

**VALIDACIÓN INTERNA DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS**

AURIOL CORONADO LIZARAZO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

**VALIDACIÓN INTERNA DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS**

AURIOL CORONADO LIZARAZO 1991465

Tesis de grado

**Director:
José Carlos Gutiérrez
Químico, Magíster en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

En primer lugar quiero agradecerle a Dios por haberme dado la oportunidad y las herramientas necesarias para lograr esta meta en mi vida.

Quiero agradecer a mi director, José Carlos Gutiérrez por su constante dedicación y por el apoyo que me ha dado siempre que lo he necesitado. También quiero agradecerle al Laboratorio Departamental de Salud Pública de Bucaramanga por su colaboración y por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis en sus instalaciones. A mis Padres por su apoyo incondicional y por brindarme la oportunidad de estudiar y también a mis amigos que han compartido durante este tiempo los buenos y malos momentos.

Esta tesis esta dedicada con todo mi cariño a mi familia.

Auriol

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEORICO	3
1.1 VALIDACIÓN	4
1.2 QUE ES LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	4
1.2.1 Por que es necesario validar los métodos de análisis	5
1.2.2 Cómo validar los métodos analíticos	7
1.2.3 Validación de métodos normalizados	7
1.2.4 Grado de validación	8
1.2.5 Parámetros de validación de un método	9
1.2.5.1 Confirmación de identificación, selectividad y especificidad	9
1.2.5.2 Límite de detección	10
1.2.5.3 Límite de cuantificación	11
1.2.5.4 Intervalo de trabajo e intervalo lineal	12
1.2.5.5 Exactitud (y sesgo)	13
1.2.5.6 Precisión	14
1.2.5.7 Sensibilidad	15
1.2.5.8 Robustez	15
1.2.5.9 Recuperación.	15
1.2.5.10 Incertidumbre de medición	16
1.3 APROXIMACIONES EXISTENTES PARA LA ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE	17
1.4 APROXIMACIÓN PROPUESTA PARA EL CÁLCULO GLOBAL DE LA INCERTIDUMBRE	19
1.4.1 Estudios de precisión	19
1.4.2 Aseguramiento de la trazabilidad de los resultados utilizando muestras adicionales	19

1.5 ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA)	21
2. METODOLOGIA	22
2.1 DEFINICIÓN DE HIPÓTESIS	22
2.2 EQUIPOS Y MATERIALES	22
2.3 REACTIVOS	22
2.4 DOCUMENTACIÓN Y MONTAJE DE LA METODOLOGÍA	23
2.4.1 Procedimiento	23
2.4.2 Cálculo	24
2.5 PREVALIDACIÓN	25
2.5.1 Calibración de la balanza analítica	25
2.5.2 Curva de calibración	25
2.5.3 Error Fotométrico o Instrumental (EF)	26
2.5.4 Límite de Detección (LD) y Límite de Detección Instrumental (LDI)	26
2.5.5 Límite de Cuantificación (LC)	27
2.5.6 Sensibilidad de Método	27
2.6 VALIDACIÓN	27
2.6.1 Precisión	28
2.6.2 Trazabilidad	31
2.6.3 Incertidumbre	34
3. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
3.1 PREVALIDACIÓN	38
3.1.1 Curva de calibración	38
3.1.2 Error Fotométrico o Instrumental (EF).	40
3.1.3 Límite de Detección (LD), Límite de Detección Instrumental (LDI) y Límite de Cuantificación.	41
3.1.4 Sensibilidad de Método	44
3.2 VALIDACIÓN	44

3.2.1 Precisión	44
3.2.2 Trazabilidad.	49
3.3 INCERTIDUMBRE	53
3.4 ENSAYO INTERLABORATORIOS	57
4. CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1	Soluciones de trabajo para la validación de las técnicas	28
Tabla 2	Tabla ANOVA de un diseño completo anidado de tres factores	30
Tabla 3	Cálculo de las varianzas obtenidas a partir del ANOVA de los resultados obtenidos en un diseño anidado de tres factores	30
Tabla 4	Tabla ANOVA para calcular la incertidumbre de la matriz y del procedimiento a partir del diseño experimental de la figura 2.2	35
Tabla 5	Cálculo de las varianzas de la matriz y de la precisión a partir del ANOVA de la tabla 2.4.	35
Tabla 6	Datos para la construcción de la curva de calibración para el análisis de metanol	38
Tabla 7	Error fotométrico o instrumental para metanol. Concentración 150 ppm metanol	41
Tabla 8	Límite de Detección, Límite de detección Instrumental y Límite de Cuantificación para metanol	43
Tabla 9	Datos de Repetibilidad de las lecturas de Metanol	45

Tabla 10	Prueba de la F para la Repetibilidad de dos concentraciones	45
Tabla 11	Resultados de la lectura por lotes, para el estudio de la reproducibilidad	46
Tabla 12	Precisión intermedia-Días del método analítico para la determinación de Metanol	47
Tabla 13	Prueba de la F para la reproducibilidad	48
Tabla 14	Prueba de la F (P = 0.005; una cola) repetibilidad y reproducibilidad	48
Tabla 15	Cálculo de las varianzas obtenidas a partir del ANOVA de los resultado del diseño anidado de tres factores	49
Tabla 16	Datos de la concentración encontrada para la elaboración de las rectas de adiciones estándar para las matrices de aguardiente, ron y vino	50
Tabla 17	Valores de los términos de la ecuación (4) y F calculado y tabulado	53
Tabla 18	Cálculo de las varianzas de la matriz y de la precisión a partir del ANOVA de la tabla 2.4	53
Tabla 19	Incertidumbre del procedimiento	54

Tabla 20	Incertidumbre de la variabilidad de las matrices	54
Tabla 21	Valores de los términos de la ecuación (8)	55
Tabla 22	Incertidumbre del la verificación de la trazabilidad	55
Tabla 23	Incertidumbre aportada por cada una de las fuentes estudiadas	56
Tabla 24	Intervalo de trabajo y calibración instrumental para análisis de Metanol	59

LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1	Recta de adiciones estándar	21
Figura 2	Disposición de los factores concentración, día y replicado del diseño anidado.	29
Figura 3	Diseño anidado de tres factores para calcular la recuperación utilizando n muestras adicionadas	32
Figura 4	Recta de adiciones estándar. La pendiente de la recta corresponde a la recuperación del método	33
Figura 5	Curva de calibración para el análisis de metanol. Espectrofotómetro UV-VIS Génesis 4, a 575 nm	39
Figura 6	Curva de Ringbom	40
Figura 7	Curva de Trabajo para el análisis de metanol. Espectrofotómetro UV-VIS Génesis 4, a 575 nm	40
Figura 8	Recta de adiciones estándar para la matriz de Aguardiente	51
Figura 9	Recta de adiciones estándar para la matriz de Ron	51
Figura 10	Recta de adiciones estándar para la matriz de Vino	52

Figura 11	Principales fuentes de incertidumbre evaluadas	56
Figura 12	Incertidumbre total para tres niveles de concentración	57

RESUMEN

TITULO:

VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHOLICAS*.

AUTOR:

Auriol Coronado Lizarazo**

PALABRAS CLAVES:

Validación

Incertidumbre

Método analítico

DESCRIPCIÓN:

Las bebidas alcohólicas deben cumplir con una serie de requisitos y normas de calidad en su contenido de metanol, de manera que no causen perjuicio a la salud de las personas que las consumen. Por tanto, el laboratorio departamental de salud pública de Bucaramanga, realiza el análisis de dichas bebidas con el objetivo fundamental de formarse una opinión a cerca de su calidad; y con base a los resultados llevar a cabo las respectivas acciones legales y disciplinarias.

Para el aseguramiento de la calidad, el laboratorio realizó la validación del método analítico para la determinación de metanol, con el fin de confirmar que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico del método en las condiciones del laboratorio y que se generan resultados confiables.

Durante el proceso de validación es necesario determinar: el intervalo lineal de trabajo, error fotométrico, límite de detección, límite de cuantificación y la sensibilidad del método. Para determinar la precisión, la trazabilidad y la incertidumbre del método se siguieron diseños anidados en donde se cambiaron los factores que mas afectan la variabilidad de los resultados.

La metodología diseñada para el proceso de validación presentó resultados prácticos acordes con los diseños teóricos propuestos. Además, la evidencia estadística permitió determinar una buena confiabilidad del método analítico en las condiciones del laboratorio y por tanto, resultados confiables que generan seguridad en las intervenciones en eventos de interés en la salud pública.

* Tesis de Grado.

