



UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN

INSTITUTO  
DE CALIDAD  
INDUSTRIAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN  
INSTITUTO DE LA CALIDAD INDUSTRIAL  
ESPECIALIZACION EN CALIDAD INDUSTRIAL  
TRABAJO FINAL INTEGRADOR

***IMPLEMENTACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO PARA VALIDAR  
METODOS ANALÍTICOS EN UN LABORATORIO DE SERVICIO A  
TERCEROS DEDICADO AL ANÁLISIS DE MUESTRAS  
MEDIOAMBIENTALES***

Autor: Stefany Y. Sanabria Vivas

Fecha: Agosto 2020

## **INDICE GENERAL**

INTRODUCCION GENERAL .....	3
OBJETIVO Y ALCANCE .....	4
PANORAMA GENERAL DE SITUACION ACTUAL .....	4
DESARROLLO.....	5
Condiciones ambientales .....	7
Selección de Muestras.....	11
Parámetros Involucrados en la Validación de Metodos .....	11
Selectividad .....	11
Linealidad .....	12
Precisión .....	13
Veracidad.....	14
Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) .....	15
Incertidumbre.....	17
Informe de validación de Método de Ensayo .....	20
Revalidación de métodos de ensayo .....	21
Beneficios esperados como consecuencia de la puesta en práctica de las mejoras planteadas y análisis de la situación final prevista .....	21
Conclusiones.....	22
Bibliografía .....	24

## **INTRODUCCION GENERAL**

Mundialmente es conocido que la base de las decisiones es la información. Hoy en día, en la era de la globalización, la humanidad persigue la mejora en todos los aspectos posibles. Pero hay una particularidad que hay que tener en cuenta: aquello que no se mide no se puede mejorar.

Desde mediciones físicas, químicas, pasando por mediciones sociales o políticas, hoy en día cualquier actividad que se quiera realizar necesita alguna medición antes, durante o después de su ejecución. En este ámbito de mediciones, el enfoque medioambiental es muy importante debido a que se trata de ámbitos normalmente regulados y controlados, y por tratarse de un recurso indispensable para el desarrollo de la vida.

Siendo el ambiente una prioridad en la agenda de gobiernos, sociedad civil y ciudadanos, su importancia es continuamente evaluada y monitoreada por los negocios, influyendo de esta manera en las decisiones de compra, legislación, estándares y reglamentos. Ninguna empresa hoy en día puede permitirse desentenderse del medioambiente. Sea cual sea su sector o ámbito de actividad, las compañías están en una constante búsqueda de minimizar el impacto ambiental y proteger el entorno tanto como sea posible.

En base a lo anteriormente planteando, sostenido en la demanda del mercado para realizar análisis medioambientales el Laboratorio se dedica a proveer servicios de ensayo medioambientales a diferentes industrias locales, y cuenta con profesionales experimentados y comprometidos con las necesidades de los clientes y las autoridades de aplicación. Para ello, la calidad de los resultados es una piedra angular a la hora de garantizar la satisfacción del cliente y la sostenibilidad del negocio. El laboratorio se estableció en la República Argentina en el año 1983. En sus inicios comenzó ofreciendo servicios de ensayo relacionados a la agricultura, eje fundamental de la economía del país. En la actualidad presta servicios activamente en sectores como la minería y el petróleo, la industria automotriz, productos químicos, entre otros.

Específicamente en el área medioambiental, tiene un rol activo en las actividades y proporciona consultoría técnica, supervisiones independientes e inspecciones en muestras representativas de las distintas fases de comercialización y producción de las industrias a las cuales presta servicio.

Las operaciones del Laboratorio de ensayos enfocado a muestras medioambientales tienen un Sistema de Calidad basado en la ISO 9001:2015, cuyo objetivo principal es la satisfacción del cliente y aportar valor en las actividades que realiza. Además, por tratarse de un Laboratorio de ensayo, se rige por los requisitos establecidos en la norma ISO/IEC 17025:2015 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. El

Laboratorio tiene identificados sus procesos principales, de soporte y estratégicos bajo los cuales se realizan las operaciones. Como parte del Sistema de Gestión, se tiene definida una estructura documental que aseguran que las actividades se realicen de manera uniforme. Además, se encuentran establecidos el uso de registros que permiten evidenciar los resultados de esas actividades realizadas.

Todo este basamento normativo no tiene otro fin mas que el de Asegurar las Prácticas profesionales, la validez de los resultados obtenidos, la confidencialidad de la información obtenida y la imparcialidad de sus actividades.

Además de todo lo anteriormente planteado, se parte de la premisa en la que cuando un cliente solicita un trabajo analítico, se supone que el laboratorio tiene un grado de conocimiento técnico que los clientes no tienen. El cliente espera poder confiar en los resultados obtenidos y espera que, ante controversias, los mismos estén respaldados. Esto obliga a las organizaciones a brindar confianza al cliente, proporcionando una respuesta correcta a la parte analítica del problema.

A partir de los requisitos de la norma ISO 17025:2017, donde se establece que los métodos de ensayo deben ser adecuados para el uso previsto y se debe corroborar que el laboratorio puede ejecutar el mismo antes de ser realizado, se parte desde la premisa que la competencia del laboratorio debe demostrarse aun sin informar ningún resultado. Esto representa un desafío a resolver debido a la amplia variedad de métodos de ensayo que se aplican en el laboratorio y las diferentes formas de evaluar estadísticamente los parámetros aplicables en una validación.

