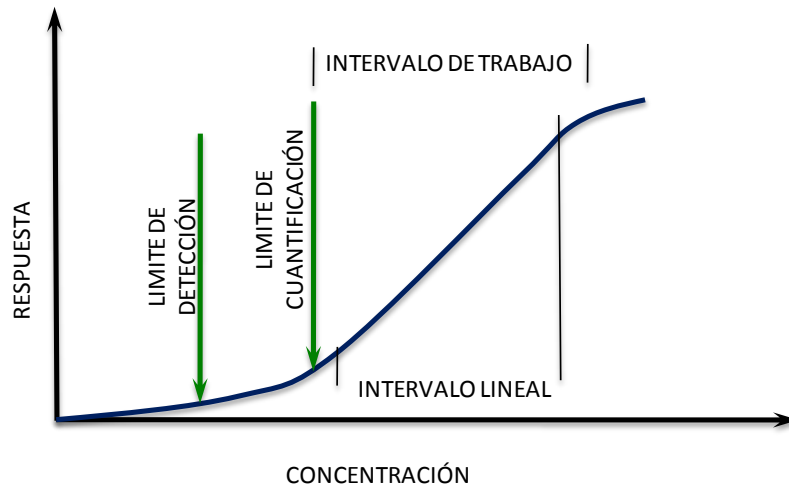
La validación de un método de ensayo debe incluir las características mencionadas en el Cuadro N°1 en comparación a un método de referencia o material de referencia certificado.

La persona responsable por la validación en el laboratorio debe determinar de antemano los objetivos de desempeño del método y asegurar que estos objetivos se alcanzan durante la validación.

6.5 INTERVALO DE TRABAJO

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analítico o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. Note que esto se refiere al intervalo de concentraciones (Figura N°1) o a los valores de la propiedad relacionada, de las disoluciones medidas realmente más que de las muestras originales. En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento. (Moya, 2017)

Figura N°1 Intervalo de trabajo



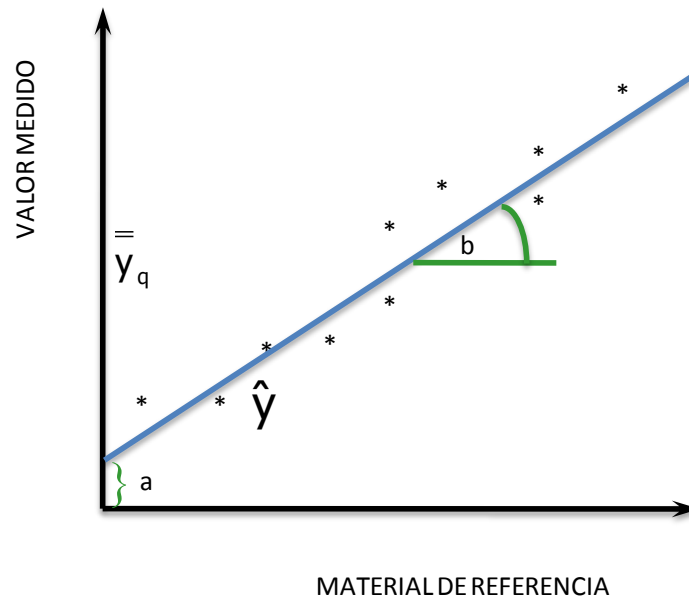
Fuente: (Moya, 2017)

6.5.1 Intervalo lineal

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal. Dentro del intervalo lineal la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito o del valor de la propiedad relacionada. La extensión de este intervalo puede establecerse durante la evaluación del intervalo de trabajo.

Note que los cálculos de regresión por ellos mismos, son insuficientes para establecer la linealidad. Para hacer esto, puede ser suficiente una inspección visual de la línea y de los residuales (Figura N°2). Existen pruebas objetivas tales como las pruebas de bondad de ajuste que continúan siendo las mejores. (Moya, 2017).

Figura N°2 Intervalo Lineal

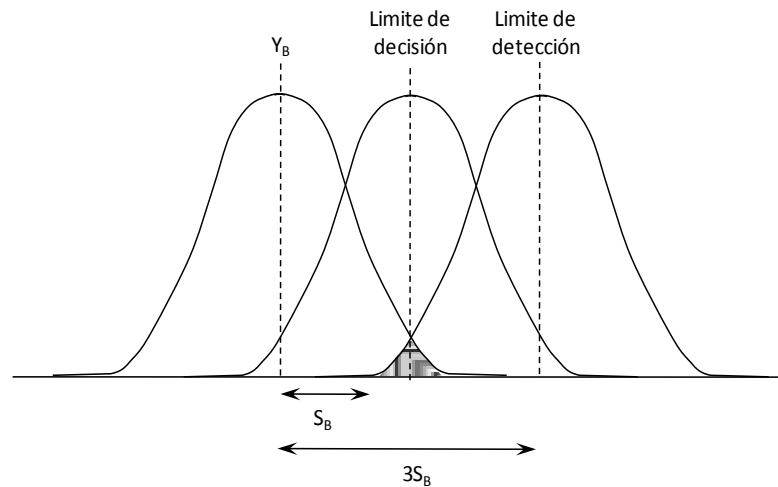


Fuente: (Moya, 2017)

6.6 LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección es una característica de las pruebas de limite, es decir, la cantidad más baja de analito que pueden detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas (FiguraN°3). De esta manera, las pruebas de limite solamente fundamentan que la cantidad del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad. (Arias, 2014)

Figura N°3. Límite de Detección



Fuente: (Moya, 2017)

Límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito individual es la cantidad más baja de un analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuada. El límite de cuantificación es un parámetro de ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra, y se utiliza en particular para la determinación de impurezas y/o productos de degradación. (ICH Tema Q2, 1995).

Luego de determinar estos parámetros lo que se espera es tener definido las siguientes zonas (Figura N°4):

Figura N°4. Zona de detección y cuantificación



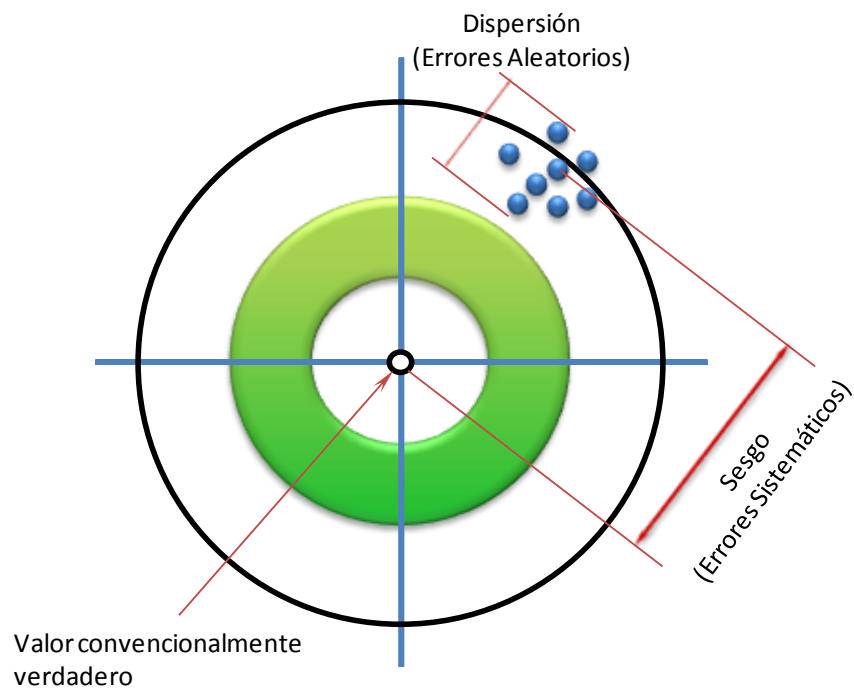
Fuente: (Moya, 2017)

6.7 PRECISION

Normalmente, la “precisión” se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo ensayista, con un equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado. Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (ésta es la medida de precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo). Puede ser que para algunos casos particulares sea más útil una medida intermedia de la precisión, por ejemplo, la precisión medida entre diferentes ensayistas, en períodos de tiempo prolongados dentro de un solo laboratorio. Esto algunas veces se conoce como “precisión intermedia” (Figura N°5), pero las condiciones exactas deberán ser especificadas. La precisión se determina por lo general en términos de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Tanto la reproducibilidad como la repetibilidad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá

establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito. La desviación estándar relativa puede ser más útil en este caso puesto que la desviación estándar dividida por la concentración es prácticamente constante dentro del intervalo de interés, a condición de que éste no sea demasiado grande. (Moya, 2017)

Figura N°5 Dispersión y posición de los Resultados



Fuente: (Moya, 2017)

6.7.1 Condiciones de los estudios de precisión

Las condiciones a seguir, para el estudio de precisión deben considerar tres parámetros (Figura N°6).

a) 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. (ISO 3534-1-1995)

b) Reproducibilidad

Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítems idénticos de análisis en distintos laboratorios, con diferentes operadores, usando distintos equipos.

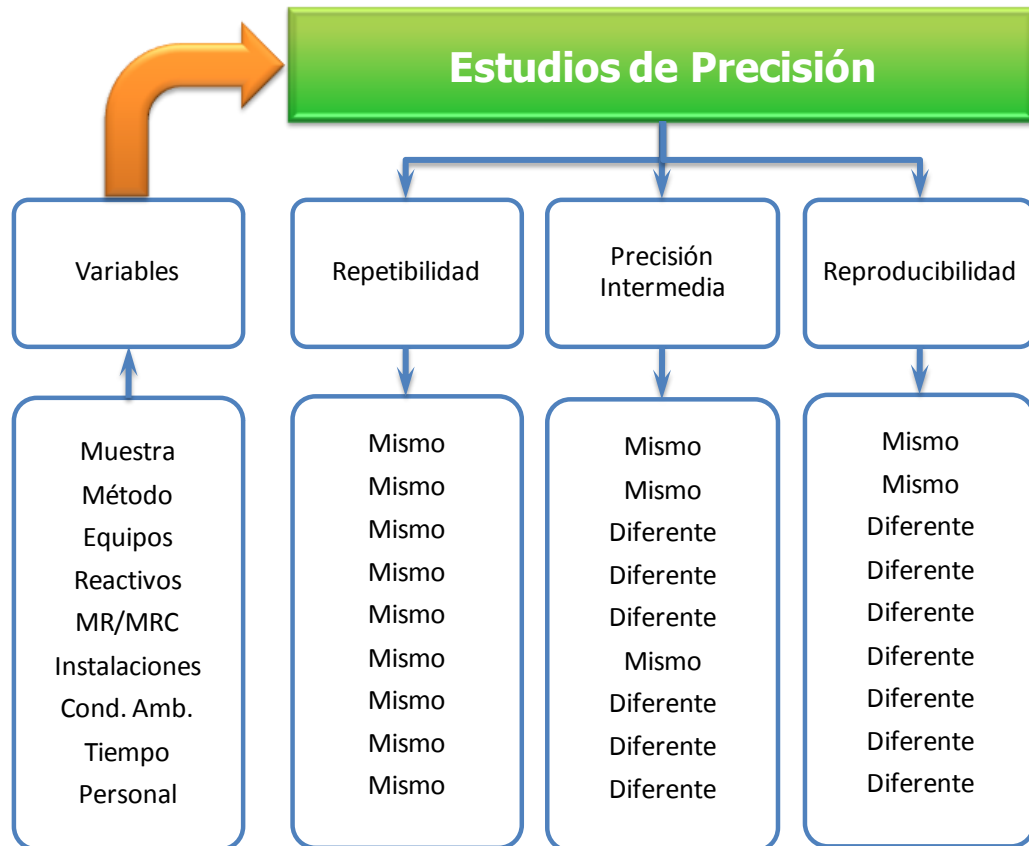
Nota: una declaración válida de reproducibilidad requiere especificación de las condiciones cambiadas.

La reproducibilidad se puede expresar en forma cuantitativa en términos de dispersión de los resultados. (ISO 3534-1-1995)

c) Precisión intermedia

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes, mismo método, muestra e instalación, pero diferente equipo, reactivo, material de referencia, condiciones ambientales, tiempo y operador. (ISO 3534-1-1995)

Figura N°6 Condiciones de Repetibilidad (S_r), Precisión Intermedia (S_w), Reproducibilidad (S_R)



Fuente: (Moya, 2017)

6.7.2 Resultados obtenidos

Luego de determinar estos parámetros (Repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad), lo que se espera es tener definido los límites de dispersión del método en estudio. (Figura N°7)

Figura 7. Límites de Precisión



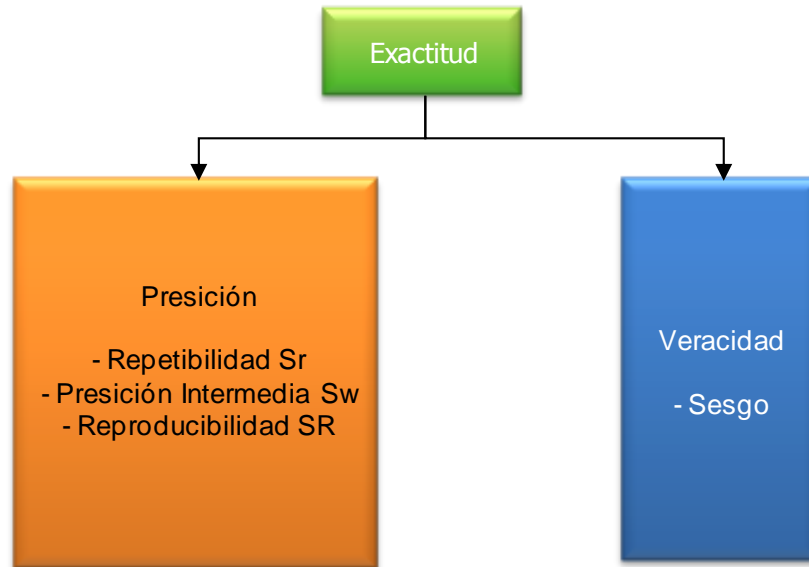
Fuente: (Moya, 2017)

6.8 EXACTITUD

La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero (La definición en ISO 3534-1-1995 se ha adoptado en este documento). La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”. La veracidad (de un método) es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real.

Normalmente, la veracidad se expresa en términos de sesgo. La “precisión” es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas tal como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados (Figura N°8). Adicionalmente, una expresión cada vez más común de exactitud es la “incertidumbre de medición”, la cual proporciona una figura única de expresión de la exactitud. (Moya, 2017)

Figura N°8 Componentes de la Exactitud



Fuente: (Moya, 2017)

6.8.1 Veracidad

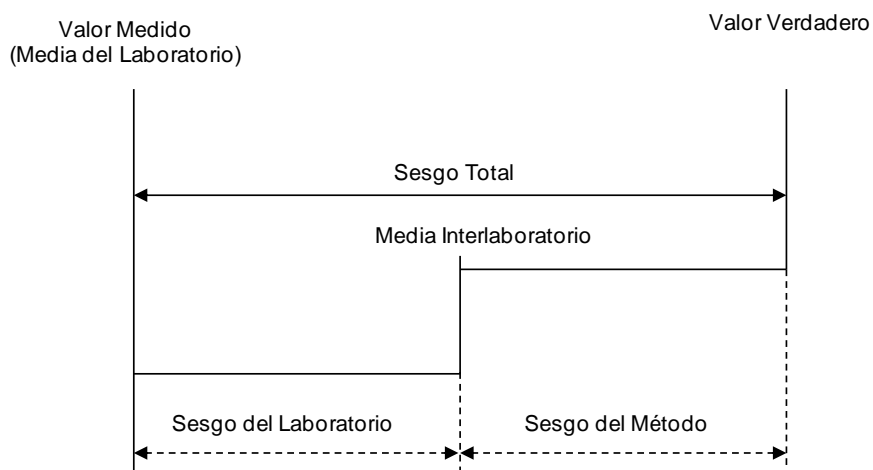
La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia (o sea, un valor verdadero o un valor verdadero convencional). Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado. Los valores de referencia son idealmente trazables a patrones internacionales. Los materiales de referencia certificados por lo general se aceptan como medio de proveer valores trazables y, por lo tanto, el valor de referencia es el valor certificado del MRC.

6.8.2 Sesgo

De acuerdo a Guía Técnica No.1 del (ISPCH, 2010) es la diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio.

Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado o material control. Se debe medir un analito de concentración conocida y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido.

Figura N°9Componentes del sesgo



Fuente: (Moya, 2017)

La Figura N°9 muestra los dos componentes del sesgo referidos aquí como los componentes debidos al método y al laboratorio. El sesgo del método surge de los errores sistemáticos inherentes al método cualquiera que sea el laboratorio que lo usa. El sesgo del laboratorio surge de errores sistemáticos adicionales característicos del laboratorio y de la interpretación que éste hace del método. En forma aislada, un laboratorio puede estimar solamente el sesgo combinado. Sin embargo, en la verificación del sesgo, es importante estar al tanto de las convenciones correspondientes

al propósito que se tiene en mente. Por ejemplo, en muchas normas para alimentos, los límites normativos se establecen en términos de los resultados obtenidos por el método de referencia. El sesgo que surge únicamente del método específico se compensa y la comparabilidad con otros laboratorios que utilizan el mismo método es la principal preocupación. El sesgo total determinado por un laboratorio particular durante la validación debe entonces compararse con cualquier sesgo reportado para el método normalizado.

Sin embargo, para la mayoría de los propósitos, la aceptación del sesgo debe decidirse sobre la base del sesgo total medido contra materiales o métodos de referencia apropiados, tomando en cuenta la precisión del método, la incertidumbre en los valores de los materiales de referencia y la exactitud requerida para el uso pretendido.

6.9 ESPECIFICIDAD

En general, se dice que los métodos analíticos consisten de una etapa de medición la cual puede o no ser precedida de una etapa de separación. Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición o alguna otra propiedad medida, la cual se atribuye al analito, se debe únicamente al analito y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que surja como una coincidencia. Esta es la confirmación de la identidad. La interferencia de otros compuestos en la medición del analito, dependerá de la efectividad de la etapa de separación y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición. La selectividad y la especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. La especificidad se considera generalmente que es el 100 % de la selectividad, pero el acuerdo no es universal. Si la etapa de medición no es específica, es posible declarar que ciertos analitos no interfieren, habiendo primero verificado que éste es el caso. Es bastante difícil establecer que nada interfiere ya que siempre existe la posibilidad de encontrar alguna interferencia no reconocida hasta el momento. Habrá casos en que ciertas interferencias químicas podrían ser identificadas por un método en particular pero que la oportunidad de

encontrarlas en la vida real sea improbable. El analista debe decidir en qué punto es razonable terminar de buscar interferencias. Estos parámetros se aplican a los ensayos tanto cualitativos como cuantitativos.

Usualmente, la selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en porciones de prueba a las cuales deliberadamente se han introducido interferencias específicas (aquéllas que se cree probable estén presentes en las muestras). Si no se está seguro de que las interferencias están presentes, la selectividad de un método se puede investigar estudiando su capacidad de medir el analito comparado con otros métodos o técnicas independientes.

Las pruebas a realizar para asegurar la selectividad o especificidad del método podrán ser diferentes en función del tipo de muestra a ensayar, la técnica utilizada, la información bibliográfica disponible, etc. Entre las pruebas más utilizadas se encuentran las siguientes:

- ✓ Método de adiciones, comparando los resultados (o la respuesta) de la muestra que contiene las posibles interferencias con el resultado de otra muestra sin dichas interferencias.
- ✓ Comparación de los resultados obtenidos por un método, con los resultados obtenidos por otro método (método de confirmación). Es importante que el método de confirmación sea un método normalizado.
- ✓ Trabajar con los datos del proceso de verificación del modelo lineal, en este caso si el modelo es lineal la pendiente debe ser constante en todo el rango de trabajo, esto muestra que el método es selectivo/específico en dicho rango. (Moya,2017)
- ✓ Test mediante adición de un estándar ("Spiking").

6.10 ROBUSTEZ

Una medida de la efectividad del método analítico es qué tan buen desempeño se mantiene aún sin una implementación perfecta. En cualquier método habrá ciertas

etapas las cuales, si no se llevan al cabo con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el desempeño del método y pueden dar como resultado que definitivamente, el método no funcione. Estas etapas deben identificarse como parte del desarrollo del método y si es posible, debe evaluarse su influencia sobre el desempeño del mismo por medio de “pruebas de robustez”. Esto incluye aplicar variaciones deliberadas al método y estudiar el efecto resultante en el desempeño.

El objetivo de la prueba de robustez es optimizar el Método de Ensayo y describir que bajo las condiciones establecidas (incluidas sus tolerancias) se pueden obtener resultados suficientemente exactos con una alta seguridad, de manera que el procedimiento funcione confiablemente si se utiliza en otros laboratorios o después de largos intervalos de tiempo.

Un método es más robusto entre menos dependan los resultados del ensayo de una modificación en las condiciones de éste. Al desarrollar un nuevo Método de Ensayo debe determinarse la modificación de los resultados por el cambio en las condiciones del ensayo.

La sistemática para la evaluación de la robustez de un método de ensayo es:

- a. Conocer las condiciones de medición
- b. Definir las condiciones que afectan al método de ensayo
- c. Seleccionar el objeto de evaluación de la conformidad a ser utilizado (MRC, MSC, Muestra)
- d. Realizar mediciones bajo las condiciones modificadas
- e. Calcular la exactitud
- f. Establecer niveles de influencia para cada una de las variables modificadas.

6.11 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA EN BASE A DATOS DE VALIDACIÓN

Es el parámetro asociado con el resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que se pueden atribuir razonablemente al analizado.

Nota: el parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o múltiplo dado de ella) o la amplitud de un intervalo de confianza. La Incertidumbre de medidas comprende, en general, muchos componentes. Algunos de estos componentes se pueden evaluar a partir de la distribución estadística de los resultados de una serie de medidas y se pueden caracterizar por desviaciones estándar experimentales. Los otros componentes que también se pueden caracterizar por desviaciones estándar, se evalúan las distribuciones de probabilidad asumida, basadas en la experiencia u otra información. Se entiende que el resultado de medida es la mejor estimación del valor del analizado y que todos los componentes de incertidumbre, que incluyen aquellos que surgen de efectos sistemáticos, tales como componentes asociados con las correcciones y estándares de referencia, contribuyen a la dispersión. (VIM, 1993)

Al contar con dos fuentes de incertidumbre se asume, como un todo a cada método de ensayo y a esto se conoce como incertidumbre global, y este es el enfoque valido para su estimación (según DTA-CRI-011).

$$u_{rel} = \sqrt{(u_{rel(sistemático)})^2 + (u_{rel(aleatorio)})^2}$$

6.11.1 Estimación de incertidumbre en base al componente aleatorio

Este método es válido si se supone que el mayor aporte de incertidumbre se debe al componente aleatorio en condiciones de reproducibilidad.

Es necesario especificando el factor de cobertura y el porcentaje de confianza.


6.11.2 Estimación de la incertidumbre en base al componente sistemático y aleatorio

En este caso la incertidumbre es la combinación de ambos componentes. La sistemática para estimación es:



- a) Calcular la precisión intermedia S_w
- b) Calcular la desviación del sesgo $DESR_\delta$
- c) Combinar ambos componentes en términos relativos
- d) Estimar la incertidumbre u_c
- e) Expandirla para poder expresarla
- f) Especificar el factor de cobertura y el porcentaje de confianza.

7. METODOLOGÍA

7.1 EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA

Equipo	Imagen
<p>Balanza analítica METTLER TOLEDO</p> <p>ME 204</p> <p>Carga: max. 220g – min. 0,1g</p> <p>Precisión: 0,001 g</p> <p>Certificado de Calibración: LP – CCB-0608 -2018</p> <p>Calibración anual de acuerdo a programa de calibración Laboratorio de Control de Alimentos (LCA)</p>	

<p>Termo higrómetro</p> <p>E.T.I8711</p> <p>Certificado de calibración LP-CCH-0559-2018</p> <p>Calibración anual de acuerdo a programa de calibración Laboratorio de Control de Alimentos (LCA)</p>	
<p>Estufa de pozo seco</p> <p>GERHARD</p> <p>KB/KBL</p> <p>T°max. 410 °C</p> <p>Certificado de calibración LP-CCT-0502-2018</p> <p>Calibración anual de acuerdo a programa de calibración Laboratorio de Control de Alimentos (LCA)</p>	
<p>Destilador Kjeldahl</p> <p>GERHARD</p> <p>VAP 300</p> <p>Verificación mensual de acuerdo a procedimiento de verificación de equipos Laboratorio de Control de Alimentos (LCA)</p>	

<p>Agitador magnético</p> <p>IKAMAG RCT</p> <p>RET – G 396006</p>	
<p>Bureta Graduada</p> <p>LMS - ALEMANIA</p> <p>Clase AS</p> <p>Capacidad de 25 ml y dispensación de 0.5 ml</p> <p>Certificado de calibración LP-CCV- 0871-2018</p> <p>Calibración anual de acuerdo a programa de calibración Laboratorio de Control de Alimentos (LCA).</p>	
<p>Dispensador de ácido bórico</p> <p>BRINKMANN DISPENSETTE</p> <p>BRAND W GERMANI</p> <p>Capacidad de dispensación: 5 ml</p> <p>Calibración anual de acuerdo a programa de calibración Laboratorio de Control de Alimentos (LCA)</p>	

Reactivos

Denominación	Calidad de Compra
Sulfato de Potasio	Alcalimetría 99 % p.a. PM= 174,26 g/mol Merck
Sulfato de cobre Penta hidrato	p.a. PM= 249,68 g/mol Merck
Ácido sulfúrico	Pureza de 95 a 97% Merck
Hidróxido de sodio	Acidimetría 99% PM= 40 g/mol Merck
Ácido clorhídrico	Al 37% p.a. Merck
Rojo de metilo	pH con rango de 4,5 a 6,2 PM= 269,31 g/mol Merck
Verde de bromo cresol	pH con rango de 3,8 a 5,4 PM= 698,04g/mol Merck
Ácido Bórico	Alcalimetría de 99,5 a 100,5 % p.a Merck
Sulfato de amonio	Pureza de 99,9999 % PM= 132,14 g/mol Merck
Agua destilada	

Materiales de referencia

<p>Material de referencia certificado:</p> <p>IBMETRO: LP-CMO-0642-2018</p> <p>Harina de Quinua</p> <p>Valor asignado: $2,12 \pm 0,14$</p> <p>Fecha de vencimiento: 2019-11-30</p>	
<p>Material de referencia secundario:</p> <p>IBMETRO: EA-LI-054</p> <p>Harina de Trigo</p> <p>Valor Asignado: $1,60 \pm 0,13$</p> <p>Fecha de vencimiento: 2019-11-30</p>	
<p>Material de referencia secundario:</p> <p>IBMETRO: EA-LI-044</p> <p>Expeller de soya</p> <p>Valor Asignado: $7,47 \pm 0,09$</p> <p>Fecha de vencimiento: 2019-05-30</p>	

7.2. PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINA CRUDA EN HARINA DE QUINUA

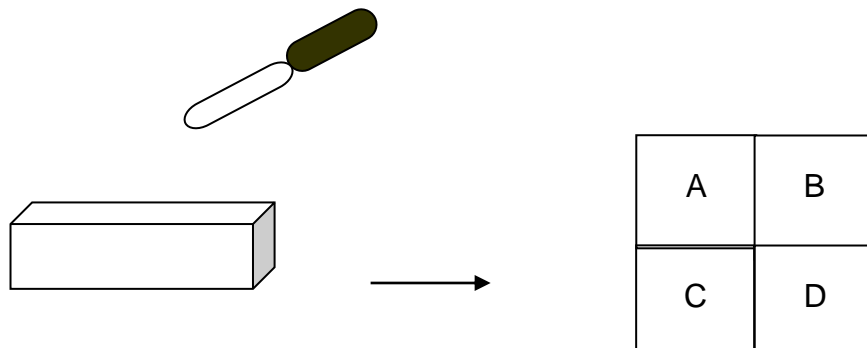
7.2.1. Preparación de las muestras

El muestreo por cuarteo se realiza en cada muestra en particular, siguiendo los siguientes pasos:

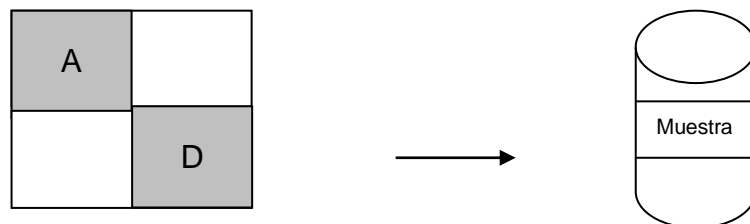
- Abrir la bolsa o envase en el que se encuentra la muestra.
- Pasar la muestra a una bandeja de plástico, homogenizar y uniformarla de manera que quede bien distribuida en la base de la bandeja.



