



INCALIN- Especialización en Calidad Industrial – Cohorte 2013 – Año 2014

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

MODIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS:

“DETERMINACIÓN DE SULFATO DE AMONIO”

Alumna:

Bioq. Accattoli Claudia Teresa.

Realizado con la orientación de la:

Lic. Patricia A. Gatti

Subgerente de metrología

Gerencia de Metrología, Calidad y Ambiente

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL.

Nota: Se solicita "Confidencialidad" de la información.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.
- 1.2. Ofidios.
 - 1.2.1. Distribución geográfica en nuestro país.
- 1.3. Sueros antiofídicos.
- 1.4. Obtención de sueros antiofídicos.
2. Análisis de la situación de partida.
 - 2.1. Objetivo.
3. Materiales generales.
 - 3.1. Material de laboratorio.
 - 3.2. Reactivos.
 - 3.3. Equipos.
 - 3.4. Material biológico.
4. Desarrollo.
 - 4.1. Determinación de la longitud de onda.
 - 4.2. Validación.
 - 4.3. Protocolo a seguir.
 - 4.4. Documento: Hoja móvil 091-REG-00*-14-***
 - 4.5. Conclusión.
5. Glosario y siglas.
6. Bibliografía.

FIGURAS

FIGURA 1: Serpiente *Micrurus pyrrhocryptus*.

FIGURA 2: Serpiente *Bothrops alternatus*.

FIGURA 3: Serpiente *Crotalus durissus terrificus*.

FIGURA 4: Foto de la realización de la técnica según Farmacopea Brasileña.
Muestra: Antiveneno *Micrurus* S 133. Etapa: Granel.

1. INTRODUCCIÓN.

La Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud ANLIS “Dr. C. G. Malbrán” (en adelante ANLIS) es el organismo dependiente del Ministerio de Salud de la Nación (MSAL), que tiene la misión fundamental de entender en las políticas científicas y técnicas vinculadas con las acciones sanitarias en el ámbito público. El Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB), es uno de los once institutos que forman parte de la ANLIS. El INPB, instituto al cual pertenezco, desarrolla y ejecuta la producción de productos biológicos entre los que se encuentran los sueros: anti ofídicos, destinados al tratamiento por envenenamiento ponzoñoso.

El ser humano vive en permanente exposición a peligros ya sea por introducirse en el ambiente natural donde habitan animales ponzoñosos o bien porque muchas especies de animales han adoptado como hábitat la vivienda del hombre y sus alrededores.

Además del accidente traumático propiamente dicho (mordedura o picadura con la consecuente inoculación de veneno), también hay que tener en cuenta otros factores de riesgo, como la edad, la condición fisiológica del paciente, los cuales pueden modificar la evolución clínica del mismo, luego de la aplicación del suero específico.

1.2. Ofidios.

Los primeros ofidios se encuentran en estratos del Período Cretáceo de hace 120 millones de años. Los ofidios carecen de extremidades, el esqueleto está formado por vértebras con un par de costillas que se enganchan en las placas ventrales, tienen movilidad serpenteante y una gran flexibilidad. El cuerpo está cubierto de escamas córneas en la parte dorsal y de placas en la parte ventral. Es de cabeza triangular, con ojos redondos, de pupila vertical. Posee glándulas salivales que se han especializado como glándulas venenosas. Algunas especies poseen un sensor térmico y la lengua es bífida. La boca puede abrirse enormemente debido a que los huesos de las mandíbulas están unidos por ligamentos elásticos, la mandíbula inferior se une al cráneo permitiendo la separación de la mandíbula superior. Las serpientes tragan a su presa entera, aunque sea de mayor tamaño, sin cortarla ni masticarla, haciéndola progresar por su tubo digestivo. Los dientes están inclinados hacia atrás de manera que el animal introducido en la boca no puede retroceder.

Entre las serpientes más venenosas de nuestro país, podemos mencionar:

a) Género: *Micrurus*. Nombre vulgar “víbora de coral”.

Posee un veneno neurotóxico, que actúa a nivel de los receptores postsinápticos colinérgicos o bien a nivel presináptico bloqueando la liberación de acetilcolina.

Provocando debilidad muscular con compromiso de los músculos respiratorios, pudiendo evolucionar hacia la insuficiencia respiratoria aguda siendo esta complicación causa frecuente de óbito.



Figura 1: Serpiente *Micrurus pyrrhocryptus*.

b) Género: *Bothrops* (6 son las más conocidas) *B. neuwiedi diporus*, *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. ammodytoides* y *B. mojeni*. Nombre vulgar “yarárá”, “víbora de la cruz”, “yarárá ñata”.

El veneno que posee tres acciones: proteolítica, coagulante y hemorrágica.

La primera provoca necrosis y las otras, trastornos en la hemostasia, acompañado de hipotensión arterial y shock (presencia de coagulación intravascular diseminada), agravada por la necrosis tubular renal.



Figura 2: Serpiente *Bothrops alternatus*.

c) Género: *Crotalus*. *Crotalus durissus terrificus*. Nombre vulgar “víbora de cascabel”.

Su veneno tiene tres acciones principales:

- Neurotóxica, por acción de la crotoxina que inhibe la liberación de acetilcolina.
- Miotóxica lesionando las fibras musculares esqueléticas.
- Coagulante que debida a la actividad trombínica consume fibrinógeno y lleva a la incoagulabilidad sanguínea.

Hay manifestaciones sistémicas, musculares pudiendo llegar a IRA (insuficiencia renal aguda), y óbito.