## **OBJETIVO Y ALCANCE**

Desarrollar una metodología para estandarizar el proceso de Validación de métodos de ensayo en el Laboratorio, estableciendo los lineamientos para el diseño y planificación de las validaciones, así como el reporte y la interpretación de resultados. Los principales aportes de este trabajo van orientados a la mejora de procesos, a través de la optimización en los tiempos y recursos requeridos para planificación y ejecución de las validaciones. Debido a los amplios rubros en los cuales se desempeña el laboratorio, el alcance de este procedimiento de validaciones se encuentra limitado a Ensayos Medioambientales e incluye muestras de aguas de distinta índole, suelos y aire. Se excluye dentro de las validaciones los parámetros de muestreo.

## **PANORAMA GENERAL DE SITUACION ACTUAL**

La situación actualmente del Laboratorio comprende métodos verificados y validados internamente, pero sin una metodología estandarizada, tanto en el diseño de las validaciones como en la ejecución e informes. Esto supone hoy por

hoy una limitante en cuanto a la planificación, interpretación de metodologías y resultados, así como una complejidad mayor a la hora de elaborar informes.

En base a esto cabe la aclaración de que el punto de partida de este trabajo final integrador considera que se cumplen otros requisitos que son considerados esenciales en las normas como el Control de documentos, la gestión del equipamiento y personal, la adecuación de las instalaciones para los fines previstos, que los patrones/reactivos/materiales de referencia sean de la calidad apropiada según sea el caso, almacenamiento y disposición de muestras, trazabilidad, entre otros.

## **DESARROLLO**

El objetivo general de una validación es demostrar que un método es apto para el uso previsto, no hay que perder de vista que un estudio de validación proporciona beneficios adicionales al laboratorio que lo realiza. Provee un conocimiento sólido y experiencia en los detalles prácticos para llevar a cabo el método, incluyendo el conocimiento de las etapas críticas del proceso. La validación da al laboratorio y a sus analistas una mayor confianza en sus propios resultados.

Existen innumerables decisiones que se sustentan en las pruebas analíticas que realizan los laboratorios del mundo cada día. Actividades como valorar bienes con fines comerciales, apoyar asistencia sanitaria, controlar la calidad de agua potable, medir niveles de contaminantes en efluentes, entre otras se sustentan, de alguna manera, en el trabajo analítico. Para que un resultado analítico permita la toma de decisiones como las descritas anteriormente, debe estar basado en la confianza, y esto se traduce en que el resultado debe ser altamente fiable y apto para su uso.

La norma ISO 17025:2017 en el punto 7.2.5.1 establece que “El laboratorio debe verificar que puede llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de utilizarlos, asegurando que se pueda lograr el desempeño requerido. Se deben conservar registros de la verificación. Si el método es modificado por el organismo que lo publicó, la verificación se debe repetir, en la extensión necesaria”. Para cumplir con esta especificación ya se vienen realizando las validaciones a los métodos de ensayo en la extensión en la cual se considera apropiada, sin embargo, muchas veces es difícil la estandarización del proceso debido a la amplitud de métodos/matrices que son realizados.

Adicionalmente, la misma norma punto 7.2.2 Validación de los métodos a los siguientes aspectos:

7.2.2.1 El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. La validación debe ser tan

amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados.

7.2.2.2 Cuando se hacen cambios a un método validado, se debe determinar la influencia de estos cambios, y cuando se encuentre que éstos afectan la validación inicial, se debe realizar una nueva validación del método.

7.2.2.3 Las características de desempeño de los métodos validados tal como fueron evaluadas para su uso previsto, deben ser pertinentes para las necesidades del cliente y deben ser coherentes con los requisitos especificados.

7.2.2.4 El laboratorio debe conservar los siguientes registros de validación:

- a) el procedimiento de validación utilizado;
- b) la especificación de los requisitos;
- c) la determinación de las características de desempeño del método;
- d) los resultados obtenidos;
- e) una declaración de la validez del método, detallando su aptitud para el uso previsto.

Para llevar a cabo una validación se puede hacer uso de diversas herramientas. La selección de cada una va a depender de la naturaleza del método que se valide, de la complejidad de la matriz, del rango de trabajo, entre muchos otros factores que deben ser considerados. La experticia técnica de la persona que lleve a cabo la validación juega un papel fundamental en la elección de una opción u otra, y puede suceder que, como resultado a los ensayos, se determine que es necesario repetir utilizando otro tipo de herramienta considerada mas idónea. Algunas herramientas que pueden ser utilizadas se listan a continuación:

- Blancos: El uso de diversos tipos de blancos permite evaluar cuanta señal de medida es atribuible al analito y cuanta a otras causas. Existen al menos dos tipos de blancos:
- Blancos de reactivos: se refiere a los reactivos utilizados durante el proceso analítico (incluyendo disolventes usados para la extracción y disolución). Estos se analizan para determinar si contribuyen a la señal de medida. Cuando este es aplicado a todo el proceso analítico, a menudo se conoce como “blanco de ensayo”.
- Blanco de muestra: Se trata de muestras matriz sin presencia de analito. En ocasiones son difíciles de obtener, pero pueden proveer una estimación más real de las interferencias que pueden aparecer en un análisis de muestras de rutina.

- Muestras de rutina: Las muestras de rutina son útiles ya que proporcionan información sobre la variabilidad del proceso, interferencia, etc., que pueden aparecer durante el trabajo diario.
- Soluciones/Material Fortificado: Son materiales o soluciones en los que el analito(s) ha sido adicionado en valores conocidos. La adición debe estar en una concentración tal que no exceda el intervalo de trabajo del método. Hay que tener en cuenta cuando se usa esta herramienta que la adición del analito puede no tener el mismo comportamiento sobre la matriz en comparación con el analito presente naturalmente.

