

Trabajo Final Integrador
Especialización en Calidad Industrial en Alimentos

**Proyecto para el desarrollo de un método de detección rápida
de alérgenos alimentarios para la verificación de limpieza de
equipos de producción.**

Alumna: Florez Laura Carolina

Año: 2018

Lugar de trabajo: UT- Nanomateriales del Centro INTI-Procesos Superficiales.

RESUMEN

En el presente trabajo se propone un proyecto para el desarrollo de un método rápido para la verificación de limpieza de equipos de producción aplicable a aquellas empresas con procesos que incluyen la manipulación de materias primas que contienen alérgenos alimentarios. El lugar de trabajo será el centro INTI- Procesos Superficiales, el cual cuenta con un sistema de gestión de la calidad alineado con el Sistema Integral del Instituto Nacional de Tecnología Industrial. La alergia alimentaria es una enfermedad en aumento que representa un problema socio-económico a nivel mundial. La leche es uno de los ocho los principales alimentos responsables de las reacciones alérgicas que pueden provocar la muerte de las personas con esta afección. La problemática debe abordarse desde lo legal, a través de las normativas existentes para la regulación de la industria alimentaria, y desde lo técnico, generando alternativas analíticas superadoras a las que se encuentran en el mercado para la detección de los alérgenos. Según la normativa sobre el rotulado de alérgenos, los fabricantes de alimentos tienen la responsabilidad desarrollar programas de gestión de riesgos de alérgenos y a realizar controles analíticos. Sobre esto último se intenta colaborar, mediante el presente proyecto, en el desarrollo de un producto innovador y de producción nacional para la verificación de limpieza de equipos con alérgenos, llevando a cabo todos los procesos correspondientes de validación del método.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Descripción del organismo	1
Relevancia del proyecto	4
OBJETIVOS Y ALCANCE	7
Objetivo	7
Alcance	7
METODOLOGÍA	8
Descripción del método	8
Desarrollo del proyecto	9
RESULTADOS PREVISTOS	13
CONCLUSIONES	14
BIBLIOGRAFÍA	15

INTRODUCCIÓN

Descripción del organismo

El lugar donde se desarrollará el proyecto propuesto será la Unidad técnica (UT) Nanomateriales del Centro Procesos Superficiales del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), donde particularmente se trabaja en el desarrollo de biosensores.

El Centro INTI -Procesos Superficiales está ubicado en el edificio N° 46 del Parque Tecnológico Miguelete del INTI y forma parte del Sistema de Centros del Instituto Nacional de Tecnología Industrial, organismo descentralizado del Ministerio de Industria dependiente de la Secretaría de Industria, Comercio y la Pequeña y Mediana Industria. Para la ejecución de sus trabajos, el Centro cumple con los requisitos establecidos por las normas de referencia, con lo establecido en la Política de Calidad del INTI, con los roles institucionales definidos por la conducción del Instituto y con los objetivos del Centro que son monitoreados en cada Revisión por la Dirección. El plantel del Centro está integrado por aproximadamente 30 profesionales y técnicos, la mayoría de ellos con un alto nivel de capacitación y formación de posgrado.

El Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) del centro INTI- Procesos Superficiales está alineado con los requisitos y criterios establecidos en el Manual del Sistema Integral de Gestión (SIG) del INTI y documentos anexos del SIG de INTI. El sistema cubre la realización de procedimientos de ensayo, calibraciones internas y de certificación de personas en áreas de incumbencia de sus Unidades Técnicas y los procedimientos de gestión relacionados. El nexo común de todas esas actividades es la realización de desarrollos aplicados, mejoras de procesos y productos, y prestación de servicios con base en la tecnología electroquímica. En particular, este trabajo se desarrollará en la Unidad Técnica Nanomateriales, en donde la principal actividad es la de elaboración de desarrollos.

Los elementos constitutivos del SGC del Centro están documentados y controlados en lo referente a su elaboración, aprobación, identificación, distribución, archivo y revisión. Los documentos que constituyen el SGC del centro INTI-Procesos Superficiales se clasifican jerárquicamente en a) manual de calidad y sus anexos, b) procedimientos de gestión, procedimientos de ensayo y procedimientos de calificación de personas c) instructivos, y d) registros. Los documentos constitutivos del SGC del Centro INTI-Procesos Superficiales están controlados y están descriptas las actividades relacionadas con la confección, revisión, aprobación, codificación, distribución, actualización y archivo correspondiente de cada documento.