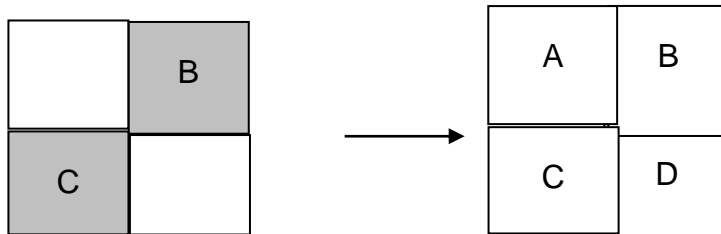
- Dividir con la ayuda de una espátula el contenido (muestra) que se encuentra en la bandeja en cuatro partes iguales, denominándose: Parte A, B, C, D.



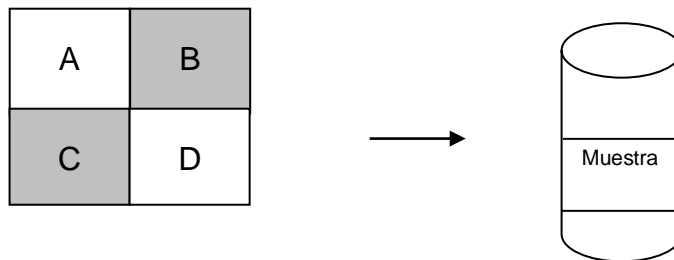
- Tomar las partes A y D y descartarlas, devolviéndolas a su envase original.



- e) Trabajar con las partes B y C que quedaron en la bandeja homogenizar y uniformar nuevamente para dividir en cuatro partes iguales: A, B, C y D.



- f) Tomar las partes B y C y descartarlas, devolviéndolas en su envase original.



- g) Las partes que quedan en la bandeja se constituyen en la porción de ensayo la cual es trasladada a una caja petri de vidrio con tapa.



7.2.2. Desarrollo

a) Porción de ensayo.

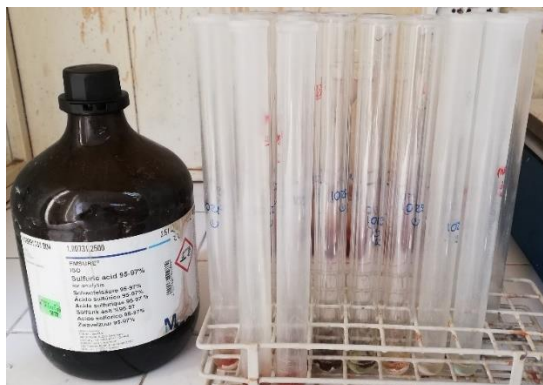
Pesar con una precisión de 0,001g, una masa de $0,30 \text{ g} \pm 0,05$ de muestra preparada de acuerdo a **7.2.1**

b) Digestión.

Colocar en el centro del platillo de la balanza analítica, el soporte de tubo Kjeldahl, y dentro de él, el tubo de digestión de manera que quede en forma vertical para facilitar la pesada, tarar, seguidamente con ayuda de una espátula incorporar la cantidad de muestra obtenida según **7.2.1.** teniendo el cuidado de no dejar caer restos de muestra próximo al platillo de la balanza analítica, en caso de que ocurriera esto con ayuda de una escobilla retirarlos

Seguidamente añadir a cada tubo de digestión:

- 0,9 g de sulfato de potasio
- 0,10 g de sulfato de cobre x 5H₂O (II)
- 3 ml de ácido sulfúrico



Realizar la digestión en la estufa de pozo seco, introduciendo los tubos con todos los reactivos en cada pozo de manera individual, digerir por un tiempo de 3 horas desde que éste, ha alcanzado la temperatura de $(400^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C})$ hasta obtener una solución límpida de color azul verdoso sin manchas negras. Una vez transcurrido este tiempo, apagar la fuente de calor del equipo digestor, dejar enfriar los tubos hasta temperatura ambiente, luego trasladarlos a la gradilla.



c) Destilación

Colocar el tubo con el contenido digerido en la parte izquierda del destilador Kjeldahl, introducir la sonda y sujetar con ayuda del soporte del tubo, verificar que el tapón de goma calce a la medida en la boca del tubo para evitar fugas.

Colocar 25 ml de ácido bórico al 4% en el matraz Erlenmeyer de 250 ml y 10 gotas de indicador (Solución A verde de bromo cresol ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$); 200 mg disuelto en Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) v/v, cantidad suficiente para 100 ml de solución. Solución B Rojo de metilo ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$) anhidro; 200mg Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), v/v, cantidad suficiente para 100 ml de solución, a partir de estos dos se prepara el indicador de proteína en una proporción de rojo de metilo – verde de bromo cresol (1:5) en este caso la proporción de mezcla de indicadores que dará origen al indicador de proteínas es importante de, el

dependerá visualizar el cambio de viraje), luego colocar el matraz en el platillo recolector del equipo destilador Kjeldahl, de tal manera que la manguera quede sumergida en la mezcla ácido bórico- indicador.



En el panel de control programar (cantidad de agua, cantidad de hidróxido de sodio, tiempo de mezcla, tiempo de destilación, tiempo de desecho y potencia) la cantidad de agua es de 10 ml, de hidróxido de sodio al 40% es de 10 ml el tiempo de destilación es de 2 minutos a potencia de 80 % la cual garantiza la completa liberación de amoníaco al concluir el tiempo de destilación el desecho de residuo es automático.

Recibir hasta 100 ml de la graduación del matraz Erlenmeyer que contiene ácido bórico.



Una vez obtenido el destilado realizar la correspondiente titulación con solución de ácido clorhídrico 0.052 N con la ayuda de un agitador magnético, hasta primer cambio de coloración.

d) Preparación de blanco de reactivo

El blanco de reactivo se realiza por duplicado pesando:

- 0,9 g de sulfato de potasio
- 0,10 g de sulfato de cobre x 5H₂O (II)
- 3 ml de ácido sulfúrico

Una vez pesado los reactivos se realiza los mismos pasos de b) y c).

Una vez concluida la destilación de todas las muestras y el blanco lavar el equipo dejando limpio sin rastros de hidróxido y sin el flujo de agua, cerrando el grifo y apagándolo. Limpiar con un paño húmedo el exterior del equipo.

e) Registro y expresión de resultados

Contenido de nitrógeno (N%)

Se obtiene usando la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{(VgMuestra - VgBlanco)}{CM} \times 0,014 \times N \times 100 = \quad g/100g$$

Dónde:

Vg Blanco = es el volumen en mililitros, de ácido clorhídrico en solución **0,052 N** empleado en el blanco.

Vg Muestra=es el volumen en mililitros, de ácido clorhídrico en solución **0,052 N** empleado en la muestra.

0,014 = es el valor, en gramos, de la cantidad de nitrógeno equivalente para el uso de 1 ml de solución 0,05 mol/l de ácido clorhídrico.

N = es la normalidad real del ácido clorhídrico en solución empleado en la titulación **0,052N**

CM = es la masa en gramos de porción de ensayo

Expresar los resultados con dos decimales.

f) Cálculo de proteína cruda

$$\text{Proteína cruda} = F_t \times \%N$$

F_t = factores de transformación del nitrógeno a proteína (Véase **Tabla N°1**):

Tabla N°1 Factores de Conversión de nitrógeno a proteína.

Producto	Factor de conversión de nitrógeno a proteína
Trigo normal	5,7
Trigo Durum	5,7
Productos de la	5,7 ó 6,25
Trigo para pienso	6,25
Cebada	6,25

Avena	5,7 ó 6,25
Centeno	5,7
Triticale	6,25
Maíz	6,25
Quinoa y derivados	6,25

Fuente: (ISO 20483-2013)

7.3. DETERMINACION DE PARAMETROS DE VALIDACION

Material de Referencia Certificado: es aquel acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos. (VIM, 1993)

Material secundario, se considera como material secundario a los restos de ensayos de aptitud que comercializa el Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO) con valores de referencia obtenidos por consenso con los laboratorios participantes en las rondas interlaboratoriales.

7.3.1. Rango lineal

Se realizó la determinación en tres niveles de concentración de proteína (véase **Tabla N°2**), se trabajó en cada nivel con 10 repeticiones por duplicado.

Tabla N°2 Niveles para el estudio del rango lineal

Nivel	Matriz	Concentración	Número de datos	Tipo
1	Harina de trigo	1,60 g/100g ± 0,13 g/100g de nitrógeno	20	Material secundario
2	Harina de Quinoa	2,12 g/100g ± 0,14 g/100g de nitrógeno	20	Material de referencia certificado
3	Expeller de soya	7,47 g/100g ± 0,09 g/100g de nitrógeno	20	Material secundario

Fuente: Elaboración Propia

- a) Se calculó los promedios con un decimal más que los datos originales en cada nivel:

$$\bar{y}_{ij} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_{k=1}^{n_{ij}} y_{ijk} \quad \text{Ecuación (1)}$$

- b) Se calculó la desviación estándar en cada nivel:

$$S_{ij} = \sqrt{\frac{1}{n_{ij} - 1} \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk} - \bar{y}_{ij})^2} \quad \text{Ecuación (2)}$$

- c) Inmediatamente se evaluaron los resultados y si se detectan datos anómalos estos pueden ser eliminados en el proceso no se identificaron datos anómalos.
- d) Test de Cochran's

Consiste en calcular el estadístico C

$$C = \frac{S_{ij}^2 \max}{\sum_{i=1}^p S_{ij}^2} \quad \text{Ecuación (3)}$$

y compararlo con el valor tabulado (Anexos) en caso de incumplimiento se puede pensar en eliminar esos datos.

e) Test de Grubbs

Primera evaluación

Consiste en calcular el estadístico G_{ij}

$$G_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j}{\sqrt{\frac{1}{(p_j - 1)} \sum_{i=1}^{p_j} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2}} \quad \text{Ecuación (4)}$$

Y comparar con el valor tabulado (Anexos) tanto para 95% y 99% de confianza. En caso de superar el 99% se considera el valor como outlier pero si está entre 95% y 99% se considera sospechoso.

➤ **Relación entre el valor de referencia y la respuesta obtenida por el método**

Con los datos ya evaluados se debe realizar una correlación lineal entre el valor medido con los valores de referencia.

Se calcula el valor de a, b y r.

Establecer un modelo lineal de acuerdo al siguiente procedimiento:

$$\bar{y}_j = a + b\hat{y}_j \quad \text{Ecuación (5)}$$

Calcular la pendiente y el intercepto

$$b = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 * \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}}$$

Ecuación (6)

$$a = \frac{\sum_{j=1}^q \bar{y}_j - b * \sum_{j=1}^q \hat{y}_j}{q}$$

Ecuación (7)

Calcular el coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sqrt{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}\right) \left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j\right)^2}{q}\right)}}$$

Ecuación (8)

Calcular la covarianza

$$\text{COV}(\hat{y}_j, \bar{y}_j) = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q (\hat{y}_j - \bar{\hat{y}}) * (\bar{y}_j - \bar{\bar{y}})$$

Ecuación (9)

Calcular la varianza residual

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^q (\bar{y}_j - (a + b * \hat{y}_j))^2}{q - 2}}$$

Ecuación (10)

Con la varianza residual y el intercepto se calculó el intervalo lineal.

➤ **Evaluación de la linealidad**

Con los valores de la linealidad se calcula la correlación lineal significativa t_r a través de la siguiente formula:

Ecuación (11)

$$t_r = \frac{r * \sqrt{(q-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Comparar t_r con el valor tabulado t_{tab} con un grado de significación del 95% y (p-2) grados de libertad.

- ✓ Si $t_r \geq t_{tab}$ existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método, y el intervalo estudiado es lineal.
- ✓ Si $t_r < t_{tab}$ no existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método, y el intervalo estudiado no es lineal.

También comprobar la covarianza

- ✓ Si $COV = 0$, el sistema este incorrelacionado
- ✓ $COV < 0$, el sistema tiene una proporcionalidad indirecta
- ✓ $COV > 0$, el sistema tiene una proporcionalidad directa

Por lo tanto:

➤ **Prueba de Hipótesis en la linealidad de la respuesta analítica**

Hipótesis nula (H_0): El método en el intervalo estudiado no es lineal.

Hipótesis de investigación (H_i): El método en el intervalo estudiado es lineal.

Por lo tanto, se establece con los resultados obtenidos que:

Se rechaza la hipótesis nula H_0 .

Se acepta la hipótesis de investigación H_i .

7.3.2. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de los datos de estudio del intervalo lineal.

Se realizó una correlación lineal entre el valor medido con los valores de referencia, a estos datos se aplicó la varianza residual y el intercepto.

Podemos encontrar los límites de detección y cuantificación aplicando las siguientes formulas:

$$y_d = a + 3S_{y/x} \quad \text{Ecuación (12)}$$

$$y_c = a + 10S_{y/x} \quad \text{Ecuación (13)}$$

Siendo:

a = El termino independiente de la recta de regresión

$S_{y/x}$ = Varianza residual

7.3.3. Precisión y repetibilidad

Se trabajó en tres niveles de concentración de proteína se manejaron 5 datos por duplicado en cada nivel. (**Tabla N°3**)

Tabla N°3 Niveles para el estudio de precisión y Repetibilidad

Nivel	Matriz	Concentración	Número de datos	Tipo
1	Harina de trigo	1,60 g/100g ± 0,13 g/100g de nitrógeno	10	Material secundario
2	Harina de Quinoa	2,12 g/100g ± 0,14 g/100g de nitrógeno	10	Material de referencia certificado
3	Expeller de soya	7,47 g/100g ± 0,09 g/100g de nitrógeno	10	Material secundario

Fuente: Elaboración Propia

Para determinar la repetibilidad y precisión intermedia se realizó lo siguiente:

Se realizaron mediciones dentro del intervalo lineal en distintas concentraciones.

Se realizaron 5 mediciones por duplicado para cada nivel de concentración

Evaluación de Resultados

La evaluación consiste en:

a) Cálculo de la Repetibilidad y Precisión Intermedia

Con los datos ya depurados

Se calculó los promedios de cada nivel

$$\hat{m}_j = \bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \quad \text{Ecuación (14)}$$

Se calculó la repetibilidad S_r y precisión intermedia S_w

$$S_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} \quad \text{Ecuación (15)}$$

$$S_{wj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} \quad \text{Ecuación (16)}$$

Se calculó la dispersión entre ensayistas

$$S_{Lj}^2 = \frac{S_{dj}^2 - S_{rj}^2}{n_j} \quad \text{Ecuación (17)}$$

$$S_{dj}^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} * (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2 \quad \text{Ecuación (18)}$$

$$= \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{y}_{ij})^2 - (\bar{y}_j)^2 * \sum_{i=1}^p n_{ij} \right]$$

$$= \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \right] \quad \text{Ecuación (19)}$$

Para la reproducibilidad S_R se emplearon datos de pruebas inter laboratorios, pero la fórmula para el cálculo de la misma es:

$$S_{Rj}^2 = S_{rj}^2 + S_{Lj}^2 \quad \text{Ecuación (20)}$$

Calcular los límites de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad

$$r = t_{\infty} * \sqrt{2} * S_r \quad \text{Ecuación (21) Repetibilidad}$$

$$r_w = t_{\infty} * \sqrt{2} * S_w \quad \text{Ecuación (22) Precisión intermedia}$$

$$R = t_{\infty} * \sqrt{2} * S_R \quad \text{Ecuación (23) Reproducibilidad}$$

Dada la complejidad de las ecuaciones se puede emplear un método abreviado en la que se calculan valores intermedios que permiten un cálculo sencillo de la reproducibilidad.

$$\begin{aligned} T_1 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} * \bar{y}_{ij}; & T_2 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} * (\bar{y}_{ij})^2 \\ T_3 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} & ; & T_4 = \sum_{i=1}^p n_{ij}^2 \\ T_5 &= \sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2 \\ S_r^2 &= \frac{T_5}{T_3 - p} \\ S_L^2 &= \left[\frac{T_2 * T_3 - T_1^2}{T_3} - S_r^2 \right] \left[\frac{T_3(p-1)}{T_3^2 - T_4} \right] \end{aligned} \quad \text{Ecuación (24)}$$

➤ **Prueba de Hipótesis en el análisis de la respuesta analítica en la precisión**

Hipótesis nula H_0 : La precisión intermedia es menor a la repetibilidad.

Hipótesis de investigación H_i : La precisión intermedia es mayor a la repetibilidad.

Por lo tanto, se establece con los resultados obtenidos que el método es preciso y repetible por tanto se:

Se rechaza la hipótesis nula H_0 .

Se acepta la hipótesis de investigación H_i .

7.3.4. Exactitud

Se trabajó en tres niveles de concentración de proteína se manejaron 10 datos por duplicado en cada nivel. (Tabla N°4)

Tabla N°4 Niveles para el estudio de exactitud

Nivel	Matriz	Concentración	Número de datos	Tipo
1	Harina de trigo	1,60 g/100g \pm 0,13 g/100g de nitrógeno	20	Material secundario
2	Harina de Quinoa	2,12 g/100g \pm 0,14 g/100g de nitrógeno	20	Material de referencia certificado
3	Expeller de soya	7,47 g/100g \pm 0,09 g/100g de nitrógeno	20	Material secundario

Fuente: Elaboración Propia

Evaluación de Resultados

La evaluación consiste en:

a) Cálculo de la exactitud

Se verifico que los resultados pertenecen a la misma población estadística, siguiendo los mismos pasos que para el intervalo de trabajo, con los datos ya depurados se realizó los siguientes cálculos.

Calcular los promedios de cada nivel

$$\hat{m}_j = \bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \quad \text{Ecuación (25)}$$

Calcular el sesgo

$$\delta_j = \bar{y}_j - \hat{y}_j \quad \text{Ecuación (26)}$$

Calcular la dispersión de los resultados

$$S_j = \sqrt{\frac{1}{p_j - 1} \sum_{i=1}^p (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2} \quad \text{Ecuación (27)}$$

Calcular el error cuadrático medio relativo

$$ECMR = \frac{\sqrt{\delta_j^2 + S_j^2}}{\hat{y}_j} * 100 \quad \text{Ecuación (28)}$$

Calcular la desviación del sesgo

$$DESR_\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} \delta_{ij}^2}{p_j}} \quad \text{Ecuación (29)}$$

b) Evaluación de la exactitud

Para realizar la verificación de la exactitud se aplica la siguiente sistemática:

Calcular t experimental

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\delta_j| * \sqrt{p_j}}{S_j} \quad \text{Ecuación (30)}$$

Contrastar con el t Tabulado si:

Si $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$ se puede afirmar que ambos valores no difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método satisface la condición de exactitud.

Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$ se puede afirmar que ambos valores difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método no satisface la condición de exactitud.

➤ **Prueba de Hipótesis en el análisis de recuperación de la respuesta analítica en la exactitud**

Hipótesis nula H_0 : El porcentaje de recuperación de exactitud es menor al 95%

Hipótesis de investigación H_i : El porcentaje de recuperación es mayor al 95%

Por lo tanto, se establece con los resultados obtenidos que el método es exacto por tanto se:

Se rechaza la hipótesis nula H_0 .

Se acepta la hipótesis de investigación H_i .

7.3.5. Especificidad y selectividad

Se trabajó con los datos del intervalo lineal, en este caso el modelo es lineal y la pendiente es constante en todo el rango de trabajo.

Con el fin de evaluar la selectividad se ha calculado las pendientes de 3 en 3 niveles, es decir:

b₁ puntos 1 al 3

b₂ puntos 2 al 4

b₃ puntos del 3 al 5.

7.3.6. Robustez

En el estudio de la robustez se evaluó durante el desarrollo del método en muestras de Harina de trigo y expeler de soya, en el rango de 1,62 y 7,47 g/100g de nitrógeno, esto debido a que se quiso estudiar el nivel más bajo y el nivel más alto.

Se realizaron 4 mediciones por duplicado en el nivel 1 y nivel 3, las variables estudiadas son:

- Cambio de concentración de ácido empleado en la titulación,
- Condiciones ambientales en la titulación
- Tiempo de digestión.

Tabla N°5 Modelo factorial incompleto para 3 variables

N°	Factores			Resultado
	A	B	C	
1	-	-	+	y ₁
2	-	+	-	y ₂
3	+	-	+	y ₃

Fuente: Elaboración Propia

Tabla N°6 Variables de análisis de robustez

N.º	Etapa	Magnitud/Variable	¿Este factor es crítico?	Factor (F)	Niveles	
					Nivel 1 / (+)	Nivel 2 / (-)
1	Digestión	Tiempo	SI	A	2 h	3 h
2	Titulación	Concentración titulante	SI	B	0,05005	0,05253
3	Titulación	Temperatura ambiental	SI	C	20 °C	30 °C

Fuente: Elaboración Propia

7.3.7. Incertidumbre de medida

El estudio de la incertidumbre estimada a partir de los datos de la validación.

- Datos de desviación estándar del sesgo (DESR_δ)
- Datos de precisión intermedia
- El componente de la incertidumbre es una función polinómica y se la expresa como incertidumbre relativa.

$$u_{rel} = \sqrt{(u_{rel(sistemático)})^2 + (u_{rel(aleatorio)})^2} \quad \text{Ecuación (31)}$$

a) Estimación de incertidumbre en base al componente aleatorio

Este método es válido si se supone que el mayor aporte de incertidumbre se debe al componente aleatorio en condiciones de reproducibilidad.

Para la estimación se aplicó la siguiente sistemática:

Calcular la S_{Rj}

Se calculó la Incertidumbre relativa

$$u_{rel} = \frac{S_{Rj}}{Y_j} * 100\% \quad \text{Ecuación (32)}$$

Estimar la incertidumbre u_c

$$u_c = \frac{u_{rel} * Y_{ijk}}{100} \quad \text{Ecuación (33)}$$

Expandirla para poder expresarla

$$U = k * u_c = 2 * u_c \quad \text{Ecuación (34)}$$

Es necesario especificando el factor de cobertura y el porcentaje de confianza.

b) Estimación de la incertidumbre en base al componente sistemático y aleatorio

En este caso la incertidumbre es la combinación de ambos componentes. La sistemática para estimación es:

Calcular la precisión intermedia S_w

Calcular la desviación del sesgo $DESR_\delta$

Combinar ambos componentes en términos relativos

$$u_{rel} = \sqrt{(u_{rel(sistemático)})^2 + (u_{rel(aleatorio)})^2} \quad \text{Ecuación (35)}$$

$$u_{rel(sistemático)} = \sqrt{\left(\frac{DESR_\delta}{\hat{Y}_{MR}} * 100\right)^2 + \left(\frac{S_{wMR}}{\hat{Y}_{MR}} * 100\right)^2} \quad \text{Ecuación (36)}$$

Estimar la incertidumbre u_c

$$u_c = \frac{u_{rel} * Y_{ijk}}{100}$$

Ecuación (37)

Expandirla para poder expresarla

$$U = k * u_c = 2 * u_c$$

(Ecuación 38)

Con el valor de incertidumbre combinada se procedió a determinar la incertidumbre expandida con un nivel de confianza del 95%, para un factor de cobertura de $k=2$.

8. RESULTADOS

8.1 RANGO LINEAL

El resultado obtenido de la correlación lineal entre el valor medido con los valores de referencias es:

Unidades	g/100g					
Ensayista	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	VR=	1,60	VR=	2,12	VR=	7,47
	1		2		3	
1	1,650	1,690	2,110	2,060	7,490	7,480
1	1,630	1,670	2,080	2,080	7,500	7,480
1	1,630	1,670	2,100	2,040	7,470	7,440
1	1,670	1,650	2,050	2,060	7,510	7,470
1	1,650	1,630	2,320	2,060	7,480	7,480
1	1,680	1,620	2,050	2,080	7,470	7,480
1	1,550	1,660	2,250	2,140	7,440	7,510
1	1,620	1,580	2,080	2,040	7,470	7,490
1	1,550	1,550	2,200	2,010	7,480	7,430
1	1,600	1,540	1,900	2,170	7,420	7,500

TEST DE COCHRAN'S Y GRUBBS

NIVEL 1

						Gtab 95%	2,290
						Gtab 99%	2,482
Ensayista	Nivel 1		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G Grubbs	EVAL Grubbs
	VR= 1,60						
	1						
1	1,65	1,69	1,67	0,03	0,0008	1,114	CORRECTO
1	1,63	1,67	1,65	0,03	0,0008	0,624	CORRECTO
1	1,63	1,67	1,65	0,03	0,0008	0,624	CORRECTO
1	1,67	1,65	1,66	0,01	0,0002	0,869	CORRECTO
1	1,65	1,63	1,64	0,01	0,0002	0,379	CORRECTO
1	1,68	1,62	1,65	0,04	0,0018	0,624	CORRECTO
1	1,55	1,66	1,61	0,08	0,0060	0,477	CORRECTO
1	1,62	1,58	1,60	0,03	0,0008	0,600	CORRECTO
1	1,55	1,55	1,55	0,00	0,0000	1,824	CORRECTO
1	1,60	1,54	1,57	0,04	0,0018	1,334	CORRECTO

\bar{y}_i	1,62	g/100g
s_j	0,04	
C Cochran	0,46	Eval Cochran
C tab	0,600	CORRECTO

El valor calculado en el test de Cochran's es de 0,46 y es menor al valor tabulado o de tablas de 0,600, lo que significa que dentro los valores obtenidos no existen valores anómalos. Los valores calculados del test de Grubbs son menores a los valores de tablas 2,290 para 95% y 2,482 para 99% de nivel de confianza, por lo que concluimos que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos y el promedio.

NIVEL 2

						Gtab 95%	2,290
						Gtab 99%	2,482
Ensayista	Nivel 2		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G Grubbs	EVAL Grubbs
	VR= 2,12						
	2						
1	2,11	2,06	2,09	0,04	0,0012	0,163	CORRECTO
1	2,08	2,08	2,08	0,00	0,0000	0,254	CORRECTO
1	2,10	2,04	2,07	0,04	0,0018	0,435	CORRECTO
1	2,05	2,06	2,06	0,01	0,0001	0,707	CORRECTO
1	2,32	2,06	2,19	0,18	0,0338	1,740	CORRECTO
1	2,05	2,08	2,07	0,02	0,0005	0,526	CORRECTO
1	2,25	2,14	2,20	0,08	0,0060	1,831	CORRECTO
1	2,08	2,04	2,06	0,03	0,0008	0,616	CORRECTO
1	2,20	2,01	2,11	0,13	0,0181	0,199	CORRECTO
1	1,9	2,17	2,035	0,19092	0,0365	1,069	CORRECTO

\bar{y}_j	2,09	g/100g	
s_j	0,06		
C Cochran	0,369	Eval Cochran	
C tab	0,600	CORRECTO	

El valor calculado en el test de Cochran's es de 0,369 y es menor al valor tabulado o de tablas de 0,600, lo que significa que dentro los valores obtenidos no existen valores anómalos. Los valores calculados del test de Grubbs son menores a los valores de tablas 2,290 para 95% y 2,482 para 99% de nivel de confianza, por lo que concluimos que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos y el promedio.