** Facultad de Ciencias, Programa de Química, Director: José Carlos Gutiérrez

ABSTRACT

TITLE:

VALIDITY OF THE ANALYTIC METHOD FOR DETERMINING METHANOL CONTENT IN ALCOHOLIC DRINKS*.

AUTHOR:

Auriol Coronado Lizarazo**

KEY WORDS:

Validity

Uncertainty

Analytic method

DESCRIPTION:

Alcoholic drinks must fulfill with an array of requirements and regulations of quality with respect to their methanol contents, thus alcoholic drinks do not be harmful to people's health. Therefore, the laboratory of public health in Bucaramanga is doing the analysis of distilled with the main objective of having an opinion about their quality, and based on the outcomes of the study, accomplishing the appropriate legal and disciplinary procedures,

To ensure the quality of alcoholic drinks, the laboratory conducted the validity of the analytic method for determining methanol content. This procedure is useful to verify that specific requirements for using the method in accordance with the laboratory conditions are followed and that reliable findings are generated.

During the validity process is necessary to determine: the linear interval of duty, photometric error, detection limit, quantification limit, and method sensitivity. To establish the accuracy and uncertainty of the method, designed experiments were used, in which the factors that affected the most the variability of the results were changed.

The methodology planned for the validity process showed practical outcomes in agreement with theoretical designs proposed. Furthermore, statistical evidence let me to determine a good reliability of the analytic method in accordance with the laboratory conditions. In addition to this, the evidence helped to produce reliable results that give security during interventions in important events of public health.

* Graduate thesis.

** Faculty Sciences, Chemistry program, Adviser: José Carlos Gutierrez

INTRODUCCIÓN

Los alimentos de consumo humano deben cumplir con una serie de requisitos y normas de calidad, esto con el fin de que no causen ningún problema de salud para los humanos.

Los análisis de laboratorio, en la mayoría de los casos, tienen por objeto generar un concepto acerca de la calidad de los alimentos u otros productos para el consumo de la población. Las bebidas alcohólicas, por ser productos que presentan una gran demanda de consumo por parte de la población y debido a que pueden causar problemas en la salud, reciben una vigilancia sobre su calidad. En nuestra región, la entidad encargada de controlar la calidad de las bebidas alcohólicas, es La Secretaría de Salud, en el laboratorio de Medicamentos y Bebidas Alcohólicas.

El Laboratorio de Medicamentos y Bebidas Alcohólicas, de la Secretaría de Salud de Bucaramanga, en busca del proceso de mejoramiento continuo, está desarrollando un sistema de aseguramiento de la calidad para obtener su acreditación, dentro de este proceso el pilar fundamental es la validación de las técnicas analíticas, de acuerdo con los requerimientos de la Norma Técnica Colombiana, NTC ISO 17025 y las buenas Prácticas de Manufactura de los Laboratorios analíticos.

El presente trabajo describe el procedimiento de validación del método “analítico para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas”. El procedimiento de validación comprende dos etapas: La primera de prevalidación donde se especifican los requisitos para la utilización de equipos, materiales de referencia, preparación de reactivos, personal, el protocolo del método adecuado a las

condiciones del laboratorio y los atributos del método (curva de calibración, error fotométrico o instrumental, límite de detección, límite de detección instrumental, límite de cuantificación, sensibilidad); en esta etapa se prepara el método para la validación. La segunda etapa es la propia validación la cual incluye las determinaciones y evaluación de: exactitud, precisión, trazabilidad, recuperación, robustez, incertidumbre.

El fin de este proceso de validación, es determinar si la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, lo cual, es el objetivo principal de este trabajo.

1. MARCO TEORICO

Para el cumplimiento de normas nacionales e internacionales en todos los campos de análisis se necesitan métodos de análisis fiables. La comunidad internacional reconoce, en consecuencia, que los laboratorios deben adoptar medidas adecuadas para asegurar que son capaces de proporcionar datos de la calidad exigida. Dichas medidas comprenden:

- La utilización de métodos de análisis validados;
- La utilización de procedimientos de control de calidad interno;
- La participación en programas de ensayos de aptitud y
- La acreditación del cumplimiento de una norma internacional, habitualmente la Norma ISO/IEC 17025.

Se debe señalar que la acreditación en ISO/IEC 17025 aborda de forma específica la aplicación de un sistema de rastreabilidad de las mediciones, además de requerir otras condiciones técnicas y de gestión.

La validación de métodos es por consiguiente un componente esencial de las medidas que debe aplicar un laboratorio para obtener datos analíticos fiables.

En algunos sectores, principalmente en el análisis de alimentos, la exigencia de disponer de métodos que han sido “validados plenamente” es una prescripción de ley. Se considera habitualmente que la validación “plena” de un método de análisis comprende un examen de las características del método en un estudio del funcionamiento del método entre laboratorios (conocido también como estudio en colaboración o ensayo en colaboración). Se han establecido protocolos aceptados internacionalmente para la validación “plena” de un método de análisis mediante un ensayo en colaboración, entre los que destacan el protocolo armonizado internacional y el procedimiento de la ISO. En estos protocolos o normas se

exigen, para la validación plena del método de análisis, la participación en el ensayo en colaboración de un número mínimo de laboratorios y materiales de ensayo. Sin embargo, no siempre es práctico o necesario realizar una validación plena de los métodos de análisis. En estos casos, puede ser apropiado proceder a una “validación de métodos por un solo laboratorio” (Thompson, 2002; ISO 17025; Castillo, 1997, Delgado, 2004).

1.1 VALIDACIÓN

La validación de métodos es una de las medidas reconocidas universalmente como parte necesaria de un sistema integral de garantía de la calidad en el ámbito de la química analítica. La ISO, la UIQPA y AOAC Internacional, han colaborado anteriormente para elaborar protocolos o directrices consensuados sobre diseño, organización e interpretación de estudios de funcionamiento de métodos, sobre ensayos de aptitud de laboratorios de análisis (químico), sobre control de calidad interno en laboratorios de química analítica y sobre el uso de la información de recuperación en las mediciones analíticas. El grupo de trabajo que elaboró estos protocolos o directrices ha recibido ahora el encargo de la UIQPA de elaborar directrices sobre la validación de métodos de análisis por un solo laboratorio. Estas directrices constituyen recomendaciones de mínimos sobre los procedimientos que deben aplicarse para asegurar la validación apropiada de métodos de análisis (Thompson, 2002).

1.2 QUE ES LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validación es la confirmación mediante examen y aporte de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico previsto (ISO 17025). La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para

responder a las necesidades de la aplicación en cuestión. Debemos resaltar el hecho que se valida con respecto a un uso determinado de antemano. Esta noción amplia de lo que implica la validación equivale al concepto de adecuación a la finalidad o propósito perseguido. (Ruis et al, 2002)

1.2.1 Por que es necesario validar los métodos de análisis. El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual obtenemos información. Se realizan millones de análisis cada día en el mundo es los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, análisis clínicos, forenses, químicos y físicos. En todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La validación de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en la gran área del aseguramiento de la calidad, otorgando la confianza necesaria, a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos. (Ruis et al, 2002).

El laboratorio deberá validar:

- Métodos no estandarizados.
- Métodos diseñados o desarrollados internamente.
- Métodos estandarizados usados fuera del alcance propuesto.
- Ampliaciones o modificaciones de métodos estandarizados.
- Cuando se realizan algunos cambios en los métodos no estandarizados ya validados, se debe documentar la influencia de tales cambios y si es necesario, se debe efectuar una nueva validación.

La validación incluye:

- La especificación de los requisitos.
- La determinación de las características de los métodos.

- Una verificación de que se pueden cumplir los requisitos al usar el método.
- Una declaración de su validez.

La técnica para determinar el funcionamiento de un método puede ser una de las siguientes o su combinación:

- Calibración con el uso de normas o materiales de referencia.
- Comparación de resultados obtenidos por otro(s) método(s).
- Comparaciones entre laboratorios.
- Evaluación sistemática de los factores que influyen en los resultados.
- Evaluación de la incertidumbre de los resultados basados en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y la experiencia práctica.

El laboratorio deberá registrar:

- Los resultados obtenidos.
- El procedimiento usado para la validación, y
- Una declaración acerca de que el método se ajusta al uso propuesto.

Para las necesidades de los clientes deben ser relevantes el intervalo y la exactitud de los valores que se pueden obtener de los métodos validados, como son:

- La incertidumbre de los resultados.
- Límite de detección.
- Selectividad del método.
- Linealidad.
- Límite de repetibilidad y reproducibilidad.

- Robustez contra influencias externas.
- Sensibilidad cruzada contra interferencias de la matriz de la muestra.