Los laboratorios están acondicionados para asegurar la satisfacción de las exigencias relativas al desarrollo de los ensayos. En cada uno de los Procedimientos de Ensayo que forman parte de la documentación se desarrollan las instrucciones correspondientes para la utilización de los equipos e instrumentos, la preparación de las muestras y la ejecución del ensayo. Los métodos y procedimientos se seleccionan según la exactitud exigida y de acuerdo con la normativa aplicable.

El Centro dispone de equipos, instrumentos y patrones de calibración y/o materiales de referencia necesarios para la correcta ejecución de los ensayos. Cada equipo o patrón de calibración tiene asignado un responsable de verificar que los mismos se almacenen y manipulen en forma segura, a fin de evitar deterioros y daños, y de informar al responsable de calidad sobre necesidades de reparaciones y calibraciones. Es responsabilidad del Director Técnico disponer los medios y organizar la capacitación del personal involucrado en el correcto uso del equipamiento y las acciones a seguir en el caso de que un equipo haya sido mal utilizado.

Cada equipo está identificado con una etiqueta donde consta el nombre del equipo, la fecha de calibración y la fecha de la próxima calibración. Todos los equipos usados para los ensayos, y que influyan sobre la exactitud y validez de los resultados, son calibrados y/o verificados y/o controlados antes de ponerse en servicio. El Centro INTI -Procesos Superficiales asegura la trazabilidad de las mediciones con respecto a los patrones nacionales del Sistema Internacional de Unidades de dichas magnitudes, cumpliendo la política definida por el INTI (INTI-SIG CG01 Política y Criterios sobre Trazabilidad Metrológica), excepto en los casos en que esa trazabilidad no existe.

El equipamiento es calibrado, según corresponda, en laboratorios acreditados, en los laboratorios del Centro INTI- Física y Metrología o por personal del Centro habilitado para esa actividad. Se mantiene una ficha de cada uno de los equipos, instrumentos y materiales de referencia en la cual se documenta toda la información que hace a la historia del equipo (mantenimiento, calibración, responsable, etc.). En cada uno de los Procedimientos de Ensayo que forman parte de la documentación del SGC del Centro INTI -Procesos Superficiales se han desarrollado las instrucciones correspondientes para la utilización de los equipos e instrumentos, la preparación de las muestras y la ejecución del ensayo.

Los métodos y procedimientos se seleccionan según la exactitud exigida y de acuerdo con la normativa aplicable. Para la validación de los métodos de ensayo se realizan, según corresponda, las siguientes actividades:

- Actualización permanente de los operadores de ensayo.
- Ensayos sobre materiales de referencia.
- Rotación de operadores (ensayos intralaboratorio).
- Ensayos de intercomparación con otros laboratorios
- Ensayos interlaboratorios.

Para el cálculo de la incertidumbre, en cada ensayo se describe la metodología de cálculo empleada y, en particular, las fuentes de incertidumbre consideradas para cada caso.

Con respecto a las condiciones de seguridad, el Centro ha nombrado un responsable que actúa como facilitador para la implementación de la política de seguridad del INTI que incluye todas las acciones tendientes a minimizar los riesgos vinculados con el tema y al cumplimiento de la Ley N° 19587 sobre Higiene y Seguridad en el Trabajo vigente. En tal sentido el Centro sigue el Procedimiento General de Gestión de Residuos Peligrosos en el PTM.

El acceso a los laboratorios está estrictamente limitado al personal del Centro, personal de la empresa de limpieza asignada al Centro y autorizada previamente, personal de mantenimiento y calibración autorizado previamente, usuarios, o sus representantes y organismos externos reconocidos como consultores o participantes en los ensayos, citados previamente. A fin de asegurar la adecuada limpieza de las áreas de ensayo y el mantenimiento del equipamiento e instalaciones, el Centro INTI -Procesos Superficiales dispone de los servicios de la empresa de limpieza contratada por el INTI para asegurar que se encuentre en condiciones adecuadas para garantizar la Calidad de los resultados de ensayos.

El personal a ser incorporado es evaluado y seleccionado en función de de las necesidades del puesto a cubrir. Esta actividad está a cargo de la Dirección con el apoyo del Coordinador de Unidad Técnica respectiva. Anualmente se elabora y se eleva para su aprobación el Plan de Capacitación de todo el personal del Centro y de acuerdo con las directivas establecidas por la Institución.