NIVEL 3

						Gtab 95%	2,290
						Gtab 99%	2,482
Ensayista	Nivel 3		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G Grubbs	EVAL Grubbs
	VR= 7,47						
	3						
1	7,49	7,48	7,49	0,01	0,0000	0,782	CORRECTO
1	7,50	7,48	7,49	0,01	0,0002	1,154	CORRECTO
1	7,47	7,44	7,46	0,02	0,0004	1,452	CORRECTO
1	7,51	7,47	7,49	0,03	0,0008	1,154	CORRECTO
1	7,48	7,48	7,48	0,00	0,0000	0,410	CORRECTO
1	7,47	7,48	7,48	0,01	0,0001	0,037	CORRECTO
1	7,44	7,51	7,48	0,05	0,0024	0,037	CORRECTO
1	7,47	7,49	7,48	0,01	0,0002	0,410	CORRECTO
1	7,48	7,43	7,46	0,04	0,0013	1,452	CORRECTO
1	7,42	7,50	7,46	0,06	0,0032	1,080	CORRECTO

\bar{y}_j	7,47	g/100g	
s_j	0,01		
C Cochran	0,37	Eval Cochran	
C tab	0,600	CORRECTO	

El valor calculado en el test de Cochran's es de 0,37 y es menor al valor tabulado o de tablas de 0,600, lo que nos indica que dentro los valores obtenidos no existen valores anómalos. Los valores calculados del test de Grubbs son menores a los valores de tablas 2,290 para 95% y 2,482 para 99% de nivel de confianza, por lo que concluimos que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos y el promedio.

Datos de ordenada y abscisa para graficar la recta

	\bar{y}_j	\hat{y}_j
Nivel	Ordenada a	Abscisa
1	1,62	1,60
2	2,09	2,12
3	7,47	7,47

Fuente: Elaboración Propia

Donde la ordenada es la distancia vertical al eje horizontal o de abscisa y representa la concentración promedio calculada, la abscisa es una línea horizontal que se represente mayormente en las coordenadas cartesianas rectangulares y representa los valores de referencia.

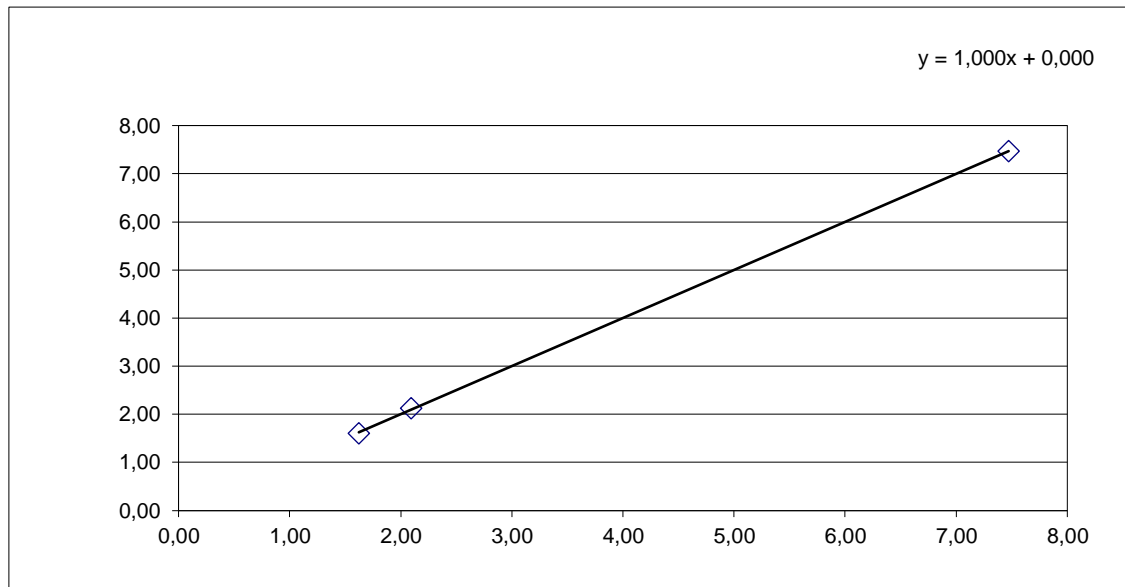
Con los valores de la ordenada y la abscisa se realizó la regresión lineal para determinar el coeficiente de correlación los resultados obtenidos son:

a	0,000
b	1,000
r	1,000

Análisis de gráfico:

Se tiene una recta con un coeficiente de correlación igual a 1, con una pendiente igual a 1 e intersección al eje igual a 0.

Gráfico N°2 La recta



Fuente: Elaboración Propia

EVALUACION DE LINEALIDAD

El valor de t_r obtenido es de 127,91 siendo mayor al valor de t_{tab} de 6,31; entonces, existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método por lo tanto el intervalo de estudio es lineal.

COVARIANZA

La covarianza obtenida es de 7,04104 que es mayor a 0, por lo que el sistema tiene una proporcionalidad directa.

Gráfico N°3 Evaluación de linealidad

Evaluación de la linealidad		EVAL
COVARIANZA	7,04104	LINEAL
$t_r =$	127,91	LINEAL
$t_{tab} =$	6,31	
$t_r = \frac{r * \sqrt{(q - 2)}}{\sqrt{(1 - r^2)}}$		

Fuente: Elaboración Propia

8.2 LÍMITE DE DETECCIÓN LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Con la varianza residual y el intercepto se calculó el intervalo lineal dando como resultado:

S _{x/y}	0,036	
LD	0,11	g/100g
LC	0,36	g/100g

8.3 REPETIBILIDAD

Se realizaron los ensayos en condiciones de repetibilidad es decir utilizando la misma muestra, equipos, condiciones ambientales, analista, método, reactivos, instalaciones y tiempo, los resultados obtenidos son:

Unidades	g/100g					
Ensayista	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	1	2	2	2	3	3
1	1,650	1,690	2,110	2,060	7,470	7,480
	1,630	1,670	2,080	2,080	7,440	7,510
	1,630	1,670	2,100	2,040	7,470	7,490
	1,670	1,650	2,050	2,060	7,480	7,430
	1,650	1,630	2,080	2,040	7,420	7,500

NIVEL 1

						G _{tab 95%}	1,715		
						G _{tab 99%}	1,764		
Ensayista	Nivel 1		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G grubbs	EVAL Grubbs	$(n_{ij} - 1)S_{ij}^2$	$(n_{ij} - 1)$
1	1,65	1,69	1,67	0,03	0,0008	1,403	CORRECTO	0,001	1
	1,63	1,67	1,65	0,03	0,0008	0,351	CORRECTO	0,001	1
	1,63	1,67	1,65	0,03	0,0008	0,351	CORRECTO	0,001	1
	1,67	1,65	1,66	0,01	0,0002	0,526	CORRECTO	0,000	1
	1,65	1,63	1,64	0,01	0,0002	1,228	CORRECTO	0,000	1

$$S_{ij}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} = 0,001$$

\bar{y}_j	1,65	g/100g
s_j	0,01	
C Cochran	0,29	Eval Cochran
C tab	0,840	CORRECTO

Se realizó la evaluación de los datos con el test de Grubbs los valores calculados son menores al valor de tablas de 1,715 para 95% y de 1,764 para 99% de nivel de confianza

por lo tanto los datos calculados no tienen diferencia estadísticamente significativa con el promedio.

También se evaluaron los datos con el test de Cochran obteniendo un valor calculado de 0,29 que es menor al valor de tablas de 0,840 lo que nos indica que dentro los datos calculados no existen datos anómalos.

NIVEL 2

					Gtab 95%	1,715			
					Gtab 99%	1,764			
Ensayista	Nivel 2		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G Grubbs	EVAL Grubbs	$(n_{ij} - 1)S_{ij}^2$	$(n_{ij} - 1)$
1	2,11	2,06	2,09	0,04	0,0012	1,177	CORRECTO	0,001	1
	2,08	2,08	2,08	0,00	0,0000	0,784	CORRECTO	0,000	1
	2,1	2,04	2,07	0,04	0,0018	0,000	CORRECTO	0,002	1
	2,05	2,06	2,06	0,01	0,0001	1,177	CORRECTO	0,000	1
	2,08	2,04	2,06	0,03	0,0008	0,784	CORRECTO	0,001	1
					$S_{ij}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} = 0,001$				

\bar{y}_j	2,07	g/100g
s_j	0,01	
C Cochran	0,46	Eval cochran
C tab	0,840	CORRECTO

Se realizó la evaluación de los datos con el test de Grubbs los valores calculados son menores al valor de tablas de 1,715 para 95% y de 1,764 para 99% de nivel de confianza por lo tanto los datos calculados no tienen diferencia estadísticamente significativa con el promedio.

También se evaluaron los datos con el test de Cochran obteniendo un valor calculado de 0,46 que es menor al valor de tablas de 0,840 lo que nos indica que dentro los datos calculados no existen datos anómalos.

NIVEL 3

						Gtab 95%	1,715		
						Gtab 99%	1,764		
Ensayista	Nivel 3		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G Grubbs	Eval Grubbs	$(n_{ij} - 1)S_{ij}^2$	$(n_{ij} - 1)$
1	7,47	7,48	7,48	0,01	0,0001	0,554	CORRECTO	0,000	1
	7,44	7,51	7,48	0,05	0,0024	0,554	CORRECTO	0,002	1
	7,47	7,49	7,48	0,01	0,0002	1,015	CORRECTO	0,000	1
	7,48	7,43	7,46	0,04	0,0013	1,292	CORRECTO	0,001	1
	7,42	7,5	7,46	0,06	0,0032	0,830	CORRECTO	0,003	1
						$S_{ij}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} = 0,001$			

\bar{y}_j	7,47	g/100g
s_j	0,01	
C Cochran	0,45	Eval Cochran
C tab	0,840	CORRECTO

Se realizó la evaluación de los datos con el test de Grubbs los valores calculados son menores al valor de tablas de 1,715 para 95% y de 1,764 para 99% de nivel de confianza por lo tanto los datos calculados no tienen diferencia estadísticamente significativa con el promedio.

También se evaluaron los datos con el test de Cochran obteniendo un valor calculado de 0,45 que es menor al valor de tablas de 0,840 lo que nos indica que dentro los datos calculados no existen datos anómalos.

8.4 REPRODUCIBILIDAD INTERNA O PRECISIÓN INTERMEDIA

Se realizó los ensayos en condiciones de reproducibilidad interna variando las variables de equipo, tiempo y analista, los resultados obtenidos son:

Unidades	g/100g					
Ensayista	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	1	2	2	2	3	3
1	1,650	1,690	2,110	2,060	7,470	7,480
1	1,630	1,670	2,080	2,080	7,440	7,510
1	1,630	1,670	2,100	2,040	7,470	7,490
1	1,670	1,650	2,050	2,060	7,480	7,430
1	1,650	1,630	2,080	2,040	7,420	7,500
2	1,680	1,620	2,050	2,080	7,510	7,470
2	1,550	1,660	2,140	2,060	7,440	7,510
2	1,590	1,500	2,080	2,040	7,480	7,430
2	1,620	1,580	2,100	2,040	7,420	7,500
2	1,550	1,470	2,110	2,060	7,430	7,500

NIVEL 1

					Gtab 95%	2,290			
					Gtab 99%	2,482			
Ensayista	Nivel 1		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G Grubbs	EVAL Grubbs	$(n_{ij} - 1)S_{ij}^2$	$(n_{ij} - 1)$
1	1,650	1,690	1,67	0,03	0,0008	0,977	CORRECTO	0,001	1
1	1,630	1,670	1,65	0,03	0,0008	0,601	CORRECTO	0,001	1
1	1,630	1,670	1,65	0,03	0,0008	0,601	CORRECTO	0,001	1
1	1,670	1,650	1,66	0,01	0,0002	0,789	CORRECTO	0,000	1
1	1,650	1,630	1,64	0,01	0,0002	0,413	CORRECTO	0,000	1
2	1,680	1,620	1,65	0,04	0,0018	0,601	CORRECTO	0,002	1
2	1,550	1,660	1,61	0,08	0,0060	0,244	CORRECTO	0,006	1
2	1,590	1,500	1,55	0,06	0,0041	1,371	CORRECTO	0,004	1
2	1,620	1,580	1,60	0,03	0,0008	0,338	CORRECTO	0,001	1
2	1,55	1,47	1,51	0,06	0,0032	2,029	CORRECTO	0,003	1

\bar{y}_j	1,62	g/100g
s_j	0,05	
C Cochran	0,32	Eval Cochran
C tab	0,600	CORRECTO

$S_{wj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} = 0,002$		
---	--	--

Se realizó la evaluación de los datos con el test de Grubbs los valores calculados son menores al valor de tablas de 2,290 para 95% y de 2,482 para 99% de nivel de confianza por lo tanto los datos calculados no tienen diferencia estadísticamente significativa con el promedio.

También se evaluaron los datos con el test de Cochran obteniendo un valor calculado de 0,32 que es menor al valor de tablas de 0,600 lo que significa que entre los datos obtenidos no existen datos anómalos.

NIVEL 2

					Gtab 95%	2,290			
					Gtab 99%	2,482			
Ensayista	Nivel 2		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G Grubbs	Eval Grubbs	$(n_{ij} - 1)S_{ij}^2$	$(n_{ij} - 1)$
1	2,110	2,060	2,09	0,04	0,0012	0,846	CORRECTO	0,001	1
1	2,080	2,080	2,08	0,00	0,0000	0,494	CORRECTO	0,000	1
1	2,100	2,040	2,07	0,04	0,0018	0,212	CORRECTO	0,002	1
1	2,050	2,060	2,06	0,01	0,0001	1,269	CORRECTO	0,000	1
1	2,080	2,040	2,06	0,03	0,0008	0,917	CORRECTO	0,001	1
2	2,050	2,080	2,07	0,02	0,0005	0,564	CORRECTO	0,000	1
2	2,140	2,060	2,10	0,06	0,0032	1,904	CORRECTO	0,003	1
2	2,080	2,040	2,06	0,03	0,0008	0,917	CORRECTO	0,001	1
2	2,100	2,040	2,07	0,04	0,0018	0,212	CORRECTO	0,002	1
2	2,110	2,060	2,085	0,0354	0,0012	0,846	CORRECTO	0,001	1

\bar{y}_j	2,07	g/100g
s_j	0,01	
C Cochran	0,28	Eval Cochran
C tab	0,600	CORRECTO

$S_{w_j}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} = 0,001$		
--	--	--

Se realizó la evaluación de los datos con el test de Grubbs los valores calculados son menores al valor de tablas de 2,290 para 95% y de 2,482 para 99% de nivel de confianza por lo tanto los datos calculados no tienen diferencia estadísticamente significativa con el promedio.

También se evaluaron los datos con el test de Cochran obteniendo un valor calculado de 0,28 que es menor al valor de tablas de 0,600 lo que significa que entre los datos obtenidos no existen datos anómalos.

NIVEL 3

						Gtab 95%	2,290		
						Gtab 99%	2,482		
Ensayista	Nivel 3		\bar{y}_{ij}	s_{ij}	S_{ij}^2	G Grubbs	EVAL Grubbs	$(n_{ij} - 1) s_{ij}^2$	$(n_{ij} - 1)$
	3								
1	7,470	7,480	7,48	0,01	0,0001	0,511	CORRECTO	0,000	1
1	7,440	7,510	7,48	0,05	0,0024	0,511	CORRECTO	0,002	1
1	7,470	7,490	7,48	0,01	0,0002	0,937	CORRECTO	0,000	1
1	7,480	7,430	7,46	0,04	0,0013	1,193	CORRECTO	0,001	1
1	7,420	7,500	7,46	0,06	0,0032	0,767	CORRECTO	0,003	1
2	7,510	7,470	7,49	0,03	0,0008	1,789	CORRECTO	0,001	1
2	7,440	7,510	7,48	0,05	0,0024	0,511	CORRECTO	0,002	1
2	7,480	7,430	7,46	0,04	0,0013	1,193	CORRECTO	0,001	1
2	7,420	7,500	7,46	0,06	0,0032	0,767	CORRECTO	0,003	1
2	7,43	7,5	7,465	0,0495	0,0025	0,341	CORRECTO	0,002	1

\bar{y}_j	7,47	g/100g
s_j	0,01	
C Cochran	0,18	Eval Cochran
C tab	0,600	CORRECTO

$S_{wj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} = 0,002$		
---	--	--

Se realizó la evaluación de los datos con el test de Grubbs los valores calculados son menores al valor de tablas de 2,290 para 95% y de 2,482 para 99% de nivel de confianza por lo tanto los datos calculados no tienen diferencia estadísticamente significativa con el promedio.

También se evaluaron los datos con el test de Cochran obteniendo un valor calculado de 0,18 que es menor al valor de tablas de 0,600 lo que significa que entre los datos obtenidos no existen datos anómalos.

La determinación de la repetibilidad y la precisión intermedia del método se resume en:

\bar{y}_j g/100g	S_r g/100g	S_w g/100g	r g/100g	r_w g/100g
1,62	0,024	0,043	0,075	0,137
2,07	0,028	0,034	0,089	0,107
7,47	0,038	0,042	0,120	0,132

Dónde: S_w : Precisión intermedia

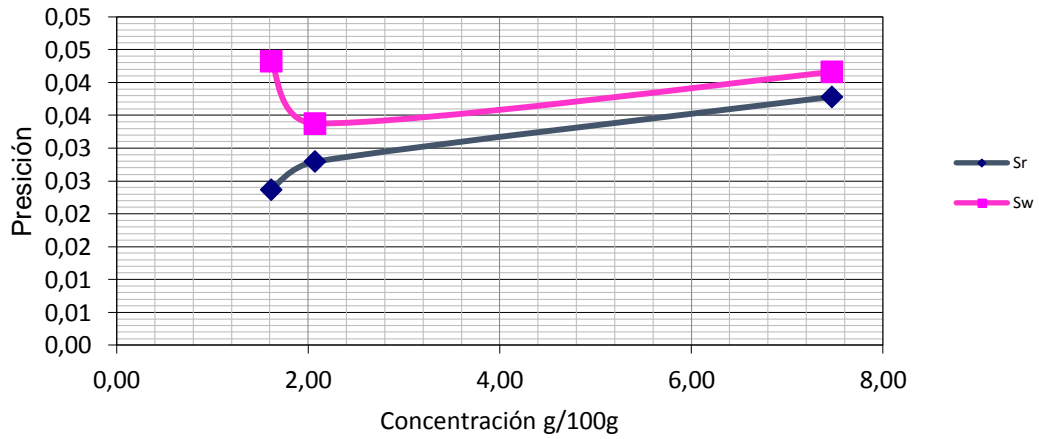
S_r : Repetibilidad

r : Limite de repetibilidad

r_w : Limite de precisión intermedia

La grafica demuestra la dependencia de la repetibilidad, precisión intermedia y repetibilidad con la concentración del analito.

Los valores de $S_w > S_r$ por lo que se cumple el criterio para la precisión intermedia.



Resultados de la relación del valor medido con la precisión:

\bar{y}_j	S_w			dif
1,62	0,043	0,027	0,026	0,017
2,07	0,034	0,016	0,034	0,000
7,47	0,042	0,006	0,121	0,079
	b	0,016		0,097

$$S_w = b \bar{y}_j$$

\bar{y}_j	S_w	T1	T2	T3	T4	T5	
1,62	0,043	534,8	865,24	1400	23,12	37,416	$S_w = a + b \bar{y}_j$
2,07	0,034	877,2	1818,42	3770	29,62	61,397	
7,47	0,042	578,0	4317,34	32246	24,04	179,572	
		1989,99	7001,00	37416	76,78	278,39	a = 0,03632
							b = 0,00065

\bar{y}_j	Sw	T1	T2	T3	T4	T5		
1,62	0,037	716,5	1159,23	1875,64	26,77	43,309	$S_w = a + b\bar{y}_j$	
2,07	0,038	705,3	1462,16	3031,1	26,56	55,055		
7,47	0,041	591,0	4414,23	32969,9	24,31	181,576		
		2012,80	7035,62	37876,6	77,64	279,94	a =	0,03632
							b =	0,00065

\bar{y}_j	Sw	T1	T2	T3	T4	T5		
1,62	0,037	716,46	1159,23	1875,64	26,77	43,309	$S_w = a + b\bar{y}_j$	
2,07	0,038	705,33	1462,16	3031,1	26,56	55,055		
7,47	0,041	591,01	4414,23	32969,9	24,31	181,576		
		2012,80	7035,62	37876,6	77,64	279,94	a =	0,03632
							b =	0,00065

\bar{y}_j	Sw	Sw cal	dif
1,62	0,043	0,037	0,006
2,07	0,034	0,038	0,004
7,47	0,042	0,041	0,000
			0,010

$$S_w = C * \bar{y}_j^d$$

\bar{y}_j	Sw	T1	T2	T3	T4		
1,62	0,043	0,21	0,04	-1,36	-0,29		
2,07	0,034	0,32	0,10	-1,47	-0,47	c =	-1,422
7,47	0,042	0,87	0,76	-1,38	-1,21	d =	0,036
		1,40	0,91	-4,22	-1,96	C =	0,038

\bar{y}_j	Sw	Sw cal	dif
1,62	0,043	0,038	0,005
2,07	0,034	0,039	0,005
7,47	0,042	0,041	0,001
			0,011

Con los valores obtenidos de precisión intermedia se estableció la relación con la concentración del analito para los tres niveles de concentración, se demostró que la diferencia entre los valores obtenidos de la precisión intermedia es de 0,010 y la diferencia obtenida de la precisión intermedia relación concentración del analito es de 0,011.

8.5 EXACTITUD

La exactitud se realizó utilizando material de referencia certificado en tres niveles.

El método es exacto en los tres niveles de concentración, el porcentaje de recuperación es superior al 95%

Unidades	g/100g					
Ensayista	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	VR=	1,60	VR=	2,12	VR=	7,47
	1		2		3	
1	1,650	1,690	2,110	2,060	7,490	7,480
1	1,630	1,670	2,080	2,080	7,500	7,480
1	1,630	1,670	2,100	2,040	7,470	7,440
1	1,670	1,650	2,050	2,060	7,510	7,470
1	1,650	1,630	2,320	2,060	7,480	7,480
1	1,680	1,620	2,050	2,080	7,470	7,480
1	1,550	1,660	2,250	2,140	7,440	7,510
1	1,620	1,580	2,080	2,040	7,470	7,490
1	1,550	1,550	2,200	2,010	7,480	7,430
1	1,600	1,540	1,900	2,170	7,420	7,500

NIVEL 1

Ensayista	Nivel 1		\bar{y}_{ij}	δ_{ij}^2
	VR= 1,60			
	1			
1	1,65	1,69	1,67	0,005
1	1,63	1,67	1,65	0,002
1	1,63	1,67	1,65	0,002
1	1,67	1,65	1,66	0,004
1	1,65	1,63	1,64	0,002
1	1,68	1,62	1,65	0,002
1	1,55	1,66	1,61	0,000
1	1,62	1,58	1,60	0,000
1	1,55	1,55	1,55	0,003
1	1,60	1,54	1,57	0,00

\bar{y}_j	1,63	g/100g
S_j	0,04	
$\delta_j = y_j - \hat{y}_j$		
$\delta_j =$	0,03	g/100g
$ECMR = \frac{\sqrt{\delta_j^2 + S_j^2}}{\hat{y}_j} * 100$		
$ECMR =$	3,06	%
$DESR_{\delta} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} \delta_{ij}^2}{p_j}}$		

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD			
$t_{exp} = \frac{ \delta_j * \sqrt{p_j}}{S_j}$			
$t_{exp} =$	2,39		
$t_{tab} =$	2,75	EVAL	
$DESR_{\delta} =$	0,047 g/100g	EXACTO	

La exactitud obtenida con el material de referencia secundario de harina de trigo para el primer nivel fue de 1,63 g/100g comparado con el valor de referencia de 1,60 g/100g

Se realizó la prueba de t- student, el valor calculado es de 2,39 que es menor al t de tablas con un nivel de confianza de 99,73 % y 9 grados de libertad, lo que nos confirma que ambos valores, es decir el valor asignado del material de referencia secundario y el valor calculado no tienen una diferencia estadísticamente significativa por lo que el método satisface la condición de exactitud.

NIVEL 2

Ensayista	Nivel 2		\bar{y}_{ij}	δ_{ij}^2
	VR= 2,12	2		
1	2,11	2,06	2,09	0,001
1	2,08	2,08	2,08	0,002
1	2,10	2,04	2,07	0,002
1	2,05	2,06	2,06	0,004
1	2,32	2,06	2,19	0,005
1	2,05	2,08	2,07	0,003
1	2,25	2,14	2,20	0,006
1	2,08	2,04	2,06	0,004
1	2,20	2,01	2,105	0,000
1	1,90	2,17	2,035	0,01

\bar{y}_j	2,09	g/100g
S_j	0,06	
$\delta_j = y_j - \hat{y}_j$		
δ_j	-0,03	g/100g
$ECMR = \frac{\sqrt{\delta_j^2 + S_j^2}}{\hat{y}_j} * 100$		
$ECMR =$	2,88	%
$DESR_\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} \delta_{ij}^2}{p_j}}$		

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD		
$t_{exp} = \frac{ \delta_j * \sqrt{p_j}}{S_j}$		
$t_{exp} =$	1,49	
$t_{tab} =$	2,69	EVAL EXACTO
$DESR_d =$	0,06	g/100g

La exactitud obtenida con el material de referencia certificado de harina de quinua para el segundo nivel fue de 2,09 g/100g comparado con el valor de referencia de 2,12 g/100g

Se realizó la prueba de t- student, el valor calculado es de 1,49 que es menor al t de tablas con un nivel de confianza de 99,73 % y 9 grados de libertad, lo que nos confirma que ambos valores, es decir el valor asignado del material de referencia secundario y el valor calculado no tienen una diferencia estadísticamente significativa por lo que el método satisface la condición de exactitud.

NIVEL 3

Ensayista	Nivel 3		\bar{y}_{ij}	δ_{ij}^2
	VR= 7,47			
	3			
1	7,49	7,48	7,49	0,000
1	7,50	7,48	7,49	0,000
1	7,47	7,44	7,46	0,000
1	7,51	7,47	7,49	0,000
1	7,48	7,48	7,48	0,000
1	7,47	7,48	7,48	0,000
1	7,44	7,51	7,48	0,000
1	7,47	7,49	7,48	0,000
1	7,48	7,43	7,46	0,000
1	7,42	7,50	7,5	0,00

\bar{y}_j	7,47	g/100g
S_j	0,01	
$\delta_j = y_j - \hat{y}_j$		
$\delta_j =$	0,00	g/100g
$ECMR = \frac{\sqrt{\delta_j^2 + S_j^2}}{\hat{y}_j} * 100$		
ECMR =	0,19	%
$DESR_\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} \delta_{ij}^2}{p_j}}$		

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD			
$t_{exp} = \frac{ \delta_j * \sqrt{p_j}}{S_j}$			
$t_{exp} =$	1,06		
$t_{tab} =$	1,83	EVAL	
		EXACTO	
$DESR_d =$	0,01 g/100g		

La exactitud obtenida con el material de referencia secundario de expeller de soya para el primer nivel fue de 7,47 g/100g comparado con el valor de referencia de 7,47 g/100g

Se realizó la prueba de t- student, el valor calculado es de 1,06 que es menor al t de tablas con un nivel de confianza de 99,73 % y 9 grados de libertad, lo que nos confirma que ambos valores, es decir el valor asignado del material de referencia secundario y el valor calculado no tienen una diferencia estadísticamente significativa por lo que el método satisface la condición de exactitud.

En resumen, la exactitud para cada nivel de concentración es el siguiente:

VR	SESGO (δ) g/100g	100- ECMR	Condición
1,62	0,03	96,94	Exacto
2,12	-0,03	97,12	Exacto
7,47	0,00	99,81	Exacto

8.6 ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

Los resultados de especificidad y selectividad se obtuvieron a través de los datos obtenidos del rango lineal con los cuales se calculó la pendiente y la desviación estandar.

		$b_1=$	1,108				
		$b_2=$	0,994				
Ordenada	Abscisa			t_{exp}	t_{tab}		
1,62	1,60	$S_b=$	0,080	1,89	6,31		SELECTIVO
2,09	2,12						
7,47	7,47	$b=$	1,000	0,11	6,31		SELECTIVO

Los resultados se evaluaron con el test t- student, obteniendo para b_1 un t calculado de 1,89 que es menor a t de tablas de 6,31 y para b_2 un t calculado de 0,11 que es menor a y de tablas de 6,31 con un nivel de confianza de 99,73 y 1 grado de libertad.