Conforme avance el desarrollo del método, se deben llevar a cabo revisiones regulares para verificar que se siguen cumpliendo las necesidades del cliente. Cualquier cambio en los requisitos que necesiten modificaciones en el plan de desarrollo debe ser aprobado y autorizado (Delgado, 2004; castillo 2004).

1.2.2 Cómo validar los métodos analíticos. Para el cumplimiento de los requisitos de validación de los métodos analíticos del laboratorio, se plantea a continuación el porqué validar los métodos normalizados y se dan las pautas básicas para llevar a cabo la validación. Para información adicional se puede consultar la bibliografía incluida acerca de la validación de métodos (Eurachem, 2000; Green, 1996).

1.2.3 Validación de métodos normalizados. Si bien la norma ISO/IEC 17025 no requiere la validación de los métodos normalizados aplicados en un laboratorio específico, sí establece que se deberán obtener datos sobre el rendimiento de su propio uso, es decir que siempre resulta apropiado contar con algún grado de validación, incluso cuando se utilicen métodos normalizados.

Con frecuencia se asume que los métodos normalizados se pueden aplicar directamente y que se alcanzarán los niveles de rendimiento publicados por quienquiera que utilice el método, pero este no es un supuesto seguro. Se debe al menos practicar con el método a través de un proceso de capacitación para alcanzar una competencia aceptable.

Para métodos normalizados debe verificarse si la información existente sobre su validación es adecuada para el propósito requerido y si el laboratorio es capaz de alcanzar el nivel de rendimiento que se reporta como posible. Ante los cambios de analista es más relevante controlar el rendimiento del analista respecto a lo que se requiere y no según la información publicada en el método, aunque siempre es posible al menos verificar dicha información.

De acuerdo con lo anterior, un método debe validarse cuando:

- Sea necesario verificar que los parámetros de rendimiento son adecuados para usarlos en un problema analítico específico.
- Se incorporen mejoras en el método.
- Se amplíe el alcance del método para nuevas matrices.
- El control de calidad indique que el método está cambiando con el tiempo.
- El método se use en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o instrumentos (Sánchez, 2002; Castillo, 1997, Delgado, 2004).

1.2.4 Grado de validación. Un laboratorio debe establecer el grado de validación requerido de acuerdo con las necesidades del cliente, con las políticas de calidad, con la naturaleza de los cambios realizados a un método previamente validado, o con las metas de calidad que se haya trazado como parte de los procesos de mejoramiento continuo del sistema de calidad.

El laboratorio debe decidir qué parámetros de rendimiento del método debe caracterizar, teniendo en cuenta las limitaciones de tiempo y costos, además de los requerimientos del cliente, la experiencia con el método y si el método será de aplicación rutinaria o no. Por ejemplo, si un método se aplica solo en casos esporádicos, puede ser mejor subcontratar ese análisis antes que incurrir en los gastos que la validación representa.

No necesariamente todos los parámetros de validación que se describen más adelante son aplicables para todos los métodos. Por ejemplo, para validar métodos normalizados en las condiciones de un laboratorio en particular, pueden no ser de interés los aspectos de selectividad y especificidad, por cuanto quienes han desarrollado y/o homologado el método ya han hecho (en la mayoría de los casos) un trabajo exhaustivo acerca de las interferencias y la manera de eliminarlas. Por otra parte, según el principio físico o químico de la medición algunas variables no son susceptibles de ser obtenidas porque no aplican o porque no es viable contar con un patrón de comparación confiable (Ruis et al, 2002; Sánchez, 2002; Mancera, 2002; Secretaria, 2002).

1.2.5. Parámetros de validación de un método. A continuación se hace una breve descripción de los parámetros que permiten evaluar el rendimiento de un método y se hace una indicación de qué se puede analizar para evaluar cada parámetro.

1.2.5.1 Confirmación de identificación, selectividad y especificidad. La identidad se establece cuando la señal producida en la etapa de medición puede ser atribuida únicamente al analito y no a la presencia de algo similar o la coincidencia. La selectividad y la especificidad evalúan la confiabilidad de las mediciones ante la presencia de interferencias; la segunda se considera por lo general como un 100% de selectividad. Las interferencias pueden disminuir o aumentar la señal atribuida al analito.

Estos parámetros no requieren mayor validación cuando se utilizan procedimientos normalizados para una matriz específica, puesto que el trabajo ya lo han adelantado quienes desarrollaron y validaron el método. En estos casos se deben tener muy en cuenta las especificaciones sobre posibles interferencias y la

manera de suprimirlas, si existen. Sin embargo, el laboratorio debe considerar el estudio de las interferencias en la validación si las matrices de las muestras que analiza son muy variadas y si en alguna de ellas los interferentes se encuentran en niveles muy altos que pueden no ser suprimidos por los procesos recomendados. Este sería un caso de ampliación del alcance del método para nuevas matrices (Thompson, 2002).

1.2.5.2 Límite de detección. Se debe saber cuál es la mínima concentración del analito que se puede detectar confiablemente cuando se aplica un método para el análisis de una muestra, aunque no existe un acuerdo universal sobre la terminología y existen varios criterios para su cuantificación. En algunos casos es suficiente brindar una indicación del nivel en el que la detección se torna menos confiable (promedio de lectura de blancos del método más tres veces su desviación estándar), pero resulta conveniente aplicar una metodología más exacta; en cualquier caso se recomienda informar el mecanismo seleccionado (Thompson; 2002; Analytical Methods Committee, 1987).

Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental. Pueden emplearse otras aproximaciones a las presentadas a continuación.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas

con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 3:1 ó 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de detección debería ser luego confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de detección propuesto (Castillo, 1997).

1.2.5.3 Límite de cuantificación. El LC es la mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud. Varias convenciones lo definen como la concentración de analito correspondiente al valor del blanco más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media de blancos.

Ninguno de los dos límites representan niveles en los que la cuantificación es imposible; es simplemente una región en que la magnitud de las incertidumbres asociadas es de valor semejante al resultado real. El límite de cuantificación no se debe determinar por extrapolación por debajo del menor estándar analizado (Sánchez, 2002).

Existen diversas maneras para determinar el límite de cuantificación, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental. Pueden emplearse otras aproximaciones a las presentadas a continuación.

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de cuantificación.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de cuantificación debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de cuantificación propuesto (Mancera, 2002).

1.2.5.4 Intervalo de trabajo e intervalo lineal. Linealidad, es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido.² Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionados con la aplicación del método (Castillo, 1997).

Se debe determinar el intervalo de concentraciones de analito dentro del cual se puede aplicar el método; esto se refiere a las concentraciones efectivamente medidas y no a las muestras originales. En el extremo inferior del intervalo de concentraciones el factor limitante es el valor del límite de detección; en el extremo superior el alcance depende de la respuesta del instrumento o de condiciones analíticas establecidas como óptimas.

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un rango de respuesta lineal (intervalo lineal); los cálculos de regresión por si solos pueden ser insuficientes para establecer la linealidad; se debe complementar con una inspección visual de la línea y los residuos. En general los controles de linealidad requieren efectuarse con al menos 10 concentraciones o valores diferentes.

La evaluación del intervalo de trabajo y del intervalo lineal permiten definir qué grado de calibración se requerirá al usar el método; en el intervalo lineal puede ser suficiente un punto de calibración para establecer la pendiente de la línea de calibración. En el resto del intervalo de trabajo será necesaria la calibración en múltiples puntos, preferiblemente más de seis. La respuesta del instrumento a la concentración no tiene que ser perfectamente lineal para que el método sea eficaz, pero la curva debe ser repetible cotidianamente. El intervalo de trabajo y el intervalo lineal pueden ser diferentes para matrices diferentes según el efecto de las interferencias que aporte la matriz (Sánchez, 2002).

1.2.5.5 Exactitud (y sesgo). Exactitud, indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero (Ruis, 2002; Thompson, 2002). A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él. Cuando existen interferencias en el método por falta de selectividad (desviación por exceso en los resultados), o cuando se trata de métodos analíticos muy laboriosos, con varias

etapas, como extracciones, purificaciones, etcétera (desviación por defecto en los resultados), el método se considera no exacto o sesgado. Se evalúa en la validación por comparación con los valores de referencia de un material caracterizado (material de referencia, MR), o con valores tomados de otro método caracterizado. Los valores de referencia deberían ser trazables a las normas internacionales; los materiales de referencia certificados (MRC) generalmente se aceptan como trazables. Es ideal que el MR sea de matriz natural lo más similar posible a las muestras de interés. En caso contrario los MR pueden ser:

- Preparados por adiciones de MRC puro u otros de pureza y estabilidad adecuadas a muestras típicas, o
- Muestras típicas bien caracterizadas, controladas para verificar su estabilidad y pasadas por un proceso interno de control de calidad.