La Dirección del Centro verifica el funcionamiento de su Sistema de la Calidad a través de la revisión del sistema, analiza las desviaciones detectadas y determina las acciones correctivas y/o preventivas, junto con las oportunidades de mejoras si las hubiese. La Dirección realiza anualmente la revisión del Sistema.

El Centro INTI - Procesos Superficiales realiza periódicamente auditorías internas con el fin de asegurar que las actividades de la calidad y sus resultados satisfacen los requerimientos preestablecidos, que se aplican en forma efectiva y que son los apropiados para alcanzar los objetivos.

Relevancia del proyecto

La alergia alimentaria es una respuesta exagerada del organismo ante una sustancia del alimento (alérgeno), que es inofensiva para las personas no alérgicas y puede causar diversas manifestaciones (INFOSAN-OMS 2006). Estas pueden ser a nivel respiratorio, cardiovascular, cutáneo y gastrointestinal de distinta severidad, que en los casos más graves puede llegar al shock anafiláctico y muerte. La alergia tiene en su origen un mecanismo inmunitaria y existe mucha variabilidad en los niveles umbrales de tolerancia entre las personas afectadas y según el tipo de alérgeno. A nivel mundial, entre 220 y 250 millones de personas pueden sufrir de alergia a los alimentos (Fiocchi y col. 2011); según un informe realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), la prevalencia estimada en la población general es del 1 al 3% en los adultos y del 4 al 6% en los niños. No existe un tratamiento apropiado para las alergias alimentarias, las personas alérgicas deben afrontar de por vida la necesidad de evitar alimentos específicos.

La responsabilidad de la industria agroalimentaria, en relación a la prevención de estos episodios, debe ser la de identificar cualquier ingrediente o aditivo alergénico, incluso a nivel de trazas, y luego asegurar su remoción, o bien declararlo en el rótulo del envase del alimento debido a que las personas alérgicas pueden sufrir reacciones como consecuencia de la presencia oculta del alérgeno en el producto que ingieren. Las alergias e intolerancias son ahora bien reconocidas como un problema de inocuidad alimentaria que debe gestionarse como parte integral del Sistema de Gestión de Inocuidad Alimentaria. Para esto, se debe contar con sistema eficaz de gestión de alérgenos en el que se deben tener en cuenta todas las operaciones, desde el suministro inicial de materias primas hasta la fabricación y el envasado del producto terminado, incluyendo el desarrollo de nuevos productos (Boye y Godefroy, 2010). La limpieza es uno de los aspectos más críticos para evitar contaminaciones cruzadas durante la elaboración de alimentos, por lo que las organizaciones deben contar con procedimientos de limpieza debidamente documentados y validados que aseguren la remoción de los alérgenos de los equipos a niveles aceptables (Arrowsmith, 2011). También deben contar con procedimientos de verificación, es decir aplicación de métodos, procedimientos, pruebas y otras evaluaciones, además de la vigilancia, para determinar si una medida de control está o ha estado funcionando de la manera prevista según el método propuesto. Para ello, se debe contar con métodos analíticos validados, es decir demostrar con evidencias analíticas que los protocolos de gestión de alérgenos son eficaces.

En la actualidad, los métodos analíticos para verificación de limpieza más usados en el mercado son los enzimoimmunoanálisis (ELISA). Los ELISA son importados, de costo elevado y requieren de 30 a 60 minutos de análisis. En este trabajo, se pretende desarrollar un método alternativo, más rápido y económico, para la detección de β -lactoglobulina (BLG), una de las principales proteínas alergénicas de la leche, utilizando muestras de agua de enjuague de equipos para la verificación rutinaria de limpieza, en el marco de la gestión de alérgenos. El Bioinsumo a desarrollar en el presente proyecto, al igual que los Kits de ELISA empleados para la cuantificación de alérgenos en alimentos, no requiere registro en ANMAT, ni en ninguna otra institución para su fabricación y comercialización. Para su inclusión en el mercado, deberán realizarse los protocolos de validación empleados normalmente para técnicas analíticas. Esto permitirá probar su desempeño y compararlo con las técnicas existentes en el mercado, conocidas por los consumidores.