8.7 ROBUSTEZ

Para evaluar la robustez se utilizaron las siguientes variables: A = tiempo de digestión, B= Concentración del titulante y C= temperatura al momento de la titulación, el estudio de robustez fue evaluado en dos niveles de concentración en el nivel de 1,62 g/100g y en el nivel de concentración de 7,47 g/100g.

Factores de influencia						
N°	Etapa	Magnitud/Variable	¿Este factor es crítico?	Factor (F)	Niveles	
					Nivel 1 / (+)	Nivel 2 / (-)
1	Digestion	Tiempo	SI	A	2 h	3 h
2	Titulación	Concentración	SI	B	0,05005	0,05253
3	Titulación	Temperatura	SI	C	20 °C	30 °C

Número de factores de influencia = 3					
Diseño factorial incompleto para 3 variables					
N°	Factores			Resultado	
	A	B	C		
1	-	-	+	y ₁	
2	-	+	-	y ₂	
3	+	-	+	y ₃	
4	+	+	-	y ₄	
Robustez en el nivel 1 (1,60 g/100g)					
N°	Factores			Resultado	
	A	B	C	y _i	
1	3 h	0,05253	20 °C	1,670	y ₁
2	3 h	0,05005	30 °C	1,545	y ₂
3	2 h	0,05253	20 °C	1,635	y ₃
4	2 h	0,05005	30 °C	2,120	y ₄

Desviación estándar del método S	0,090
$\sqrt{2} * S$	0,127

F	Nivel 1 / (+)	Nivel 2 / (-)	$\Delta = \text{Nivel}_{\text{Alto}} - \text{Nivel}_{\text{Bajo}} $	Comparación $\Delta < \sqrt{2} * S$
A	1,88	1,61	0,27	Sensible a variable
B	1,83	1,65	0,18	Sensible a variable
C	1,62	2,12	0,50	Sensible a variable

Robustez en el nivel 2 (7,47 %)					
Nº	Factores			Resultado	
	A	B	C	y _i	
1	3 h	0,052	20 °C	7,350	y ₁
2	3 h	0,05005	30 °C	7,495	y ₂
3	2 h	0,052	20 °C	7,700	y ₃
4	2 h	0,05005	30 °C	7,200	y ₄

Desviacion estandar del método S	0,075
$\sqrt{2} * S$	0,106

F	Nivel 1 / (+)	Nivel 2 / (-)	$\Delta = \text{Nivel}_{\text{Alto}} - \text{Nivel}_{\text{Bajo}} $	Comparacion $\Delta < \sqrt{2} * S$
A	7,45	7,42	0,03	Sensible a variable
B	7,35	7,53	0,18	Sensible a variable
C	7,52	7,20	0,32	Sensible a variable

Con la evaluación se pudo definir que el método es sensible a las tres variables de control por lo el tiempo de digestión debe ser superior a las dos horas y media a una temperatura de $400 \text{ °C} \pm 10 \text{ °C}$, la concentración del titulante en este caso el ácido clorhídrico debe tener una concentración de 0,052 N y la temperatura ambiental al momento de la titulación debe ser de $20 \text{ °C} \pm 5 \text{ °C}$.

8.8 INCERTIDUMBRE

Los resultados obtenidos para la incertidumbre se calcularon en base a los datos de desviación estándar del sesgo (DESR_δ) y con los datos obtenidos en la evaluación de la exactitud y precisión intermedia.

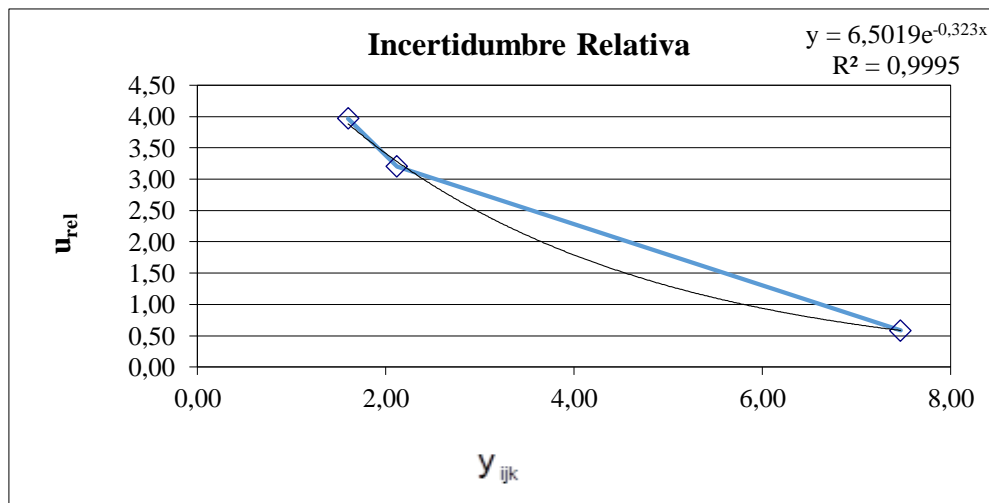
\hat{Y}_j	DESR _δ g/100g	DESR _δ %	Sw %	u _{rel} %	U exp g/100g
1,60	0,047	2,93	2,7	3,97	0,13
2,12	0,058	2,76	1,6	3,20	0,14
7,47	0,014	0,18	0,6	0,59	0,09

Para el nivel 1 de concentración la incertidumbre relativa es de 3,97 y la incertidumbre expandida es de 0,13.

Para el nivel 2 de concentración la incertidumbre relativa es de 3,20 y la incertidumbre expandida es de 0,14.

Para el nivel 3 de concentración la incertidumbre relativa es de 0,59 y la incertidumbre expandida es de 0,09.

Con un factor de cobertura de 2 y 95% grados de confianza.



PARAMETRO	RESULTADO	
Rango lineal	0,36 – 7,47 g/100g de Nitrógeno	
Límite de detección	0,11 g/100g de Nitrógeno	
Límite de	0,36 g/100 g de Nitrógeno	
Repetibilidad	Concentración g/100g	Sr g/100g
	1,62	0,024
	2,07	0,028

	7,47	0,038
Precisión intermedia	Concentración g/100g	Swg/100g
	1,62	0,043
	2,07	0,034
	7,47	0,042
Sesgo	Concentración g/100g	δ_j g/100g
	1,60	0,03
	2,12	-0,03
	7,47	0,00
Especificidad	El método es específico y selectivo en el rango de 0,36 a 7,47 g/100g de Nitrógeno.	
Robustez	El método es robusto a trabajar con el máximo tiempo de digestión y titulando con el ácido clorhídrico 0,052 N, consiguiéndose valores con buena exactitud a una temperatura de titulación entre 20 – 25 °C	
Incertidumbre	Estimada a partir de los resultados de la validación se cuenta con la siguiente expresión como incertidumbre relativa. $U_{rel} = 6,501 * X^{-0,32}$	

Fuente: Elaboración Propia

9. DISCUSIONES

-Metodología para la cuantificación de proteína cruda en harina de quinua.

La metodología se realizó de acuerdo a un método normalizado ISO 20483 – 2013 modificando su alcance para la matriz harina de quinua. Los tres fundamentos en el procedimiento son:

Digestión: Las proteínas están formadas por aminoácidos y la digestión debe garantizar que toda la materia orgánica se combustiona y de esta manera poder extraer el nitrógeno. Por lo tanto, la digestión se realizó en un tiempo mayor de 2 horas y media a una temperatura de 400°C.

Destilación: La importancia de la concentración del hidróxido de sodio (40%) es que debe neutralizar el ácido sulfúrico. La neutralización es fundamental ya que de ella depende que se libere el nitrógeno que se encuentra como sulfato de amonio, este al ser neutralizado pasara a su forma gaseosa como amoniaco el cual será retenido en una solución de ácido bórico al 4% el mismo contendrá la solución indicadora

Titulación: La concentración del titulante, el ácido clorhídrico 0,052 N fue estandarizado, con carbonato de sodio previamente desecado obteniendo un factor de corrección de 1,015.

- Características de desempeño del método.

Para realizar la validación del método de ensayo de micro Kjeldahl se utilizó el material de referencia certificado en harina de quinua IMBETRO LP-CMO-0642-2018, material de referencia secundario harina de trigo IBMETRO EA-LI-054 y material de referencia secundario expeller de soya IBMETRO EA-LI-044. Utilizando tres niveles de concentración de proteína cruda de 2,12 g/100g, 1,62 g/100g y 7,47 g/100g respectivamente.

El método es específico y selectivo para la determinación de proteína cruda en harina de quinua en el rango de 0,36 a 7,47 g/100g de nitrógeno.

Con los datos obtenidos se determinaron los promedios, desviación estándar, evaluación con el test de Grubbs y Cochran para los tres niveles, los mismos permitieron determinar la ecuación de la recta por medio de Excel, $y=1,000x+0,000$, con un coeficiente de correlación de 1,00 (Gráfica No.2), el cual se encuentra dentro del rango aceptable para

establecer que es lineal, de acuerdo a lo mencionado en la Guía No.1 del ISPCH (2010): el coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (**X**) y la variable respuesta (**Y**) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son -1 y 1 . El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con una pendiente positiva. Cuando $r=0$, no existe correlación alguna, independencia total de los valores X e Y .

El límite de cuantificación y de detección obtenido de $0,36$ g/100g y $0,11$ g/100g, respectivamente; ambos valores se determinaron por medio de los 3 niveles de concentración empleados en la presente validación. Y el rango de análisis se estableció por medio del análisis de la recta definido entre $0,36$ g/100g y $7,47$ g/100g de nitrógeno. La precisión se determinó a través de la evaluación de la precisión intermedia, y repetibilidad.

Para la determinación de repetibilidad se realizaron 5 determinaciones por duplicado en cada nivel de concentración con el material de referencia certificado y los dos materiales de referencia secundarios con un mismo analista.

La repetibilidad obtenida para el nivel 1 es de $0,29$ con el test de Cochran, para el nivel 2 es de $0,46$ con el test de Cochran y en el nivel 3 es de $0,45$ con el test de Cochran.

Para la reproducibilidad intermedia se realizaron 10 determinaciones por duplicado en cada nivel de concentración con el material de referencia certificado y los dos materiales de referencia secundarios cambiando las variables de equipo, tiempo y analista.

Para el nivel 1 de concentración se obtuvo una reproducibilidad intermedia de $0,32$ con el test de Cochran en el nivel 1, de $0,28$ con el test de Cochran en el nivel 2 y $0,18$ con el test de Cochran en el nivel 3.

La exactitud se determinó por medio de la desviación del sesgo, verificando la exactitud calculando el t experimental para los tres niveles de concentración concluyendo que el $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$ con un nivel de confianza de $99,73\%$ y grados de libertad de 9 por lo que se puede afirmar que ambos valores no difieren significativamente y el método satisface las

condiciones de exactitud, en el primer nivel $t_{exp}2,39 \leq t_{tab} 2,75$; segundo nivel $t_{exp}1,49 \leq t_{tab} 2,69$ y en el tercer nivel $t_{exp}1,06 \leq t_{tab} 1,83$.

Además, se determinó el valor de recuperación con los valores encontrados del ECMR los cuales son superiores al 95% este valor nos indica que el método es apropiado para este tipo de matriz, porque el porcentaje de recuperación es aceptable.

Para la robustez, se evaluaron tres factores importantes de la metodología: tiempo de digestión, concentración del titulante y temperatura ambiental en la etapa de titulación.

La evaluación se realizó con los dos materiales de referencia secundarios ya que se evaluó la concentración más baja y la concentración más alta. De acuerdo a (La Guía No.1 ISPCH, 2010), la robustez se determina por medio del test de Youden y Steiner, donde los factores que se establecen, varían con un valor alto y uno bajo de acuerdo a las variables que puedan afectar la metodología analítica. (Tabla N°6).

Para cada nivel se realizaron 4 determinaciones, para el tiempo de digestión se trabajó con un tiempo de 2 horas y tres horas, para la etapa de titulación se empleó como titulante ácido clorhídrico en concentración de 0,0500 N y 0,0520 N y por último se trabajó en la etapa de titulación acondicionando el área de titulación a una temperatura de 20°C y 30°C.

Concluyendo que las tres variables son sensibles, por lo que el tiempo de digestión debe ser superior a las 2 horas y 20 minutos, la concentración del titulante debe ser de 0,052 N y la temperatura ambiente al momento de la titulación debe ser de 20°C \pm 5°C.

La incertidumbre del método se determinó en base al componente sistemático y aleatorio, utilizando los datos de la precisión intermedia y desviación del sesgo se combinaron ambos componentes en términos relativos $U_{rel} = 6,501 * X^{-0,32}$ para calcular la incertidumbre y poder expandirla con un factor de cobertura igual a 2 (k=2).

10. CONCLUSIONES

1. Se estableció el método analítico para la cuantificación de proteína cruda por micro Kjeldahl que se desarrolló a través de la digestión, destilación y titulación.
2. Se determinaron las características de desempeño del método analítico para la cuantificación de proteína cruda por micro Kjeldahl.
 - ✓ Se determinó que el método analítico para la cuantificación de proteína cruda por micro Kjeldahl es específico y selectivo evidenciándose que la matriz u otro componente no ejercen ningún efecto en la cuantificación de proteína cruda en harina de quinua.
 - ✓ Se estableció que el método analítico para para la cuantificación de proteína cruda por micro Kjeldahl es lineal desde 0,36 g/100g a 7,47 g/100g obteniendo un coeficiente de correlación $r = 1,000$. Demostrando así que existe una correlación entre la concentración de proteína cruda y el volumen obtenido en la titulación de nitrógeno.
 - ✓ Se comprobó que el método analítico para la cuantificación de proteína cruda por micro Kjeldahl es preciso en el rango de trabajo establecido.
 - ✓ Se estableció que el método analítico para la cuantificación de proteína cruda por micro Kjeldahl es exacto el $t_{exp} \leq t_{tab}$ con un nivel de confianza de 99,73% con grados de libertad de 9 por lo que se puede afirmar que ambos valores no difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método satisface las condiciones de exactitud.
 - ✓ Los límites de detección y cuantificación son: LD = 0,11 g/100g y LC = 0,36 g/100g respectivamente.
 - ✓ Es Robusto variando en el tiempo de digestión con un tiempo superior a las 2 horas y media, concentración del titulante de 0,052 normal y condiciones ambientales en el momento de la titulación de $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, es sensible al tiempo

de digestión, de titulación y de condiciones ambientales al momento de la titulación.

- ✓ La incertidumbre fue estimada a partir de los datos de la validación, datos de desviación estándar del sesgo ($DES_{R\delta}$), datos de precisión intermedia ya que el componente de la incertidumbre es una función polinómica y se la expresa como incertidumbre relativa $U_{rel} = 6,501 * X^{-0,32}$ para calcular la incertidumbre y poder expandirla con un factor de cobertura igual a 2 ($k=2$).
- ✓ La validación del método analítico para determinar proteína cruda en harina de quinua por micro Kjeldahl, fue sometido a una evaluación por parte de la Dirección técnica de Acreditación (DTA) como parámetro para la ampliación de acreditación del Laboratorio de Control de Alimentos (LCA), los resultados obtenidos fueron satisfactorios a la fecha, es un parámetro acreditado.
- ✓

3. Se acepta la hipótesis planteada: El método analítico de micro Kjeldahl utilizado para la cuantificación de proteína cruda en harina de quinua es exacto y preciso.

4. Se elaboró un procedimiento para la validación del método de ensayo el cual puede ser aplicado a otras matrices.

11. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda evaluar el método con otros tipos de matrices alimenticias para ampliar el alcance del método.
- ✓ Se recomienda al Laboratorio de Control de alimentos (LCA) como coordinador de los 18 laboratorios a nivel nacional habilitados en la Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RELOAA) aplicar este método para realizar la vigilancia y control de este producto.

12. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Arias Gonzales, L. (2014). *Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina a en alimentos, por cromatografía líquida de alta resolución y su determinación en guayaba fresca*. Guatemala de la Asunción.

Carrasco, E. y Soto, J. (2010). *Importancia de los Granos Andinos*. Roma: Biodiversity International.

DTA – CRI 011. (2015). *Estimación de la incertidumbre de las mediciones en laboratorios de Ensayo*.

EURACHEM. (2016). *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos*. España: euroLab.

Fennema, O. (1993). *Química de los Alimentos*. Zaragoza: ACRIBIA.

ICH Tema Q2. (1995). *Nota de explicación de validación de validación procedimientos de analítica: texto de metodología*.

ISO 3534- 1: 1995. *Estadística, Vocabulario y Símbolos. Parte1: términos relativos a probabilidades y estadística general*.

ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Calibración y Ensayo*.

ISPCH. Instituto de salud Pública de Chile. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición*. Santiago.

Risi Juan, Rojas Wilfredo y Pacheco Mauricio. (2015). *Producción y mercado de la quinua en Bolivia*. La Paz: Grafika Leal.

Moya, D. (2017). *Curso Validación de Métodos de Ensayo*. DMA/NFMG

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S102406752006000100013&script=sci_arttex.

Rojas, W. y cols. (2010). *Valor nutricional, agroindustrial y funcional de los granos andinos*. Roma: Biodiversity International.

Rojas, W. (2010). *Granos andinos*. Roma: Bioersity International.

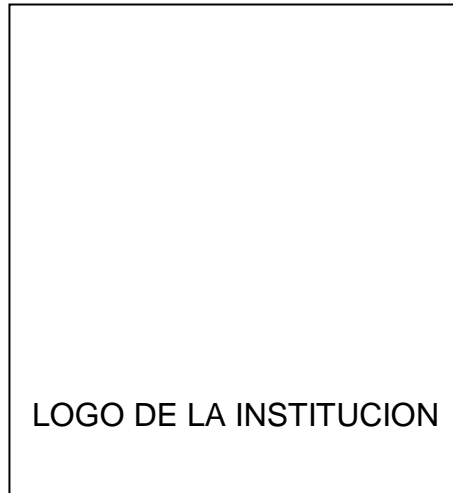
UNE – EN ISO 20483 -2013. *Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo de contenido de proteína cruda según el Método Kjeldahl*.

VIM- 1993. *Vocabulario Internacional de Metrología, Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*.

Zumbado, H. (2004). *Análisis Químico de los Alimentos Métodos Clásicos*. La Habana: Universitaria.

ANEXOS

NOMBRE DE LA INSTITUCION



MANUAL TÉCNICO XXX

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

XXX-XX-XX

I.	Contenido	
1	OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN	II-99
2	RESPONSABILIDADES	II-99
3	REFERENCIAS.....	II-99
3.1	Referencias normativas.....	II-99
3.2	Referencia a documentos del sistema de gestión.....	II-99
4	SIGLAS.....	II-100
	XXX-XX-X-XX Determinación de nitrógeno total harina de quinua – Calculo de proteína cruda.....	II-100
1)	Ámbito de aplicación	II-100
2)	Definiciones	II-100
3)	Fundamento.....	II-103
4)	Precauciones y advertencias de seguridad	II-105
5)	Equipos, reactivos y materiales.....	II-106
	Materiales.....	II-106
6)	Trazabilidad metrológica	II-124
12)	Datos de validación del método.....	II-133
5	FORMATOS DE REGISTRO A APLICAR.....	II-135

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

El presente Manual Técnico establece los procedimientos de ensayo vigentes que aplica al Área de análisis.

1 RESPONSABILIDADES

Actividades	RT	SA	EC	AL	
Planificación de los ensayos	I	C	I	E	
Realización de ensayos	I	C	I	E	
Aplicación de actividades de control de calidad	I	C	I	E	
Cálculo y transcripción de resultados	I	C	I	E	
Control de los datos	I	E	I	E	
Reporte de resultados de ensayo	I	C	I	E	

RT Responsable Técnico

E Ejecuta

EC Encargado de calidad

C Coordina

SA Supervisor de Área

I Informa/Recibe Información

AL Analista de Laboratorio

AX Auxiliar de Laboratorio

PL Personal de Laboratorio

2 REFERENCIAS

2.1 Referencias normativas

- 1) Norma Boliviana ISO/IEC 17025 - 2005 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Calibración y Ensayo, apartados 5.4
- 2) ISO 20483-2013. Cereales y pulsos. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de proteína cruda- método Kjeldahl.
- 3) Norma Boliviana ISO/9000 – 2005 Sistemas de gestión de la calidad – Fundamentos y Vocabulario

2.2 Referencia a documentos del sistema de gestión

- 1) XXX-XX Manual de la Calidad. Capítulo 5.4
- 2) XXX-X-XX Control de trabajos de ensayos no conformes

- 3) XXX-X-XX Validación de métodos de ensayo
- 4) XXX-X- XX Aseguramiento de la calidad de resultados de ensayo

3 SIGLAS

SG: Sistema de Gestión

RT: Responsable Técnico

EC: En cargado de calidad

II. XXX-XX-X-XX Determinación de nitrógeno total en harina de quinua – Cálculo de proteína cruda

1) **Ámbito de aplicación**

Es aplicable a la determinación del contenido de nitrógeno en harina de quinua de acuerdo al método Kjeldahl, y el cálculo del contenido de proteína cruda.

Esta norma proporciona el método para determinar el contenido de nitrógeno total en el rango de 0.36 g/100g a 7,50 g/100g.

El método no distingue entre nitrógeno proteico y nitrógeno no proteico.

2) **Definiciones**

Cereales

Los cereales constituyen un grupo de plantas dentro de otro más amplio: las gramíneas. Los más utilizados en la alimentación humana son el trigo, el arroz y el maíz, aunque también son importantes la cebada, el centeno, la avena y el mijo. El grano del cereal, que constituye el elemento comestible, es una semilla formada por varias partes: la cubierta o envoltura externa, compuesta básicamente por fibras de celulosa que contiene vitamina B 1, se retira durante la molienda del grano y da origen al salvado. En el interior del grano distinguimos fundamentalmente dos estructuras: el germen y el núcleo. En el germen o embrión abundan las

proteínas de alto valor biológico, contiene grasas insaturadas ricas en ácidos grasos esenciales y vitamina E y B 1 que se pierden en los procesos de refinado para obtener harina blanca.

La parte interna o núcleo amiláceo, está compuesto por almidón y en el caso del trigo, avena y centeno por un complejo proteico denominado gluten que está formado por dos proteínas: gliadina y gluteina, que le dan elasticidad y características panificables a la masa de pan y son responsables de la esponjosidad y textura del buen pan. Cuando el cereal se consume tras quitarle las cubiertas y el germen, se denomina cereal refinado. Cuando se procesa sin quitarle las cubiertas, el producto resultante se denomina integral. Las harinas integrales son más ricas en nutrientes, contienen mayor cantidad de fibra, de carbohidratos y del complejo vitamínico B 1. El valor nutritivo de los cereales está en relación con el grado de extracción del grano "cuanto más blanco es un pan, menor valor nutritivo tiene".

Los cereales y sus derivados son ricos en carbohidratos tanto de absorción rápida (tras la ingestión pasan a la sangre en poco tiempo) como de absorción lenta (fibra). El contenido de la fibra varía según el proceso industrial de preparación. El contenido proteico es muy variable, entre un 6 y un 16% del peso, dependiendo del tipo de cereal y del procesamiento industrial. La composición en aminoácidos de las proteínas de los cereales depende de la especie y variedad; en general son pobres en aminoácidos esenciales, por lo que se las cataloga de proteínas de moderada calidad biológica. Por tanto, cuando se combinan con legumbres, o con proteínas de origen animal (queso, pescado, etc.) se obtienen proteínas de elevado valor biológico.

Quinoa

La quinoa es una planta, concretamente un Pseudo-cereal, que pertenece al género Chenopodium y a la familia de las Amaranthaceae. La semilla de la quinoa se consume como si fuera un cereal y en cuanto a su composición está formada principalmente por hidratos de carbono, proteínas y grasas de tipo insaturadas, conteniendo a su vez ácidos omega 6 y omega 3. Además, tiene un alto aporte de fibra, así como una serie de micronutrientes como el calcio, el zinc el fósforo y vitamina B y E.

Estas características hacen que la quinoa sea considerada por la FAO como un Pseudo-cereal muy valorado y con un gran potencial nutritivo.

Proteína

Las proteínas son moléculas complejas imprescindibles para la estructura y función de las células. Su nombre proviene del griego proteos que significa fundamental, lo cual se relaciona con la importante función que cumplen para la vida.

Las proteínas se originan a partir de la unión de otras moléculas llamadas aminoácidos, se agrupan en largas cadenas y se mantienen estables por uniones químicas llamadas enlaces peptídicos.

Las proteínas pueden ser de varios tipos según las funciones que cumplen en el organismo, sin embargo, a grandes rasgos se clasifican en proteínas estructurales y proteínas con actividad biológica. Las proteínas que consumimos en la dieta pueden ser de cualquiera de los dos tipos, independientemente de su origen se consideran proteínas alimentarias, el valor nutritivo de las proteínas viene dado por la mayor o menor presencia de los aminoácidos esenciales en su composición.

Muestra

Porción representativa tomada de un lote.

Muestra Elemental

Es la cantidad de muestra de consumo humano tomada al azar en un punto del lote.

Muestra de Laboratorio

Es la cantidad de muestra de consumo humano, obtenida de una muestra fraccionada, que está en condiciones de ser enviada al laboratorio para efectuar los ensayos correspondientes.

Muestra de ensayo

Es la cantidad de muestra de consumo humano, homogeneizado y fraccionado (cuarteo), destinada a diferentes ensayos.

3) Fundamento

En un análisis elemental de un alimento, lo más frecuente y menos complejo es investigar la proteína bruta de los diferentes aminoácidos o proteínas específicas. No obstante, los procedimientos más utilizados no determinan directamente esta proteína, sino el contenido en nitrógeno, que se expresa como nitrógeno total y que se obtiene mediante una combustión líquida en la que, en un primer paso, el nitrógeno de la muestra se convierte en sulfato amónico, el cual luego se transforma en amoniaco. Este amoniaco se destila y se valora en una solución de ácido normalizado. Esta técnica desarrollada por Kjeldahl, se ha convertido en método de referencia con múltiples modificaciones. Determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto al nitrógeno proteico como al no proteico. La proteína bruta se halla multiplicando el nitrógeno total (N) por un factor, que se ha calculado considerando los componentes básicos de un gran número de muestras del mismo alimento, y expresando el resultado como proteína.

La técnica más utilizada es el método Kjeldahl. Este método se trata de una volumetría.

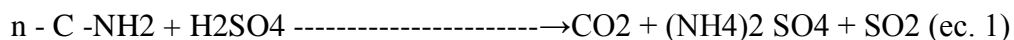
El método Kjeldahl mide el contenido en nitrógeno de una muestra. La proteína se puede calcular seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno para el alimento específico que está siendo analizando, tal y como explicaremos más adelante. Este método puede ser dividido, básicamente en 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y valoración. El procedimiento a seguir es diferente en función de si en la etapa de destilación el nitrógeno liberado es recogido sobre una disolución de ácido bórico o sobre un exceso conocido de ácido clorhídrico o sulfúrico patrón. Ello condicionará la forma de realizar la siguiente etapa de valoración, así como los reactivos empleados.

Digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores que aceleran el proceso, aumentando el punto de ebullición del ácido. Con esta digestión, transformamos el nitrógeno (en su mayor parte orgánico) en sulfato amónico (nitrógeno amoniacal). Pasamos a medio alcalino mediante la adición de hidróxido

sódico concentrado, y se destila el nitrógeno en forma de amoniaco en corriente de vapor de agua.

- a. Etapa de digestión: un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ión amonio, según la ecuación 1.

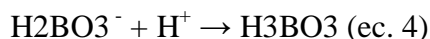
Catalizador/calor



- b. Etapa de destilación: se alcaliniza la muestra digerida y el nitrógeno se desprende en forma de amoniaco (ecuación 2). El amoniaco destilado se recoge sobre un exceso conocido de ácido bórico (ecuación 3).