Usualmente la aplicación de un método involucra un sesgo combinado: el sesgo del método que surge de errores sistemáticos inherentes a él (sin importar el laboratorio que aplica el método), y el sesgo del laboratorio que surge de errores sistemáticos característicos del laboratorio. El sesgo obtenido en una validación debe compararse con el sesgo reportado para el método y el obtenido por varios laboratorios que utilicen el mismo método (Sánchez, 2002; ISO 5725).

1.2.5.6 Precisión. La precisión, según la norma ISO 3534, es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas. Estas condiciones dependen de los factores que se varíen entre cada uno de los ensayos. Algunos de ellos son: el laboratorio, el analista, el equipo, el día en que se hace el ensayo, etc. Dependiendo de los factores que se varíen se pueden analizar tres tipos de precisión, repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (Maroto, 2002).

La repetibilidad es la precisión más pequeña esperada, da una idea de la variabilidad que se espera cuando un método es aplicado por un solo analista en un equipo durante un periodo corto. En el otro extremo, la reproducibilidad, que representa la variabilidad que se obtiene cuando una muestra es analizada por varios laboratorios, tiene un valor más amplio. La precisión intermedia y más útil en casos específicos, se obtiene cuando se evalúan algunas condiciones en el análisis. Es importante que los valores de precisión sean representativos de las condiciones de ensayo probables (Rui et al, 2002).

1.2.5.7 Sensibilidad. La sensibilidad es el gradiente de la curva de respuesta, o lo que es lo mismo, el cambio en la señal correspondiente a un cambio de concentración de analito. Para el intervalo lineal de un método, la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración, y es un parámetro objeto de seguimiento cuando se efectúan calibraciones rutinarias (Thompson, 2002).

1.2.5.8 Robustez. Es una medida de qué tan bien responde un método analítico ante una implementación no tan perfecta, ya que si ciertas etapas del método no se implementan con el suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre la efectividad del método. Generalmente este parámetro aplica para métodos desarrollados por el laboratorio, en los cuales se realizan variaciones deliberadas en el método y se cuantifica el efecto en el rendimiento, antes de entrar en estudios de colaboración. Por lo tanto es una variable que no necesariamente debe ser objeto de la validación cuando se utilizan métodos normalizados (Castillo, 1997; Delgado, 2004; Thompson, 2002).

1.2.5.9 Recuperación. Se debe evaluar la capacidad de un método de determinar todo el analito presente en las muestras, según el alcance del método

(algunos solo determinan algunas especies del analito). La mejor manera de determinar la eficacia de extracción del método es adicionar diferentes concentraciones del analito a las muestras y procesarlas por el método completo. Aunque es la manera más común de cuantificar la recuperación, el analito adicionado puede no enlazarse tan fuertemente a la matriz como el presente de manera natural y dar como resultado la impresión de una elevada eficacia de extracción. La alternativa es efectuar el proceso con MR en la matriz deseada, si existen; si estos MR han sido generados mediante caracterización de muestras naturales el estudio de recuperación representará con mayor precisión la extracción de muestras reales (Sánchez, 2002).

1.2.5.10 Incertidumbre de medición. La incertidumbre de medición es un parámetro simple que expresa el rango de valores posibles sobre la base del resultado de la medición; su estimación por procedimientos adecuados toma en cuenta todos los efectos reconocidos que afectan el resultado. La estimación de la incertidumbre de un método debe tomar en cuenta la precisión general de largo plazo, el sesgo, la incertidumbre del MR, la incertidumbre de calibración, y cualquier otro efecto significativo, como pueden ser la temperatura o tiempo de análisis, si aplican (Eurachem, 2000).

La guía ISO 3534-1, define incertidumbre como “una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se afirma que esta el valor verdadero”. Su estimación por procedimientos adecuados toma en cuenta todos los efectos reconocidos que afectan el resultado, la precisión general, el sesgo, la incertidumbre del MR, la incertidumbre de calibración, y cualquier otro efecto significativo, como pueden ser la temperatura o tiempo de análisis, si aplican (Mancera, 2002; ISO 3534).

El concepto de incertidumbre refleja, pues duda acerca de la exactitud del resultado obtenido una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de error y que se han aplicado las correcciones oportunas. Es decir, la incertidumbre proporciona una idea de la calidad del resultado ya que indica cuanto puede alejarse un resultado del valor considerado verdadero. Por tanto los resultados siempre deben ir acompañados de su incertidumbre para que se puedan tomar decisiones basadas en dichos resultados (Thompson, 2002; Maroto, 2002; Eurachem, 2000).

1.3 APROXIMACIONES EXISTENTES PARA LA ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE

Hoy en día es cada vez más importante que los resultados analíticos vayan acompañados de su incertidumbre. Así lo establece la norma ISO/IEC 17025.

El cálculo de la incertidumbre no es sencillo debido al elevado número de fuentes de error presentes en un procedimiento analítico. Esto ha hecho que se hayan propuesto varias aproximaciones para su cálculo.

- **Aproximación ISO.** Comúnmente, este método recibe el nombre de “*bottom-up*” debido a que divide el proceso de medida químico en sus partes fundamentales, cada una de las partes fundamentales se subdivide a la vez en contribuciones más pequeñas, etc. Posteriormente se calcula la incertidumbre de cada una de las partes y se combinan para obtener la incertidumbre global del proceso de medida química.
- **Lineamientos de la GUM.** Al igual que la aproximación ISO, la GUM cuantifica la incertidumbre mediante el cálculo de las contribuciones individuales y su posterior combinación. Ambas tanto la ISO como la GUM dividen el proceso en cuatro etapas:

Especificación

Identificación

Cuantificación

Combinación

- **Aproximación propuesta por el Analytical Methods Committee.** Esta aproximación esta basada en calcular la incertidumbre utilizando la información generada en los ejercicios colaborativos. A esta Aproximación también se le conoce como “top-down” debido a que cuantifica la incertidumbre desde un nivel superior. La aproximación top-down agrupa todas las posibles fuentes de error en cuatro términos: El sesgo del método, el sesgo del laboratorio, el sesgo de la serie y el sesgo del error aleatorio.

Las desventajas de la aproximación “top-down” han hecho que se haya ido proponiendo otras aproximaciones globales basadas en utilizar la información de un laboratorio individual.

La mayoría de las aproximaciones globales que se están proponiendo actualmente se basan en utilizar la información obtenida en la validación del método. A continuación se profundiza en la aproximación propuesta por Maroto, en su tesis de doctorado, la cual, calcula la incertidumbre globalmente aprovechando la información generada durante la verificación de la trazabilidad y también la obtenida durante otras etapas de validación del método como los estudios de precisión (Maroto, 2002; Maroto et al, 2002).

1.4 APROXIMACIÓN PROPUESTA PARA EL CÁLCULO GLOBAL DE LA INCERTIDUMBRE

Para el cálculo de la incertidumbre en métodos de rutina validados en un intervalo amplio de concentraciones con blancos de muestras adicionadas se utiliza la siguiente expresión:

$$u(c_{corr}) = \frac{1}{R} \sqrt{\frac{S_I^2}{p_s} + S_e^2 \left(\frac{1}{n} + \frac{(c_{corr} - \bar{c}_a)^2}{\sum \sum (c_{a,ij} - \bar{c}_a)^2} \right) + S^2_{matriz}}$$

El primer término corresponde a la incertidumbre del procedimiento, el segundo a la verificación de la trazabilidad y el tercero a otros términos debidos a la variabilidad de las matrices de las muestras de rutina.

1.4.1 Estudios de precisión. Se propone un diseño anidado de tres factores, el cual permite obtener información acerca de la precisión intermedia y de la repetibilidad, a demás de evaluar la posible variación de la precisión del método con la concentración.

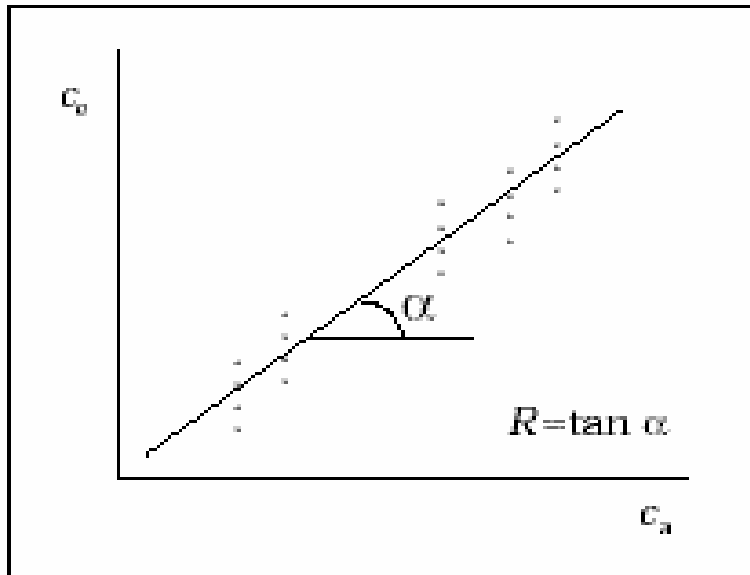
Su diseño y el cálculo de las varianzas asociadas a cada factor se muestran claramente en el diseño metodológico (Ferre, 2002).