La calidad en el ámbito analítico puede definirse como un conjunto de características, propiedades, atributos o capacidades de una entidad que la hacen mejor, peor, o igual que otras entidades del mismo tipo (Cuadrado, 2016). Se habla de propiedades o características que sirven para evaluar la calidad analítica, que engloba la calidad de los resultados, del proceso analítico y de los materiales y equipos utilizados. Básicamente existen cuatro acciones para el aseguramiento de la calidad analítica: calibración del instrumental a usar, validación del método, verificación de los instrumentos, y realizar controles de calidad de los resultados (Hernández, 2013). Además, todos los laboratorios de química analítica, deberán asegurar su calidad y competencia mediante el cumplimiento de los sistemas de calidad vigentes, siendo la norma ISO 9001 y la norma ISO 17025 necesarias de implantación y cumplimiento en el ámbito analítico. La guía Eurachem (Eurolab, 2016) engloba todos estos aspectos en seis principios de las buenas prácticas analíticas. En ellos, se describe que son necesarias medidas analíticas para satisfacer los requisitos acordados "fit-for-purpose", la necesidad de la utilización de métodos y equipos probados (validación, calibración y verificación), la evaluación del desempeño técnico del laboratorio mediante controles de calidad, la obligación de la definición de procedimientos adecuados de control y, por último, el aseguramiento de calidad.

Aunque existen muchos alimentos que pueden provocar reacciones a las personas con alergias alimentarias, se identifican ocho alimentos alergénicos más comunes que dan cuenta del 90 % de las reacciones alérgicas y constituyen la fuente de los que se derivan muchos otros ingredientes, estos son leche, huevo, pescado, crustáceos, frutos secos, maní, trigo y soja (US-FDA). De estos principales alérgenos alimentarios, la leche es uno de los principales alérgenos que afectan a la población infantil, con una prevalencia aproximada de entre el 1 y 15 % (Fiocchi y col. 2010). En el presente proyecto nos centraremos en la BLG, una de las proteínas

mas alergénicas de la leche junto con la caseína. La caseína representa el 80% de las proteínas totales de la leche y la BLG entre el 10% y el 20% de las proteínas del suero lácteo. La BLG es termolábil, pero relativamente resistente a la hidrólisis ácida y a la digestión por proteasas, lo que permite que algunas moléculas queden intactas después de la digestión y sean absorbidas, estimulando el sistema inmunitario.

En el mundo existen numerosas legislaciones sobre alérgenos alimentarios; en particular en el Codex Alimentarius, codex stan 1-1985 “Norma general para el etiquetado de alimentos preenvasados” se listan los ingredientes que causan hipersensibilidad y deben ser declarados (cereales que contienen gluten, crustáceos, huevo, pescado, maní, soja, leche, nueces y sulfitos, y derivados de ellos). Algunas otras regulaciones son el Reglamento de la Unión Europea (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, en USA la Ley sobre el Etiquetado de Alérgenos Alimentarios y Protección al Consumidor, de la Food and Drug Administration (FDA) 2004 (FALCPA), en Japón la Consumer Affairs Agency, Government of Japan y la Legislación de Rotulado de Alérgenos – RDC 26/2015 ANVISA en el caso de Brasil. Si bien existen puntos comunes en los alérgenos más relevantes, las legislaciones de los distintos países presentan diferencias respecto a los alérgenos de declaración obligatoria basados en las prevalencias geográficas. En ninguna de las legislaciones existen dosis de referencia (umbrales) definidas. En ausencia de niveles umbrales, la industria trabaja con los niveles de detección de los kits comerciales y sus planes de gestión.

En nuestro país, el Código Alimentario Argentino (C.A.A.), en su Art. 235, 7º establece que los alérgenos deberán ser declarados a continuación de la lista de ingredientes del rótulo siempre que ellos o derivados de ellos estén presentes en los productos alimenticios envasados, ya sean añadidos como ingredientes o como parte de otros ingredientes. La legislación también establece la forma de declaración obligatoria (frases a utilizar, tamaño). Por lo tanto la necesidad de gestionar los riesgos potenciales de los alimentos alergénicos en un entorno de producción de alimentos es de gran importancia en todos los eslabones de la cadena alimentaria.

OBJETIVOS Y ALCANCE

Objetivo

Elaborar un proyecto que sirva como punto de partida para el desarrollo de métodos para la determinación cuantitativa de β -lactoglobulina (BLG) empleando membranas nanoporosas.

Alcance

Descripción del proyecto para el trabajo de desarrollo de un método de verificación de limpieza de alérgenos.