- c. Etapa de valoración: La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ión borato formado, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y verde de bromo cresol (ecuación 4). Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoniaco destilados.



MÉTODO KJELDAHL

Con este método, podemos calcular el porcentaje de nitrógeno en la muestra. Multiplicando por un número que varía según el alimento, podemos estimar el porcentaje de proteínas. La desventaja de este método es que se determina todo tipo de nitrógeno en la muestra, así, si un alimento tiene muchas bases nitrogenadas, el porcentaje de proteína se estima por encima del valor real. Las principales ventajas son que es un método rápido y, además, económico.

4) Precauciones y advertencias de seguridad

Tomar en cuenta los siguientes procedimientos:

XXX-X-XX Procedimiento de control de las instalaciones y condiciones ambientales.

XXX-X-XX Procedimiento de Orden y Limpieza.

XXX-X-XX Procedimiento para el Control de equipos.

XXX-X-XX Procedimiento para la Validación de métodos de ensayo y estimación de la

Incertidumbre de medida

XXX-X-XX Procedimiento para la Calificación y Capacitación del personal.

XX-X-XX Procedimiento de Manipulación de Muestras.

XXX-X-XX Procedimiento de Verificación de Balanzas.

XXX-X-XX Procedimiento de Verificación de Material de Vidrio.

XXX-X-XX Procedimiento de Aseguramiento de la Calidad de los resultados de ensayo.

XXX-X-XX Procedimiento para la manipulación de Patrones y Materiales de Referencia.

5) Equipos, reactivos y materiales

Equipos:

- a) Moledora o molinillo de cuchillas.
- b) Balanza analítica con capacidad de pesar, cerca 0,001g.
- c) Campana de Extracción.
- d) Termocupla
- e) Aparato de digestión
- f) Aparato de destilación.
- g) pH metro
- h) Agitador magnético

La distribución homogénea de la temperatura en la unidad de digestión debe ser cerciorada.

El aseguramiento de la homogeneidad de la temperatura debe ser realizada llevando a cabo un ensayo con un material de referencia y considerar el rango de recuperación obtenido.

El aparato de destilación también debe ser verificado por la conducción de la destilación de una cantidad conocida de una sal de amonio (ejemplo 0,10 g de de sulfato de amonio) y verificando que el rango de recuperación sea entre 99.5 a 100,5 %.

Materiales

- a) Tubo Kjeldahl
- b) Gradilla
- c) Pipeta graduada de 10 ml
- d) Matraz aforado de 1000 ml
- e) Dispensador de capacidad de 5 ml.
- f) Matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- g) Espátula.

- h) Bandeja rectangular
- i) Gradilla
- j) Soporte para tubo Kjeldahl
- k) Bureta de 25 ml con una graduación de 0,1 ml y error máximo de 0,05 ml en cumplimiento a la norma ISO/R 385 Clase A

Reactivos:

Usar solo reactivos libres de nitrógeno o de grado analítico reconocido excepto para materiales de referencia, y agua destilada o desmineralizada o agua extra pura.

- a) Solución de HCl = 0,05 mol/l, (Cuaderno de Preparación de Reactivos XXX-XXXX-XXX).

PREPARACION Y VALORACION DE HCL 0,052

CALCULOS

DATOS DE HCl

$$PM = 36.5 \text{ g/mol}$$

$$Eq-q = PM/1$$

$$d = 1,19 \text{ g/ml}$$

$$\% \text{ p/p} = 37\%$$

Calculo de la concentración [c] de HCl en g/ml disol.

$$F_1 \quad [C]_{HCl} = \frac{Eq - q_{HCl} * N_{HCl}}{10^3}$$

Donde:

$$PM \text{ HCl} = 36,5 \text{ g/mol}$$

[c] = Concentración de HCl en g/ml

$$\text{Eq-q} = \text{PM}/1$$

N = Normalidad que se desea preparar

Reemplazando datos en F1

$$[\text{C}]_{\text{HCl}} = \frac{\frac{36,5}{1} * 0,052}{10^3}$$

$$[\text{C}] = 1,89 \times 10^{-3} \text{ g HCl/ml}$$

Calculo del soluto de HCl puro

F2

$$\mathbf{S = [C]*D}$$

Donde:

S = Soluto de HCl puro

[C] = Concentración de HCl en g/ml

D = Volumen de disolución que se desea preparar (1000ml disol.)

Reemplazando datos en F2

$$S = 1,89 \times 10^{-3} \text{ g HCl/ml disol.} \cdot 1000 \text{ ml disol.}$$

$$S = 1,89 \text{ g HCl puro}$$

Calculo para los gramos de HCl comercial

$$37 \text{ g HCl puro} \text{ ----- } 100 \text{ g de HCl comercial}$$

$$3,65 \text{ g HCl puro} \text{ ----- } X \text{ g HCl comercial}$$

$$X = 5,13 \text{ g HCl comercial}$$

Calculo del volumen de HCl con la densidad [d = 1,19 g/ml]

$$F3 \quad V_{\text{HCl}} = \frac{m_{\text{HCl}}}{d_{\text{HCl}}}$$

Donde:

V HCl = Volumen de HCl

m = masa de HCl comercial

d = densidad de HCl [d = 1,19 gr/ml]

Remplazando datos en F3

V HCl = 4,31 ml HCl

Carbonato de sodio con certificado de pureza de $100 \pm 0,05\%$.

Cálculos para la Valoración de HCl 0,052 N con Na₂CO₃ p.a.

Para un volumen Teórico (VT) de 10 ml de HCl 0,052 N

Calculando el Fa del estándar primario Na₂CO₃

F4

$$Fa_{Na_2CO_3} = \frac{Eq - q_{Na_2CO_3} * N_{HCl}}{10^3}$$

Donde:

PM Na₂CO₃ = 106 gr/mol

Fa = Factor de análisis del Na₂CO₃

Eq-q = PM/2

N = Normalidad de la solución HCl [0,052 N]

Remplazando datos en F4

$$Fa_{Na_2CO_3} = \frac{\frac{106}{2} Na_2CO_3 * 0,052N_{HCl}}{10^3}$$

$$Fa_{Na_2CO_3} = 2,756 \times 10^{-3} \text{ g Na}_2\text{CO}_3 / \text{ml de HCl}$$

Calculo de la cantidad de muestra [CM] para un VT = 10ml de HCl 0,052 N

F5

$$CM = Fa * VT$$

Donde:

CM = cantidad de muestra de Na_2CO_3

Fa = factor de análisis del Na_2CO_3

VT = Volumen teórico [10ml de HCl]

CM = $2,756 \times 10^{-3}$ g Na_2CO_3 /ml de HCl * 10 ml HCl 0,052 N

CM = 0,02756 g de Na_2CO_3

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION.

Colocar 10 - 20ml de H_2O destilada al matraz aforado de 1000ml

Medir exactamente 4,31 ml HCl p.a. [$d = 1.19\text{g/ml}$; 37%p/P] con una pipeta graduada de 10ml

Luego Verter los 4,31 ml HCl p.a. [$d = 1.19\text{g/ml}$; 37%p/P] al matraz aforado de 1000ml

Añadir unos 800 ml de H_2O destilada y llevar al agitador magnético para mezclar

Posteriormente aforar con H_2O destilada (recomendación antes de llegar al aforo puede utilizar una pizeta, para no cometer ningún error al aforar la solución)

Nuevamente llevar a un agitador magnético para completar la disolución

Trasvasar a un frasco ámbar limpio y seco debidamente etiquetado

VALORACION DE HCl 0,052 N con Na₂CO₃ p.a.

Para un volumen Teórico (VT) de 10 ml de HCl 0,052 N

Primero

Pesar en un Matraz Erlenmeyer de 100 ml exactamente 0,02756 g Na₂CO₃ p.a. Con ayuda de una balanza analítica con una precisión de 0,1mg

Luego añadir de 10 – 20 ml de agua destilada al matraz Erlenmeyer para diluir el Na₂CO₃

A continuación, agregar de 1 – 3 gts. Del indicador (Naranja de metilo)

*Esta cantidad pesada 0,02756 g Na₂CO₃ p.a.

Esta calculado para gastar 10 ml (VT) de solución de HCl 0,052 N

Segundo

Cargar la bureta con la solución de HCl 0,1N (recientemente preparada)

Llevar la bureta a un soporte universal y colocar el matraz Erlenmeyer por debajo de la bureta (Como se observa en el gráfico)

Empezar a titular abriendo la llave de la bureta hasta cambio de color (de Amarillo naranja a Rojo)

Anotar el volumen gastado de la bureta (VP)

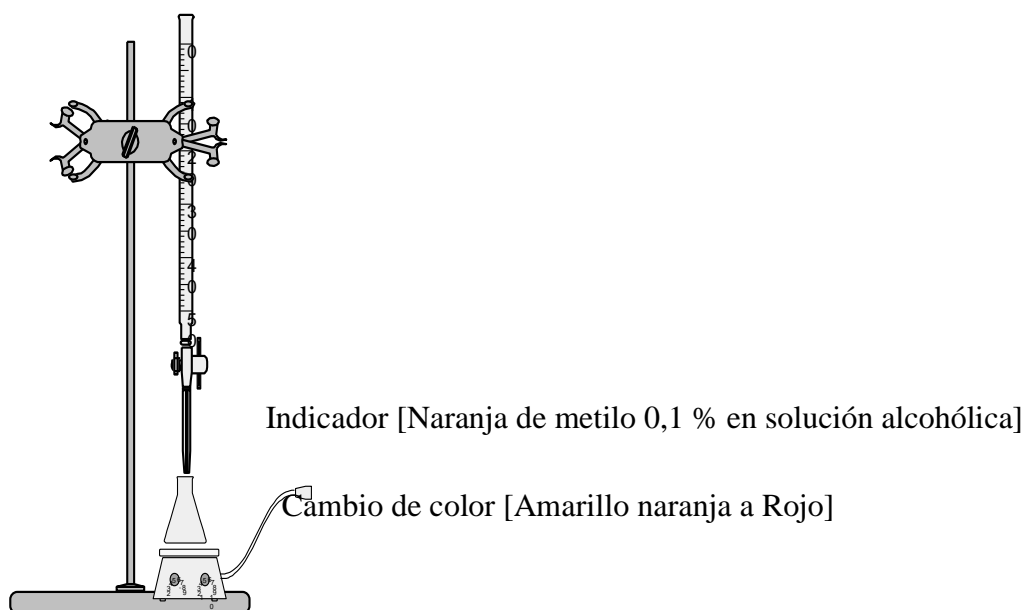
Calcular el “FC “con la siguiente fórmula

$$F_c = V_t / V_p$$

El intervalo de aceptación de FC se encuentra entre (0,9 – 1,1)

Si el factor de corrección calculado se encuentra por debajo o por encima del intervalo de aceptación se debe volver a preparar la solución de HCl 0,052 N

GRAFICO VALORACION DE HCl 0,052 N



$$CM = 0,02756 \text{ g Na}_2\text{CO}_3$$

Indicadores:

Añadir volúmenes de solución A y solución B como está la recomendación del aparato que se usa (por ej. 5 volúmenes de solución A y 1 volumen de solución B).

NOTA 1.- Es posible usar una solución de ácido bórico lista para usar que contenga el indicador de color.

NOTA 2.- El rango de la solución A y B debe ser ajustado dependiendo del aparato.

La titulación debe realizarse potencio métricamente con el uso de un electrodo de pH, el cual debe ser verificado una hora antes de su uso.

Solución A

Verde de bromo cresol (C₂₁H₁₄Br₄O₅S); 200 mg

Etanol (C₂H₅OH), cantidad suficiente para 100 ml de solución

Solución B

Rojo de metilo (C₁₅H₁₅N₃O₂) anhidro; 200mg

Etanol (C₂H₅OH), v/v, cantidad suficiente para 100 ml de solución

PREPARACION DE ROJO DE METILO – VERDE DE BROMO CRESOL (1:5)

CALCULOS PAR LA PRIMERA PARTE

Calculo de la cantidad de soluto [Rojo de Metilo]

0,2 g Rojo de Metilo ----- 100 ml Solución Alcohólica al 95 %

X = 0,2 g Rojo de Metilo

Calculando el Volumen de Alcohol p.a. necesario para preparar una solución alcohólica al 95%

$$F1 \quad V_{1 \text{ Alcohol } 99,9\%} = \frac{C_{2[\text{Sol. Alcohólica } 95\%]} * V_{2[\text{Solución}]}}{C_{1[\text{Alcohol al } 99,9\%]}}$$

Donde:

C1 = [C] Concentración de alcohol p.a. 99.9 %

V1 = Volumen que se requiere para tomar la alícuota del alcohol p.a. 99.9 %

C2 = Concentración deseada de la solución alcohólica [Ej. 95%]

V2 = Volumen de la solución deseado [Ej. 100 ml]

Remplazando datos en F1

$$V_{1 \text{ Alcohol } 99,9\%} = \frac{95\% * 100 \text{ ml Sol}}{99,9\%}$$

V 1 Alcohol 99,9 % = 95 ml de alcohol

Calculo del volumen de H2O

$$F2 \quad V_{H_2O} = V_{\text{Disol.}} - V_{\text{Alcohol al } 99,9\% \text{ p.a.}}$$

Donde:

V_{H_2O} = Volumen de H_2O que se requiere

$V_{Disol.}$ = Volumen de la Disolución que se desea preparar [Ej. 100 ml]

$V_{Alcohol}$ al 99,9 %p.a. = Volumen de Alcohol al 99,9 % p.a.

Remplazando datos en F2

$$V_{H_2O} = 5 \text{ ml de } H_2O$$

CALCULOS PAR LA SEGUNDA PARTE

Calculo de la cantidad de soluto [Verde de Bromo cresol] a partir de $[C] = 1g$ Verde Br cresol/ 500ml de Solución alcohólica al 95 %

1 g Verde de Bromo cresol ----- 500 ml Solución Alcohólica al 95 %

X g Verde de Bromo cresol ----- 100 ml de Solución Alcohólica al 95 %

$$X = 0,2 \text{ g Verde de Bromo cresol}$$

Calculando el Volumen de Alcohol p.a. necesario para preparar una solución alcohólica al 95%

$$F1 \quad V_{1 \text{ Alcohol } 99,9\%} = \frac{C_{2[\text{Sol. Alcohólica } 95\%]} * V_{2[\text{Solución}]}}{C_{1[\text{Alcohol al } 99,9\%]}}$$

Donde:

C1 = [C] Concentración de alcohol p.a. 99.9 %

V1 = Volumen que se requiere para tomar la alícuota del alcohol p.a. 99.9 %

C2 = Concentración deseada de la solución alcohólica [Ej. 95%]

V2 = Volumen de la solución deseado [Ej. 100 ml]

Remplazando datos en F1

$$V_{1 \text{ Alcohol } 99,9\%} = \frac{95\% * 100 \text{ ml Sol}}{99,9\%}$$

Este es el Volumen que se debe tomar del frasco

$$V_{1 \text{ Alcohol } 99,9\%} = 95 \text{ ml de alcohol}$$

Cálculo del volumen de H2O

$$F2 \quad V_{\text{H}_2\text{O}} = V_{\text{Disol.}} - V_{\text{Alcohol al } 99,9\% \text{ p.a.}}$$

Donde:

V_{H_2O} = Volumen de H_2O que se requiere

$V_{Disol.}$ = Volumen de la Disolución que se desea preparar [Ej. 100 ml]

$V_{Alcohol\ al\ 99,9\ \%p.a.}$ = Volumen de Alcohol al 99,9 % p.a.

Remplazando datos en F2

$$V_{H_2O} = 100\ ml_{Disol.} - 95\ ml_{Alcohol\ al\ 99,9\ \%p.a.}$$

$V_{H_2O} = 5\ ml\ de\ H_2O$

Calculo para tomar la Alícuota de las dos soluciones preparadas (1; 5)

1 ml Sol. Rojo de metilo ----- 5 ml Sol. Verde bromo cresol

X ml Sol. Rojo de metilo ----- 100 ml Sol. Verde bromo cresol

X = 20 ml Sol. Rojo de metilo

Este es el Volumen que se debe tomar de la primera
--

100 ml Sol. Verde bromo cresol

Este es el Volumen que se debe tomar de la Segunda
--

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION.

Primero

En un vaso de precipitados de 100 ml pesar exactamente 0,2 g de Rojo de Metilo con ayuda de una balanza analítica de precisión de 0,1mg

Transferir la cantidad pesada (0,2 g de Rojo de Metilo) a un matraz aforado de 100 ml

Añadir 95 ml de alcohol p.a. 99,9% al matraz; Agitar para que el soluto (Rojo de Metilo) se disuelva [Recomendación: lavar el vaso de precipitado con los 95 ml de alcohol p.a. 99.9 % para no perder el soluto]

Luego con ayuda de una pipeta de 5 ml completar hasta el aforo con H₂O destilada [Recomendación: No debe sobrepasarse el menisco del aforo]

Agitar hasta diluir completamente

Segundo

En otro vaso de precipitado de 100 ml pesar exactamente 0,2 g de Verde de Bromo Cresol con ayuda de una balanza analítica de precisión de 0,1mg

Transferir la cantidad pesada (0,2 g de Verde de Bromo Cresol) a un matraz aforado de 100 ml

Añadir 95 ml de alcohol p.a. 99,9% al matraz; Agitar para que el soluto (Verde de Bromo Cresol) se disuelva [Recomendación: lavar el vaso de precipitado con los 95 ml de alcohol p.a. 99.9 % para no perder el soluto]

Luego con ayuda de una pipeta de 5 ml completar hasta el aforo con H₂O destilada [Recomendación: No debe sobrepasarse el menisco del aforo]

Agitar hasta diluir completamente

Tercero

Preparar un frasco de color ámbar, limpio y seco de capacidad aproximada de 250 ml

Luego de la primera solución preparada tomar una alícuota de 20 ml

Trasferir la alícuota tomada al frasco de color ámbar

Posteriormente de la segunda solución preparada, vaciar todo el contenido al envase de color ámbar

Agitar y pegar la respectiva etiqueta; y el indicador ya está preparada para su uso

PREPARACION DE Na (OH) 40% (10 N)

MATERIALES

Bureta de 10 ml

Matraz erlenmeyer de 100 ml

Matraz aforado de 1000 ml

Vaso de precipitado 100 ml

Balanza analítica

Espátula

Pipeta graduada de 10 ml

REACTIVOS

Na (OH) p.a.

H2O destilada

CALCULOS

DATOS DE NaOH

PM = 40 gr/mol

Eq-q = PM/1

Cálculo de la concentración [c] de NaOH en gr/ml disol.

F1

$$[C]_{\text{NaOH}} = \frac{\text{Eq} - q_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}}}{10^3}$$

Donde:

PM NaOH = 40 gr/mol

[c] = Concentración de NaOH en gr/ml

Eq-q = PM/1

N = Normalidad que se desea preparar

Reemplazando datos en F1

$$[C]_{\text{NaOH}} = \frac{\frac{40}{1} * 10_{\text{NaOH}}}{10^3}$$

$$[C] = 0,4 \text{ g NaOH/ml disol}$$

Calculo del soluto NaOH

$$F2 \quad S = [C]*D$$

Donde:

S = Soluto de NaOH

[C] = Concentración de NaOH en gr/ml

D = Volumen de disolución que se desea preparar (1000ml disol.)

Remplazando datos en F2

$S = 0,4 \text{ g NaOH/ml disol.} * 1000 \text{ ml disol.}$

$S = 400 \text{ g NaOH}$

PREPARACION DE ACIDO BORICO AL 4%

MATERIALES

Bureta de 10 ml

Matraz erlenmeyer de 100 ml

Matraz aforado de 1000 ml

Vaso de precipitado 100 ml

Balanza analítica

Espátula

Pipeta graduada de 10 ml

REACTIVOS

H₃BO₄ p.a.

H₂O destilada

CALCULOS

DATOS DE H₃BO₄

PM = 4 %

F1 4g H₃BO₄ -----100 ml

X -----1000 ml

X = 40 g H₃BO₄

6) Trazabilidad metrológica

Los resultados de los ensayos experimentales son trazables metrológicamente, bajo las siguientes consideraciones:

- El equipo de medición, Bureta volumétrica se mantiene calibrado y verificado, según procedimiento (**verificación de material de vidrio XXX-X-XX**) y cumple con los criterios del DTA-CRI-014.

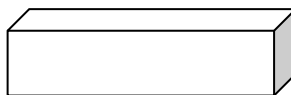
- El equipo de digestión, se mantiene calibrado y verificado, según procedimiento (**verificación de material de vidrio XXX-X-XX**) y cumple con los criterios del DTA-CRI-014.
- El equipo potencia métrico, se mantiene calibrado y verificado, según procedimiento (**verificación de material de vidrio XXX-X-XX**) y cumple con los criterios del DTA-CRI-014.
- Los equipos auxiliares de mediciones en magnitudes físicas mantienen sus calibraciones vigentes con Laboratorios de Calibración reconocidos y se realiza las confirmaciones metrológicas respectivas.
- Las verificaciones se realizan con patrones de trabajo y los factores de corrección se aplican de forma sistemática a las mediciones respectivas.
- El control de calidad de los resultados es realizados con material de referencia certificado, y repetición de muestras naturales.

7) Preparación de las muestras

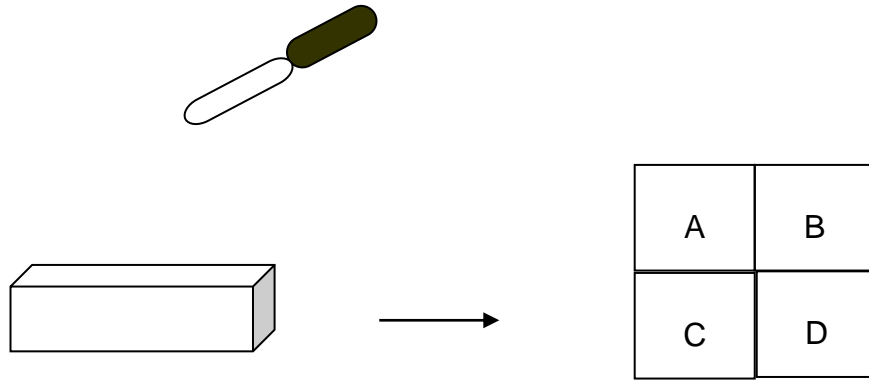
Muestreo para muestras en grano que se encuentran en un único envase como bolsa de polietileno, polipropileno, tela y/o papel.

El muestreo por cuarteo se realiza en cada muestra en particular, siguiendo los siguientes pasos:

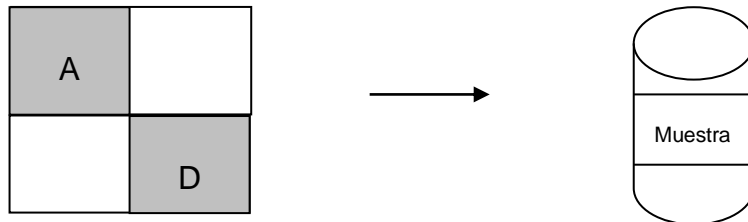
1. Abrir la bolsa o envase en el que se encuentra la muestra.
2. Pasar la muestra a una bandeja de plástico, homogenizar y uniformarla de manera que quede bien distribuida en la base de la bandeja.



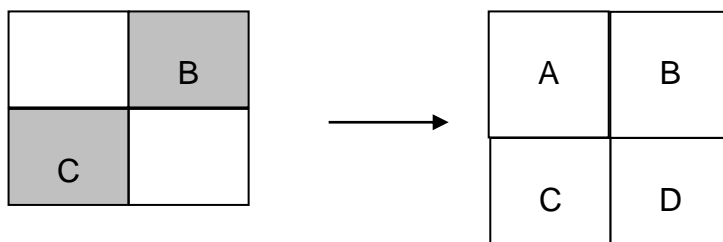
3. Dividir con la ayuda de una espátula el contenido (muestra) que se encuentra en la bandeja en cuatro partes iguales, denominándose: Parte A, B, C, D.



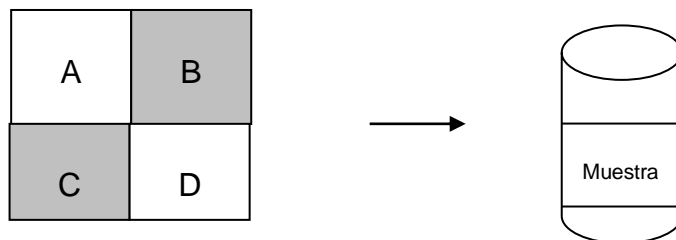
4. Tomar las partes A y D y descartarlas, devolviéndolas a su envase original.



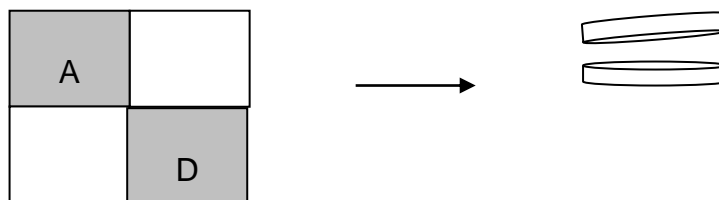
5. Trabajar con las partes B y C que quedaron en la bandeja homogenizar y uniformar nuevamente para dividir en cuatro partes iguales: A, B, C y D.



6. Tomar las partes B y C y descartarlas, devolviéndolas en su envase original.



7. Las partes que quedan en la bandeja se constituyen en la porción de ensayo, la cual es trasladada a una caja petri de vidrio con tapa.



8. Si la muestra se encuentra molida en forma de harina seguir de 1 a 7 exceptuando la molienda en preparación de muestra.

8) Desarrollo

a) Porción de ensayo.

Pesar en la Sala de Balanzas II, con una precisión de 0,001g, una masa de $0,30 \text{ g} \pm 0,05$ de muestra preparada de acuerdo a 7) y registrar en el Cuaderno de registro de determinación de proteínas (XXX-XXXX-XXX).

b) Digestión.

En la Sala de Balanzas marcar los tubos de ensayo con un marcador para vidrio indeleble el código de la muestra haciendo referencia a los tres últimos dígitos se trabajará por duplicado marcando con 1 y 2, para el material de referencia certificado se procede a identificar los tubos con las letras MR 1 y 2 de la misma manera se trabaja por duplicado.

Colocar en el centro del platillo de la balanza analítica, el soporte de tubo Kjendalh, y dentro de él, el tubo de digestión de manera que quede en forma vertical para facilitar la pesada, tarar, seguidamente con ayuda de una espátula incorporar la cantidad de muestra obtenida según 7) teniendo el cuidado de no dejar caer restos de muestra próximo al platillo de la balanza analítica, en caso de que ocurriera esto con ayuda de una escobilla retirarlos; registrar la porción de ensayo en el Cuaderno de registro de determinación de proteínas (XXX-XXX-XXX)

Seguidamente añadir a cada tubo de digestión:

- 0,9 g de sulfato de potasio
- 0,10 g de sulfato de cobre penta hidratado (II)
- 3 ml de ácido sulfúrico

Realizar la digestión en el equipo digestor introduciendo los tubos con todos los reactivos en la plancha calefactora, digerir por un tiempo de 3 horas desde que éste, ha alcanzado la temperatura de $(400^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C})$ hasta obtener una solución límpida de color azul verdoso sin manchas negras. Una vez transcurrido este tiempo, apagar la fuente de calor del equipo digestor, dejar enfriar los tubos hasta temperatura ambiente, luego trasladarlos a la gradilla, realizar todo este proceso en el área de análisis.

c) Destilación

Colocar el tubo con el contenido digerido en la parte izquierda del vapodest, introduzca la sonda y sujete con ayuda del soporte del tubo, verifique que el tapón de goma calce a la medida en la boca del tubo para evitar fugas.

Identificar el matraz erlenmeyer de la misma manera que los tubos para cada muestra.

Colocar 25 ml de ácido bórico al 4% en el matraz erlenmeyer de 250 ml y 10 gotas de indicador, luego colocar el matraz en el platillo recolector del equipo vapodest, de tal manera que la manguera quede sumergida en la mezcla ácido bórico- indicador.