La fortificación no se limita únicamente al analito de interés, sino que también puede ser utilizada para adicionar otros componentes. De esta forma se puede por ejemplo adicionar la muestra con cantidades variables de un interferente particular para evaluar la concentración del interferente a la cual la determinación del analito se ve afectada negativamente.

- Materiales pre-adicionados: Son materiales en los que el analito de interés puede ser básicamente extraño, pero ha sido incorporado en algún momento anterior al muestreo. La utilidad en la validación de muestras pre-adicionadas depende de en que medida el analito puede ser caracterizado.
- Patrones de medida: Son sustancias utilizadas con fines de identificación o calibración. En la práctica puede ser todo aquello en lo cual ha sido caracterizado un parámetro o propiedad particular y que puede emplearse como referencia metrológica. Hay que distinguir entre Material de Referencia (MR) y Material de Referencia Certificado (MRC) ya que su uso en el proceso de validación es diferente.

Los Materiales de Referencia pueden ser cualquier material empleado como valor de referencia. En este caso la propiedad o analito debe ser estable y homogénea pero no necesita contar con el alto grado de caracterización, trazabilidad metrológica, incertidumbre y documentación exigida a los MRC.

La caracterización del parámetro de interés en un Material de Referencia Certificado se controla de manera más rigurosa que un MR, y el valor caracterizado se certifica con un documento que demuestra su trazabilidad metrológica y en el que se declara su incertidumbre. La caracterización se realiza empleando varios métodos o con un procedimiento de medida primario, de modo que se elimine o minimice cualquier sesgo.

### Condiciones ambientales

Un parámetro fundamental para obtener resultados confiables en una validación es el control y monitoreo de las condiciones ambientales. Estas deben ser definidas en un alcance tal que permitan el funcionamiento óptimo del equipamiento, la estabilidad de los reactivos/patrones/materiales de referencia, así como de las muestras producto de análisis.

Controlar las condiciones ambientales podría ser decisivo en los resultados obtenidos producto de una validación, pudiendo producir errores sistemáticos que serían muchas veces atribuibles al método de ensayo. Además, el hecho que los ensayos sean llevados a cabo en distintos días, otorga una variabilidad per se al proceso que, si se ve drásticamente influenciada por factores ambientales, podría llegarse a la errada conclusión que un método no es apto para el uso previsto.

Usualmente es considerado como condiciones ambientales la temperatura y la humedad relativa. En algunas condiciones de ensayo, también la presión podría considerarse un factor más a tener en cuenta.

La tolerancia definida para cada uno de los parámetros debe contemplar las condiciones reales en las cuales se realiza el ensayo en la rutina. Muchas veces será necesario el uso de equipamiento como Acondicionadores de aire, extractores, deshumidificadores, entre otros que van a permitir mantener las mismas en equilibrio ante cambios en el ambiente externo. Este aspecto es particularmente importante en lugares donde suele haber temperaturas y humedades extremas dependiendo de las estaciones climáticas. Un punto que muchas veces no se menciona en los textos porque se da por sobreentendido es que la infraestructura edilicia en general debe permitir el funcionamiento óptimo de los equipos/instrumentos y permitir un flujo acorde de personal y muestras, antes de pensar en validar un método de ensayo.

En el proceso de validación de métodos se considera implícito que los estudios para determinar sus características de desempeño se llevan a cabo empleando equipos que funcionan correctamente, debidamente calibrados y dentro de especificación. Asimismo, se asume que la cadena de trazabilidad metrológica se encuentra garantizada mediante el uso de Materiales de Referencia que poseen trazabilidad a las unidades del Sistema Internacional.

La primera variable a definir en este estudio es poder saber cuál es el ensayo del cual se quiere realizar la validación. Existen una gran variedad de métodos analíticos en el mercado y en todos los casos, dependiendo de sus características van a ser englobados principalmente en 4 grandes tipos.

<b>Tipo de Ensayo</b>	<b>Característica</b>
Ensayos Físicos	Son métodos para medir propiedades físicas de una muestra (densidad, punto de fusión, etc.). Se caracterizan por tener generalmente una corta trazabilidad, la muestra no debe someterse a un tratamiento extenso y en la mayoría de los casos la muestra se introduce directamente en el instrumento de medición
Componentes mayoritarios	Son métodos para medir contenido de una sustancia, o del resultante de alguna reacción química. Casi siempre requieren



	multo-etapas para la preparación de la muestra (por ejemplo: digestión, separación, titulación, etc.). La cadena de trazabilidad en general es un poco mas larga que en el método anterior.
Componentes trazas	Son métodos para medir bajas concentraciones de una sustancia, o del resultante de alguna reacción química. Por requerir trabajar en rangos pequeños de sustancia, muchas veces van a requerir equipos y patrones de alta calidad metrológica para garantizar incertidumbres adecuadas. La cadena de trazabilidad en general un poco mas larga que en métodos físicos.
Ensayos cualitativos	Se refiere a métodos de ensayo donde el resultado es binomial.