METODOLOGÍA

Descripción del método

El método propuesto plantea generar un insumo que consistirá en una membrana de un material polimérico con canales perfectos de medidas y número definidos obtenidos por medio de radiaciones ionizantes (Fig. 1a). Dentro de los canales se inmovilizarán, por medio de modificaciones químicas y derivatización con N-hydroxysuccinimide (NHS), anticuerpos específicos que reconozcan el analito de interés (anticuerpos policlonales anti- BLG), constituyendo en su conjunto lo que pasaremos a llamar “membrana” (Fig. 1b). La membrana se colocara en un portafiltro jeringa o en otro sistema de filtración con vacío y se filtrará un volumen determinado de muestra. Como sistema de detección se usará un anticuerpo específico marcado (método captura) o analito marcado (método competitivo) que será filtrado en un paso siguiente. Se incluirán pasos de lavados intermedios y todas las etapas se realizarán sin desmontar el sistema de filtración usado. El método propuesto pretende obtener un resultado en no más de 15 minutos. En la figura 2 se puede observar un esquema del método propuesto.

Figura 1. Membrana polimérica con nanocanales.

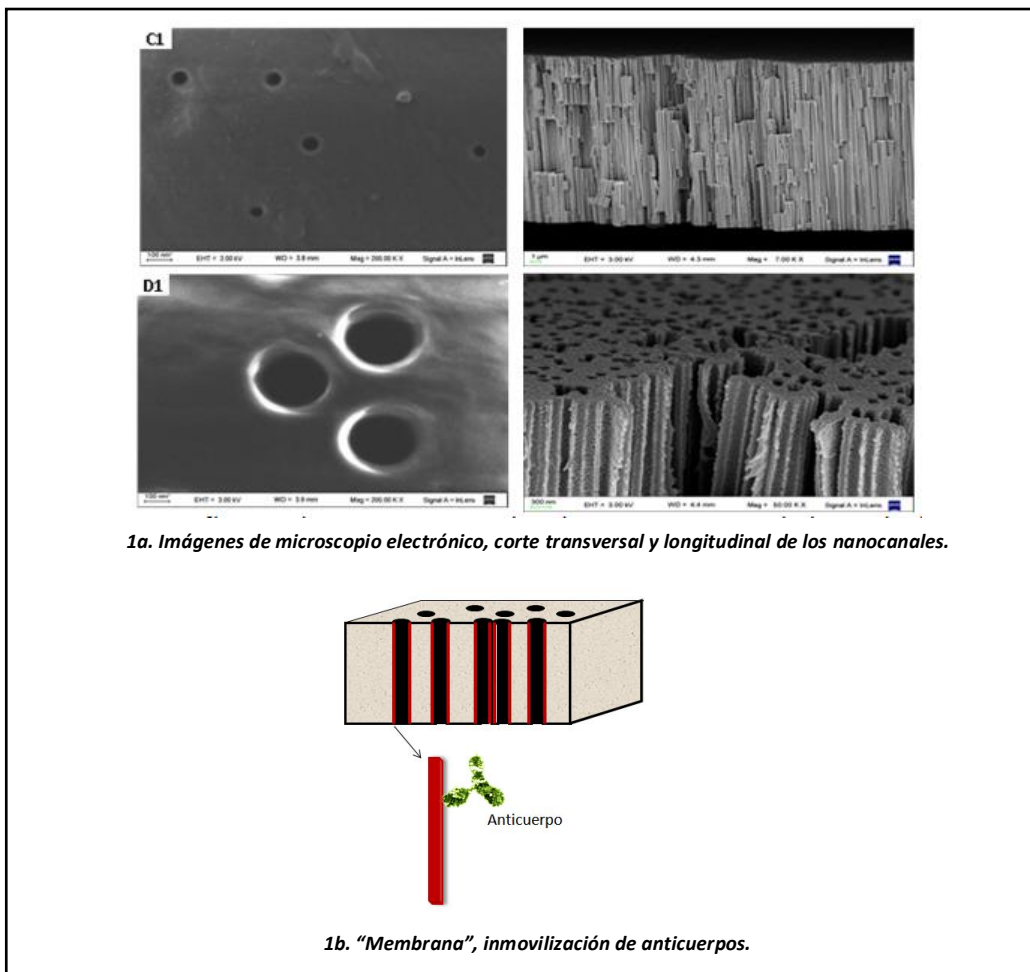
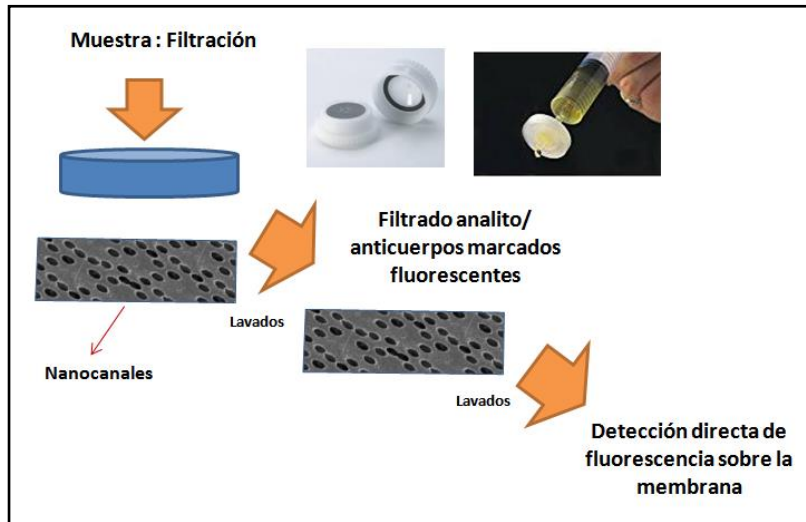