1.4.2 Aseguramiento de la trazabilidad de los resultados utilizando muestras adicionadas. Para verificar la trazabilidad en un intervalo amplio de concentraciones es necesario evaluar dos tipos de sesgo: el sesgo proporcional

(en términos de recuperación) y el sesgo constante. Como las adiciones se harán a blancos de muestras, se puede calcular tanto el sesgo proporcional como sesgo constante a partir de la recta de adiciones estándar (Rui et al, 2002; Maroto, 2002).

- **Calculo de sesgo proporcional. Estudios de recuperación.** Para evaluar el sesgo proporcional del método es necesario calcular la recuperación variando representativamente la concentración adicionada y el intervalo de matrices de las muestras de rutina. Para ello, pueden utilizarse diseños anidados de tres factores (ver figura 3). Según este diseño, el analito se adiciona a diferentes tipos de muestras que son representativas de las matrices de las muestras de rutina. Esta adición debe hacerse preferiblemente al menos a tres niveles de concentración (en los extremos y el valor medio del intervalo de concentraciones de las muestras de rutina). Posteriormente, se deben analizar cada muestra adicionada dos veces en condiciones intermedias. Este diseño anidado permite obtener útil información para el cálculo de la incertidumbre ya que a partir del ANOVA, puede obtener la incertidumbre debida a la variabilidad de las muestras de rutina e información sobre como varía la precisión con la concentración. La recta de adiciones se obtiene graficando la concentración encontrada versus la concentración adicionada, la pendiente de esta recta es una estimación de la recuperación del método y la ordenada en el origen proporciona una estimación del sesgo constante del método (Maroto, 2002).

Figura 1. Recta de adiciones estándar.



1.5 ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA)

El análisis de la varianza conocido como ANOVA (del inglés Análisis of Variance), es una técnica estadística muy poderosa que se utiliza para separar y estimar las diferentes fuentes de la variación que influyen en el resultado, algunas causas de estas variaciones se deben principalmente al error aleatorio y al efecto controlado o efecto fijo, el cual como su nombre lo indica es controlado por el experimentador de acuerdo a su interés, es así, que su análisis se puede realizar variando uno o mas factores entendiéndose factor como cualquier aspecto de las condiciones experimentales que influye en el resultado obtenido en un experimento, en caso de variar dos factores se estaría hablando de un ANOVA de dos factores, sea cual fuere el caso esta herramienta estadística se puede utilizar para separar la variación debida al error aleatorio de cualquier otra variación provocada al cambiar el factor de control y de esta manera probar si una alteración del factor de control ocasiona diferencias significativas entre los valores medios obtenidos (Miller, 1999).

2. METODOLOGIA

2.1 DEFINICIÓN DE HIPÓTESIS

Para el desarrollo del presente trabajo se planteo la siguiente hipótesis general: el método analítico para la determinación de metanol por espectrofotometría en bebidas alcohólicas, aplicados en el laboratorio de medicamentos y bebidas alcohólicas de la secretaria de salud, genera resultados confiables para controlar la calidad de las bebidas alcohólicas.

2.2 EQUIPOS Y MATERIALES

- Balones volumétricos de 100 y 50 ml, clase A.
- Tubos de ensayo de 25 ml de capacidad.
- Baño de agua termostataado a 60-75 °C.
- Espectrofotómetro VIS.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 ml de capacidad, clase A.
- Dispensadores de volumen variable, hasta 50 ml de capacidad.
- Vortex.
- Balanza analítica.

2.3 REACTIVOS

- Sal sódica del ácido cromotrópico R.A.
- Ácido 0-fosfórico al 85% R.A.

- Ácido sulfúrico al 96% R.A.
- Agua destilada
- Alcohol etílico, 99.8 % Abs. R.A.
- Alcohol metílico R.A.
- Permanganato de potasio, R.A.
- Metabisulfito de sodio, R.A.
- Solución de permanganato de sodio al 3 % y 15 ml de ácido ortofosfórico al 85 % en 100 ml de agua destilada. Preparar mensualmente.
- Solución de la sal sódica del ácido cromotrópico al 5 % en agua destilada, filtrar si no es clara. Utilizar la solución fresca o almacenarla máximo semanalmente, en recipiente protegida de la luz y bajo refrigeración. Puede emplearse tanto el ácido como la sal.

2.4 DOCUMENTACIÓN Y MONTAJE DE LA METODOLOGÍA

El procedimiento del método analítico para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas se describe a continuación.

2.4.1 Procedimiento. Tomar y destilar 100 ml de la bebida alcohólica, recoger en un balón volumétrico de 100 ml y ajustar el volumen a 20 °C. Determinar el grado alcoholimétrico de la muestra previamente destilada, diluirlo o ajustarlo hasta una concentración de alcohol entre el 5-6 % en volumen. Si se encuentra más del 0.05% de metanol diluir, ajustando el grado alcoholimétrico al rango mencionado anteriormente. Para muestras que contengan menos del 0.05 % de metanol, poner 200 ml de muestra en un destilador de fraccionamiento, reflujar por 15 minutos, recoger 10 ml de destilado y diluir a 160 ml con agua destilada.

Pipetear 2 ml de solución de permanganato en tubo de ensayo, enfriar en baño de hielo durante 10 minutos, añadir 1 ml de muestra y dejar en reposo en el baño durante 30 minutos. Decolorar con una pequeña cantidad de metabisulfito de sodio anhidro y adicionar 1 ml de solución de ácido cromotrópico. Añadir lentamente con agitación 15 ml de ácido sulfúrico al 96 % y colocar 15 minutos en baño de maría (60-75 °C). Enfriar y trasvasar cuantitativamente a balón volumétrico de 50 ml lavando con pequeñas porciones de agua destilada, mezclar y completar a volumen, con agua a temperatura ambiente. Leer la absorbancia a 575 nm utilizando como blanco alcohol etílico al 5.5 % tratado análogamente en la forma descrita.

Preparar soluciones patrón de alcohol metílico que contenga 50, 100,150, 200 y 250 mg/litro, en alcohol etílico al 5.5 % y tratarlas simultáneamente de la misma forma como la muestra. Efectuar las lecturas de las absorbancias correspondientes. Las temperaturas de lectura de las soluciones patrón y de las muestras no deben diferir en más de 1 °C, ya que la temperatura afecta sensiblemente la intensidad del color.

Si la intensidad del color en la muestra problema es demasiado, diluir con un blanco de ácido sulfúrico-etanol preparado similarmente. Se recomienda como máximo diluir a no más de tres veces.

2.4.2 Cálculo. Construir la curva de calibración, graficando las lecturas de las absorbancias de cada uno de los estándares Vs concentración en mg/L. Por interpolación de la absorbancia de la muestra encontrar la concentración de la muestra incógnita.

Cálculo del contenido de alcohol metílico, en mg / dm³, en alcohol anhidro:

$$C_m \times (100 / GA) \times f.$$

Donde: C_m = Concentración de metanol leída en la curva.

f = Factor de dilución de la muestra.

GA = Grado alcoholimétrico de la muestra.

2.5 PREVALIDACIÓN

Antes de iniciar con el proceso de validación se determinaron los siguientes parámetros:

2.5.1 Calibración de la balanza analítica. Se utilizó el método de comparación directa con un patrón. Este es el método más simple y surge a partir de la definición de calibración. En este método se comparó los valores proporcionados por la balanza del laboratorio al medir varios patrones de los que se conocían los valores de las magnitudes de sus pesos. Dicha calibración fue contratada por el Laboratorio Departamental de Salud, con un laboratorio de metrología de la ciudad de Bogotá, quienes reportaron la incertidumbre de la balanza para tres rangos de peso.

2.5.2 Curva de calibración. Para el análisis de metanol en las bebidas alcohólicas, se prepararon estándares en un intervalo de 0.0 hasta 120 %, del valor teórico de concentraciones, teniendo en cuenta el límite de detección

instrumental (LDI) y el rango lineal teóricos (soluciones estándar de 30, 50, 100, 150, 200, 250 ppm de metanol), se determinaron sus absorbancias tomando 4 datos experimentales de cada punto. Con los datos se construyó la curva de calibración y la curva de Ringbom, mediante las cuales se identificó el intervalo lineal y se seleccionó los estándares para elaborar las curvas de trabajo diarias.