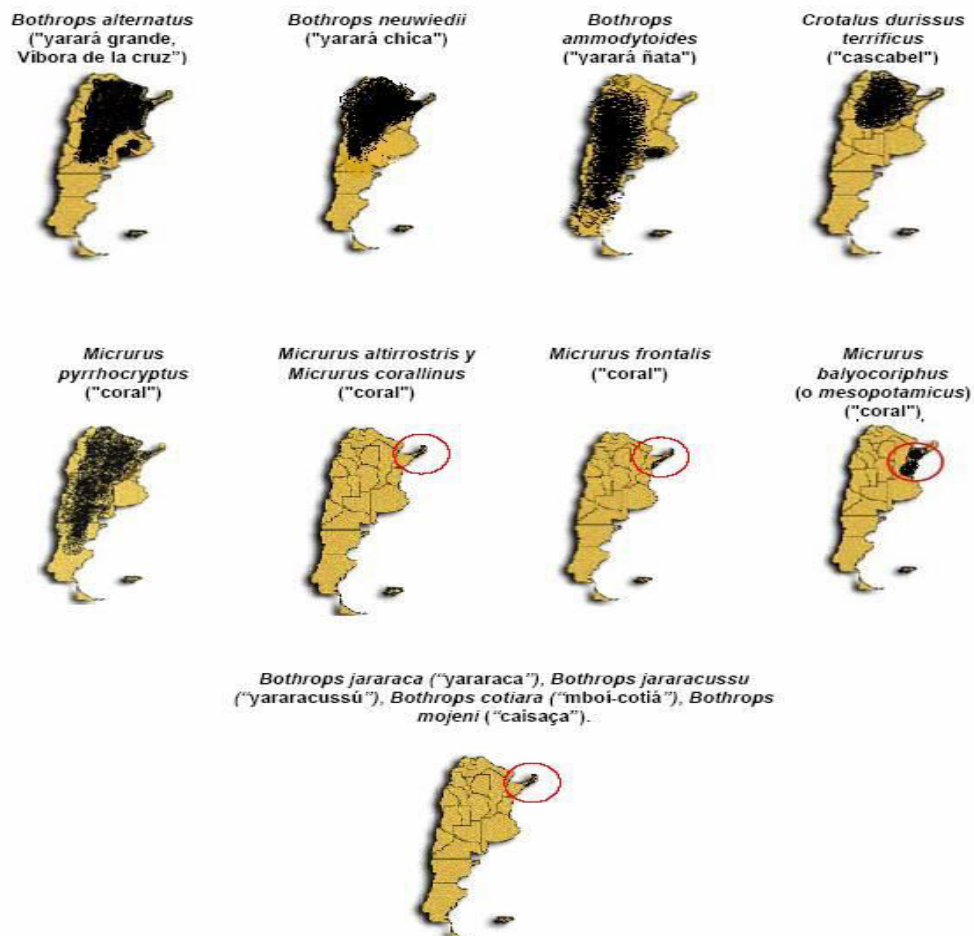


Figura 3: Serpiente *Crotalus durissus terrificus*

1.2.1 Distribución geográfica en nuestro país.

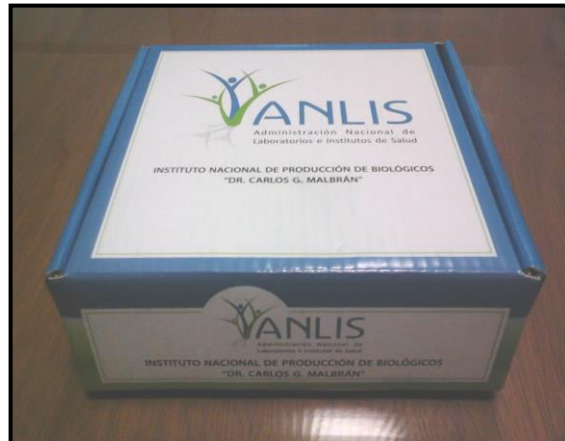
DISTRIBUCIÓN DE LAS SERPIENTES VENENOSAS EN LA ARGENTINA.

Distribución de las serpientes venenosas en Argentina según los hallazgos y los registros históricos.



1.3. Sueros antiofídicos.

Hasta la fecha el tratamiento, de envenenamiento producido por mordeduras de serpientes venenosas, es la aplicación parenteral de los sueros antiofídicos específicos. Se trata de una inmunización pasiva donde se neutraliza la acción del veneno pero no revierte el daño ya producido. Por esa razón es muy importante recibir el suero lo más rápido posible luego del accidente.



1.4. Obtención de Sueros antiofídicos.

El suero hiperinmune de uso terapéutico se puede producir en distintos animales. El caballo suele ser el animal de elección por que puede ser sangrado en grandes volúmenes, se obtienen altos títulos de anticuerpos, es fácilmente adiestrable y de sencillo mantenimiento.

Se realiza un plan de inmunización adecuado y una vez que los animales inmunizados alcanzan un título esperado, son sometidos a un proceso en el cual se les extrae sangre en una cantidad que no comprometa su salud. La sangre es colectada asépticamente con anticoagulante y se deja reposar en refrigeración hasta que las células sanguíneas sedimentan permitiendo separar de ellas el plasma donde se encuentran los anticuerpos. Al plasma obtenido se le adiciona tiomersal como conservante y se almacena en cuarto frío. Para la producción de anti venenos uno de los métodos utilizados es la realización de una simple purificación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio y subsecuente digestión con pepsina.

Luego se agrega fenol, cloruro de sodio, se agita y se deja en reposo 24 horas. El precipitado que se obtiene contiene principalmente fibrinógeno que se descarta. Al sobrenadante se le agrega sulfato de amonio se agita y se deja en reposo, para luego filtrarlo. El precipitado contiene las inmunoglobulinas de interés. Se elimina el sulfato de amonio y se ajusta el pH. Solo deben quedar trazas de sulfato de amonio.

Referencia:

Farmacopea Brasileña (5 Edición <1290-1365> Suero hiperinmune para uso humano). Especificación $\leq 0,2\%$ (p/v).

2. ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN DE PARTIDA.

La técnica de análisis utilizada actualmente en control de calidad fisicoquímico, para determinar la presencia de sulfato de amonio, utilizado en la elaboración de suero hiperinmune, es una técnica semi cuantitativa, colorimétrica, extraída de la Farmacopea de Brasil.

Procedimiento: Diluir una muestra a 1 % (v/v), con agua bidestilada y transferir 10 ml de la solución a un tubo. Transferir 1 ml de solución stock de sulfato de amonio 0,6% (p/v) en matraz de 100 ml, y completar a volumen con agua bidestilada. Diluir a 1:2, 1:3, 1:4 y transferir 10 ml de cada dilución a tres tubos. Adicionar 1 ml de reactivo de Nessler a cada tubo, conteniendo la muestra, los patrones. Dejar 10 minutos en reposo para que desarrolle color, luego comparar. La intensidad de color de la muestra es igual o menor que la solución de patrón diluida 1:3.

Reactivo de Nessler. (Mezclar solución A y solución B, 24 h antes de usar y conservar 10-12 meses en la oscuridad a temperatura ambiente).

Solución A: 23 g de I_2Hg (Ioduro de mercurio) y 16 g de IK (Ioduro de potasio). Disolver ambas drogas llevando a 100 ml con agua destilada.

Solución B: 100 ml de NaOH (Hidróxido de sodio) 6 M.

El reactivo de Nessler ($2K_2 [HgI_4]$), en presencia de amoníaco, se descompone formando yoduro de dimercuriamonio que permite la determinación colorimétrica.

Según la concentración del complejo formado la coloración será:
amarillo-anaranjado ($Hg_2NH_2I_3$)

El resultado de la determinación es una observación visual del color desarrollado al agregar el reactivo de Nessler. Y el analista anota en un registro el resultado.

Problema planteado:

- a) No satisface la forma de registrar el resultado, si bien se confía en el analista que realiza la determinación, el único registro es el resultado que vuelca en el cuaderno de informes de resultados.
- b) ¿Qué pasaría si hay una falla en el proceso de eliminación del sulfato y el color obtenido no pudiera discriminarse fácilmente mediante una observación visual?

Luego de adquirir nuevos conocimientos se observó una oportunidad de mejora. Para resolver la parte a) del problema se aplica el Ciclo de Deming, planificar, hacer, verificar y actuar. Muy útil una vez que se ha identificado el problema.

- a) Se planifica un cambio en la forma de registrar el resultado, se procede a sacar una foto y se guarda el registro de la misma. Luego se analiza para ver si la mejora es satisfactoria.