Figura 2. Esquema del método propuesto



Desarrollo del proyecto

Teniendo en cuenta el marco en el cual se encuadra el presente trabajo, el proyecto será dividido en varias etapas para su implementación. En primera medida, se deberá llevar a cabo el control de la calibración del equipamiento a utilizar para garantizar la veracidad de los resultados a obtener, utilizando métodos normados y materiales de referencia adecuados para la correcta trazabilidad de las mediciones. En este caso, el equipamiento a utilizar será una balanza analítica (AB204-S Mettler Toledo), un lector de fluorescencia (Cytation 5) y material volumétrico. Según el SGC del centro INTI- Procesos Superficiales se deberá proceder según los documentos PG 14 "Aseguramiento de la calidad de los resultados de calibraciones y ensayos" y PG 08 "Control de equipos".

Una vez confirmado el correcto funcionamiento y calibración de los equipos, en la segunda etapa, se procederá al desarrollo del método y a su puesta a punto, proceso en el cual se ensayarán los parámetros apropiados para la detección del antígeno: mecanismo, reactivos, insumos necesarios. En primer lugar, se deberá confirmar el correcto reconocimiento de los anticuerpos sobre el antígeno, dado que este reconocimiento es fundamental para el método. Teniendo certeza de la correcta reacción antígeno- anticuerpo, se realizarán pruebas ensayando diferentes volúmenes y flujos de filtración, así como varios buffers de lavado y concentraciones de reactivos para lograr optimizar los parámetros de detección. Además, se evaluarán concentraciones de analito para estimar el rango de detección del método y se harán pruebas con diferentes fluoróforos para comparar y seleccionar aquel con mayor sensibilidad y menor ruido. La lectura de los resultados será en unidades relativas de

fluorescencia (RFU) y las mismas se relacionarán con valores determinados de concentración de BLG, realizándose una curva de calibración que servirá posteriormente para la determinación de los valores de concentración de las muestras.

Según la norma ISO/IEC 17025, los laboratorios deben validar todos los métodos que se utilicen, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios; por lo tanto, una vez determinados los parámetros del método, en la tercera y última etapa, se procederá a la validación del método. La validación de un método analítico es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Examina las características de desempeño del método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse cuando se aplique (Rius y col., 2000). La validación demuestra que los cálculos y condiciones de medición incluyen todos los factores que pueden afectar significativamente los resultados. En este caso, para la validación se utilizarán muestras de agua de enjuague y los indicadores de calidad a evaluar serán (Compañó y Ríos, 2002; Method validation Course 0072):