2.5.3 Error Fotométrico o Instrumental (EF). El error instrumental se define como:

$$EF = 2 \frac{\sum |X_i - \bar{X}|}{n} \quad (1)$$

Donde:

X_i : Representa los diferentes valores de % T.

\bar{X} : Representa el promedio de los valores de % T.

n : Número de datos (10).

Para determinar el error fotométrico o instrumental (EF), se preparó diez veces un patrón de 150 ppm de alcohol metílico y fueron leídos, pasando primero un blanco de reactivos.

2.5.4 Límite de Detección (LD) y Límite de Detección Instrumental (LDI).

Para determinar LD y LDI se realizó 20 mediciones del blanco de reactivos y dos estándares de concentración baja.

$$LD = \overline{Sb} + 3Sb \quad (2)$$

Donde:

\overline{Sb} : Es la señal media del blanco o del estándar bajo que se haya escogido.

Sb : Es la desviación estándar del blanco o del estándar bajo.

2.5.5 Limite de Cuantificación (LC). En la determinación del LC se analizo veinte veces el blanco de reactivos. El LC se calcula como diez veces la desviación estándar del análisis del blanco o del estándar bajo seleccionado.

$$LC = \overline{Sb} + 10Sb \quad (3)$$

2.5.6 Sensibilidad de Método. Se determino como la pendiente promedio de todas las curvas de calibración realizadas durante la validación.

2.6 VALIDACIÓN

En el procedimiento para la validación de los métodos analíticos, se empleo (tabla 1): dos blancos de reactivos (BK1 y BK2), dos estándares de concentración conocida 0.9C (250 ppm) y 0.09C (50 ppm), dos muestras M_1 y M_2 , dos muestras adicionadas M_1+A_1 ((100 ppm) y M_2+A_2 (150 ppm), (donde A_1 y A_2 son adiciones

estándar de concentración conocida); estos lotes se corrieron 10 veces y se sometieron a tratamiento estadístico.

Tabla 1. Soluciones de trabajo para la validación de las técnicas

Solución #	Descripción
1 y 2	Determinación del testigo. Blanco de reactivos
3	Solución estándar 0.9 C mg/L (250 ppm)
4	Solución estándar 0.09 C mg/L (50 ppm)
5	Muestra 1
6	Muestra 2
7	Muestra 1 + Adición estándar 1 (0.4C) (100 ppm)
8	Muestra 2 + Adición estándar 2 (0.7C) (150 ppm)

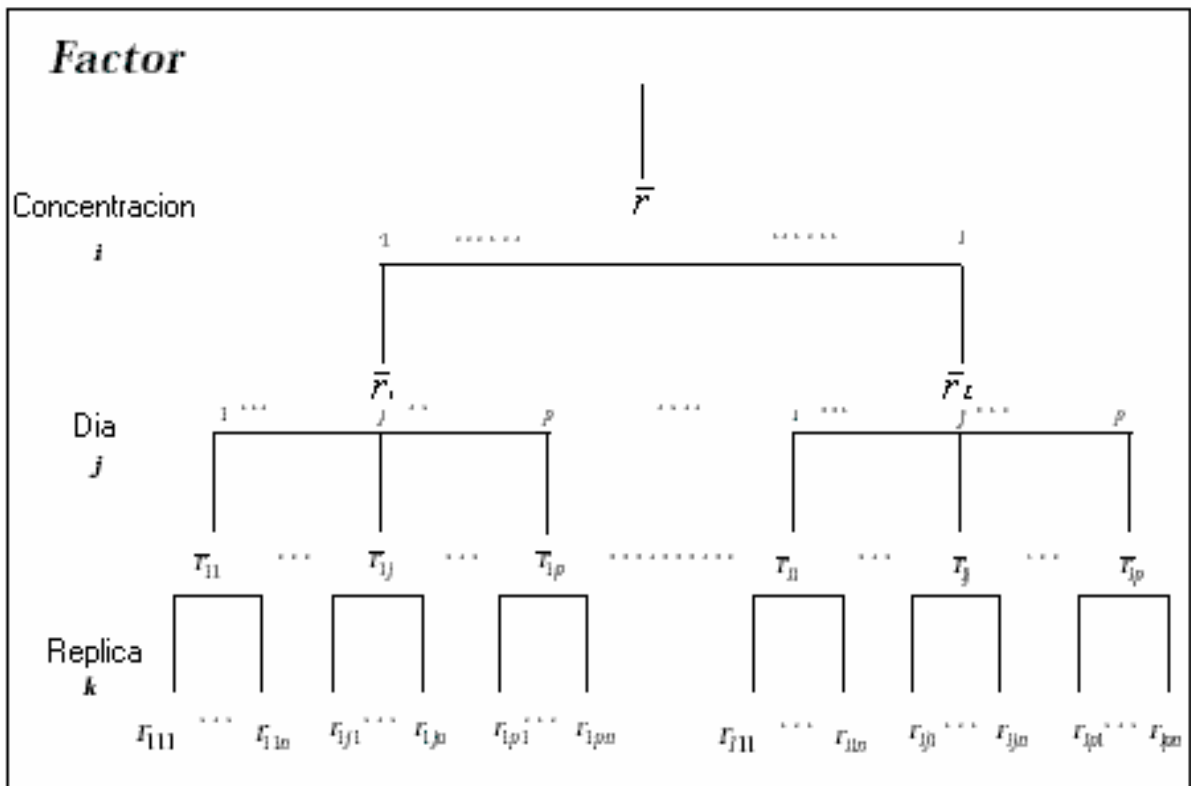
Dentro de cada lote las muestras se analizaron en forma aleatoria; esto permite eliminar los efectos de cambios sistemáticos en factores que no pueden ser controlados y que puedan dar lugar a falsas conclusiones.

2.6.1 Precisión. Se determinó la precisión en varios niveles: repetibilidad, reproducibilidad y la precisión intermedia asociada a cada uno de los factores variados en un diseño anidado. Una de las formas de calcular la precisión de un procedimiento analítico es analizando una muestra n veces variando entre cada ensayo todos aquellos factores que puedan afectar los resultados. Por esta razón, es mejor utilizar diseños anidados. La ventaja de estos diseños es que proporcionan una buena estimación de la precisión intermedia ya que los factores se varían en forma ordenada y así, se puede saber cuáles son los factores que influyen más en la variabilidad de los resultados.

- **Precisión intermedias de series diferentes:**

Se analizaron 10 lotes de soluciones 7 y 8, descritas en la tabla 1, utilizando un diseño anidado de tres factores en los que se varía la concentración, el día y el replicado como se ilustra en la figura 2. Los factores de variabilidad estudiados en este diseño anidado se colocan de forma que los factores que estén más afectados por errores sistemáticos estén mas arriba en el diseño y los menos afectados por errores sistemáticos más abajo (figura 2).

Figura 2. Disposición de los factores concentración, día y replicado del diseño anidado.



Seguendo el diseño de la figura 2, una muestra de concentración i , debería ser analizada dos veces en un mismo día; este proceso debe repetirse durante diez días para cada una de las muestras.

Las varianzas asociadas a la repetibilidad y entre días, pueden obtenerse haciendo un análisis de la varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos a partir del diseño anidado propuesto en la figura 2.

La tabla 2, muestra el ANOVA asociado a un diseño anidado completo de tres factores. La tabla 3, muestra los distintos tipos de precisión (expresados como varianzas) que pueden calcularse a partir del ANOVA de la tabla 2.

Tabla 2. Tabla ANOVA de un diseño completo anidado de tres factores (g.l. son los grados de libertad).

Fuente	Cuadrados Medios	g.l
Concentración	$CM_C = \frac{n.p \sum_{i=1}^l (\bar{r}_i - \bar{r})^2}{l - 1}$	$l - 1$
Día	$CM_D = \frac{n \sum_i^l \sum_{j=1}^p (\bar{r}_{ij} - \bar{r}_i)^2}{l.(p - 1)}$	$l.(p - 1)$
Replica	$CM_R = \frac{\sum_i^l \sum_j^p \sum_{k=1}^n (r_{ijk} - \bar{r}_{ij})^2}{l.p.(n - 1)}$	$l.p.(n - 1)$

Tabla 3. Cálculo de las varianzas obtenidas a partir del ANOVA de los resultados obtenidos en un diseño anidado de tres factores.