En el panel de control programar (cantidad de agua, cantidad de hidróxido de sodio, tiempo de mezcla, tiempo de destilación, tiempo de desecho y potencia), una vez programado iniciar la destilación.

Recibir hasta 100 ml de la graduación del matraz erlenmeyer que contiene ácido bórico.

Una vez obtenido el destilado realizar la correspondiente titulación con solución de ácido clorhídrico 0.052 N con la ayuda de un agitador magnético, hasta primer cambio de coloración en la sala de análisis.

Anotar el volumen gastado. En el Cuaderno de registro de determinación de proteínas (XXX-XXXX-XXX)

Realizar el mismo procedimiento para el material de referencia certificado.

d) Preparación de blanco de reactivo

El blanco de reactivo se realiza solo en caso de cambio de reactivos cuando este se termine y se utilice un nuevo frasco, siguiendo todo el procedimiento desde **b)** y **c)**.

Una vez concluida la destilación de todas las muestras y el blanco lavar el equipo dejando limpio sin rastros de hidróxido y sin el flujo de agua, cerrando el grifo y apagándolo. Limpiar con un paño húmedo el exterior del equipo.

9) Registro y expresión de resultados

a) Contenido de nitrógeno

Para realizar los cálculos que fueron ingresados en el cuaderno de registro de determinación de proteínas (XXX-XXXX-XXX) se debe ingresar los datos a la plantilla de cálculo de nitrógeno de cereales, derivados y quinua, derivados (XXX – XXXX-XXX), obteniendo el porcentaje de nitrógeno(%N), expresado en porcentaje m/m, y es obtenido usando la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{(VgMuestra - VgBlanco)}{CM} \times 0,014 \times N \times 100 = \quad g/100g$$

Dónde:

Vg Blanco = es el volumen en mililitros, de ácido clorhídrico en solución **0,052 N** empleado en el blanco.

Vg Muestra=es el volumen en mililitros, de ácido clorhídrico en solución **0,052 N** empleado en la muestra.

0,014 = es el valor, en gramos, de la cantidad de nitrógeno equivalente para el uso de 1 ml de solución 0,05 mol/l de ácido clorhídrico.

N = es la normalidad real del ácido clorhídrico en solución empleado en la titulación **0,052N**

CM = es la masa en gramos de porción de ensayo

Expresar los resultados con dos decimales.

b) Calculo de proteína cruda

$$\text{Proteína cruda} = F_t \times \%N$$

F_t = factores de transformación del nitrógeno a proteína:

Producto	Factor de conversión de nitrógeno a proteína
Trigo normal	5,7
Trigo Durum	5,7
Productos de la molienda de trigo	5,7 ó 6,25
Trigo para pienso	6,25
Cebada	6,25

Avena	5,7 ó 6,25
Centeno	5,7
Triticale	6,25
Maíz	6,25
Quinoa y derivados	6,25

10) Informe de resultados

Los resultados se reportan en unidades del sistema internacional g/100g, con dos decimales y según disposiciones del procedimiento, **Presentación de informes de ensayo XXX- X- XX.**

Se reportará el resultado con la incertidumbre.

Por ejemplo: si el valor medido en una muestra es de 2,34 g/100g

$$y = 6,501 * X^{-0,32}$$

$$U_{rel} = 6,501 * 2,34^{-0,32} = 4,95$$

$$U_c = X * \frac{U_{rel}}{100}$$

$$U_c = 6,501 * \frac{4,95}{100} = 0,32$$

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

$$U_{exp} = 2 * 0,32 = 0,64$$

Y el resultado será reportado:

3,34 ± 0,64 g/100g

11) Control de calidad del resultado de ensayo

- a) **Precisión**, todas las muestras son analizadas por duplicado y los resultados de las réplicas son registrados en la Plantilla de control de calidad de resultados por repetición de ensayos con muestras naturales XXX – XXX- XXX.
- b) **Exactitud**, todas las muestras del alcance del siguiente método que ingresan al laboratorio se las analiza juntamente con el material de referencia certificado son ingresados en la Planilla de control de calidad de resultados regular de muestras de control XXX – XXX-XXX.

12) Datos de validación del método

Los resultados de la validación del método son:

PARAMETRO	CONCLUSIONES	
Rango lineal	0,36 – 7,50 g/100g de Nitrógeno	
Límite de detección	0,11 g/100g de Nitrógeno	
Límite de cuantificación	0,36 g/100 g de Nitrógeno	
Repetibilidad	Concentración g/100g	Sr g/100g
	1,65	0,024
	2,07	0,028

	7,47	0,038
Reproducibilidad interna	Concentración g/100g	r_w g/100g
	1,62	0,137
	2,07	0,107
	7,47	0,132
Precisión intermedia	Concentración g/100g	S_{wg} /100g
	1,62	0,04
	2,07	0,034
	7,47	0,042
Reproducibilidad	No aplica ya que se realizó una validación inter laboratorio	
Sesgo	Concentración g/100g	δ_j g/100g
	1,60	0,03
	2,12	-0,03
	7,47	0,00
Especificidad	El método es específico y selectivo en el rango de 0,36 a 7,47 g/100g de Nitrógeno.	
Robustez	El método es robusto a trabajar con el máximo tiempo de digestión y titulando con el ácido clorhídrico 0,052 N, consiguiéndose valores con buena exactitud a una	

	temperatura de titulación entre 20 – 25 °C
Incertidumbre	<p>Estimada a partir de los resultados de la validación se cuenta con la siguiente expresión como incertidumbre relativa.</p> $U_{rel} = 6,501 * X^{-0,32}$

4 FORMATOS DE REGISTRO A APLICAR

XXX-XXXX-XXX Cuaderno de registro de determinación de proteínas

XXX-XXXX-XXX Planilla de cálculo de nitrógeno en cereales, derivados y quinua, derivados.

XXX-XXXX-XXX Planilla de recuperación de sulfato de amonio

XXX-XXXX-XXX Preparación de reactivos área físico química

XXX-XXX-XXX Recepción, registro y resultados de muestras de alimentos

XXX-XXX-XXX Planilla de control de calidad de resultados por uso regular de muestras control (MRC), (MSC).

XXX-XXX-XXX Planilla de control de calidad de resultados por repetición de ensayos con muestras naturales.

6 REVISIONES Y APROBACIÓN

Elaboración: Dra. Claudia Zenteno	Firma:
Revisión:	Firma:
Aprobación:	Firma:

NOMBRE DE LA INSTITUCION
LABORATORIO INVOLUCRADO



**PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN DE
MÉTODOS DE ENSAYO Y ESTIMACIÓN DE
LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA**

XXX-X-XX

Contenido

1	OBJETIVO.....	II-140
2	ALCANCE.....	II-140
3	RESPONSABILIDADES.....	II-140
4	REFERENCIAS.....	II-141
4.1	Referencias normativas.....	II-141
5	DEFINICIONES Y SIGLAS.....	II-141
5.1	Definiciones.....	II-141
5.2	Siglas.....	II-143
6	DESARROLLO.....	II-143
6.1	Condiciones generales.....	II-143
6.2	Planificación de la verificación/validación de un método.....	II-144
6.3	Parámetros de validación/verificación.....	II-145
6.3.1	Métodos cuantitativos.....	II-146
6.3.1.1	Intervalo de trabajo.....	II-146
6.3.1.2	Límite de detección y cuantificación.....	II-153
6.3.1.3	Precisión.....	II-156
6.3.1.4	Exactitud.....	II-161
6.3.1.5	Especificidad.....	II-167

6.3.1.6	Robustez	II-169
6.3.1.7	Estimación de la incertidumbre de medida en base a datos de validación	II-170
6.4	Elaboración del informe de verificación / validación.....	II-172
6.5	Aprobación del método	II-173
7	FORMATOS DE REGISTRO A APLICAR	II-173
8	REVISIONES Y APROBACIÓN.....	II-174

1 OBJETIVO

Establecer las actividades técnicas de diseño experimental, planificación, ejecución, análisis estadístico e informe de la validación y verificación de métodos de ensayo, utilizados en la prestación de servicios del LCA.

2 ALCANCE

Se aplica a la verificación de métodos:

- Normalizados
- Validados

Y la validación de métodos:

- No normalizados
- Desarrollados por el laboratorio
- Normalizados modificados
- Normalizados utilizados fuera del alcance previsto.

3 RESPONSABILIDADES

Actividades	RT	EC	SA	AL	PL	PR
Diseño experimental						
Planificación						
Ejecución experimental						
Análisis estadístico de datos de validación						
Informe de validación						

RT Responsable Técnico

EC Encargado de Calidad

SA Supervisor de Área

AL Analista de Laboratorio

PL Personal de Laboratorio

PR Proveedor

E Ejecuta

C Coordina

I Informa/Recibe Información

4 REFERENCIAS

4.1 Referencias normativas

- 4) Norma Boliviana ISO/IEC 17025 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Calibración y Ensayo, apartado 5.4
- 5) DTA-CRI-016 Verificación y validación de métodos

4.2 Referencia a documentos del sistema de gestión

- 1) XXX-XX Manual de la Calidad. Capítulo 5.4
- 2) XXX-X-XX Compra de suministros y servicios
- 3) XXX-X-XX Control de las instalaciones y condiciones ambientales
- 4) XXX-X-XX Manipulación de materiales de referencia

4.3 Bibliografía

No aplica

5 DEFINICIONES Y SIGLAS

5.1 Definiciones

Exactitud

Grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.

Límite de detección

Es aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o señal de fondo.

Límite de cuantificación

Es la cantidad mínima que puede cuantificarse con un nivel aceptable de exactitud.

Linealidad

Es la proporcionalidad entre concentración del analito y respuesta

Precisión

Grado de concordancia entre resultados analíticos independientes obtenidos bajo condiciones específicas.

Repetibilidad

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones.

Reproducibilidad

Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos.

Robustez

Capacidad que tiene el método de resistir pequeños cambios sin afectar los resultados.

Rango

Intervalo entre los niveles superior e inferior.

Selectividad o especificidad

Capacidad de un método analítico para medir exacto y específicamente el analito sin detectar interferencias de impurezas.

Sensibilidad

Cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo.

Validación

Confirmación por examen y la provisión de evidencias objetivas de que los requisitos particulares para un uso específico son cumplidas.

Verificación

Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

5.2 Siglas

SG: Sistema de Gestión

RT: Responsable Técnico

EC: Encargado de Calidad

6 DESARROLLO

6.1 Condiciones generales

La validación consiste en la evaluación del desempeño de los métodos de ensayo, de forma de demostrar que estos se ajustan a las condiciones operativas del Laboratorio y se confirma su correcta aplicación en las condiciones mencionadas.

Previo a la validación el laboratorio controla todas las variables que intervienen de forma directa e indirecta en esta actividad:

Servicios y suministros: Se asegura la provisión y disponibilidad de reactivos, materiales e insumos, con el grado de calidad exigido por el método.

Instalaciones y condiciones ambientales: Se cuentan con instalaciones adecuadas para el desarrollo de los métodos de ensayo y las condiciones ambientales temperatura y humedad son monitoreadas y registradas para un control eficaz

Método de Ensayo: Los procedimientos de ensayo han sido detalladamente redactados, estos se seleccionan según la disponibilidad de los métodos base que pueden ser normalizados, no normalizado o desarrollados por el Laboratorio.

Equipos: El laboratorio cuenta con todos los equipos principales y auxiliares para la correcta ejecución de los procedimientos de ensayo, estos son debidamente mantenidos, calibrados/calificados y periódicamente verificados para asegurar su correcto funcionamiento.

Trazabilidad: La trazabilidad de las mediciones se mantiene a través de la calibración de los equipos con patrones trazables, mediante servicios de Laboratorios de Calibración reconocidos en el ámbito nacional. En mediciones químicas se cuenta con trazabilidad interna a materiales de referencia certificados y secundarios, y patrones químicos.

6.2 Planificación de la verificación/validación de un método

La Dirección Técnica del Laboratorio se definirá los parámetros o mediciones que estarán sometidas a validación o verificación, según tipo de método y encargará al responsable de área la planificación obligatoria considerando:

- 1) Discusión y condiciones generales para la validación del método de ensayo
- 2) Objetivo
- 3) Alcance
- 4) Documentos de referencia
- 5) Fundamento analítico
- 6) Interferencias
- 7) Descripción de la matriz de ensayo y muestras para validación

7.1 Matriz de ensayo

7.2 Muestras de ensayo para la validación

- Obtención y manipulación de las muestras

- Preparación de las muestras
- 8) Parámetros de validación
- 9) Personal para la validación
- 10) Instalaciones y condiciones ambientales
- 11) Equipos y trazabilidad metrológica
- 12) Materiales
- 13) Reactivos
- 14) Materiales de referencia
- 15) Diseño experimental de la validación
- 16) Actividades de validación

- Intervalo de trabajo
- Intervalo lineal
- Límite de detección y de cuantificación
- Repetibilidad y Precisión intermedia
- Reproducibilidad
- Exactitud
- Selectividad / especificidad
- Robustez
- Incertidumbre de medida
- 17) Análisis de los datos de validación
- 18) Control de calidad interno
- 19) Informe de validación

Esta planificación es documentada en el formato **plan de validación/verificación de métodos de ensayo (XXX-XXX-XXX)**.

6.3 Parámetros de validación/verificación

Dependiendo el tipo de método y si es necesario validarlo o verificarlo se puede seguir la siguiente tabla de parámetros a determinar.

	MÉTODO CUANTITATIVO	MÉTODO CUALITATIVO
VERIFICACIÓN	Rango lineal (cuando sea aplicable) Límite de detección (cuando sea aplicable) Límite de cuantificación (cuando sea aplicable) Repetibilidad Reproducibilidad interna o precisión intermedia Sesgo	Sistema de control interno de calidad de las variables de control: personal, equipos, materiales, reactivos, instalaciones, condiciones ambientales y medios de control La participación en comparaciones Inter laboratorios y programas de ensayos de aptitud acordes con DTA-CRI-015.
VALIDACIÓN	Rango lineal Límite de detección (cuando sea aplicable) Límite de cuantificación (cuando sea aplicable) Repetibilidad Reproducibilidad interna o precisión intermedia Reproducibilidad Sesgo Especificidad (cuando sea aplicable) Robustez (cuando sea aplicable) Incertidumbre	Especificidad, Límite de detección (sensibilidad), Falsos positivos, Falsos negativos, Exactitud relativa (si fuera necesario).

6.3.1 Métodos cuantitativos

6.3.1.1 Intervalo de trabajo

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. Note que esto se refiere al intervalo de concentraciones o a los valores de la propiedad relacionada, de las disoluciones medidas realmente más que de

las muestras originales. En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

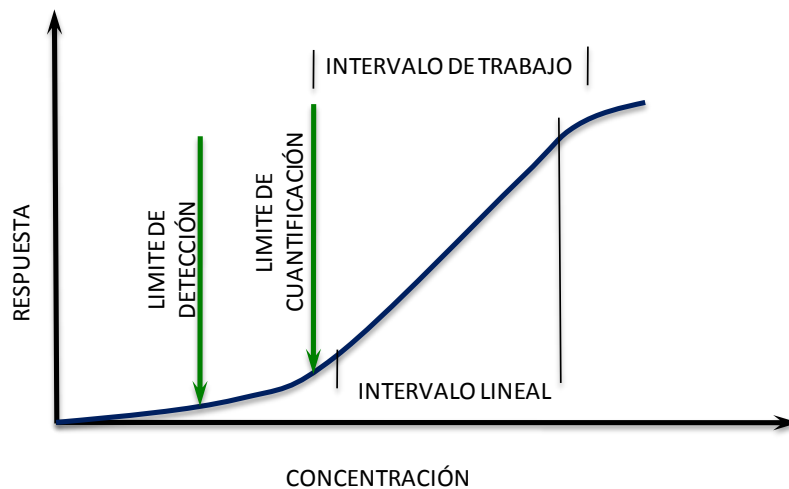
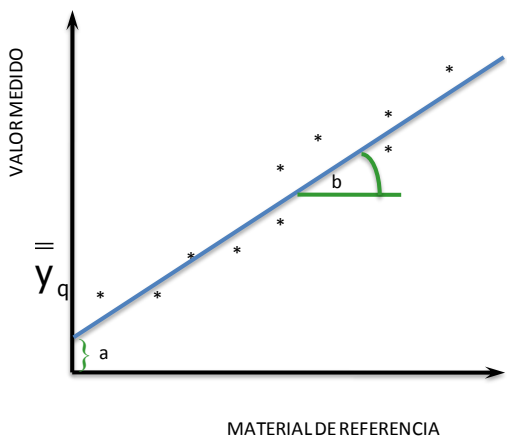


Figura1. Intervalo de Trabajo

Intervalo lineal

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal. Dentro del intervalo lineal la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito o del valor de la propiedad relacionada. La extensión de este intervalo puede establecerse durante la evaluación del intervalo de trabajo.

Note que los cálculos de regresión por ellos mismos, son insuficientes para establecer la linealidad. Para hacer esto, puede ser suficiente una inspección visual de la línea y de los residuales. Existen pruebas objetivas tales como las pruebas de bondad de ajuste que continúan siendo las mejores.



\hat{y}

Figura 2. Intervalo Lineal

Diseño experimental Intervalo de trabajo

Para determinar el intervalo lineal de un método se recomienda lo siguiente:

Se recomienda realizar mediciones en al menos 3 niveles distintos de concentración dentro del intervalo de trabajo.

Realizar mediciones en Material de Referencia Certificado en cada punto, caso contrario se podrá trabajar con muestras enriquecidas no superando el 20% de la concentración original para no alterar la matriz o con material de referencia secundario.

Realizar al menos 10 mediciones en cada nivel de concentración.

Para realizar la toma de datos se podrá utilizar las siguientes tablas.

Ensayista	Nivel								
	1	2	j	q-1	
1									
2									
..									
..					..				
i					y_{ijk}				

..					..				
..					..				
..									
p									

Tabla 1. Formulario de datos originales (Formulario A)

Ensayista	Nivel								
	1	2	j	q-1	
1									
2									
..									
i					\bar{Y}_{ij}				
..									
p									

Tabla 2. Formulario de promedios (Formulario B)

Ensayista	Nivel								
	1	2	j	q-1	
1									
2									
..									
i					S_{ij}				
..									
p									

Tabla 3. Formulario de Desviaciones Estándar (Formulario C)

Evaluación de Resultados

La evaluación de los resultados consiste en:

Verificar que los resultados pertenecen a la misma población estadística

Calcular los promedios con un decimal más que los datos originales:

$$\bar{y}_{ij} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_{k=1}^{n_{ij}} y_{ijk} \quad \text{Ec(1)}$$

Calcular la desviación estándar en cada celda:

$$S_{ij} = \sqrt{\frac{1}{n_{ij} - 1} \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk} - \bar{y}_{ij})^2} \quad \text{Ec(2)}$$

Evaluar los resultados y eliminar los valores anómalos

Test de Cochran's

Consiste en calcular el estadístico C

$$C = \frac{S_{ij}^2 \max}{\sum_{i=1}^p S_{ij}^2} \quad \text{Ec(5)}$$

y compararlo con el valor tabulado (Anexos) en caso de incumplimiento se puede pensar en eliminar esos datos.

Test de Grubbs

Primera evaluación

Consiste en calcular el estadístico G_{ij}

$$G_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j}{\sqrt{\frac{1}{(p_j - 1)} \sum_{i=1}^{p_j} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2}} \quad \text{Ec(6)}$$

Y se debe comparar con el valor tabulado (Anexos) tanto para 95% y 99% de confianza. En caso de superar el 99% se considera el valor como outlier pero si está entre 95% y 99% se considera sospechoso.

Relación entre el valor de referencia y la respuesta obtenida por el método

Con los datos ya evaluados se debe realizar una correlación lineal entre el valor medido con los valores de referencia.

Ensayista	Abscisa \hat{y}_j	Ordenada \bar{y}_j
1		
..		
..		
..		
q		

Tabla 4 Valores para la correlación

Establecer un modelo lineal

$$\bar{y}_j = a + b\hat{y}_j \quad \text{Ec(8)}$$

Calcular la pendiente y el intercepto

$$b = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 * \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}} \quad \text{Ec(9)}$$

$$a = \frac{\sum_{j=1}^q \bar{y}_j - b * \sum_{j=1}^q \hat{y}_j}{q} \quad \text{Ec(10)}$$

Calcular el coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sqrt{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j \right)^2}{q} \right) \left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j \right)^2}{q} \right)}} \quad \text{Ec(11)}$$

Calcular la covarianza

$$\text{COV}(\hat{y}_j, \bar{y}_j) = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q (\hat{y}_j - \bar{\hat{y}}) * (\bar{y}_j - \bar{\bar{y}}) \quad \text{Ec(12)}$$

Calcular la varianza residual

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^q (\bar{y}_j - (a + b * \hat{y}_j))^2}{q - 2}} \quad \text{Ec(13)}$$

Evaluar la linealidad

Quattrocchi et al, considera que la mejor forma de evaluar la linealidad del método estudiado es realizar una prueba estadística de t (t de Student):

Calcular la correlación lineal significativa (t_r).

$$t_r = \frac{r * \sqrt{(q-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Ec(14)}$$

Comparar t_r con el valor tabulado t_{tab} con un grado de significación del 95% y (p-2) grados de libertad.

Si $t_r \geq t_{\text{tab}}$ existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método, y el intervalo estudiado es lineal

Si $t_r < t_{tab}$ no existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método, y el intervalo estudiado no es lineal.

También se puede comprobar la covarianza

Si $COV = 0$, el sistema está in correlacionado

$COV < 0$, el sistema tiene una proporcionalidad indirecta

$COV > 0$, el sistema tiene una proporcionalidad directa

6.3.1.2 Límite de detección y cuantificación

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, como en el ensayo de trazas, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método. La importancia de determinar esto y los problemas implícitos, surgen del hecho que la probabilidad de detección no cambia repentinamente de cero a la unidad cuando se cruza un umbral. Los problemas han sido investigados estadísticamente con detalle y se ha propuesto una gama de criterios de decisión. Surgen confusiones adicionales debido a que no existe actualmente un acuerdo universal sobre la terminología aplicada. El término “límite de detección” no es aceptado ampliamente aunque se usa en varios documentos sectoriales. La ISO utiliza como un término general “valor mínimo detectable de la variable de estado definida” el cual en química se traduce como la “concentración neta mínima detectable”. La IUPAC es cautelosa en el uso de “límite de detección” prefiriendo “valor (verdadero) mínimo detectable”.

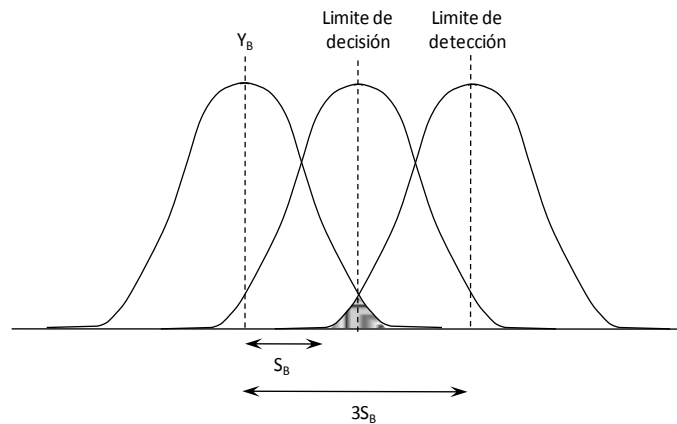


Figura 3. Límite de Detección

Diseño experimental Límite de Detección y Cuantificación

En la práctica no hay acuerdo entre los profesionales en la manera de calcularlo, ya que esta definición no es concreta, a continuación se dan algunas alternativas de calcularlo.

Para determinar el Límite de detección y cuantificación se recomienda lo siguiente:

- Mediciones en blancos, se recomienda realizar 10 mediciones mínimo por duplicado
- Tomar los datos del estudio de Intervalo lineal
- Resolución del equipo de medición

Mediciones en blancos se debe realizar la toma de datos se podrá usar el Formulario A y se podrá realizar los cálculos en el Formulario B y C. Después se realizaran las mismas pruebas estadísticas anteriores. Ya con los valores estudiados se calculara la desviación estándar del blanco y se podrá calcular el límite de detección y cuantificación.

$$y_d = y_B + 3 * S_B \quad \text{Ec(15)}$$

$$y_c = y_B + 10 * S_B \quad \text{Ec(16)}$$

Cabe resaltar que el hecho de medir cero en el blanco no significa que este sea límite, si esto ocurriera se debe repetir esta medición con blancos fortificados o material de referencia adecuado.

Datos del Intervalo Lineal con la varianza residual y el intercepto se podrá aplicar las siguientes fórmulas:

$$y_d = a + 3S_{y/x} \quad \text{Ec(17)}$$

$$y_d = a + 10S_{y/x} \quad \text{Ec(18)}$$

Siendo:

a = El termino independiente de la recta de regresión

$S_{y/x}$ = Varianza residual

Resolución del equipo de medición, aunque no es aconsejable consiste en calcular la concentración medida suponiendo una división de escala como respuesta del equipo de medición.

Resultados obtenidos

Luego de determinar estos parámetros lo que se espera es tener definido las siguientes zonas:



Figura 4. Zona de detección y cuantificación

6.3.1.3 Precisión

Normalmente, la “precisión” se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo ensayista, con un equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado. Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (ésta es la medida de precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo). Puede ser que para algunos casos particulares sea más útil una medida intermedia de la precisión, por ejemplo la precisión medida entre diferentes ensayistas, en períodos de tiempo prolongados dentro de un solo laboratorio. Esto algunas veces se conoce como “precisión intermedia”, pero las condiciones exactas deberán ser especificadas. La precisión se determina por lo general en términos de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Tanto la reproducibilidad como la repetibilidad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito. La desviación estándar relativa puede ser más útil en este caso puesto que la desviación estándar dividida por la concentración es prácticamente constante dentro del intervalo de interés, a condición de que éste no sea demasiado grande.

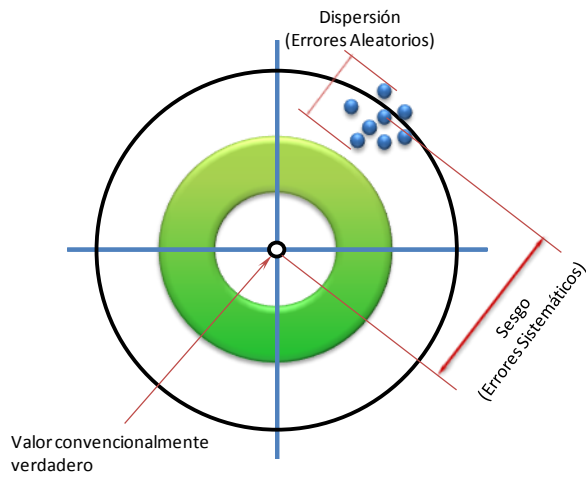


Figura 5. Dispersión y posición de los Resultados

Condiciones de los estudios de Precisión

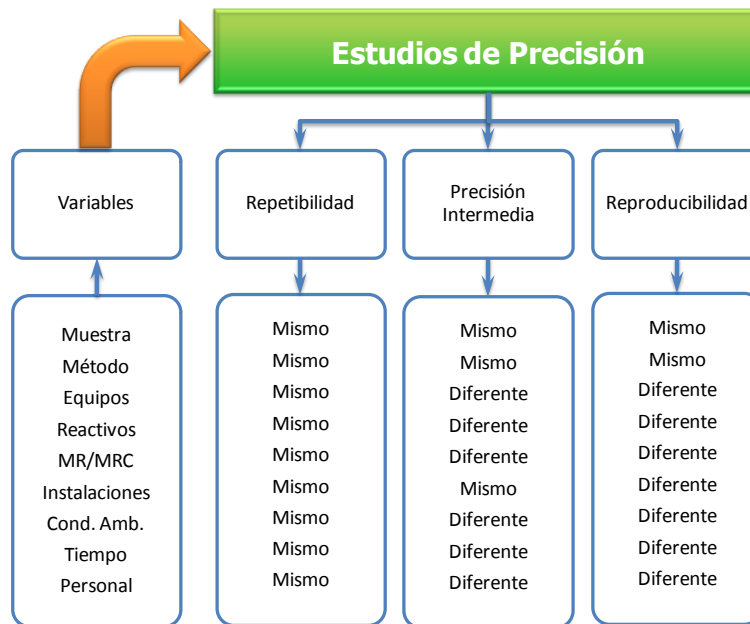


Figura 6. Condiciones de Repetibilidad (S_r), Precisión Intermedia (S_w), Reproducibilidad (S_R)

Diseño experimental Repetibilidad, Precisión Intermedia y Reproducibilidad

Para determinar la repetibilidad y precisión intermedia se recomienda lo siguiente:

Se debe realizar mediciones dentro del intervalo lineal en distintas concentraciones.