En base a esta clasificación se definen cuales son los parámetros que se deben determinar, teniendo en cuenta el comportamiento de este. De acuerdo con la Guía para la validación de métodos del Organismo Argentino de Acreditación (OAA) – Versión 2/Julio 2019 la selección de los parámetros a evaluar se realiza a partir de la tabla a continuación:

Parámetro	Tipo de Método			
	Cualitativo	Componentes Trazas	Componentes Mayoritarios	Propiedad Física
Selectividad	SI	SI	SI	NO
Linealidad	NO	SI	DEPENDE	DEPENDE
Límite de detección	SI	SI	NO	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	SI	SI
Precisión	NO	SI	SI	SI
Veracidad	NO	SI	SI	SI
Rango	NO	SI	SI	SI
Robustez	SI	SI	SI	SI
Incertidumbre	NO	SI	SI	Si

La segunda de las variables a tener en cuenta es el alcance de la validación. Este alcance va a estar definido dependiendo de cuál sea el método de ensayo a utilizar. Se diferencian tres casos de métodos de ensayo de acuerdo a los cuales se definen los parámetros de la validación. Estos métodos son:

- Método de ensayo normalizado: se aplica exactamente como esta definido en la norma. Es importante utilizar métodos que hayan sido publicados por entidades reconocidas (por ejemplo, ISO, IRAM, ASTM, AOAC, AOCS, Standard Methods, entre otros).
- Método de ensayo normalizado modificado: es un método en el cual se hicieron modificaciones a lo descrito en la norma de referencia. Puede

considerarse una modificación de un método normalizado cualidades como: método de extracción distinta, matriz distinta, extensión del rango, uso de reactivos diferentes, entre otros. Cabe destacar que siempre que se utilice como base la norma, pero se realice alguna modificación de cualquier índole, esto debe considerarse un método modificado.

- Método de ensayo interno: es un método desarrollado por el laboratorio y que no se encuentra en otras normas. También se les conoce en algunos casos como métodos “In House”.

La validación debe ser tan extensa que permita conocer las características de funcionamiento del método.

En el caso de los Métodos de ensayo normalizado no requieren de una validación completa. No obstante, el laboratorio debe determinar las características de funcionamiento del método en sus propias condiciones.

Para los Métodos de ensayo normalizado modificado no se requiere tampoco una validación completa. En la mayoría de los casos las modificaciones realizadas en este tipo de métodos solo requieren la necesaria comprobación de su funcionamiento. En los casos que sea necesario, la modificación técnica realizada por el laboratorio deberá ser contrastada aportando evidencia de que no se modifican las propiedades relevantes del método de referencia.

Por el contrario, en los Método de ensayo interno el laboratorio debe validar completamente el método de acuerdo a estándares reconocidos y realizar todo el trabajo experimental que sea necesario para verificar que el mismo es adecuado.

Para esquematizar lo anteriormente planteado, se define el alcance de la validación en cuanto a parámetros a evaluar de acuerdo a la tabla a continuación:

<b>Tipo de método</b>	<b>Parámetros a evaluar (según corresponda)</b>
Método Normalizado	Linealidad, Límites de detección y cuantificación, Precisión, Veracidad, Rango e Incertidumbre
Método basado en un método normalizado	Selectividad, Linealidad, Límites de detección y cuantificación, Precisión, Veracidad, Rango, Robustez e Incertidumbre
Métodos Normalizados No	Selectividad, Linealidad, Límites de detección y cuantificación, Precisión, Veracidad, Rango, Robustez e Incertidumbre

La preferencia es siempre tratar de utilizar en el laboratorio métodos normalizados. Estos métodos han requerido mucho tiempo de investigación, desarrollo analítico y validación coordinado por las entidades y muchas veces realizados por laboratorios de referencia.

## Selección de Muestras

Tan importante como la ejecución de los ensayos y su tratamiento estadístico es la elección de muestras/matrices que serán utilizadas para la realización de la validación. De preferencia se utilizan matrices naturales, en las condiciones que mas se aproximen a las muestras que serán recibidas por el laboratorio.

En algunos casos y de acuerdo a la experiencia técnica del personal y al comportamiento de las variables estadísticas, la matriz a validar puede ser escogida estratégicamente para que permita representar un universo de matrices (este punto es aplicable siempre y cuando no se altere el alcance del método de ensayo).

La decisión de utilizar una matriz y asumir un comportamiento igual en otras puede deberse a conocimiento intrínseco de la misma, a características químicas ampliamente conocidas, a propiedades físicas presentes, a estudios o investigaciones de procedencia fiable cuya conclusión pueda tomarse como aplicable al caso particular o cualquier otra condición que sea considerada por el Laboratorio. Podría darse también el caso de hacer estudios preliminares para decidir si dos o mas matrices son equivalentes entre sí, y tomar la decisión de cual debería ser el alcance de la validación. La cantidad y la extensión de estos estudios debe ser documentada y estar sustentada en información fiable.

Es recomendable que, las condiciones de muestreo para las muestras de rutina se mantengan para las muestras utilizadas para la validación.

A continuación, se detalla de qué manera debería ser evaluado cada parámetro en el caso de realizar una Validación. Tomar en cuenta que en algunos casos pueden ser requeridas particularidades dependiendo de la naturaleza del ensayo.

## Parámetros Involucrados en la Validación de Metodos

### Selectividad

Es una medida de la capacidad de un método analítico de diferenciar entre el analito de interés y otros componentes presentes en la muestra, es decir, se evalúa la confiabilidad de las mediciones en presencia de potenciales interferentes. Al evaluar este parámetro, se debe confirmar si la señal correspondiente a la matriz es despreciable respecto a la del analito.

Es crucial establecer que la propiedad medida solo se debe al analito y no a algo química o físicamente similar, o que surja como una coincidencia, causando así un sesgo en el resultado de medición. Puede ser necesario que la etapa de

medición sea precedida por una etapa de aislamiento para mejorar la selectividad en un sistema de medición.

Cuando los métodos publicados por organismos de normalización son aplicados dentro de su alcance, la selectividad usualmente ha sido evaluada como parte del proceso de normalización.

La selectividad se puede determinar de las siguientes maneras.