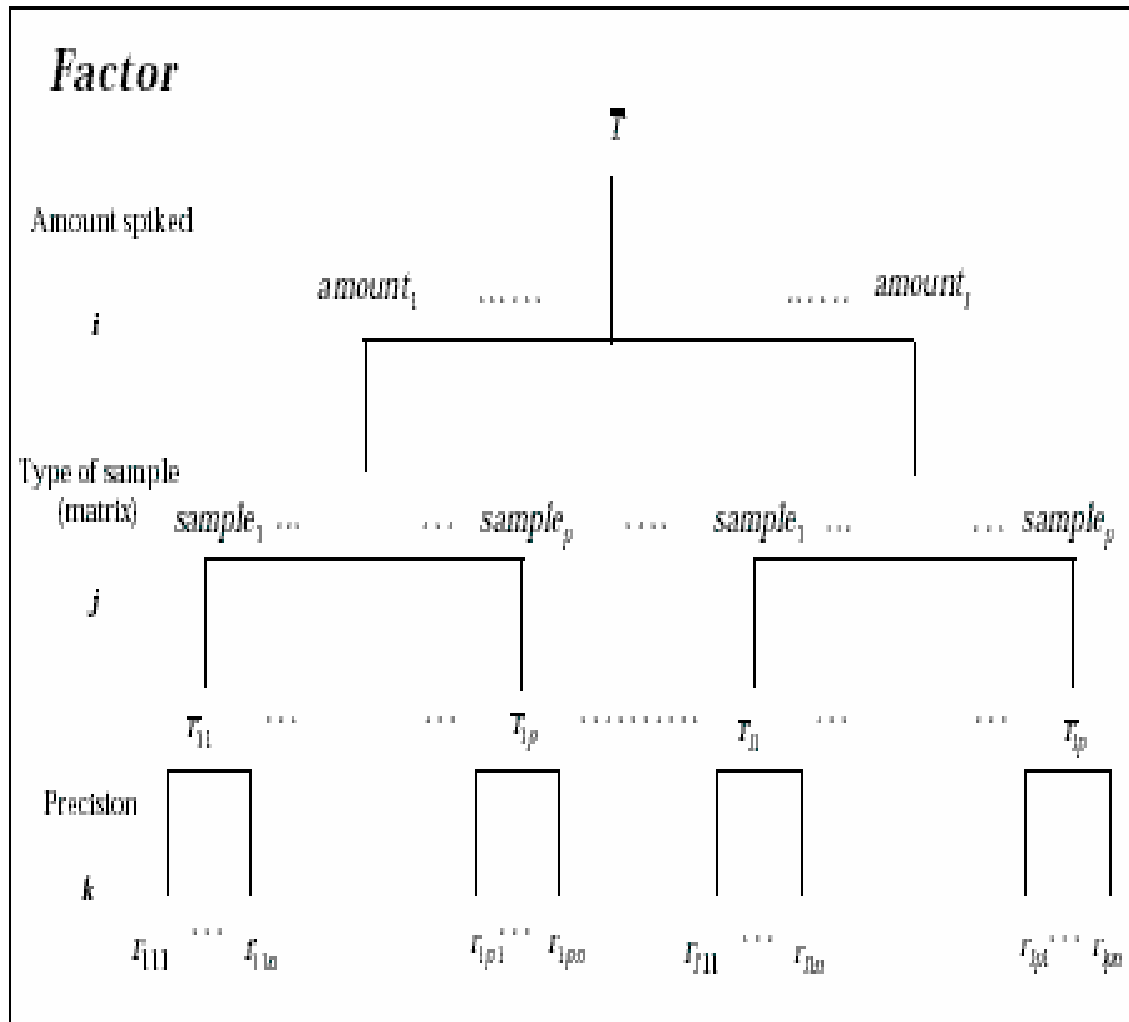
Varianza	Expresión
Repetibilidad, S_R^2	CM_R
Entre días, S_D^2	$\frac{CM_D - CM_R}{n}$
Intermedia, S_I^2	$S_R^2 + S_D^2 + S_C^2$

2.6.2 Trazabilidad. Para el aseguramiento de la trazabilidad de los resultados se utilizó muestras adicionadas. Para verificar la trazabilidad en un intervalo amplio de concentración es necesario evaluar dos tipos de sesgo: el sesgo proporcional (en términos de recuperación) y el sesgo constante. Para evaluar el sesgo proporcional del método es necesario calcular la recuperación variando representativamente la concentración adicionada y el intervalo de matrices de las muestras de rutina. Para ello se utilizó el diseño anidado de tres factores (figura 3).

Según este diseño, el analito se adiciona a tres tipos de muestras que son representativas de las matrices de las muestras de rutina. Esta adición debe hacerse preferiblemente al menos a tres niveles de concentración (en los extremos y en el valor medio del intervalo de concentraciones de las muestras de rutina). Posteriormente, se analizó cada muestra adicionada dos veces en condiciones intermedias. Este diseño anidado permite obtener información útil para el cálculo de la incertidumbre ya que a partir del ANOVA puede obtenerse la incertidumbre debida a la variabilidad de las muestras de rutina e información sobre cómo varía la precisión con la concentración (tabla 18).

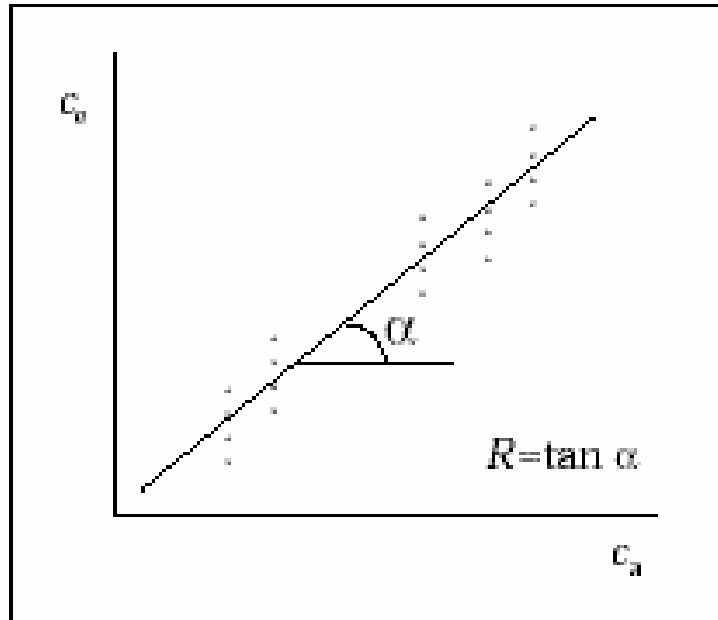
Las adiciones se hicieron en muestras que no contenían concentración inicial del metanol. Se calculó la recuperación de muestras con adiciones de 50, 100 y 150 ppm de metanol, variando las matrices de las muestras utilizando aguardiente, ron y vino; para este fin se analizó cada muestra adicionada dos veces en condiciones intermedias siguiendo el diseño anidado de tres factores que se muestra en la figura 3.

Figura 3. Diseño anidado de tres factores para calcular la recuperación utilizando n muestras adicionadas. El metanol se adiciona a tres niveles de concentración (50, 150 y 250 ppm de metanol). En cada nivel de concentración se adiciona a tres tipos de muestra diferentes (aguardiente, ron y vino). Cada una de las muestras adicionadas debe analizarse dos veces en condiciones intermedias.



La figura 4, muestra la recta de adiciones obtenida al representar la concentración encontrada frente a la concentración adicionada. La pendiente de la recta nos proporciona una estimación de la recuperación del método y la ordenada en el origen proporciona una estimación del sesgo constante del método.

Figura 4. Recta de adiciones estándar. La pendiente de la recta corresponde a la recuperación del método.



Para verificar la trazabilidad de los resultados se verifico que la pendiente de la recta no difiera significativamente de uno y que la ordenada de la recta no difiera significativamente de cero, esto se hizo mediante test conjunto, se tuvo en cuenta la correlación entre la pendiente y la ordenada de la recta. El valor de F calculado se obtiene a partir de la ecuación (4):

$$F = \frac{\delta_{cte}^2 + 2.\bar{C}a.\delta_{cte}.(R-1) + \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1} C^2 a,ij}{n} (1-R)^2}{2.Se^2 / n} \quad (4)$$

Donde $C_{a,ij}$ es la concentración adicionada i al tipo de muestra j ; \bar{C}_a es el valor medio de todos los $C_{a,ij}$, p son los niveles de concentración en que se adiciona el analito; q el número de matrices a las que se adiciona el analito a cada nivel de concentración; n es el número de puntos de la recta de adiciones ($n = p \cdot q$); S_e es la desviación estándar de los residuales de la recta; R es la recuperación y corresponde a la pendiente de la recta; y δ_{cte} es el sesgo constante y corresponde a la ordenada en el origen de la recta. El valor F calculado se comparó con el de F tabulado de una distribución de 2 y $n - 2$ grados de libertad. Si el valor de F calculado es menor que el de F tabulado, el sesgo constante y proporcional del método no son significativos.