Realizar mediciones en muestras naturales en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

Realizar al menos 10 mediciones al menos por duplicado para cada nivel de concentración

Para realizar la toma de datos se podrá usar el Formulario A (Tabla 1)

Evaluación de Resultados

La evaluación consiste en:

Verificar que los resultados pertenecen a la misma población estadística

Esto podrá hacerse siguiendo los pasos ya descritos para el intervalo de trabajo.

Calculo de la Repetibilidad y Precisión Intermedia

Con los datos ya depurados

Calcular los promedios de cada nivel

$$\hat{m}_j = \bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \quad \text{Ec(19)}$$

Calcular la repetibilidad y precisión intermedia

$$S_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} \quad \text{Ec(20)}$$

$$S_{wj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} \quad \text{Ec(21)}$$

Calcular la dispersión entre ensayistas

$$S_{Lj}^2 = \frac{S_{dj}^2 - S_{rj}^2}{n_j} \quad \text{Ec(22)}$$

$$\begin{aligned} S_{dj}^2 &= \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} * (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2 \\ &= \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{y}_{ij})^2 - (\bar{y}_j)^2 * \sum_{i=1}^p n_{ij} \right] \end{aligned} \quad \text{Ec(23)}$$

$$S_{Lj}^2 = \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \right] \quad \text{Ec(24)}$$

Calcular la reproducibilidad

$$S_{Rj}^2 = S_{rj}^2 + S_{Lj}^2 \quad \text{Ec(25)}$$

Calcular los límites de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad

$$r = t_{\infty} * \sqrt{2} * S_r \quad \text{Ec(26)}$$

$$r_w = t_{\infty} * \sqrt{2} * S_w \quad \text{Ec(27)}$$

$$R = t_{\infty} * \sqrt{2} * S_R \quad \text{Ec(28)}$$

Solo se determinara la reproducibilidad cuando se haga valide o verifique en ensayos colaborativos.

Relación entre la concentración y la precisión intermedia y la reproducibilidad

Nivel	\bar{y}_j	S_r	S_w
1			
...			
j			
...			
p			

Se debe realizar una gráfica y estudiar la dependencia de la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad con la concentración del analito.

Dada la complejidad de las ecuaciones se puede emplear un método abreviado en la que se calculan valores intermedios que permiten un cálculo sencillo de la reproducibilidad.

$$\begin{aligned}
 T_1 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} * \bar{y}_{ij}; & T_2 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} * (\bar{y}_{ij})^2 \\
 T_3 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} & ; & & T_4 &= \sum_{i=1}^p n_{ij}^2 \\
 T_5 &= \sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2 \\
 S_r^2 &= \frac{T_5}{T_3 - p} \\
 S_L^2 &= \left[\frac{T_2 * T_3 - T_1^2}{T_3} - S_r^2 \right] \left[\frac{T_3(p-1)}{T_3^2 - T_4} \right]
 \end{aligned}
 \quad \text{Ec(29)}$$

Resultados Obtenidos

Luego de determinar estos parámetros lo que se espera es tener definido los límites de dispersión del método en estudio.



Figura 7. Límites de Precisión

6.3.1.4 Exactitud

La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero (La definición en ISO 3534-1 se ha adoptado en este documento). La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”. La veracidad (de un método) es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real.

Normalmente, la veracidad se expresa en términos de sesgo. La “precisión” es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas tal como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados. Adicionalmente, una expresión cada vez más común de exactitud es la “incertidumbre de medición”, la cual proporciona una figura única de expresión de la exactitud. Estos tres diferentes parámetros serán discutidos en su momento.

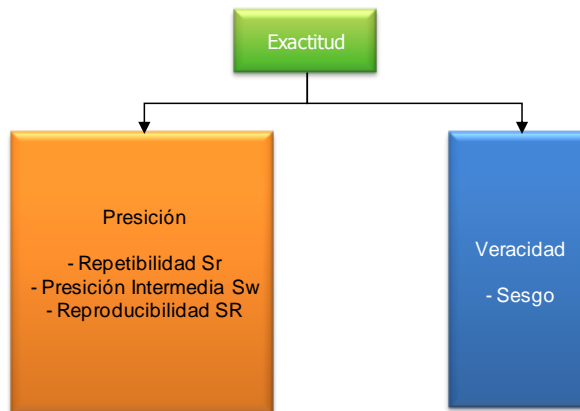


Figura 8. Componentes de la Exactitud

Veracidad

La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia (o sea, un valor verdadero o un valor verdadero convencional). Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado. Los valores de referencia son idealmente trazables a patrones internacionales. Los materiales de referencia certificados por lo general se aceptan como medio de proveer valores trazables y por lo tanto, el valor de referencia es el valor certificado del MRC. Observe que los valores de referencia, certificados u otros pueden ser absolutos (trazables al SI) o convencionales, es decir, que son acordados para un propósito en particular.

Claramente la disponibilidad de estos materiales es limitada. Los materiales de referencia para una validación pueden ser por consiguiente:

- Preparados por adición de materiales típicos con materiales de referencia de pureza certificada u otros materiales de pureza y estabilidad adecuadas.

- Materiales típicos bien caracterizados, de estabilidad verificada internamente y conservados para control de calidad interno.

La validación requiere la adecuación a un propósito, por lo tanto, la selección de un material de referencia puede depender del uso pretendido. El material de referencia debe ser apropiado para su uso. Para trabajos de normalización debe usarse un material de referencia certificado adecuado e idealmente de la misma matriz.

Interpretando las mediciones de sesgo:

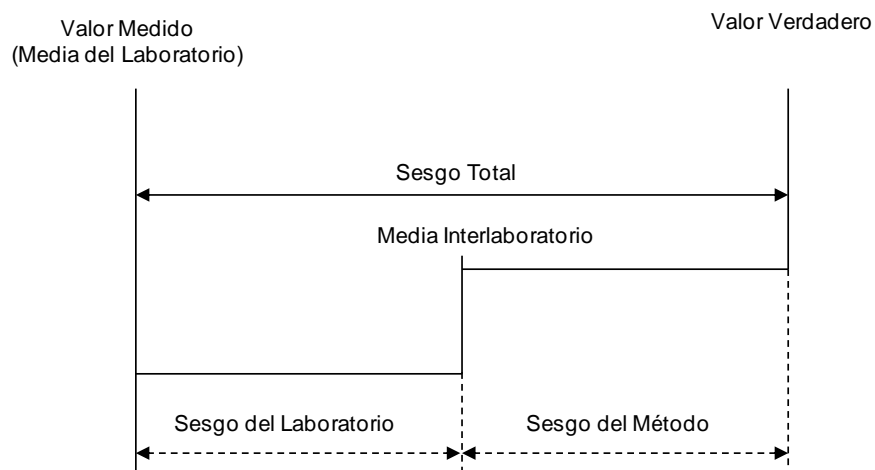


Figura 10. Componentes del sesgo

La figura muestra los dos componentes del sesgo referidos aquí como los componentes debidos al método y al laboratorio. El sesgo del método surge de los errores sistemáticos inherentes al método cualquiera que sea el laboratorio que lo usa. El sesgo del laboratorio surge de errores sistemáticos adicionales característicos del laboratorio y de la interpretación que éste hace del método. En forma aislada, un laboratorio puede estimar solamente el sesgo combinado. Sin embargo, en la verificación del sesgo, es importante estar al tanto de las convenciones correspondientes al propósito que se tiene en mente. Por ejemplo en muchas normas para alimentos, los límites normativos se establecen en términos de los resultados obtenidos por el método de referencia. El sesgo que surge únicamente del método específico se compensa y la comparabilidad con otros

laboratorios que utilizan el mismo método es la principal preocupación. El sesgo total determinado por un laboratorio particular durante la validación debe entonces compararse con cualquier sesgo reportado para el método normalizado.

Sin embargo, para la mayoría de los propósitos, la aceptación del sesgo debe decidirse sobre la base del sesgo total medido contra materiales o métodos de referencia apropiados, tomando en cuenta la precisión del método, la incertidumbre en los valores de los materiales de referencia y la exactitud requerida para el uso pretendido.

Valor de referencia

Existen las siguientes posibilidades para obtener los valores de referencia:

Referencia externa, consiste en:

- Material de Referencia Certificado (MRC)
- Material de Referencia (MR) Patrón Químico
- Muestra Obtenida a partir de un ensayo de aptitud

Comparación de métodos, consiste en:

- Comparación Interna: Determinaciones de un analito con distintos métodos en el mismo laboratorio.
- Comparación Externa: Mediante los ensayos de aptitud.

Método de adición, Consiste en añadir una cantidad conocida de MR y evaluar el grado de recuperación de las mismas y de esta determinar el valor de referencia de la muestra:

Diseño experimental de la exactitud

Para la determinación de la exactitud se puede aplicar la siguiente sistemática:

Se recomienda realizar mediciones dentro del intervalo lineal en diferentes concentraciones.

Realizar ensayos en material de referencia (mejor si es certificado).

Realizar al menos 10 mediciones al menos por duplicado

Para realizar la toma de datos se puede usar el Formulario A (Tabla 1)

Evaluación de la Exactitud

La evaluación consiste en:

Verificar que los resultados pertenecen a la misma población estadística

Esto podrá hacerse siguiendo los pasos ya descritos para el intervalo de trabajo.

Calculo del nivel de exactitud

Con los datos ya depurados

Calcular los promedios de cada nivel

$$\hat{m}_j = \bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \quad \text{Ec(30)}$$

Calcular el sesgo

$$\delta_j = \bar{y}_j - \hat{y}_j \quad \text{Ec(31)}$$

Calcular la dispersión de los resultados

$$S_j = \sqrt{\frac{1}{p_j - 1} \sum_{i=1}^p (y_{ij} - \bar{y}_j)^2} \quad \text{Ec(32)}$$

Calcular el error cuadrático medio relativo

$$ECMR = \frac{\sqrt{\delta_j^2 + S_j^2}}{\hat{y}_j} * 100 \quad \text{Ec(33)}$$

Calcular la desviación del sesgo

$$DESR_\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} \delta_{ij}^2}{p_j}} \quad \text{Ec(34)}$$

Evaluación de la exactitud

Para realizar la verificación de la exactitud se aplica la siguiente sistemática:

Calcular t experimental

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\delta_j| * \sqrt{p_j}}{S_j} \quad \text{Ec(35)}$$

Contrastar con el t Tabulado si:

Si $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$ se puede afirmar que ambos valores no difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método satisface la condición de exactitud.

Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$ se puede afirmar que ambos valores difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método no satisface la condición de exactitud.

6.3.1.5 Especificidad

En general, se dice que los métodos analíticos consisten de una etapa de medición la cual puede o no ser precedida de una etapa de separación. Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición o alguna otra propiedad medida, la cual se atribuye al analito, se debe únicamente al analito y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que surja como una coincidencia. Esta es la confirmación de la identidad. La interferencia de otros compuestos en la medición del analito, dependerá de la efectividad de la etapa de separación y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición. La selectividad y la especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. La especificidad se considera generalmente que es el 100 % de la selectividad pero el acuerdo no es universal. Si la etapa de medición no es específica, es posible declarar que ciertos analitos no interfieren, habiendo primero verificado que éste es el caso. Es bastante difícil establecer que nada interfiere ya que siempre existe la posibilidad de encontrar alguna interferencia no reconocida hasta el momento. Habrá casos en que ciertas interferencias químicas podrían ser identificadas por un método en particular pero que la oportunidad de encontrarlas en la vida real sea improbable. El analista debe decidir en qué punto es razonable terminar de buscar interferencias. Estos parámetros se aplican a los ensayos tanto cualitativos como cuantitativos.

Si hay interferencias presentes y no pueden separarse del analito de interés o si el analista no está consciente de su presencia, entonces esas interferencias tendrán varios efectos. Dependiendo de cómo se establece la identidad del analito, las interferencias pueden inhibir la confirmación, por ejemplo, al distorsionar la señal que surge del analito. Las interferencias también pueden tener el efecto de incrementar aparentemente la concentración del analito al contribuir a la señal atribuida a él, (o contrariamente, disminuir la concentración del analito sí contribuye con una señal negativa). Por lo general, las interferencias afectarán la pendiente de la curva de calibración de una forma diferente a la que lo haría el analito de interés, así, la pendiente de la curva de

calibración en el método de adiciones puede afectar la linealidad de la curva. Este efecto tiene el potencial para indicar la posible presencia de una interferencia oculta, pero no es útil si la curva de recuperación es inherentemente no lineal.

Usualmente, la selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en porciones de prueba a las cuales deliberadamente se han introducido interferencias específicas (aquellas que se cree probable estén presentes en las muestras). Si no se está seguro de que las interferencias están presentes, la selectividad de un método se puede investigar estudiando su capacidad de medir el analito comparado con otros métodos o técnicas independientes.

Las pruebas a realizar para asegurar la selectividad o especificidad del método podrán ser diferentes en función del tipo de muestra a ensayar, la técnica utilizada, la información bibliográfica disponible, etc. Entre las pruebas más utilizadas se encuentran las siguientes:

Método de adiciones, comparando los resultados (o la respuesta) de la muestra que contiene las posibles interferencias con el resultado de otra muestra sin dichas interferencias. En este caso los valores de exactitud y precisión evaluados y verificados nos deben llevar a emitir una conclusión sobre la selectividad/especificidad del método.

Comparación de los resultados obtenidos por un método, con los resultados obtenidos por otro método (método de confirmación). Es importante que el método de confirmación sea un método normalizado, en este caso también los niveles de exactitud y precisión y los procesos de verificación son elementos importantes para establecer la selectividad/especificidad de un método de ensayo.

Trabajar con los datos del proceso de verificación del modelo lineal, en este caso si el modelo es lineal la pendiente debe ser constante en todo el rango de trabajo, esto muestra que el método es selectivo/específico en dicho rango.

Test mediante adición de un estándar ("Spiking").

6.3.1.6 Robustez

Una medida de la efectividad del método analítico es qué tan buen desempeño se mantiene aun sin una implementación perfecta. En cualquier método habrá ciertas etapas las cuales, si no se llevan al cabo con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el desempeño del método y pueden dar como resultado que definitivamente, el método no funcione. Estas etapas deben identificarse como parte del desarrollo del método y si es posible, debe evaluarse su influencia sobre el desempeño del mismo por medio de "pruebas de robustez". Esto incluye aplicar variaciones deliberadas al método y estudiar el efecto resultante en el desempeño.

De esta manera es posible identificar las variables que tiene el efecto más significativo y en base a ello, controlarlas cuidadosamente cuando se aplica el método. Cuando se requiere mejorar el método, las mejoras se pueden realizar sobre aquellas partes que se sabe, son críticas. La robustez por lo general se evalúa durante el desarrollo del método, comúnmente por el laboratorio que lo ha propuesto y antes de la colaboración con otros laboratorios. La AOAC [21] describe una técnica establecida para pruebas de robustez. Las pruebas de robustez se aplican normalmente para investigar su efecto sobre la precisión y la exactitud del método.

El objetivo de la prueba de robustez es optimizar el Método de Ensayo y describir que bajo las condiciones establecidas (incluidas sus tolerancias) se pueden obtener resultados suficientemente exactos con una alta seguridad, de manera que el procedimiento funcione confiablemente si se utiliza en otros laboratorios o después de largos intervalos de tiempo.

Un método es más robusto entre menos dependan los resultados del ensayo de una modificación en las condiciones de éste. Al desarrollar una nuevo Método de Ensayo

debe determinarse la modificación de los resultados por el cambio en la condiciones del ensayo.

La sistemática para la evaluación de la robustez de un método de ensayo es:

- g. Conocer las condiciones de medición
- h. Definir las condiciones que afectan al método de ensayo
- i. Seleccionar el objeto de evaluación de la conformidad a ser utilizado (MRC, MSC, Muestra)
- j. Realizar mediciones bajo las condiciones modificadas
- k. Calcular la exactitud
- l. Establecer niveles de influencia para cada una de las variables modificadas.

6.3.1.7 Estimación de la incertidumbre de medida en base a datos de validación

La incertidumbre es el parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando.

Al contar con dos fuentes de incertidumbre se asume, como un todo a cada método de ensayo y a esto se conoce como incertidumbre global, y este es el enfoque valido para su estimación (según DTA-CRI-011).

$$u_{rel} = \sqrt{(u_{rel(sistemático)})^2 + (u_{rel(aleatorio)})^2}$$

Estimación de incertidumbre en base al componente aleatorio

Este método es válido si se supone que el mayor aporte de incertidumbre se debe al componente aleatorio en condiciones de reproducibilidad.

Para la estimación se aplica la siguiente sistemática:

- 1) Calcular la S_{Rj}

2) Calcular la Incertidumbre relativa

$$u_{rel} = \frac{S_{Rj}}{Y_j} * 100\%$$

3) Estimar la incertidumbre u_c

$$u_c = \frac{u_{rel} * Y_{ijk}}{100}$$

4) Expandirla para poder expresarla

$$U = k * u_c = 2 * u_c$$

Es necesario especificando el factor de cobertura y el porcentaje de confianza.

Estimación de la incertidumbre en base al componente sistemático y aleatorio

En este caso la incertidumbre es la combinación de ambos componentes. La sistemática para estimación es:

g) Calcular la precisión intermedia S_w

h) Calcular la desviación del sesgo $DESR_\delta$

i) Combinar ambos componentes en términos relativos

$$u_{rel} = \sqrt{(u_{rel(sistemático)})^2 + (u_{rel(aleatorio)})^2}$$

$$u_{rel(sistemático)} = \sqrt{\left(\frac{DESR_\delta}{\hat{Y}_{MR}} * 100\right)^2 + \left(\frac{S_{wMR}}{\hat{Y}_{MR}} * 100\right)^2}$$

j) Estimar la incertidumbre u_c

$$u_c = \frac{u_{rel} * Y_{ijk}}{100}$$

k) Expandirla para poder expresarla

$$U = k * u_c = 2 * u_c$$

- 1) Especificar el factor de cobertura y el porcentaje de confianza.

6.4 Elaboración del informe de verificación / validación

Los datos de validación son registrados en los formatos de registro de resultados de ensayo, estos se transcriben a las planillas electrónicas de **análisis de datos de validación (XXX-XXX-XXX)**.

Para la presentación de los resultados de validación se elabora el respectivo **informe de validación (XXX-XXX-XXX)**, que consideran los siguientes apartados, cuando corresponda:

- 1) Introducción
- 2) Objetivo
- 3) Alcance
- 4) Documentos de referencia
- 5) Fundamento analítico
- 6) Resumen
- 7) Descripción de la matriz de ensayo
- 8) Equipos y trazabilidad metrológica
- 9) Materiales
- 10) Reactivos
- 11) Materiales de referencia
- 12) Actividades de validación
 - Preparación de las muestras
 - Implementación del diseño experimental
 - Intervalo de trabajo, intervalo lineal, límites de detección y cuantificación
 - Precisión
 - Exactitud
 - Robustez
 - Selectividad/Especificidad
 - Incertidumbre de la medición

13) Resultados obtenidos

- Tratamiento inicial de los datos
- Intervalo lineal
- Límites de detección y cuantificación
- Intervalo de trabajo
- Repetibilidad
- Precisión intermedia
- Especificidad/ selectividad
- Robustez
- Incertidumbre de la medición

14) Resultados y conclusiones

15) Trazabilidad metrológica

16) Recomendaciones sobre control de calidad

17) Software utilizado en el análisis de datos

18) Elaboración, revisión y aprobación

19) Anexos

Culminada la validación se realiza seguimiento periódico al método, para esto se define los parámetros a evaluar. Normalmente estos parámetros son: Precisión, exactitud e incertidumbre.

Otro aspecto importante son los aspectos para definir el monitoreo, para esto es recomendable trabajar con: tiempo, frecuencia de realización de los ensayos y número de muestras ensayadas

6.5 Aprobación del método

Una vez completado el proceso de validación se presenta para la aprobación del informe y del nuevo método al Responsable Técnico para su respectiva aprobación

7 FORMATOS DE REGISTRO A APLICAR

XXX-XXX-XXX Plan de validación/verificación de métodos de ensayo

XXX-XXX-XXX Datos de validación/verificación

XXX-XXX-XXX Planilla de análisis de datos de validación/verificación

XXX-XXX-XXX Informe de validación/verificación de métodos de ensayo

8 REVISIONES Y APROBACIÓN

Elaboración:	Fecha:
Revisión:	Firma:
	Fecha:
Aprobación:	Firma:
	Fecha:

III. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL HARINA DE QUINUA – CALCULO DE PROTEÍNA CRUDA

1. INTRODUCCIÓN

El requisito 5.4 de la norma ISO /IEC 17025: 2005 establece que los laboratorios deben validar, los métodos no normalizados, los desarrollados internamente, métodos normalizados ampliados y modificados todo para comprobar su fiabilidad. Por lo que, en el marco de asegurar la calidad de sus análisis y tener el control de calidad interno, el laboratorio de control de alimentos presenta el informe de Validación del Método para la determinación cuantitativa de proteína cruda en harina de quinua, el cual es el método utilizado en el laboratorio.

Cereales

Los cereales constituyen un grupo de plantas dentro de otro más amplio: las gramíneas. Los más utilizados en la alimentación humana son el trigo, el arroz y el maíz, aunque también son importantes la cebada, el centeno, la avena y el mijo. El grano del cereal, que constituye el elemento comestible, es una semilla formada por varias partes: la cubierta o envoltura externa, compuesta básicamente por fibras de celulosa que contiene vitamina B 1 , se retira durante la molienda del grano y da origen al salvado. En el interior del grano distinguimos fundamentalmente dos estructuras: el germen y el núcleo. En el germen o embrión abundan las proteínas de alto valor biológico, contiene grasas insaturadas ricas en ácidos grasos esenciales y vitamina E y B 1 que se pierden en los procesos de refinado para obtener harina blanca.

La parte interna o núcleo amiláceo, está compuesto por almidón y en el caso del trigo, avena y centeno por un complejo proteico denominado gluten que está formado por dos proteínas: gliadina y gluteína, que le dan elasticidad y características panificables a la masa de pan y son responsables de la esponjosidad y textura del buen pan. Cuando el cereal se consume tras quitarle las cubiertas y el germen, se denomina cereal refinado.

Cuando se procesa sin quitarle las cubiertas, el producto resultante se denomina integral. Las harinas integrales son más ricas en nutrientes, contienen mayor cantidad de fibra, de carbohidratos y del complejo vitamínico B 1. El valor nutritivo de los cereales está en relación con el grado de extracción del grano "cuanto más blanco es un pan, menor valor nutritivo tiene".

Los cereales y sus derivados son ricos en carbohidratos tanto de absorción rápida (tras la ingestión pasan a la sangre en poco tiempo) como de absorción lenta (fibra). El contenido de la fibra varía según el proceso industrial de preparación. El contenido proteico es muy variable, entre un 6 y un 16% del peso, dependiendo del tipo de cereal y del procesamiento industrial. La composición en aminoácidos de las proteínas de los cereales depende de la especie y variedad; en general son pobres en aminoácidos esenciales, por lo que se las cataloga de proteínas de moderada calidad biológica. Por tanto, cuando se combinan con legumbres, o con proteínas de origen animal (queso, pescado, etc.) se obtienen proteínas de elevado valor biológico.

Quinoa

La quinoa es una planta, concretamente un Pseudo-cereal, que pertenece al género *Chenopodium* y a la familia de las *Amaranthaceae*. La semilla de la quinoa se consume como si fuera un cereal y en cuanto a su composición está formada principalmente por hidratos de carbono, proteínas y grasas de tipo insaturadas, conteniendo a su vez ácidos omega 6 y omega 3. Además, tiene un alto aporte de fibra, así como una serie de micronutrientes como el calcio, el zinc el fósforo y vitamina B y E.

Estas características hacen que la quinoa sea considerada por la FAO como un Pseudocereal muy valorado y con un gran potencial nutritivo.

Proteína

Las proteínas son moléculas complejas imprescindibles para la estructura y función de las células. Su nombre proviene del griego proteos que significa fundamental, lo cual se relaciona con la importante función que cumplen para la vida.

Las proteínas se originan a partir de la unión de otras moléculas llamadas aminoácidos, se agrupan en largas cadenas y se mantienen estables por uniones químicas llamadas enlaces peptídicos.

Las proteínas pueden ser de varios tipos según las funciones que cumplen en el organismo, sin embargo, a grandes rasgos se clasifican en proteínas estructurales y proteínas con actividad biológica. Las proteínas que consumimos en la dieta pueden ser de cualquiera de los dos tipos, independientemente de su origen se consideran proteínas alimentarias, el valor nutritivo de las proteínas viene dado por la mayor o menor presencia de los aminoácidos esenciales en su composición.

Muestra

Porción representativa tomada de un lote.

Muestra Elemental

Es la cantidad de muestra de consumo humano tomada al azar en un punto del lote.

Muestra de Laboratorio

Es la cantidad de muestra de consumo humano, obtenida de una muestra fraccionada, que está en condiciones de ser enviada al laboratorio para efectuar los ensayos correspondientes.

Muestra de ensayo

Es la cantidad de muestra de consumo humano, homogeneizado y fraccionado (cuarteo), destinada a diferentes ensayos.

2. OBJETIVO DEL METODO

La porción de ensayo es digerida por ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. Los productos de la reacción se hacen alcalinos luego destilados. El amonio liberado es recolectado en una solución de ácido bórico, el que es titulado con una solución de ácido clorhídrico, para determinar el contenido de nitrógeno y calcular el contenido de proteína cruda.

Establecer las actividades, condiciones técnicas y el planteamiento experimental para la validación del método de ensayo para la determinación de proteínas en cereales por volumetría según el método micro Kjeldahl de acuerdo a la norma ISO 20483-2013.

3. ALCANCE

Cereales, quinua, legumbres (arveja, haba y lenteja) y derivados, objeto de la presente validación.

4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- XXX-X-XX Validación y verificación de métodos de ensayo
- XXX-X-XX Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo
- XXX-X-XX Control de equipos y trazabilidad de medida
- ISO 20483-2013. Cereales y pulsos. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de proteína cruda- método Kjeldahl

5. FUNDAMENTO

MÉTODO KJELDAHL

En un análisis elemental de un alimento, lo más frecuente y menos complejo es investigar la proteína bruta de los diferentes aminoácidos o proteínas específicas. No obstante, los procedimientos más utilizados no determinan directamente esta proteína, sino el contenido en nitrógeno, que se expresa como nitrógeno total y que se obtiene mediante una combustión líquida en la que, en un primer paso, el nitrógeno de la muestra se convierte en sulfato amónico, el cual luego se transforma en amoniaco. Este

amoníaco se destila y se valora en una solución de ácido normalizado. Esta técnica desarrollada por Kjeldahl, se ha convertido en método de referencia con múltiples modificaciones. Determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto al nitrógeno proteico como al no proteico. La proteína bruta se halla multiplicando el nitrógeno total (N) por un factor, que se ha calculado considerando los componentes básicos de un gran número de muestras del mismo alimento, y expresando el resultado como proteína.

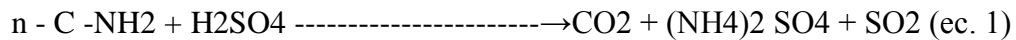
La técnica más utilizada es el método Kjeldahl. Este método se trata de una volumetría.