¿Qué hacer?	Comentarios
Medir blanco de matriz representativa que contengan interferentes representativos de la muestra a analizar <sup>3</sup> sin el analito de interés y con el analito de interés en baja concentración.	Utilizar por ejemplo para métodos espectrofotométricos, cromatográficos y fisicoquímicos.
Analizar muestras de ensayo y materiales de referencia por el método candidato y otros métodos independientes (métodos normalizados o previamente validados).	Por ejemplo, cuando no se conozcan los interferentes de un método a desarrollar.

En aquellos casos donde el método de medición en evaluación es altamente selectivo, el uso de otras técnicas confirmatorias puede no ser necesario. Esta situación se puede presentar en ensayos donde existen reacciones típicas o ampliamente estudiadas, o donde los materiales están fabricados únicamente para reflejar una variación en la variable a medir en el caso que estén presentes (por ejemplo, ELISA, PCR, entre otros).

### Linealidad

Es la capacidad del método para producir resultados de las pruebas que sean directamente, o por una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de analito en las muestras dentro de un rango determinado de trabajo. La descripción de la naturaleza de la relación entre dos o más variables se llama análisis de regresión y estudia la dependencia de una variable dependiente respecto a una variable explicativa o independiente, con la finalidad de conocer el valor de la variable dependiente respecto a un valor conocido de la variable independiente utilizando la ecuación de regresión.

El intervalo de trabajo y la linealidad del método se evalúan mediante una inspección visual del gráfico, con el apoyo de estadísticas y un gráfico de residuales de una regresión lineal.

El rango lineal es el intervalo entre los niveles mínimo y máximo de analito en que se ha demostrado que el método puede determinar un valor con precisión, veracidad y linealidad. Los rangos generalmente son establecidos por las normas de referencia, y se expresan en las mismas unidades que los resultados

obtenidos por ese método. El rango de trabajo no necesariamente tiene que coincidir con el rango lineal, se puede utilizar sólo una porción de este último.

Tener en consideración que para la evaluación de la linealidad se deben utilizar patrones de concentración conocida en solvente(s) adecuados.

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces?
Preparar curvas de calibración a diferentes niveles de concentración. Al menos 6 niveles distribuidos adecuadamente	Medir 3-5 veces cada concentración.

Calcular las estadísticas de regresión apropiadas. Calcular y graficar y graficar los residuales (la diferencia entre el valor observado de  $y$  y el valor calculado de  $y$  pronosticado por la línea recta para cada valor de  $x$ ). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad o un cambio de varianza con el nivel.

### Precisión

La precisión es la medición en la cual se determina cuan cerca se encuentran unos resultados de otros. La precisión se puede expresar como Desvío estándar, Coeficiente de variación o Intervalo de confianza. Una menor precisión se ve reflejada como un mayor desvío estándar (S).

La precisión se puede considerar a 3 niveles:

- Repetibilidad: es la precisión en condiciones de repetibilidad (mismo laboratorio, mismo equipamiento, mismo método, misma muestra, mismo analista e intervalo corto de tiempo). Se simboliza generalmente con “r” minúscula.
- Precisión intermedia: es la precisión en condiciones de precisión intermedia (mismo laboratorio, mismo equipamiento o diferente, distintos analistas, mismo método, misma muestra e intervalos de tiempo mayores que para la repetibilidad). Se simboliza con las letras “Rw”. En algunos casos también se puede observar simbolizado como “Ri” o Repetibilidad Intermedia.
- Reproducibilidad: es la precisión en condiciones de reproducibilidad (distintos laboratorios, diferente equipamiento, mismo método, misma muestra, diferentes analistas e intervalos largos de tiempo). Se simboliza con generalmente con “R” mayúscula.

La precisión es generalmente dependiente de la concentración del analito, y así debe determinarse en una serie de concentraciones a través del intervalo de

interés. Es importante que las mediciones de precisión se realicen con matrices representativas, es decir, con las matrices que el laboratorio analiza de rutina. Esto permite obtener desvíos estándar que son característicos de la operación del laboratorio en cuestión.

Para calcular la precisión se realiza lo especificado a continuación:

<b>¿Qué hacer?</b>	<b>¿Cuántas veces?</b>
Realizar mediciones independientes a varias concentraciones dentro del rango de trabajo.	Cada analista debe hacer entre 6-15 repeticiones de cada concentración y/o variable a cambiar.

Se debe comparar el valor de repetibilidad con el establecido en la norma de referencia (siempre en las mismas unidades). El valor de repetibilidad del laboratorio debe ser menor o igual al establecido en la norma, para que el mismo sea apto para su uso. Este criterio también es aplicable si se comparan valores de precisión intermedia y/o reproducibilidad.

Para los métodos cualitativos, la precisión no se puede expresar como una desviación estándar o desviación estándar relativa, pero puede expresarse como tasas de verdaderos positivos y negativos.

### Veracidad

La veracidad es el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor aceptado como referencia. La veracidad se puede expresar como recuperación (en %) y/o como sesgo (bias).

En general existen tres enfoques distintos para el cálculo de la veracidad: a) análisis de materiales de referencia, b) experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas y c) comparación con los resultados obtenidos por el otro método.

Los estudios de sesgo deben cubrir el alcance del método y, por lo tanto, pueden requerir el análisis de diferentes tipos de muestras y/o diferentes tipos de analitos.

<b>¿Qué hacer?</b>	<b>¿Cuántas veces?</b>
--------------------	------------------------

Analizar un material de referencia certificado, preferentemente en matriz.	Al menos 10 repeticiones independientes
Medir blancos de matriz o muestras de ensayo no adicionadas y adicionadas con el analito de interés en un intervalo de concentraciones.	Al menos 10 repeticiones independientes
Comparar los resultados obtenidos por el método a validar con los resultados obtenidos por un método de referencia previamente validado.	Al menos 10 repeticiones independientes

La veracidad se calcula como un % de recuperación o sesgo, considerando el valor de referencia del material utilizado/del método de referencia como el valor verdadero. En este último caso hay que tener en cuenta que el método alternativo (método previamente validado) podría estar sesgado en si mismo, en cuyo caso el experimento no brinda una medición absoluta de la veracidad.

### Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

Se define al límite de detección como la menor concentración de un analito en una muestra que puede ser detectada a un dado nivel de confianza, y límite de cuantificación a la menor concentración de un analito que puede ser determinada con una precisión y veracidad aceptable, bajo las condiciones especificadas en un método de ensayo.

Es necesario hacer una diferenciación entre el límite de detección del instrumento y el límite de detección del método. El límite de detección del instrumento puede basarse en el análisis de una muestra, usualmente un blanco de reactivo sometido directamente al instrumento (omitiendo cualquier paso de preparación de muestra), o en la relación señal/ruido. Para obtener el límite de detección del método, el límite de detección debe basarse en el análisis de muestras que hayan sido sometidas a todo el proceso de medición obteniendo resultados calculados con la misma ecuación que para las muestras de ensayo.

Métodos de cálculos de límites para métodos cuantitativos:

- Análisis de matriz blanco.

Esta metodología se puede utilizar en ensayos en los cuales se obtiene una señal medible para un blanco, como puede ser la espectrofotometría y la espectroscopia atómica.

	<b>¿Cómo calcular?</b>
--	------------------------

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces?	Límite de Detección (LD)	Límite de Cuantificación (LC)
Medir replicados de muestras blanco (matrices que no contengan cantidades detectables del analito)	10	Calcular el desvío estándar (S) de los datos obtenidos (donde S está en <b>unidades de concentración</b> ).  LD= 3S'	Calcular el desvío estándar (S) de los datos obtenidos (donde S está en <b>unidades de concentración</b> ).  LC= 10S'
Medir replicados de muestras blanco (matrices que no contengan cantidades detectables del analito)	10	Calcular el promedio $\bar{X}$ y el desvío estándar (S) de los datos obtenidos (donde $\bar{X}$ y S están expresados en <b>unidades de señal</b> ).  LD= $\bar{X} + 3S'$	Calcular el promedio $\bar{X}$ y el desvío estándar (S) de los datos obtenidos (donde $\bar{X}$ y S están expresados en <b>unidades de señal</b> ).  LC= $\bar{X} + 10S'$

Donde:  $S' = \frac{S}{\sqrt{n}}$

- Análisis de matriz con una baja concentración de analito

Esta metodología se puede utilizar en ensayos en los cuales no se puede cuantificar una señal de blanco de reactivos, como puede ser la cromatografía.

		¿Cómo calcular?	
¿Qué hacer?	¿Cuántas veces?	Límite de Detección (LD)	Límite de Cuantificación (LC)
Medir replicados de blancos de reactivos fortificados con baja concentración del analito	10	Calcular el desvío estándar (S) en <b>unidades de concentración</b> y Desvío estándar relativo (RSD) de los datos obtenidos. Multiplicar S por el factor $k_Q$ .  LD= 3S'	Calcular desvío estándar (S) en <b>unidades de concentración</b> y Desvío estándar relativo (RSD) de los datos obtenidos. Multiplicar S por el factor $k_Q$ .  LC= $k_Q \times S'$

Si la desviación estándar es aproximadamente constante a bajas concentraciones el multiplicador  $k_Q$  es igual a 10 (para LC) a una desviación



estándar relativa (RSD) de 10 %. Los multiplicadores 5 y 6 se corresponden a valores de RSD de 20 % y 17 % respectivamente.

- Métodos de cálculos de límites para métodos cualitativos:

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces?	¿Qué calcular/determinar a partir de los datos?
Medir en orden aleatorio muestras blanco enriquecidas con el analito en un intervalo de niveles de concentración	10	Construir una curva de respuesta de porcentajes de resultados positivos o negativos frente a la concentración, de la cual será posible determinar por inspección, la concentración a la cual el resultado se vuelve poco confiable.

Cuando el valor crítico y/o el Límite de Detección son usados para tomar decisiones, la precisión debería ser monitoreada y los límites pueden necesitar ser recalculados de vez en cuando.

### Incertidumbre

Es un parámetro no negativo caracterizado por la dispersión de una cantidad de valores que pueden ser atribuidos al mesurando, basado en la información utilizada (VIM, 2012). La incertidumbre puede ser representada en unidades absolutas o en porcentaje y en general es expresada con un máximo de dos dígitos.

La incertidumbre debe informarse junto al valor en aquellos casos previstos en la ISO 17025 versión vigente.

En una medición individual en una muestra de ensayo en una matriz determinada, se pueden identificar cuatro fuentes de incertidumbre:

- El método en sí mismo
- El método como es usado en el laboratorio
- La variación día a día del laboratorio
- La variación dentro de una corrida analítica (repetibilidad).

La incertidumbre se puede expresar como incertidumbre expandida (U) de acuerdo a la formula a continuación.

$$U = 2 \cdot u_c$$

Dónde:

uc: incertidumbre combinada.

2: factor de cobertura para un intervalo de confianza del 95%

La razón por la cual se calcula la incertidumbre expandida es para alcanzar una confianza suficientemente alta (95%) en el cual el valor verdadero se encuentre dentro del intervalo dado por el resultado de la medición  $\pm$  la incertidumbre.

Para el cálculo de la incertidumbre combinada (uc) según el método Nordtest, se utiliza la siguiente ecuación:

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2}$$

Dónde:

u(R<sub>w</sub>)\*: componente estándar de la incertidumbre para la Reproducibilidad dentro del laboratorio.

u(bias): componente de la incertidumbre asociado con el posible sesgo del método y el laboratorio.