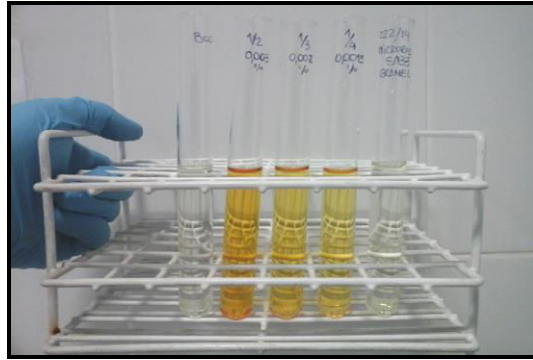
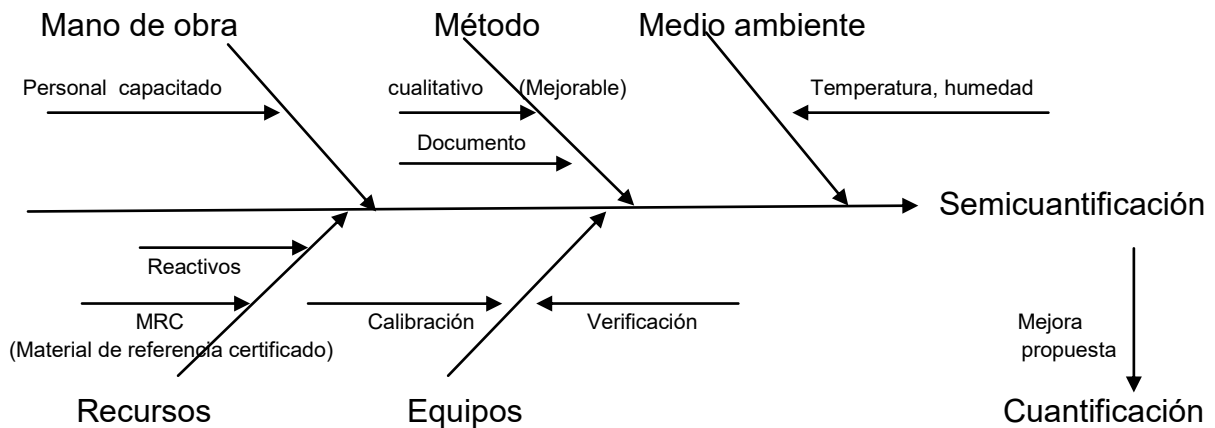


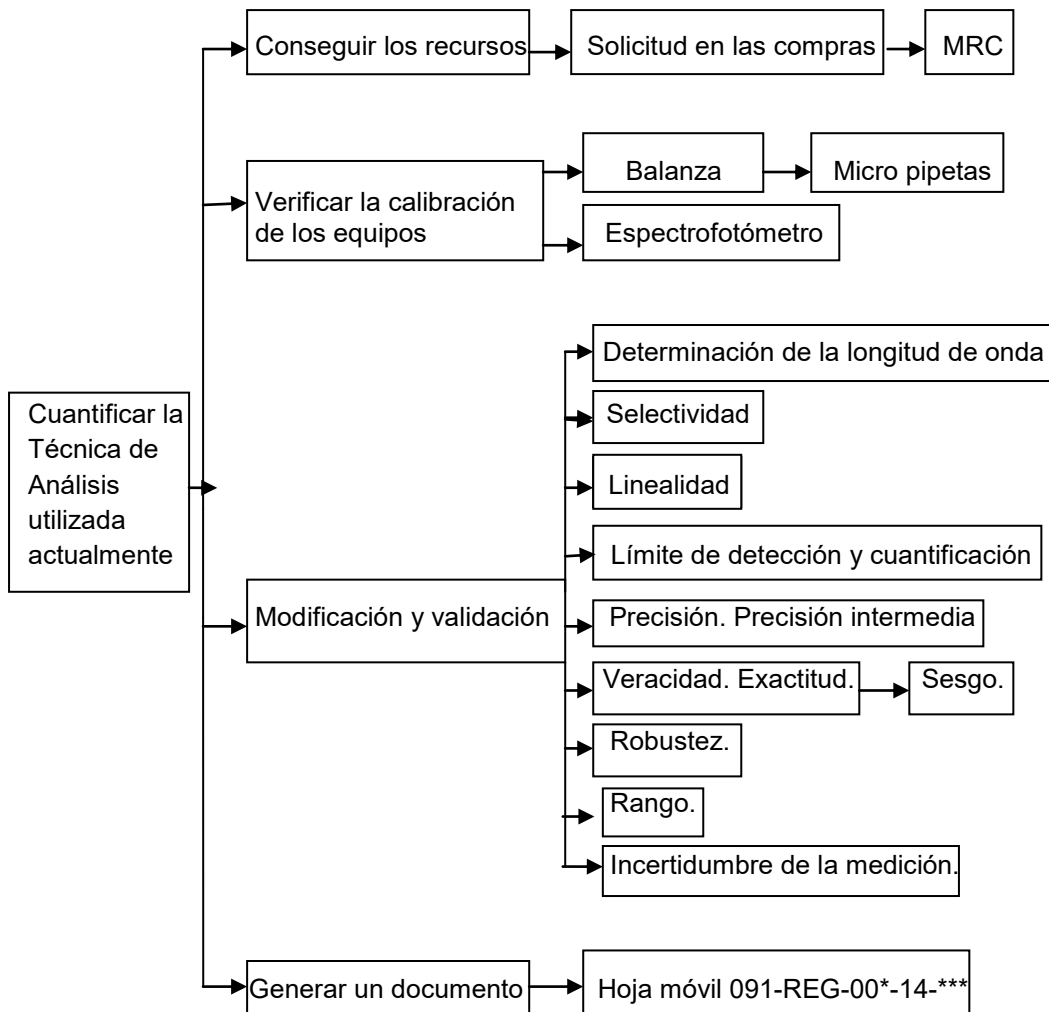
FIGURA 4 – Corresponde a una muestra de Antiveneno Micrurus S 133

Del análisis se puede concluir que si bien se introdujo una mejora, ésta no es suficiente porque una foto digital puede no ser una prueba válida, ya que puede ser modificada con la tecnología actual.

Por otro lado queda por resolver b), para lo cual se realiza un torbellino de ideas y un diagrama de causa – efecto, método atribuido al profesor Kaoru Ishikawa.



Luego se utiliza la herramienta Diagrama de árbol, que es una herramienta muy útil para visualizar los pasos consecutivos a seguir, mostrando que hay que tener en cuenta para asegurar el logro del objetivo. (Ver punto 2.1)



2.1. Objetivo.

Resolver el problema planteado:

Modificación de la medición de la técnica de análisis utilizada actualmente, (Farmacopea Brasileña (5 Edición <1290-1365> Suero hiperinmune para uso humano).

Se plantea en forma teórica como se realizará la validación en una etapa posterior, a futuro, al contar con los insumos requeridos para tal validación. Luego el método así modificado se aplica, siendo la validación del método primordial en sistemas de calidad, asegurando la calidad.

Se presenta una planilla, (Hoja móvil 091-REG-00*-14-***), como modelo del registro de la cuantificación.