- Selectividad/ especificidad: son medidas que calculan la fiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. Selectividad, es una medida de la capacidad de un método analítico de diferenciar entre el analito de interés y otros componentes que pueden estar presentes en la muestra, como impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz. Especificidad es la propiedad de un procedimiento analítico de determinar solamente el analito de interés. Esto se evaluará comparando muestras que contengan el analito y muestras negativas que no contengan el analito de interés. Se analizarán muestras con cantidades agregadas de algunas posibles interferencias en presencia de la BLG y se evaluará si la presencia de la interferencia aumenta o inhibe la detección o cuantificación del analito.
- Límite de detección (LD): es la mínima cantidad de analito que puede ser distinguida del fondo con cierto nivel de confianza especificado. Para un resultado analítico que es muy cercano al valor del blanco, se plantea la duda de si el valor corresponde a valores aleatorios del blanco o a la presencia real del analito. La señal de fondo es producida por el blanco y exhibe ruido. Los valores por encima del LD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo del LD son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables. EL LD se calculará como 3 veces la dispersión, expresada como desviación estándar, a partir de mediciones repetidas del blanco.
- Límite de cuantificación (LQ): es la mínima cantidad de analito que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un dado nivel de confianza. Para

el análisis cuantitativo debe quedar absolutamente claro que sólo se emplean valores atribuibles al analito. Para obtener el LQ se multiplicará entre 3 y 10 veces el límite de detección según un nivel de confianza a determinar.

- Linealidad y rango: la linealidad de un método define su aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito, el rango lineal es el rango de concentraciones de analito para las cuales el método brinda resultados proporcionales a la concentración. En el extremo inferior del rango de concentraciones, los factores limitantes son los valores del LD y/o del límite de cuantificación mientras que en el extremo superior del rango de concentraciones, las limitaciones aparecen por efectos varios que dependen de la respuesta del instrumento. Se utilizará el procedimiento según el Organismo Argentino de Acreditación, primero se medirá 1 blanco y 6 concentraciones diferentes del analito, se representará la señal obtenida en función de la concentración y se determinará el ámbito lineal y los extremos superior e inferior del intervalo de trabajo. Luego se repetirá la medición con al menos 6 concentraciones diferentes, dentro del rango lineal, se graficarán nuevamente y se calculará el coeficiente de regresión apropiado.
- Exactitud: indica que tan cercano es el resultado obtenido con respecto al valor verdadero o de referencia. Para calcular este parámetro se deberá usar un material de referencia certificado, preferentemente con una matriz semejante a la de la muestra, en este caso la matriz será agua. Se realizarán un mínimo de 10 repeticiones del ensayo 3 días consecutivos y se comparará el promedio de los valores obtenidos (\bar{X}) con el valor de referencia certificado (μ), teniendo en cuenta la incertidumbre asociada de ese material. El resultado será el módulo de la diferencia $|\bar{X}-\mu|$. En el caso de no existir un material de referencia se realizará un ensayo de recuperación, utilizando muestras fortificadas, es decir, con agregado de analito en una concentración conocida. Se calculará el % de recuperación como la concentración media después de la fortificación (C_2) menos la concentración media de la muestra original (C_1), dividido la concentración añadida o fortificada (C_{nom}) $\rightarrow \%RECUP = (C_2-C_1)/C_{nom} \times 100$.
- Precisión: es el grado de concordancia entre resultados de análisis independientes obtenidos bajo condiciones establecidas. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar. Se mide como Repetibilidad (mismas condiciones de medición: mismo analista, instrumento y día) y Reproducibilidad (diferentes condiciones de medición: distintos analistas, instrumentos y días). Se calculará mediante la medición de un número significativo de alícuotas, y dado que la repetibilidad y la reproducibilidad dependen de la concentración de analito, deberán determinarse para varias concentraciones.

- **Robustez**: es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y que provee una indicación de su fiabilidad durante su uso habitual. Permite identificar aquellas variables que provocarán cambios significativos y que deberían ser controladas más estrictamente. Se modificarán deliberadamente algunos parámetros y se observará que no hayan variaciones significativas en el resultado.
- **Incertidumbre**: es el último parámetro que se debe calcular, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando. Generalmente es una desviación estándar o un intervalo de confianza y su estimación toma en cuenta todos los efectos reconocidos que operan sobre el resultado. Sin esa indicación, los resultados de las mediciones no podrían ser comparados, ni entre sí, ni con respecto a valores de referencia, dados en una especificación o norma. El resultado se deberá informar en partes por millón (ppm) y el cálculo se realizará en cuatro etapas, primero se deberán identificar todas las posibles fuentes de incertidumbre, luego se procederá a cuantificar la incertidumbre (standard) de cada fuente, posteriormente se combinarán las incertidumbres y por último se deberá expandir y expresar el resultado.

De esta forma, al concluir con el proceso de validación y, entonces, con el desarrollo de este trabajo, se deberá contar con un procedimiento debidamente detallado y documentado. El mismo estará, por lo tanto, listo para una posterior etapa de transferencia a la industria.