En el caso de la estimación de incertidumbre por el método de Nordtest, el valor se puede obtener por medio de las 3 metodologías definidas a continuación:

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces?
Realizar mediciones del cada Material de Referencia Certificado (MRC)	Medir cada MRC al menos en 5 series analíticas (por ejemplo, diferentes días)
Participar en ensayos interlaboratorios con el método de ensayo y la matriz motivo de estudio.	Utilizar las últimas 6 participaciones satisfactorias.
Realizar el ensayo de muestras fortificadas con un patrón (de concentración e incertidumbres conocidos) a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) y calcular el porcentaje de recuperación.	El número de repeticiones recomendables es de N=20

El valor de incertidumbre muchas veces no se refiere a un criterio de aceptación en sí, pero por el contrario si se considera en muchos casos una medida de la calidad de las mediciones que brinda un laboratorio.

### Robustez

Este parámetro estudia la respuesta del método analítico cuando se introducen pequeñas pero deliberadas variaciones a los parámetros especificados en el procedimiento. La prueba de robustez permite describir en qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias) se pueden obtener resultados confiables.

Cuando se utilizan métodos publicados por organismos de normalización dentro del alcance de aplicación del método, la robustez por lo general ha sido estudiada como parte del proceso de normalización.

Un ensayo de robustez implica hacer cambios deliberados en el método, e investigar el efecto subsiguiente en el desempeño. A continuación, es posible identificar las variables en el método que tienen el efecto mas significativo y garantizar que, cuando se utiliza el método están estrictamente controladas.

Entre las variables analíticas que podrían producir variaciones en un método se pueden encontrar:

- Calidad de los Reactivos
- pH
- Tiempo de agitación, de secado, de centrifugado, entre otros.
- Temperatura
- Composición de Fase Móvil
- Flujo de gas carrier
- Tamaño de celda espectrofotométrica
- Otros

La AOAC (Association of Official Analytical Colaboration) plantea para estudiar la Robustez el uso de un diseño experimental de tipo Plackett-Burman. Este diseño plantea que se puede evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra. Cada variable se estudia mediante un valor (o cualidades cuando esto no es posible) alto (A, B, ...,G) y otro bajo (a, b,..., g) y se diseñan ocho pruebas como se muestra en el siguiente cuadro de análisis:

Un posible criterio para asignar valores altos y bajos a las variables puede ser un  $\pm 10\%$ . Por ejemplo, si según el método de ensayo se debe dejar incubando un anticuerpo durante 20 minutos, el valor alto para dicha variable sería 22 minutos (A) y el bajo 18 minutos (a).

Valor de la variable	Análisis							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADOS:	s	t	u	v	w	x	y	z

Se realiza lo definido a continuación:

¿Qué hacer?	¿Qué calcular?
Identificar las variables que pueden tener un efecto significativo sobre el desempeño del método. Establecer los experimentos de acuerdo al cuadro de análisis.	Determinar el efecto de cada condición en los resultados de la medida. Clasificar las variables de acuerdo a su efecto sobre el desempeño del método. Realizar pruebas de significación para determinar si los efectos observados son estadísticamente significativos.

### Informe de validación de Método de Ensayo

Luego de finalizada la adquisición y procesamiento de datos, los mismos deben ir en un Informe. Este informe debe ser un documento controlado por el Sistema de Gestión y debe ser realizado, revisado y aprobado por el personal con las competencias para el mismo.

El contenido del informe de validación debe incluir (cuando corresponda):

- Objetivo y alcance del método
- Ítems a ensayar
- Materiales de referencia utilizados
- Trazabilidad de equipos
- Detalle de insumos, reactivos y acondicionamiento de muestras.
- Lista de equipos, instrumentos y dispositivos utilizados.
- Personas que participaron en la validación del método.
- Parámetros de validación evaluados.
- Registro de las condiciones de los ensayos y gráficos representativos (curvas de calibración, gráficos de residuos, cromatogramas, etc.)
- Resultados obtenidos.
- Incertidumbre de medición.
- Conclusiones, criterios de aceptación o rechazo, criterios de revalidación.

## Revalidación de métodos de ensayo

Por tratarse el ensayo de muestras de procesos dinámicos, no puede considerarse que una vez realizada la validación inicial la misma puede permanecer estática en el tiempo.

Se debería realizar la revalidación del método cuando cambien las condiciones iniciales en el cual fue realizada la misma: por ejemplo, amplia rotación de analistas, cambio de equipos considerados críticos para la realización del ensayo, etc. o cuando existan dudas que los parámetros determinados en la validación puedan haber sufrido cambios.

Un ejemplo de posibles efectos de las modificaciones en el método de ensayo a los parámetros de validación se describe en la tabla a continuación:

<b>Modificación</b>	<b>Posibles efectos sobre</b>
Método de extracción	Selectividad, veracidad
Matriz de la muestra	Selectividad, veracidad, precisión, Límite de Detección, Límite de Cuantificación.
Extensión del rango	Linealidad, precisión
Cambios en el pH	Robustez
Sistema de detección	Selectividad, linealidad, rango de trabajo.

En la rutina, la manera de controlar si la validación sigue estando vigente es manteniendo controles de calidad rutinarios que permitan verificar que la precisión y la exactitud se mantienen dentro de parámetros estables. Muchas veces son utilizadas las cartas de control como un método sencillo, práctico y relativamente económico donde se puede identificar fácilmente si existe algún desvío a lo esperado.