3. MATERIALES GENERALES.

Necesarios para realizar el trabajo en forma experimental.

3.1. Material de laboratorio.

- Micropipeta de volumen regulable de (5-50) μ l.
- Micropipeta de volumen regulable de (50-200) μ l.
- Micropipeta de volumen regulable de (200-1000) μ l.
- Pipetas de vidrio Clase A, de 5 ml.
- Pipetas de vidrio Clase A, de 10 ml.
- Propipeta de goma de 3 válvulas o Auxiliar de Pipeteo.
- Tubos de ensayo de vidrio.
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Matraces Clase A, de 100 ml.
- Frasco tipo SCHOTT (Transparente y color ámbar).
- Vasos de precipitados.
- Barra magnética.
- Espátulas de acero inoxidable.
- Tips (puntas plásticas) de 1000 μ l de capacidad.
- Tips (puntas plásticas) de 200 μ l de capacidad.
- Cubeta de cuarzo.
- Piseta plástica.
- Guantes de nitrilo.
- Anteojos de policarbonato como protector ocular.

3.2. Reactivos.

- MRC (Material de Referencia Certificado)
[ICNH 41-1000 ppm ammonium for IC, ICSO 41- 1000 ppm sulfate for IC.](#)
- Sulfato de amonio.
- Mercurio ioduro rojo.
- Ioduro de potasio.

-Hidróxido de sodio.

-Agua bidestilada.

3.3. Equipos.

-Agitador magnético con calefactor.

-Balanza analítica electrónica. (Resolución a la décima de mg).

-Espectrofotómetro UV-VIS.

-Cámara digital.

-Estufa de esterilización. (Rango (30 a 200) ° C).

-Desecador.

3.4. Material biológico.

-Suero hiperinmune: producido en el Servicio “Sueros Terapéuticos” del INPB.

4. DESARROLLO.

Se realiza una verificación de los equipos de medición, antes de su uso, determinando algunos parámetros, dentro de las posibilidades del laboratorio.

NOTA: “Antes de estar dispuesto para servicio, el equipo debe controlarse, y/o calibrarse para establecer si cumple con los requerimientos de las especificaciones de los laboratorios y las especificaciones de normas relevantes. El equipo debe ser controlado y/o calibrado antes de su uso”. [ISO/IEC17025:2005(E). Punto 5.5.2].

Se verifican las cualidades metrológicas de la Balanza analítica electrónica. Una de las cualidades metrológicas a verificar es: Fidelidad (repetibilidad).

- Capacidad para repetir las indicaciones con la misma carga en condiciones estables.
- Se realiza con cargas del 50 y 100% de la capacidad máxima.
- Para evaluar cuantitativamente la repetibilidad se utiliza el desvío estándar de una serie de 10 lecturas.

Para la verificación del correcto funcionamiento del espectrofotómetro.

Se determinan algunos de los siguientes parámetros:

- Control de la exactitud de la longitud de onda.
- Control de la exactitud fotométrica.

- Control de la precisión fotométrica.
- Control de la linealidad fotométrica.
- Control de Luz difusa o parásita.

4.1. Determinar la longitud de onda adecuada para el compuesto formado en la reacción.

La espectrofotometría es una técnica utilizada en los laboratorios para cuantificar numerosos compuestos, debido a su sencillez operativa y a la rapidez en el análisis.

La concentración de una sustancia es calculada a partir de la cantidad de luz absorbida por una muestra, en el rango del espectro del ultravioleta (UV) y visible (Vis) aplicando la ley de Lambert-Beer.

Colores de la luz visible

Longitud de onda. Absorbancia en nanómetros.	Color Absorbido	Color Observado
380-420	Violeta	Amarillo-verde
420-440	Azul-violeta	Amarillo
440-470	Azul	Anaranjado
470-500	Verde-Azul	Rojo

Con el reactivo de Nessler, según la concentración de Sulfato de amonio, se puede observar:

Amarillo: (0,4-5 mg/l) → 400-425 nm.

Pardo rojizo: (>10 mg/l) → 450-500 nm.

Para determinar la longitud de onda adecuada:

- Se prepara una solución de sulfato de amonio en una concentración del rango al cual se trabaja (0,2% (p/v)).
- A partir de esa solución se hace un barrido desde 400-500 nm, y se ve que longitud de onda es la más adecuada.

4.2. Validación.

EURACHEM A33.1

“Confirmación mediante un examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”.

JCGM 200:2008. VIM-3^a

“Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto”.

VALIDACIÓN DE MÉTODO

ISO/IEC 17025:2005 (E) en el punto 5.4.5.1 especifica que:

“La validación es una confirmación por examen y el suministro de evidencias objetivas de que los requerimientos particulares para un uso específico y esperado se cumplan”.

4.3. Protocolo a seguir:

4.3.1. Selectividad.

4.3.2. Linealidad.

4.3.3. Límite de detección y de cuantificación.

4.3.4. Precisión. Precisión intermedia.

4.3.5. Veracidad. (Exactitud). Sesgo.

4.3.6. Robustez.

4.3.7. Rango.

4.3.8. Incertidumbre de la medición.

4.3.1. Selectividad.

IUPAC

“Capacidad de un método para ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices, sin interferencias de otros componentes de similar comportamiento”.

EURACHEM

“La capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidas”.

Puede haber interferencias, que causen un error sistemático en la determinación del analito.

Se evalúa con el análisis de:

- Un blanco de reactivos.
- Una matriz natural o sintética libre de analito.
- Analito puro o en un solvente adecuado.
- La misma matriz con el agregado de una cantidad conocida de analito o una muestra real.
- Potenciales interferencias en presencia de analito.

4.3.2. Linealidad.

EURACHEM

“Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito”.

ICH

“Capacidad de un método analítico de producir resultados que sean directamente, o por medio de una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra”.

Para evaluar si existe relación lineal entre las dos magnitudes se hace una regresión por el método de cuadrados mínimos. Relación existente entre una señal instrumental (absorbancia), en función de la concentración del analito.

Se realizan:

- Seis puntos de distintas concentraciones, igualmente espaciados.
- Cantidad de replicados por concentración: ≥ 3
- Replicados independientes
- Usando analito en solvente o analito en matriz.

- Medidos aleatoriamente.

Se grafican los valores obtenidos, se evalúa la presencia de “outliers”, (puntos aberrantes), se construye el gráfico de los residuos. Se evalúa estadísticamente por cuadrados mínimos, y se obtienen los parámetros de la regresión: ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación.

A partir de la información obtenida en la evaluación de la linealidad se determina para la rutina si solo es necesario calibrar con dos puntos o con varios puntos.

Si la incertidumbre de la regresión es pequeña comparada con otras componentes del proceso de medición, el diseño de la calibración no es crítico.

Si la incertidumbre de la regresión es importante, se tienen en cuenta diferentes factores a la hora de establecer la calibración.

$$u(x_0) = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

X_0 = concentración de la muestra que se analiza.

Promedio (media aritmética)= promedio concentración de estándares.

p = número de veces que se analiza la muestra.

n = número de estándares en la calibración.