El método Kjeldahl mide el contenido en nitrógeno de una muestra. La proteína se puede calcular seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno para el alimento específico que está siendo analizado, tal y como explicaremos más adelante. Este método puede ser dividido, básicamente en 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y valoración. El procedimiento a seguir es diferente en función de si en la etapa de destilación el nitrógeno liberado es recogido sobre una disolución de ácido bórico o sobre un exceso conocido de ácido clorhídrico o sulfúrico patrón. Ello condicionará la forma de realizar la siguiente etapa de valoración, así como los reactivos empleados.

Digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores que aceleran el proceso, aumentando el punto de ebullición del ácido. Con esta digestión, transformamos el nitrógeno (en su mayor parte orgánico) en sulfato amónico (nitrógeno amoniacal). Pasamos a medio alcalino mediante la adición de hidróxido sódico concentrado, y se destila el nitrógeno en forma de amoníaco en corriente de vapor de agua.

- d. Etapa de digestión: un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ión amonio, según la ecuación 1.

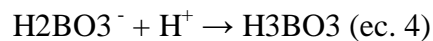
Catalizador/calor



- e. Etapa de destilación: se alcaliniza la muestra digerida y el nitrógeno se desprende en forma de amoníaco (ecuación 2). El amoníaco destilado se recoge sobre un exceso conocido de ácido bórico (ecuación 3).



- f. Etapa de valoración: La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ión borato formado, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y verde de bromo cresol (ecuación 4). Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoníaco destilados.



6. RESUMEN

Determinación de proteínas en cereales, derivados y quinua, derivados destinados al consumo humano.

La técnica más utilizada es el método Kjeldahl. Este método se trata de una volumetría. El método Kjeldahl mide el contenido en nitrógeno de una muestra. El contenido en proteína se puede calcular seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína

y el nitrógeno para el alimento específico que está siendo analizando, tal y como explicaremos más adelante. Este método puede ser dividido, básicamente en 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y valoración. El procedimiento a seguir es diferente en función de si en la etapa de destilación el nitrógeno liberado es recogido sobre una disolución de ácido bórico o sobre un exceso conocido de ácido clorhídrico o sulfúrico patrón. Ello condicionará la forma de realizar la siguiente etapa de valoración, así como los reactivos empleados.

Digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores que aceleran el proceso, aumentando el punto de ebullición del ácido. Con esta digestión, transformamos el nitrógeno (en su mayor parte orgánico) en sulfato amónico (nitrógeno amoniacal). Pasamos a medio alcalino mediante la adición de hidróxido sódico concentrado, y se destila el nitrógeno en forma de amoniaco en corriente de vapor de agua.

7. DESCRIPCIÓN DE LA MATRIZ DE ENSAYO

Harina de trigo. - La harina de trigo es el principal ingrediente para la elaboración de pan, sus componentes son: almidón (70 – 75 %), agua (14 %) y proteínas (10 - 12 %), además de polisacáridos no del almidón (2 - 3%) particularmente arabinoxilanos y lípidos (2%).

Quinoa. - Existen cientos de variedades de quinoa a lo largo del territorio Boliviano, un grano andino que pertenece al grupo de los cereales y que empieza a ser difundido a todo el mundo, no sólo por nuestra tradición sino por el alto valor nutricional y beneficios a la salud del consumo de este importante grano. **Lamentablemente, todavía es un alimento de alto costo y que esperamos pronto sea accesible.**

Uno de los aspectos más importantes es la cantidad y calidad de la proteína que contiene, con 14,4 gramos de proteína en cien gramos de quinoa, es muy parecida a

la del huevo y la leche, estas son las proteínas de mejor calidad entre los alimentos. Es rescatable que siendo la quinua un alimento vegetal, pueda ofrecernos una proteína de alto valor como la de los alimentos de origen animal.

Soya. - La proteína de soja se ha convertido en competencia de la Proteína de Suero de Leche o Whey Protein, que es posiblemente el suplemento más vendido. La de soja es una fuente de proteínas de origen vegetal y últimamente está acaparando mayor interés por sus propiedades y beneficios, ya que puede promover resultados notorios respecto al crecimiento de masa muscular e incluso como apoyo a la salud.

La harina de soja se fabrica triturando semillas de soja hasta obtener un polvo fino. Se presenta en tres formas: natural o con toda la grasa (contiene [aceites](#) naturales), desgrasada (se retiran los aceites) con un 50% de contenido.

Rango Lineal

Matriz	Numero	Tipo
Harina de trigo	20	Material secundario
Harina de Quinoa	20	Material de referencia certificado MRC
Expeller de soya	20	Material secundario

Precisión y repetibilidad

Matriz	Numero	Tipo
Harina de trigo	10	Material secundario
Harina de Quinoa	10	Material de referencia certificado MRC
Expeller de soya	10	Material secundario

Precisión intermedia

Matriz	Numero	Tipo
Harina de trigo	20	Material secundario
Harina de Quinoa	20	Material de referencia certificado MRC
Expeller de soya	20	Material secundario

Exactitud

Matriz	Numero	Tipo
Harina de trigo	20	Material secundario
Harina de Quinoa	20	Material de referencia certificado MRC
Expeller de soya	20	Material secundario

Robustez

Matriz	Numero	Tipo
Harina de trigo	4	Material secundario
Expeller de soya	4	Material secundario

8. EQUIPOS Y TRAZABILIDAD METROLÓGICA

- Balanza analítica marca METTLER, con precisión de 0,001 mg. Certificado de Calibración LP – CCB-0596 -2018 con fecha de 10 de agosto de 2018.
- Termo higrómetro marca. Certificado de calibración LP-CCH-0512-2016; con fecha de 7 de noviembre de 2016.

- Termo higrómetro marca. Certificado de calibración LP-CCH-0559-2018; con fecha de 8 al 9 de agosto de 2018.
- Termocupla. Certificado de calibración LP-CCT-0767-2018, con fecha de 14 de junio de 2018.
- Bureta volumétrica marca LMS clase A capacidad de 25 ml y dispensación de 0.05 ml código: Fecha de calibración 2018-08-08 Certificado de calibración LP-CCV- 0871-2018: trazabilidad IBMETRO
- Estufa de pozo seco. Certificado de calibración LP-CCT-0502-2018 del 26 de abril de 2018.
- Estufa de pozo seco. Certificado de calibración LP-CCT-0501-2018 del 26 de abril de 2018.
- Pesa patrón E2 de 50 g. Certificado de calibración LP-CCM-0190-2017: 21 de Julio del 2017.
- Pesa patrón E2 de 100 g. Certificado de calibración LP-CCM-0190-2017: 21 de Julio del 2017.
- Pesa patrón E2 de 200 g. Certificado de calibración LP-CCM-0190-2017: 21 de Julio del 2017.
- pH metro Mettler. Certificado de calibración LP-CCQ-0122-2018 del 2 mayo del 2018

9. MATERIALES

- Tubo Kjeldahl
- Gradilla
- Pipeta graduada de 10 ml
- Matraz aforado de 1000 ml
- Dispensador de capacidad de 5 ml.

- Matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- Espátula.
- Bandeja rectangular
- Propi petas

10. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico 0,052
- Ácido sulfúrico p.a.
- Hidróxido de sodio al 40%
- Ácido Bórico 4 %
- Indicador mezcla de indicador rojo de metilo – verde de bromo cresol
- Sulfato de potasio
- Sulfato de cobre penta hidratado
- Sacarosa
- Sulfato de amonio
- Carbonato de sodio

11. MATERIALES DE REFERENCIA

- Harina de quinua material certificado IBMETRO con 2,12 g/100g de proteína.
- Harina de trigo material secundario
- Expeller de soya material secundario

12. ACTIVIDADES DE VALIDACIÓN

12.1 Preparación de las muestras

Para las muestras de harina de trigo (MS), harina de quinua (MRC) y expeller de soya (MS) se tomaron las porciones de ensayo de forma directa para realizar las respectivas determinaciones por tratarse de muestras que contienen pequeñas porciones se procedió

a uniformizar la porción de ensayo por agitación del frasco para pasar seguidamente a realizar la pesada de las mismas.

Las muestras fueron analizadas de la siguiente forma:

- Nivel 1: Valor asignado de referencia e incertidumbre: 1,60 g/100g \pm 0,13 g/100g de nitrógeno (Harina de trigo) material secundario.
- Nivel 2: Valor asignado de referencia e incertidumbre: 2,12 g/100g \pm 0,14 g/100g de nitrógeno (Harina de quinua) material de referencia certificado.
- Nivel 3: Valor asignado de referencia e incertidumbre: 7,47 g/100g \pm 0,09 g/100g de nitrógeno (Expeller de soya) material secundario.

Muestras de harina de trigo (MS), harina de quinua (MRC) y expeller de soya (MS) para el estudio de intervalo de trabajo, intervalo lineal, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, selectividad, repetibilidad, precisión intermedia y robustez

12.2 Implementación del diseño experimental

Según **Plan de Validación (XXX-XXX-XXX)** se han realizado los siguientes parámetros de validación:

Parámetro	Especificación	Tipo de Muestra	Condiciones de ensayo	No Mediciones	Responsable
Rango lineal	0,36 – 7,47 g/100g de Nitrógeno	MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO DE HARINA DE QUINUA- MATERIAL SECUNDARIO HARINA DE TRIGO Y EXPELLER DE SOYA	Misma muestra, método, equipo, instalación, tiempo, condición ambiental.	10 por duplicado en cada concentración: 1,60 g/100g 2,12 g/100g 7,47 g/100g	CZ
Linealidad	$r \leq 1$		De rango lineal	Los datos del rango lineal	CZ
Límite de detección	0,11 g/100g de Nitrógeno		De linealidad	Los datos del rango lineal	CZ
Límite de cuantificación	0,36 g/100g de Nitrógeno		De linealidad	Los datos del rango lineal	CZ
Repetibilidad	1,60 g/100g 2,12 g/100g 7,47 g/100g		Misma muestra, método, equipo, instalación, tiempo, condición ambiental.	10 por duplicado en cada concentración: 1,60 g/100g 2,12 g/100g 7,47 g/100g	CZ
Precisión intermedia	1,60 g/100g 2,12 g/100g 7,47 g/100g		Misma muestra, método, equipo; diferentes analistas, balanza	10 por duplicado en cada concentración: 1,60 g/100g 2,12 g/100g 7,47 g/100g	CZ DV
Reproducibilidad	No aplica se realizó una Validación inter laboratorio		No aplica	No aplica	No aplica

Sesgo	1,60 g/100g 2,12 g/100g 7,47 g/100g		De rango lineal	De rango lineal	CZ
Especificidad	Específico y selectivo en el rango 0,36 – 7,47 g/100g de Nitrógeno		De rango lineal	Los datos de exactitud	CZ
Robustez	1,60 g/100g 7,47 g/100g		Cambio de concentración de ácido usado en la titulación, condiciones ambientales en la titulación y tiempo de digestión	4 por duplicado en rango 1,60 g/100g 7,47 g/100g	CZ
Incertidumbre	Datos de la validación		De rango lineal y precisión intermedia	Datos de exactitud y precisión	CZ

12.3 Intervalo de trabajo, intervalo lineal, límites de detección y cuantificación, selectividad/especificidad e incertidumbre de la medición

El intervalo de trabajo es el rango de concentraciones del extremo inferior y superior del intervalo de concentración del analito, se lo determina mediante el estudio del intervalo lineal y los valores del límite de detección y cuantificación, que determina la concentración más baja y más alta en el que se puede determinar el contenido de nitrógeno por el método en estudio, con niveles aceptables de incertidumbre, para luego ser multiplicados por el factor correspondiente y así obtener el valor como proteína.

Intervalo lineal

Este estudio se realizó en muestras de Harina de trigo, harina de quinua y expeller de soya, en el rango de 1,62 a 7,47 g/100g de nitrógeno, para luego ser multiplicados por el factor correspondiente y así obtener el valor como proteína, como indica el método en estudio.

- Se realizaron mediciones de 3 niveles de distintas concentraciones por duplicado para obtener los valores de referencia.
 - Nivel 1: 1,60 g/100g de Nitrógeno
 - Nivel 2: 2,12 g/100g de Nitrógeno
 - Nivel 3: 7,47 g/100g de Nitrógeno
- Se realizaron 10 mediciones de cada nivel de concentración por duplicado.

Límite de detección y cuantificación

Se utilizaron los datos del estudio de intervalo lineal.

- Se realizó una correlación lineal entre el valor medido con los valores de referencia, a estos datos se aplicó la varianza residual y el intercepto

12.4 Precisión

El estudio de precisión se realizó en las medidas de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Repetibilidad (Sr)

Este estudio se realizó en muestras de harina de trigo, harina de quinua y expeller de soya.

- Se realizaron mediciones dentro del intervalo lineal en distintas concentraciones, en muestras de harina de quinua por un solo analista.
- Mediciones por duplicado para cada nivel en distintas concentraciones.

Precisión intermedia (Sw)

Este estudio se realizó en muestras de Harina de trigo, harina de quinua y expeller de soya, en el rango de 1,62 a 7,47 g/100g de nitrógeno.

- Se realizaron mediciones dentro del intervalo lineal en distintas concentraciones de nitrógeno.
- Mediciones por duplicado para cada nivel en distintas concentraciones.
- Mediciones por duplicado con 2 analistas, en diferentes días.

Reproducibilidad (SR)

No aplica este estudio, ya que se realizó la validación intra laboratorio

12.5 Exactitud

El estudio del método validado busca cuantificar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos como lo aleatorios sobre los resultados.

Para la determinación de la exactitud se aplicó la siguiente sistemática:

- Se realizaron mediciones dentro del intervalo lineal de 3 niveles en distintas concentraciones, para obtener los valores de referencia.
 - Nivel 1: 1,62 g/100g de Nitrógeno
 - Nivel 2: 2,12 g/100g de Nitrógeno
 - Nivel 3: 7,47 g/100g de Nitrógeno

Se realizaron 10 mediciones todas las mediciones por duplicado en cada concentración.

Especificidad/selectividad

Se trabajó con los datos del intervalo lineal, en este caso el modelo es lineal y la pendiente es constante en todo el rango de trabajo.

12.6 Robustez

El estudio de la robustez se evaluó durante el desarrollo del método en muestras de Harina de trigo y expeller de soya, en el rango de 1,62 y 7,47 g/100g de nitrógeno.

Se realizaron 4 mediciones por duplicado en el nivel 1 y nivel 3, las variables estudiadas son:

- Cambio de concentración de ácido usado en la titulación,
- Condiciones ambientales en la titulación
- Tiempo de digestión.

12.7 Incertidumbre de medida

El estudio de la incertidumbre estimada a partir de los datos de la validación.

13. RESULTADOS OBTENIDOS

El análisis de los datos obtenidos en las pruebas experimentales de la validación se realizó según procedimiento **Validación de métodos de ensayo y estimación de la incertidumbre de medición (XXX-X-XX)**, como a continuación se detalla:

13.1 Tratamiento inicial de los datos

Los datos utilizados en el análisis estadístico para la validación del método, fueron evaluados previamente en su consistencia estadística mediante:

Test de Cochran

Verificación que los resultados pertenecen a la misma población estadística aplicación de la técnica numérica de Test de Cochran consiste en calcular el estadístico C y comparar con el valor de C tabulado (C crítico) en caso de incumplimiento se debe eliminar ese grupo de datos.

Evalúa precisión errores aleatorios

- Calcular las desviaciones estándares de mediciones individuales
- Comparación con valor tabulado

Test de Grubbs

Se basa en la relación de la diferencia del valor individual con el promedio general. Con la dispersión se compara con valor tabulado para 95% y 99 % de confianza.

Compara errores sistemáticos

- En caso de superar el 99% se considera un valor como outlier pero si está entre 95% y 99 % se considera sospechoso
- Si la primera evaluación no reporta ningún valor outlier o sospechoso se debe realizar la segunda prueba
- Consiste en calcular el estadístico G máximo y G mínimo se debe eliminar dos valores tanto del máximo como del mínimo

Como se puede observar todos los grupos caen dentro del valor crítico del test de Cochran y son aceptados para su evaluación.

13.2 Intervalo lineal

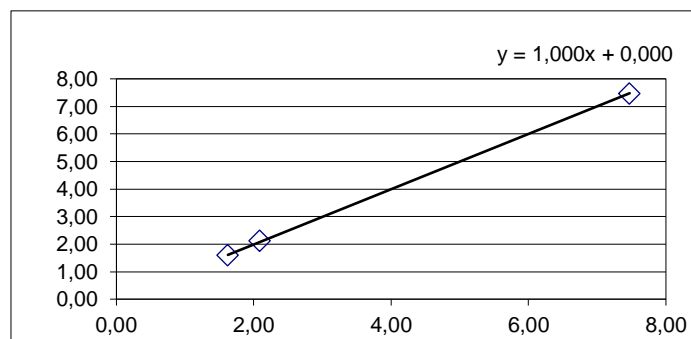
Relación entre valor de referencia y respuesta obtenida

- Con los datos ya evaluados se realizó una correlación lineal entre el valor medido con los valores de referencia
- Se comparó la correlación lineal significativa con el valor tabulado con un grado de significación del 95% y (P-2) grados de libertad.

	\bar{y}_j	\hat{y}_j
Nivel	Ordenad a	Abscisa
1	1,62	1,60
2	2,09	2,12
3	7,47	7,47

a	0,000
b	1,000
r	1,000

Análisis gráfico:



Evaluación de la linealidad:

Evaluación de la linealidad		EVAL
COVARIANZA	7,04104	LINEAL
$t_r =$	127,91	LINEAL
$t_{tab} =$	6,31	
$t_r = \frac{r * \sqrt{(q - 2)}}{\sqrt{(1 - r^2)}}$		

Como se puede observar el valor calculado es mayor al valor tabulado y por lo tanto se puede asegurar que existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método, y el intervalo estudiado es lineal.

Por otro lado, analizando la covarianza se tiene una proporcionalidad directa debido a que esta es mayor a cero.

13.3 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de los datos de estudio del intervalo lineal.

- Se realizó una correlación lineal entre el valor medido con los valores de referencia, a estos datos se aplicó la varianza residual y el intercepto

Podemos encontrar los límites de detección y cuantificación aplicando las siguientes formulas:

$$y_d = a + 3S_{y/x}$$

$$y_c = a + 10S_{y/x}$$

Obteniendo los siguientes resultados:

$$S_{x/y} \quad 0,036$$

$$LD \quad 0,11 \text{ g/100g}$$

$$LC \quad 0,36 \text{ g/100g}$$

13.4 Repetibilidad

La repetibilidad se calculó a partir de los datos de estudio de repetibilidad de los 3 niveles con distintas concentraciones, aplicando la siguiente formula.

$$S_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)}$$

Obteniendo los siguientes resultados:

Analista	Nivel	Resultado
CZ	1	0,001
CZ	2	0,001
CZ	3	0,001

Se informa que el $S_r < S_w$ por lo que cumple el criterio para la repetibilidad.

13.5 Precisión intermedia

La precisión intermedia se calculó a partir de los datos de estudio de precisión intermedia de los 5 niveles con distintas concentraciones, aplicando la siguiente formula.

$$S_{wj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} =$$

Obteniendo los siguientes resultados:

\bar{y}_j g/100g	S_r g/100g	S_w g/100g
1,62	0,024	0,04
2,07	0,028	0,034
7,47	0,038	0,042

Se informa que el $S_w > S_r$ por lo que se cumple el criterio para la precisión intermedia.

13.6 Exactitud

Con los datos ya evaluados se calcularon.

- De cada nivel los promedios, sesgo, la dispersión de los resultados, el error cuadrático medio relativo y la desviación del sesgo, aplicando las siguientes formulas.

$$\bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} y_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}}$$

- Promedios

$$\delta_j = \bar{y}_j - \hat{y}_j$$

- Sesgo

$$S_j = \sqrt{\frac{1}{p_j - 1} \sum_{i=1}^p (y_{ij} - \bar{y}_j)^2}$$

- Dispersión de resultados

$$ECMR = \frac{\sqrt{\delta_j^2 + S_j^2}}{\hat{y}_j} * 100$$

- Error cuadrático medio relativo

$$DES_{\delta} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} \delta_{ij}^2}{p_j}}$$

- Desviación del sesgo

Obteniendo los siguientes resultados:

VR	SESGO (δ) g/100g	100- ECMR	Condición
1,62	0,03	96,94	Exacto
2,12	-0,03	97,12	Exacto
7,47	0,00	99,81	Exacto

- Evaluando los resultados obtenidos se concluye que en los 3 niveles de concentración es exacto.
- La evaluación de la exactitud, se realizó con la verificación de la exactitud, calculando el t experimental con la siguiente formula.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\delta_j| * \sqrt{p_j}}{S_j}$$

t experimental

- Si el $t_{exp} \leq t_{tab}$ se puede afirmar que ambos valores difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método satisface la condición de exactitud.

13.7 Especificidad / Selectividad

Se trabajó con los datos del intervalo lineal, en este caso el modelo es lineal y la pendiente es constante en todo el rango de trabajo.

- Con el fin de evaluar la selectividad se ha calculado las pendientes de 3 en 3 niveles es decir b_1 puntos 1 al 3, b_2 puntos 2 al 4 y b_3 puntos del 3 al 5.

Obteniendo los siguientes resultados:

		$b_1=$	1,108				
		$b_2=$	0,994				
Ordenada	Abscisa			t_{exp}	t_{tab}		
1,62	1,60	$S_b=$	0,080	1,89	6,31		SELECTIVO
2,09	2,12						
7,47	7,47	$b=$	1,000	0,11	6,31		SELECTIVO

Se concluye que el método es selectivo en todo el rango de trabajo

13.8 Robustez

Se realizaron 4 mediciones por duplicado en el nivel 1 y nivel 3, las variables estudiadas son:

- Cambio de concentración de ácido usado en la titulación.
- Condiciones ambientales en la titulación.
- Tiempo de digestión.

13.9 Incertidumbre de medida

El estudio de la incertidumbre estimada a partir de los datos de la validación.

- Datos de desviación estándar del sesgo ($DESR_{\delta}$)
- Datos de precisión intermedia
- El componente de la incertidumbre es una función polinómica y se la expresa como incertidumbre relativa.

$$U_{rel} = 6,501 * X^{-0,32}$$

Obteniendo los siguientes resultados:

\hat{y}_j	$DESR_{\delta}$ g/100g	$DESR_{\delta}$ %	Sw %	u_{rel} %	U exp g/100g
1,60	0,047	2,93	2,7	3,97	0,13
2,12	0,058	2,76	1,6	3,20	0,14
7,47	0,014	0,18	0,6	0,59	0,09

14. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En resumen, los resultados de la validación son:

PARAMETRO	CONCLUSIONES	
Rango lineal	0,36 – 7,47 g/100g de Nitrógeno	
Límite de detección	0,11 g/100g de Nitrógeno	
Límite de cuantificación	0,36 g/100 g de Nitrógeno	
Repetibilidad	Concentración g/100g	Sr g/100g
	1,62	0,024
	2,07	0,028
	7,47	0,038
Reproducibilidad interna	Concentración g/100g	r _w g/100g
	1,62	0,137
	2,07	0,107
	7,47	0,132

Precisión intermedia	Concentración g/100g	Swg/100g
	1,62	0,04
	2,07	0,034
	7,47	0,042
Reproducibilidad	No aplica ya que se realizó una validación inter laboratorio	
Sesgo	Concentración g/100g	δ_j g/100g
	1,60	0,03
	2,12	-0,03
	7,47	0,00
Especificidad	El método es específico y selectivo en el rango de 0,36 a 7,47 g/100g de Nitrógeno.	
Robustez	El método es robusto a trabajar con el máximo tiempo de digestión y titulando con el ácido clorhídrico 0,052 N, consiguiéndose valores con buena exactitud a una temperatura de titulación	

	entre 20 – 25 °C
Incertidumbre	<p>Estimada a partir de los resultados de la validación se cuenta con la siguiente expresión como incertidumbre relativa.</p> $U_{rel} = 6,501 * X^{-0,32}$

En general el método presenta un desempeño favorable y se adecúa de buena manera a los propósitos para los cuales ha sido validado.

15. TRAZABILIDAD METROLÓGICA

Los resultados del método son trazables al Sistema Internacional de Unidades mediante:

- Calibración de sus equipos de medición principal y secundaria, con Laboratorios de Calibración del instituto Boliviano de Metrología, según lo dispuesto en el DTA-CRI-12
- Uso de material de referencia certificado (MRC), en nuestro caso harina de quinua con 2,12 g/100 de Nitrógeno.
- Uso de material de referencia secundario (MS), en nuestro caso harina de trigo con 1,60 g/100g y expeller de soya con 7,42 g/100g de nitrógeno.

El análisis realizado es para el material de referencia certificado y los materiales de referencia secundarios, utilizados en la validación, pero no significa necesariamente que serán los únicos materiales a ser utilizados para demostrar la trazabilidad, se debe

realizar a través de control de calidad, ensayos de aptitud y control de equipos utilizados en las mediciones.

16. RECOMENDACIONES SOBRE CONTROL DE CALIDAD

El desempeño del método es vigilado en cuanto a exactitud y precisión, mediante graficas de control. Para este propósito se emplea Materiales de referencia certificados y materiales de referencia secundarios con valores asignados.

Las actividades de control de calidad interno a aplicarse son:

La diferencia absoluta entre dos resultados de ensayo en condiciones de repetibilidad en un tiempo corto de tiempo no debe ser mayor que el 5% de los casos del límite de repetibilidad $r = (0,0063 \times Wp) \times 2,8/5,7$; de acuerdo la ISO 20483-2013

- a. **Control de la precisión**, mediante la repetición de ensayos (duplicados) de muestras naturales utilizando el mismo método de ensayo.
- b. **Control de la exactitud**, mediante el uso de material de referencia certificado y/o material de referencia secundario

También se establece la participación en ensayos de aptitud como un medio de control de calidad de los resultados de ensayo.

Las actividades de control de calidad se realizarán según disposiciones del procedimiento de **Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo (XXX-X-XX)**.

- a) La precisión del método será controlada en función de los valores de precisión intermedia:

$$LSC = S_w \sqrt{\frac{1}{p-1} X^2(p-1; \frac{\alpha}{2})}$$

$$LSC = S_w \sqrt{\frac{1}{p-1} X^2(p-1; \frac{\alpha}{2})}$$

$$VC = S_w$$

$$LIC = S_w \sqrt{\frac{1}{p-1} X^2(p-1; 1 - \frac{\alpha}{2})}$$

$$LIC = S_w \sqrt{\frac{1}{p-1} X^2(p-1; 1 - \frac{\alpha}{2})}$$

- b) La veracidad del método será controlada en función de los valores de razón de recuperación, establecida en los estudios de sesgo.
- c) Asimismo, los errores sistemáticos y aleatorios será controlado con la evaluación de la exactitud.

17. SOFTWARE UTILIZADO EN EL ANÁLISIS DE DATOS

En el procesamiento de datos se ha utilizado MS EXCEL, en las planillas configuradas para cada parámetro de validación analizado, los resultados se muestran con dos números decimales más que los utilizados en el reporte y se ha redondeado para obtener el resultado final.

Es posible que, si se recalcula los datos, los mismos pueden presentar variaciones de los reportados en el presente informe: debido al número de decimales y al vínculo de las planillas diseñadas para el análisis de datos.

Para la expresión de los resultados se ha aplicado los siguientes criterios:

- Los resultados están expresados con 3 cifras significativas.

18. ELABORACIÓN, REVISIÓN Y APROBACIÓN

Elaboración de informe a cargo de:

Nombre:	Dra. Claudia Zenteno San Miguel	Firma:
Cargo:		

Revisión del informe a cargo de:

Nombre:		Firma:
Cargo:		

Aprobación del informe a cargo de:

Nombre:		Firma:
Cargo:		
Fecha:		

19. ANEXOS

Anexo 1 XXX-XXX-XXX Planilla de datos de validación/verificación

Anexo 2 XXX-XXX-XXX Planilla de análisis de datos de validación/verificación

- Rango lineal
- Repetibilidad
- Precisión intermedia
- Exactitud
- Especificidad/especificidad
- Robustez
- Estimación de la incertidumbre