Otra forma de monitorear que los parámetros se mantengan bajo control es mediante la participación en Ensayos de Interlaboratorio. Hay que ser cuidadoso con el uso de esta metodología de control puesto que, los valores del interlaboratorio pueden estar atados a los valores reportados por los otros participantes y muchas veces no es tan amplia la oferta del mercado para participar. De preferencia siempre hay que escoger Proveedores de Interlaboratorio confiables, preferiblemente acreditados y cuyo valor medio de la muestra provenga de un valor asignado y no de un valor de consenso.

Es importante que, en ambos casos, Muestras control o Interlaboratorio, el material utilizado sea representativo de las muestras reales de rutina, tanto en matriz como en concentración.

## **BENEFICIOS ESPERADOS COMO CONSECUENCIA DE LA PUESTA EN PRÁCTICA DE LAS MEJORAS PLANTEADAS Y ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN FINAL PREVISTA**

Como parte de la mejora continua planteada en el sistema de gestión, con esta propuesta de mejora para sistematizar la ejecución de las validaciones se prevé una mejora significativa principalmente en tres aspectos fundamentales.

El primero de ellos tiene que ver con la posibilidad de enmarcar bajo un mismo esquema de metodologías todas las validaciones. Este sistema permitirá que la planificación de estas sea más ágil y que en su ejecución se evite el desperdicio de recursos como tiempo/reactivos/materiales de referencia debido a que ya se posee una guía sistematizada sobre la cual orientar el diseño y los análisis a ejecutar.

El segundo beneficio esperado tiene que ver con la armonización de los Informes de Validación. Si bien hoy por hoy se realizan, este cambio permitirá un mejor orden en la confección de estos, requisitos claros y uniformes independientes del método que se quiera validar y la posibilidad de revisar periódicamente la necesidad de recalcular de todos/algunos parámetros involucrados.

Y el tercer ítem a tener en cuenta es que, si bien la validación de métodos requiere un cierto nivel técnico y experiencia previa del personal, muchas veces la información disponible en las distintas fuentes bibliográficas es amplia y considera todo o gran parte del abanico de métodos de ensayo que existen en la actualidad. Al sintetizar en un procedimiento la información que ciertamente aplica para el alcance definido permite por un lado sintetizar la información mínima requerida que debe ser tomada en cuenta por una persona para poder iniciar una validación y, además, permite establecer un punto de partida para la capacitación de personas con menos experiencia que comiencen a interiorizarse en este aspecto analítico.

## **CONCLUSIONES**

Con base en todo lo anteriormente planteado, vale recalcar que dentro de los análisis químicos la validación es considerada como fundamental en todo el proceso. Aunque esto es claro y ampliamente conocido por cualquier persona perteneciente al rubro, no siempre está claro cuando y como debe hacerse, cual sería la forma más eficaz de llevarla a cabo y en que casos es necesario replantear los resultados.

La idea de realizar este procedimiento es establecer un punto de partida para entrar en la interminable rueda del ciclo PDCA planteado por Deming, donde el resultado final siempre será la mejora continua, mejorando cada día los resultados obtenidos y disminuyendo (cuando sea posible) u optimizando la utilización de los recursos disponibles.

A corto plazo seguramente se tendría que realizar una revisión completa en base a la información ganada con la ejecución de este, agregando información que por una u otra razón aporte valor al proceso. A mediano/largo plazo se podrán implementar indicadores para relativizar costos/tiempos invertidos en las validaciones y realizar una sistematización de los cálculos estadísticos.

Como medidas complementarias se podría recomendar la adquisición de software de cálculos estadísticos que permitan simplificar la gestión interna que conlleva todo el análisis de los datos. Si bien es importante conocer que significa el dato obtenido y de que manera se puede mejorar, muchas veces la realización matemática de los mismos requiere una gran inversión de tiempo y esfuerzo por parte de las personas tanto en su realización como en su revisión.

Otra medida que se podría plantear a futuro, como parte de las actividades del ciclo PDCA, es sistematizar los casos en los cuales sea necesario una revalidación. En este caso se brinda una guía aproximada con las consideraciones básicas a tener en cuenta para definir si un método tiene o no que ser revalidado. Se puede plantear en un mediano/largo plazo relevar dentro de los métodos ya validados, cuales y en que condiciones fue necesario revalidar uno/varios parámetros(s) y en base a ello, integrarlo al proceso como un ítem más del procedimiento.

Como resultado final de este trabajo se espera que se puedan validar nuevos métodos (tanto normalizados, modificados y/o In House) y que esto permita ampliar la oferta de ensayos brindada por el laboratorio y comenzar a vislumbrar la posibilidad de ingresar en otro tipo de industrias/negocios que requieran el uso de métodos de ensayo más específicos a la actividad que desempeñan otras organizaciones o el diseño personalizado de métodos adaptados a sus necesidades y expectativas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1a ed. 2016). Disponible en [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). Guía para la validación de métodos de ensayo GUI-LE-03. Versión 2. Julio 2019. Disponible en [www.oaa.org.ar](http://www.oaa.org.ar)
- Eurachem/CITAC Guide. Ellison, Williams y colaboradores. Cuantificación de la Incertidumbre en medidas analíticas. 3era Edición. Disponible en: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
- EA. Evaluación de la incertidumbre de medida en las calibraciones EA-4/02 M:2013. Disponible en: [www.european-accreditataion.org](http://www.european-accreditataion.org)
- B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell, E. Sahlin, Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories, Nordtest Report TR 537 (ed. 4) 2017. Disponible en [www.nordtest.info](http://www.nordtest.info).
- NORMA IRAM-ISO 9001:2015 Sistemas de Gestión de Calidad. Requisitos.
- NORMA ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de calibración y ensayo.