4.3.3. Límite de detección y de cuantificación.

Límite de detección (L_D)

EURACHEM

“Menor concentración de analito en una muestra de ensayo que puede ser confiablemente distinguida del blanco”.

Límite de detección (L_Q)

EURACHEM

“Menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con un aceptable nivel de incertidumbre”.

Existen diferentes métodos, enumerados a continuación:

- 1-A partir de la medición de una matriz sin analito.
- 2-A partir de la medición de una matriz fortificada.
- 3-A partir de la recta de calibración.

1- A partir de la medición de una matriz sin analito

Se hacen 10 determinaciones independientes de una “muestra blanco” (matriz sin analito) y se calcula la desviación estándar:

$$L_D = x_b + 3.s \qquad L_Q = x_b + 10.s$$

x_b = valor medio obtenido para la muestra blanco.

s = desviación estándar de los resultados.

2- A partir de la medición de una matriz fortificada.

Se hacen 10 determinaciones independientes de una matriz fortificada a baja concentración y se calcula la desviación estándar de los resultados:

$$L_D = 3.s \qquad L_Q = 10.s$$

s = desviación estándar de los resultados.

3- A partir de la recta de calibración.

A partir de la pendiente de la recta de calibración (b) y de la desviación estándar de la respuesta (s) se calculan los límites de detección y cuantificación con las siguientes expresiones:

$$L_D = 3,3 \ s/b \qquad L_Q = 10 \ s/b$$

4.3.4. Precisión. Precisión intermedia.

JCGM 200:2008. VIM-3^a

“Grado de concordancia entre resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto o de objetos similares, bajo condiciones especificadas”.

EURACHEM

“Es la proximidad de la concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas”.

ISO 3534-1

“La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado. La medida de la precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de prueba. “Resultados de prueba independientes” significa que los resultados fueron obtenidos de tal forma que no son influenciados por cualquier otro resultado previo sobre el mismo o similar objeto de prueba. Las mediciones cuantitativas de la precisión dependen en forma crítica

de las condiciones estipuladas. La Repetibilidad y Reproducibilidad son series particulares de condiciones extremas”.

IUPAC Compendium de Chemical Technology, 1985

“Una medida de la reproducibilidad de las mediciones dentro de una serie, es decir, la dispersión de una serie alrededor de su valor central”.

Precisión intermedia

EURACHEM

“La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio en: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.”. [ICH Q2A, CPMP/ICH/381/95].

Forma de expresar la precisión:

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Desviación Estándar Relativa (RSD) o RSD%, CV%

$$RSD \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Cuando una muestra es ensayada analizando dos o más replicados y el resultado se calcula como el promedio de dichos replicados, la correcta expresión de la precisión es la desviación estándar del promedio.

$$\frac{s}{\sqrt{n}}$$

n= número de replicados

La precisión de un método de ensayo se evalúa en diferentes condiciones.

- Repetibilidad.
- Precisión intermedia.
- Reproducibilidad.

Condiciones de Repetibilidad: el mismo método, la misma muestra (homogénea), en un solo laboratorio, un solo analista, con el mismo equipamiento y en un corto intervalo de tiempo.

Condiciones de Precisión intermedia: el mismo método, la misma muestra (homogénea), en un solo laboratorio, diferentes analistas, con distinto equipamiento y en mayores intervalos de tiempo.

Condiciones de Reproducibilidad: el mismo método, la misma muestra (homogénea), en distintos laboratorios, diferentes analistas, con distinto equipamiento y en intervalos largos de tiempo.

Se analizan materiales de referencia o matrices fortificadas a varias concentraciones a lo largo del rango de trabajo (0,05%-0,30%), 10 determinaciones para cada concentración.

Se informa la desviación estándar para cada concentración.

La precisión de un método se expresa a través del cálculo de la desviación estándar de una serie de resultados. En una validación in-house conviene evaluar la precisión tanto en condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia.

4.3.5. Veracidad. (Exactitud). Sesgo

JCGM 200:2008. VIM-3^a

“Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia”.

EURACHEM

“Es la proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie grande de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado”.

Nota: La medida de la veracidad se expresa por lo general en términos de sesgo. La referencia a la veracidad como “exactitud de la media” no se recomienda generalmente”. [ISO 3534-1].

Para poder evaluar la veracidad el valor de referencia debe ser trazable al (SI) Sistema Internacional de Unidades.

Sistema de unidades basado en el Sistema Internacional de Magnitudes, con nombres y símbolos de las unidades, y con una serie de prefijos con sus nombres y símbolos, así como reglas para su utilización, adoptado por la Conferencia General de Pesas y Medidas (CGPM).

El (SI) está basado en las siete magnitudes básicas del ISQ. Los nombres y símbolos de las unidades Básicas se presentan en la siguiente tabla:

Magnitud básica	Unidad básica	
Nombre	Nombre	Símbolo
longitud	metro	m
masa	kilogramo	kg
tiempo	segundo	s
corriente eléctrica	ampère	A
temperatura termodinámica	kelvin	K
cantidad de sustancia	mol	mol
intensidad luminosa	candela	cd

TRAZABILIDAD

JCGM 200:2008. VIM-3^a

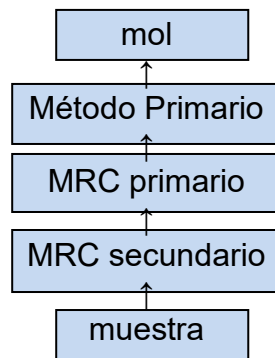
“Propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida”.

EURACHEM

“Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por medio de la cual éstos pueden ser relacionados, con una incertidumbre determinada, a referencias establecidas, generalmente patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones”.

[ISO/IEC Guide 30-1992,3.8].

Trazabilidad química:



La veracidad se evalúa a través de la medición del sesgo (bias), pudiendo expresarse como

DIFERENCIA $\delta = \text{valor medio experimental} - \text{valor de referencia}$

RECUPERACIÓN $\%R = (\text{valor medio experimental} / \text{valor de referencia}) \times 100$

SESGO

EURACHEM

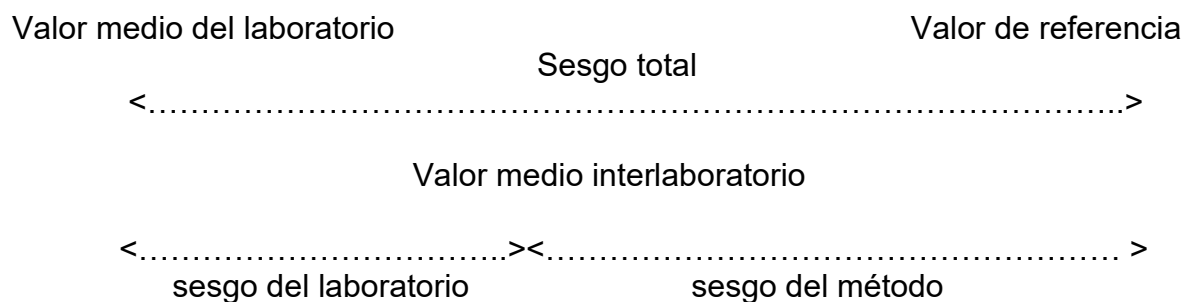
“La diferencia entre el valor esperado de los resultados de prueba y un valor de referencia aceptado”.