RESULTADOS PREVISTOS

Como resultado de la realización del presente proyecto se espera obtener un sistema lo suficientemente sensible como para ser competitivo con los kits comerciales existentes en el mercado para la detección de BLG en aguas de enjuague de equipos. Se espera que al finalizar el proceso, el método sea trazable, se pueda establecer el resultado previsible de su comparación directa con los patrones apropiados, mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones reales, todas con incertidumbres conocidas y realizando cada paso según procedimientos documentados y posteriormente registrados. Es decir, se espera que el método esté debidamente validado y documentado.

Por otro lado, de ser exitoso el desarrollo del método, se espera que el mismo pueda ser incorporado a un plan de gestión de alérgenos en las industrias alimenticias, apuntando principalmente a pequeñas y medianas empresas. En particular, se prevé su implementación en la etapa de verificación de limpieza de equipos, pudiendo ser incluido en procedimientos del sistema de gestión -validación de limpieza- y en análisis de riesgos. Además, se pretende que sea utilizado para asegurar la calidad de los productos y así brindar confiabilidad a aquellos consumidores alérgicos.

CONCLUSIONES

El proyecto desarrolla un trabajo que se llevará a cabo en una organización que cuenta con procedimientos de control de calidad y de aseguramiento de la calidad bien definidos.

La finalidad del proyecto es brindar una alternativa para un problema existente en la industria alimenticia.

Para asegurar la calidad en los resultados analíticos será necesario verificar y calibrar la instrumentación, validar el método analítico y realizar controles de calidad.

En particular, se deberán realizar sucesivos ensayos y mediciones, teniendo en cuenta todos los aspectos de metrología y trazabilidad, y a partir de ello, se pretenderá obtener un método de detección de BLG debidamente documentado y validado, en el cual esté asegurada la calidad de las mediciones.

En este proyecto se implementa el concepto MNPQ (medir- normalizar- ensayar- asegurar la calidad) dado que, mediante repetidas mediciones se pretende desarrollar un método el cual pueda ser normalizado, incorporado en sistemas de gestión de alérgenos, y utilizado para ensayar muestras de agua de enjuague y asegurar la calidad de los productos que se elaboran en líneas de producción con alérgenos alimentarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Arrowsmith, Helen. Validation of cleaning to remove food allergens (Guideline). Campden BRI. December 16, 2011.
- Boye Joyce y Godefroy Samuel Benrejeb. Allergen Management in the Food Industry. 2010. John Wiley & sons. New Jersey. USA.
- Compañó Beltrán R y Ríos Castro A. Garantía de calidad en los laboratorios de química analítica. 1ªed. Madrid: Síntesis; 2002.
- Cuadrado Espejo Manuel. Importancia de la calibración en los laboratorios de Química Analítica. Trabajo de fin de grado en farmacia. Universidad de Sevilla, 2016.
- Eurolab. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 1ª ed. España. 2016.
- Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna SL, von Berg A, Beyer K, Bozzola M, Bradsher J, Compalati E, Ebisawa M, Guzman MA, Li, R. G. Heine H, Keith P, Lack G, Landi M, Martelli A, Rancé F, Sampson H, Stein A, Terracciano L, Vieths S. *Pediatr. Allergy Immunol.* 21 (2010) 1-125.
- Fiocchi A, Sampson HA. "Food Allergy", Section 2.5, in WAO White Book on Allergy, Milwaukee, Wisconsin: World Allergy Organization, 2011, pp 47-53.
- Hernández Revilla, M. Validación de métodos de ensayo y estimación de la incertidumbre conforme a la norma ISO/IEC 17025. Aplicación al análisis de aguas residuales y continentales. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid, Facultad de Ciencias, Departamento Química Analítica, 2013.
- INFOSAN, Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos, Organización Mundial de la Salud. Nota informativa nº 3/2006- Alergias alimentarias, 9 de Junio de 2006.
- ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International standar. Second edition. International Organization for Standarization, 2017.
- Method validation Course 0072. LGC limited. London Kirchmer, C.J. Estimation of Detection Limits for Environmental Analytical Procedures. Chapter 4. American Chemical Society 1988.
- Rius FX, Maroto A., Boqué R, Riu J. La validación de métodos analíticos. Técnicas de laboratorio. 2000; 252, 382-385.
- US- FDA, Food and Drug Administration. Guía para la industria: Guía de Etiquetado de Alimentos, 2016.