Nota: El sesgo es el error sistemático total en contraste con el error aleatorio. Puede existir uno o más componentes del error sistemático que contribuyen al sesgo. Una mayor diferencia sistemática con respecto al valor de referencia aceptado se refleja por un valor de sesgo mayor”. [ISO 3534-1].

“Caracteriza al error sistemático en un procedimiento analítico dado y es la desviación (positiva o negativa) de la medida de los resultados analíticos con respecto al valor verdadero (conocido o aceptado)”.

[IUPAC Compendium of Chemical technology, 1985].

El sesgo del método surge de los errores sistemáticos inherentes al método, cualquiera sea el laboratorio que lo use. El sesgo del laboratorio surge de errores sistemáticos adicionales característicos del laboratorio.



Sin embargo la aceptación del sesgo se decide sobre la base del sesgo total medido contra materiales o métodos de referencia apropiados.

MATERIAL DE REFERENCIA (MR)

EURACHEM

“Material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos como para ser utilizados en la calibración de aparatos, en la evaluación de un método de medición o para asignar valores a otros materiales”.

MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC)

EURACHEM

“Material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza”.

Para la determinación de la veracidad: Se analiza un material de referencia. Se comparan los resultados obtenidos con el valor aceptado para el material de referencia o bien se analiza un material de referencia utilizando el método a validar y un método independiente (si es posible primario).

Se hacen 10 determinaciones.

Comparación con un método de referencia: Se analizan las mismas muestras por el método a validar y por el método de referencia. Se evalúa el nuevo método por medio de una regresión lineal o utilizando pruebas estadísticas. Para ver si hay diferencia estadísticamente significativa entre los métodos.

4.3.6. Robustez.

EURACHEM

“la robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal”.

[ICH Q2A, CPMP/ICH/381/95]

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. Las pruebas de robustez se aplican normalmente para ver la precisión y la exactitud del método.

Para realizarlo se desafía al método realizando variaciones en la preparación de las muestras o en el proceso analítico.

Algunas variables a tener en cuenta son:

- Estabilidad de muestras y soluciones.
- Analistas.
- Marca de reactivos.

Una referencia rápida para realizar las pruebas de robustez es:

Se analizan e identifican las variables que pueden tener un efecto significativo en el desempeño del método. Se establecen experimentos para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente. Se analiza una vez cada serie de condiciones experimentales. Se determina el efecto de cada cambio de condiciones sobre la media. Se clasifican las variables en orden de mayor a menor efecto sobre el desempeño del método.

Como se mencionó anteriormente se estudia la estabilidad del analito, las soluciones de calibración y las muestras. Se evalúa la estabilidad del analito en diferentes condiciones de almacenamiento y tiempo.

Las directivas 2002/657/EC de la UE recomiendan preparar una solución del analito en la concentración de interés como para generar 40 alícuotas. Luego se mide el contenido de esa solución utilizando el método de análisis. (C_0)

Se envasan las alícuotas en recipientes adecuados, se etiquetan y almacenan, de acuerdo al siguiente esquema:

Temperatura	-20°C	+4°C	+20°C
Oscuridad	10 alícuotas	10 alícuotas	10 alícuotas
luz			10 alícuotas

Los tiempos de almacenamiento son: una, dos, tres, cuatro o más semanas, hasta el primer indicio de degradación observable durante la cuantificación.

Se determinan las concentraciones de las diferentes alícuotas (C_1), comparándolas con (C_0).

$$\text{Analito remanente (\%)} = C_1 \times 100 / C_0$$

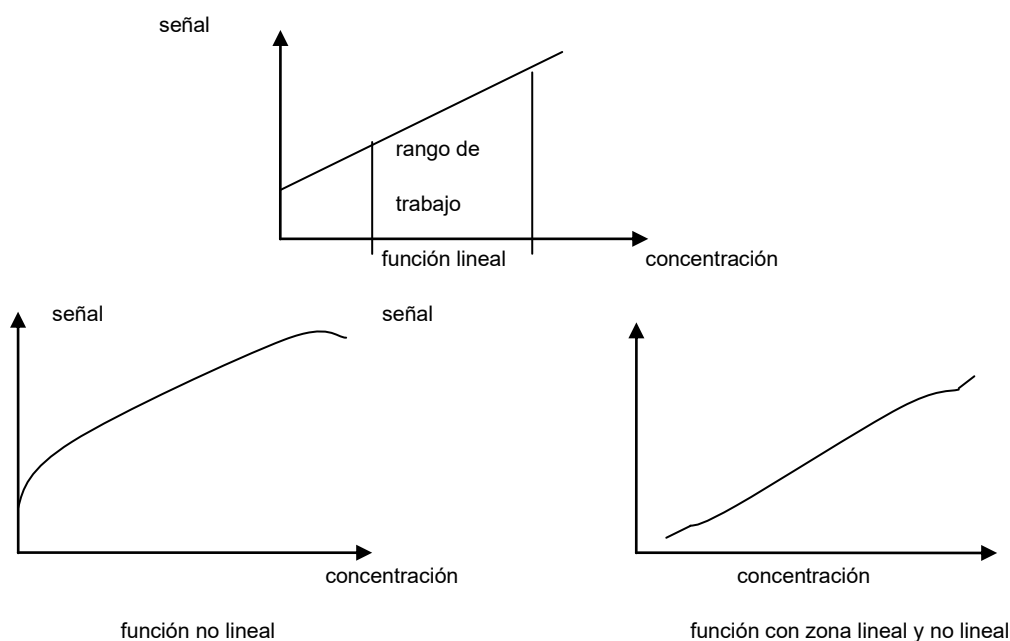
Las mismas directivas de la UE sugieren un tratamiento similar para evaluar la estabilidad del analito en las muestras. Analizar una alícuota inmediatamente y las otras porciones después de 1, 2, 4 y 20 semanas.

4.3.7. Rango.

IUPAC.

“Intervalo de concentraciones de analito dentro del cual se puede considerar al método validado”.

Sobre el significado de este parámetro hay documentos que hacen referencia al rango lineal, y otros al rango de trabajo, el cual puede o no incluir al rango lineal.



En la validación lo más importante es establecer el rango de concentraciones del analito, dentro del cual el método será validado.

4.3.8. Incertidumbre de la medición.

[JCGM 100:2008]

“Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando”.

Es un indicador de la calidad de una medición. Pero esto no significa que una medición con una menor incertidumbre vaya a tener una mayor exactitud del mensurando.

Es importante calcular la incertidumbre para poder comparar resultados entre laboratorios y comparar resultados contra especificaciones o límites regulatorios.

Es un requerimiento normativo según ISO/IEC 17025:2005, en el punto 5.4.6.2:

“Los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición”.

Se debe informar la incertidumbre según ISO/IEC 17025: punto 5.10.3.1 c)

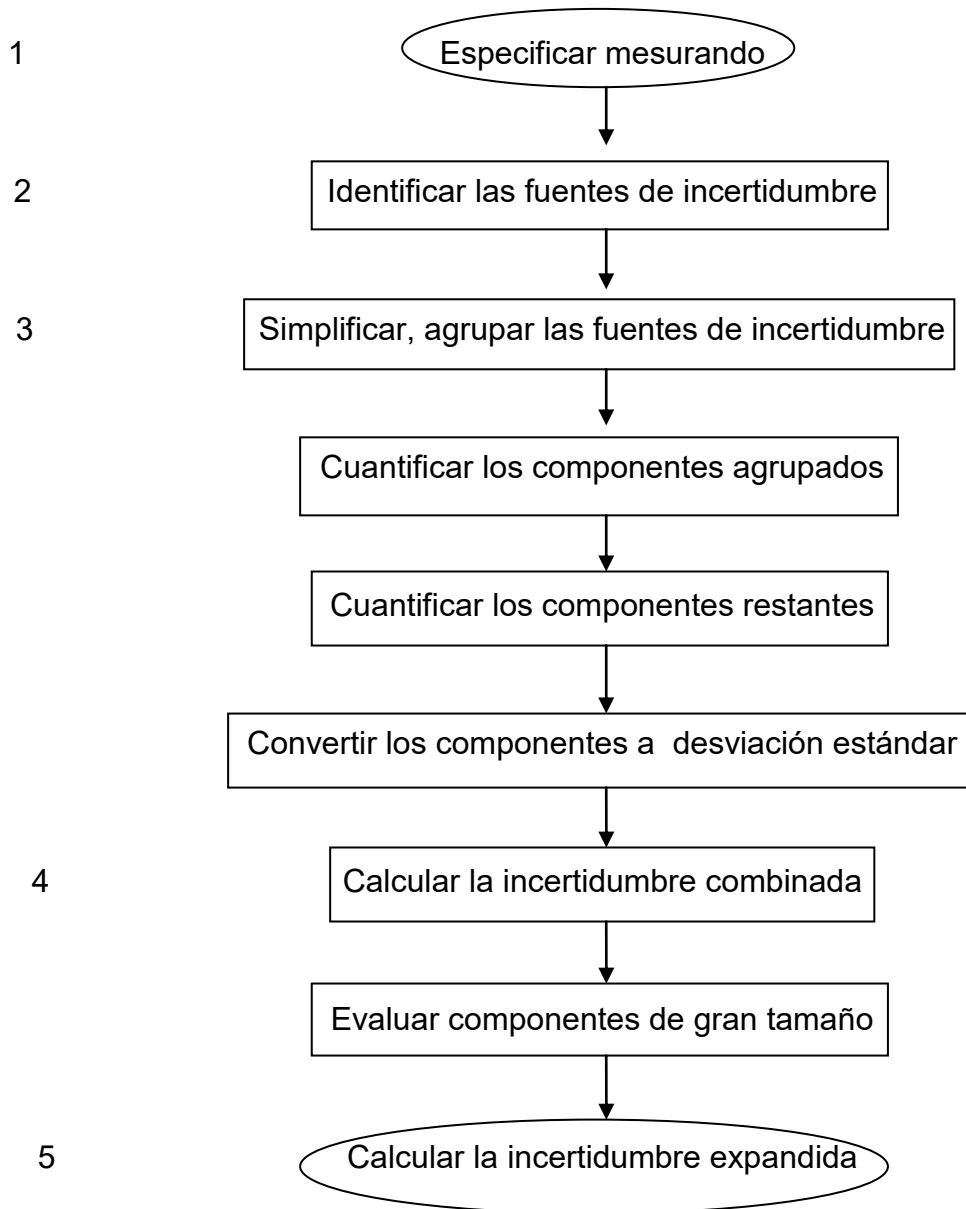
- Cuando lo solicite el cliente.
- Cuando la incertidumbre afecte el cumplimiento con un límite de especificación.
- Cuando sea pertinente para la validez o aplicación de los resultados de los ensayos.

Algunas de las principales fuentes de incertidumbre en el análisis químico son:

- Definición incompleta del mesurando
- Muestreo
- Pureza de los reactivos
- Calibración del instrumental
- Efectos de matriz e interferencias
- Efecto de las condiciones ambientales
- Error en la apreciación en la lectura de un menisco
- Resolución de los instrumentos
- Materiales de referencia.

Para el cálculo de la incertidumbre

EURACHEM.



1) Especificación del mesurando: se define claramente lo que se está midiendo y la expresión matemática que relaciona el mesurando con los parámetros de los cuales depende.

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

y= mesurando (magnitud de salida)

x_i =magnitudes de entrada.

2) Se identifican de todas las posibles fuentes de incertidumbre: se comienza con la expresión utilizada para calcular el mesurando. Puede haber otras magnitudes que no aparecen en la expresión del cálculo y pueden afectar el resultado de la medición, como por ejemplo la temperatura ambiente.

3) Se determina la incertidumbre de cada fuente: se denomina incertidumbre estándar y es la incertidumbre asociada a cada componente, expresada como desviación estándar.

Existen dos formas de evaluación:

- Evaluación Tipo A: determinación estadística a partir de una serie de mediciones.

- Evaluación Tipo B: determinación basada en otros medios. Obtenida de certificados de calibración, de materiales de referencia, manuales de equipos, especificaciones de fabricantes, etc.

Tipo A Por ejemplo: Precisión de la Balanza analítica marca PRECISA ACCULAB modelo ALC 2104 con pesa de 200 g.

Pesa: E2 OIML

Serie AA 9502

certificado SAC Nº 16173-P0313.

Desviación estándar de 10 pesadas = $7,85 \cdot 10^{-5}$ g

S = 0,0001 g

$u_{\text{prec.}} = 0,0001$ g

Tipo B. Se adoptan distribuciones estadísticas basadas en conocimientos previos: distribución normal, rectangular, triangular.

Por ejemplo: variación de la temperatura: ± 4 °C

tolerancia de un matraz de 100 ml: $\pm 0,1$ ml

$u_{\text{tol.}} = 0,1 \text{ ml} / \sqrt{6} = 0,041$ ml

4) Se calcula la incertidumbre combinada.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 \cdot u^2(x_i)}$$

donde: $c_i = \frac{\partial y}{\partial x_i}$ (coeficiente de sensibilidad)

$u(x_i)$ = incertidumbre estándar de la variable x_i

Casos simples:

a) $y = x_1 + x_2$

$$u(y) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2}$$

$$\frac{u_c(y)}{y} = \sqrt{\left[\frac{u(x_1)}{x_1}\right]^2 + \left[\frac{u(x_2)}{x_2}\right]^2}$$

b) $y = x_1 / x_2$

5) Se calcula la incertidumbre expandida.

$$U(y) = k \cdot u_c(y)$$

k = factor de cobertura. Generalmente $k=2$ (95% de confianza)

$U(y)$ se expresa a lo sumo con 2 cifras significativas.

Hay dos metodologías para calcular la incertidumbre.

- ✓ Cuantificación de componentes individuales.
- ✓ Con el uso de datos de validación, QC o interlaboratorio.

En química es común calcularla a partir de datos de validación.

Se utiliza la incertidumbre asociada a la determinación del sesgo del método. Y la incertidumbre asociada a la precisión del método teniendo en cuenta la mayor cantidad de variables posibles: analistas, equipos, material volumétrico, tiempo, lotes de reactivos. (Incertidumbre de precisión = s_{Rw}).

La ecuación a utilizar es: $u(y) = \sqrt{s^2/n + u_{ref}^2 + s_{Rw}^2}$

s = desviación estándar asociada a la evaluación del sesgo.

u_{ref} = incertidumbre del material de referencia usado al evaluar el sesgo.

n = número de mediciones realizadas para evaluar el sesgo.

s_{Rw} = desviación estándar obtenida en el estudio de precisión intermedia.

4.4. Documento.

Hoja móvil 091-REG-00*-14-*** (A modo de ejemplo)

Se presenta el formato de la planilla, con un blanco fortificado 0,10% de sulfato de amonio.

FECHA: dd/mm/aa
 EQUIPO: ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS

HORA:
 MARCA:

LONGITUD DE ONDA (nm):

Ticket con las mediciones.

TUBO	Absorbancia (Y)	Concentración(X)
1		0,05
2		0,10
3		0,15
4		0,20
5		0,25
6		0,30
sumatoria		
sumatoria ²		
promedio		

n
 x*y=
 x2=
 B=
 A=

PROD	ABS	Concentración%	promedio
sulfato 0,10%			
sulfato 0,10%			



Calculo de incertidumbre:

Resultado:.....

Observaciones:.....

Analista:.....

4.5. Conclusión.

Fortaleza: se destaca el nivel profesional, que con los nuevos conocimientos metrológicos, y de gestión de la calidad, adquiridos en el transcurso de estos dos años del posgrado, plantea esta modificación, que lleva a la mejora de la medición. Así como también la generación de un documento donde se registra la cuantificación.

Oportunidad: se presenta el trabajo en forma teórica, para su posterior realización en forma experimental, como posible "Tesis de Maestría".

Además de presentar un impacto sobre el control del suero hiperinmune, la modificación podrá ser transferida al proyecto de "Vacunas Bacterianas ", que la institución lleva adelante.

Siendo de suma importancia en el proceso productivo de uno de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA o API) de la Vacuna Triple Bacteriana Difteria, Tétanos y

Pertussis (Vacuna DTP), donde es necesario ajustar correctamente la cantidad de sulfato de amonio en la fase de purificación del Toxoide Tetánico, sin que se modifique su pureza antigénica.

Debilidad: faltan algunos insumos.

Amenaza: no se cuenta en la actualidad con el MRC, necesario para poder realizar la validación de la modificación (cuantificación) de la técnica de análisis. Siendo parte de la problemática en metrología. Es una amenaza circunstancial asociada a la debilidad.

5. Glosario y siglas

Glosario y siglas	Significado
ANLIS	Administración nacional de laboratorios e Institutos de salud ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.
INPB	Instituto Nacional de Producción de Biológicos.
MSAL	Ministerio de Salud de la Nación.
Vacuna DTP	Vacuna Triple Bacteriana Difteria, Tétanos y Pertussis.
IFA - API	Ingredientes farmacéuticos activos.
CGPM	Conferencia General de Pesas y Medidas.
OIML	Organización Internacional de Metrología Legal.
ICH	Conferencia Internacional de Armonización.
EURACHEM	Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
JCGM 200:2008 VIM -3 ^a	Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados.
MRC	Material de Referencia Certificado
ISO	Organización Internacional de Normalización
JCGM 100:2008	Guía de la Expresión de la Incertidumbre en Mediciones

6. Bibliografía.

- ✓ Farmacopea Brasileña 5 Edición. <1290-1365> Sueros hiperinmune para uso humano.
http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm
- ✓ Ministerio de Salud Resolución 34 de 2007. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos con ofidios.
- ✓ CENAM. Publicación Técnica CNM-MRD-DP-030. Métodos Analíticos adecuados a su propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. Segunda Edición. Desarrollada por EURACHEM. Noviembre 2005.
- ✓ Atlas de Patología humana provocada por la agresión de animales. Dr. Olindo A. Martino, Dr. Tomás A. Orduna, Lic. Manuel O. Espinosa. Buenos Aires 2001.
- ✓ OPS-OMS. Manual de procedimientos. Producción y control de antivenenos. Edición revisada Enero 1977.
- ✓ Curso DGQ (Asociación Alemana para la Calidad). Gestión de la Calidad Enfocada en los Procesos I – Fundamentos. Presentación de la Familia ISO 9000. Documentación.
- ✓ ISO 9000 Medición análisis y mejora. Mejora continua. Papel de las técnicas estadísticas. Términos relativos al proceso y al producto, a la conformidad, a la documentación, a la gestión de la calidad para los procesos de medición.
- ✓ 2002/657/EC de UE.
- ✓ ISO 9001 Realización del producto. Preservación del producto. Control de los equipos de seguimiento y medición. Medición, análisis y mejora. Mejora continua. Punto 8.1 "...incluyendo las técnicas estadísticas y el alcance de su utilización".
- ✓ ISO 9004 Revisión de la información obtenida del seguimiento, medición y análisis. Mejora, innovación y aprendizaje. Uso de técnicas apropiadas estadísticas...punto 8.1.2. y punto 8.4.
- ✓ Curso DGQ (Asociación Alemana para la Calidad). Gestión de la Calidad Enfocada en los Procesos II – Implementación y Evaluación. Herramientas y métodos de Gestión de Calidad.
- ✓ Curso DGQ (Asociación Alemana para la Calidad). El camino hacia la gestión total de localidad. Implementación de la gestión estratégica de personal. Desarrollo de personal. Recursos.

- ✓ Metrología I. Cálculo de Incertidumbre. Especialización en Calidad Industrial. Lic. Fernando Kornblit.
- ✓ Curso DGQ (Asociación Alemana para la Calidad). Métodos Estadísticos para la Toma de Decisiones.
- ✓ Metrología I. Temperatura. Especialización en Calidad Industrial. M. Jiménez Rebagliati.
- ✓ Metrología I. Mediciones de masa. Ing. J. Sánchez.
- ✓ Guía para la verificación de espectrofotómetros UV-Visible utilizados en el análisis de suelo y agua.
- ✓ EURACHEM. www.eurachem.org The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A Laboratory
- ✓ Guide to Method Validation and Related Topics (1998).
- ✓ Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3rd Edition (2012).
- ✓ ICH www.ich.org Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2 (R1)- 2005.
- ✓ IUPAC www.iupac.org Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis- 2002.
- ✓ ISO www.iso.org General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- ✓ BIMP www.bimp.org JCGM 200:2008 Vocabulario Internacional de metrología (VIM) – Conceptos fundamentales y generales, términos asociados.
- ✓ ISO 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- ✓ ISO/IEC www.nist.gov.srm Guide 34-2000 “General Requirements for the Competence of Reference Material Producers”.



Bioq. Accattoli Claudia T.