2.6.3 Incertidumbre.

$$U = U_{proc} + U_{traz} + U_{otros} \quad (5)$$

Para calcular la incertidumbre de los resultados es necesario conocer: 1) la incertidumbre del procedimiento; 2) la incertidumbre debido a la verificación de la trazabilidad y 3) la incertidumbre debido a otros términos.

La incertidumbre del procedimiento y de la variabilidad de las de las matrices de las muestras de rutina se calculo a partir del ANOVA de las concentraciones encontradas, obtenidas al analizar las muestras adicionadas siguiendo el diseño propuesto en la figura 3. La tabla 4, muestra la tabla ANOVA asociada al diseño experimental de la figura 3, y la tabla 5, las varianzas que pueden calcularse a partir del ANOVA.

Tabla 4. Tabla ANOVA para calcular la incertidumbre de la matriz y del procedimiento a partir del diseño experimental de la figura 3.

Fuente	Cuadros medios	g.l
Matriz	$MS_{matriz} = \frac{2 \cdot \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^q (c_{e,ij} - \bar{c}_{e,i})^2}{p \cdot (q - 1)}$	$p \cdot (q - 1)$
Precisión	$MS_I = \frac{2 \cdot \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^q \sum_{k=1}^2 (c_{e,ijk} - \bar{c}_{e,ij})^2}{p \cdot q \cdot (2 - 1)}$	$p \cdot q \cdot (2 - 1)$

Tabla 5. Cálculo de las varianzas de la matriz y de la precisión a partir del ANOVA de la tabla 4.

Varianza	Expresión
Precisión intermedia, S_I^2	MS_I
Matriz, S_{matriz}^2	$\frac{MS_{matriz} - MS_I}{2}$

- **Incertidumbre del procedimiento:** La incertidumbre del procedimiento se calcula a partir de la varianza de la precisión, S_I^2 , que se obtenida en la tabla 5. Esta varianza corresponde a la precisión intermedia del método ya que las muestras adicionales se analizaron en condiciones intermedias. Por tanto, la incertidumbre del procedimiento puede calcularse utilizando la siguiente ecuación:

$$U_{proc} = \frac{1}{R} \sqrt{\frac{S_I^2}{p_s}} \quad (6)$$

Donde R , es la recuperación del método, S_I^2 , es la precisión intermedia y p_s , es el número de veces que se analiza la muestra de rutina en diferentes series.

- **Incertidumbre de la variabilidad de las matrices de la muestra de rutina:** Esta incertidumbre se calcula a partir de la variabilidad de las muestras de rutina que puede calcularse utilizando la información obtenida al analizar las muestras adicionadas ya que el analito se adiciona a diferentes tipos de muestras que son representativas de la variabilidad de las muestras de rutina. Esta incertidumbre se calcula a partir de la varianza de la matriz, S^2_{matriz} , obtenida en la tabla 5.

$$U_{matriz} = \frac{S_{matriz}}{R} \quad (7)$$

- **Incertidumbre de la verificación de la trazabilidad:** Para calcular la incertidumbre de la verificación de la trazabilidad, debe tenerse en cuenta la correlación que hay entre la pendiente (recuperación del método) y la ordenada de la recta (sesgo constante). Esta incertidumbre se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$U_{traz} = \frac{S_e}{R_e} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(c_{corr} - \bar{c}_a)^2}{\sum \sum (c_{a,ij} - \bar{c}_a)^2}} \quad (8)$$

Donde S_e , es la desviación estándar de los residuales de la recta, $c_{a,ij}$, es la concentración adicionada i al tipo de muestra j , \bar{c}_a , es el valor medio de todos los $c_{a,ij}$ y n es el número de puntos de la recta de adiciones.

- **Calculo de la incertidumbre total:** La expresión propuesta para el cálculo global de la incertidumbre es la siguiente:

$$u(c_{corr}) = \frac{1}{R} \sqrt{\frac{S_I^2}{p_s} + S_e^2 \cdot \left(\frac{1}{n} + \frac{(c_{corr} - \bar{c}_a)^2}{\sum \sum (c_{a,ij} - \bar{c}_a)^2} \right) + S_{matriz}^2} \quad (9)$$

El primer término corresponde a la incertidumbre del procedimiento, el segundo a la incertidumbre de la verificación de la trazabilidad y el tercero a la incertidumbre de otros términos debida a la variabilidad de las matrices de las muestras de rutina.

La incertidumbre expandida se obtuvo multiplicando la incertidumbre estándar, u , por el factor de cobertura, $k = 2$.

3. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 PREVALIDACIÓN

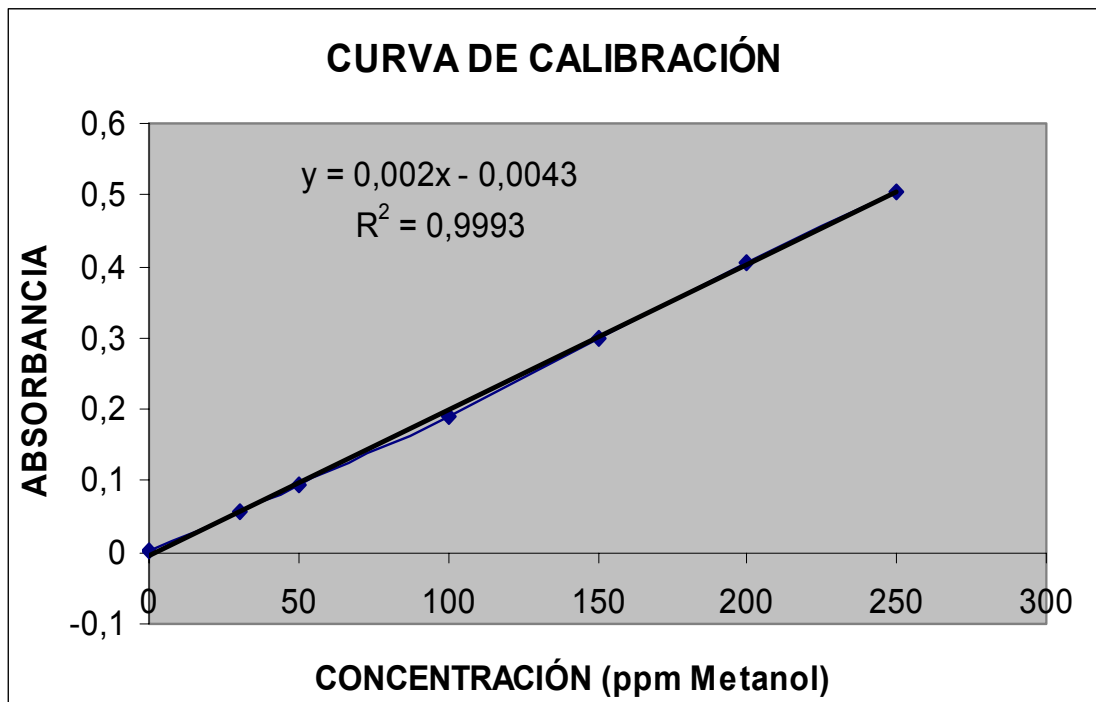
A continuación se presentan los resultados obtenidos en la validación del método analítico para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas.

3.1.1 Curva de calibración. En la tabla 6, se encuentran los datos de concentración y absorbancia para la construcción de la curva de calibración, la cual se realizó con patrones de una concentración desde 0 hasta 250 ppm de Metanol en el espectrofotómetro UV-VIS Génesis 4 a una longitud de onda 575 nm; para cada patrón se realizaron diez replicas.

Tabla 6. Datos para la construcción de la curva de calibración para el análisis de metanol.

Concentración (ppm Metanol)	Absorbancia (575 nm)	% Transmitancia
0	0.003	99.31
30	0.057	87.70
50	0.093	80.72
100	0.191	64.42
150	0.299	50.23
200	0.407	39.17
250	0.504	31.33

Figura 5. Curva de calibración para el análisis de metanol. Espectrofotómetro UV-VIS Génesis 4 a 575 nm.



Mediante la curva de Ringbom se determinó que el rango lineal de concentración es de 50 a 250 ppm de Metanol (figura 6). Por esta razón se analizaron estándares entre 50 y 250 ppm de Metanol, para construir la curva de trabajo, con la cual se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9991, como se observa en la figura 7.

Figura 6. Curva de Ringbom.

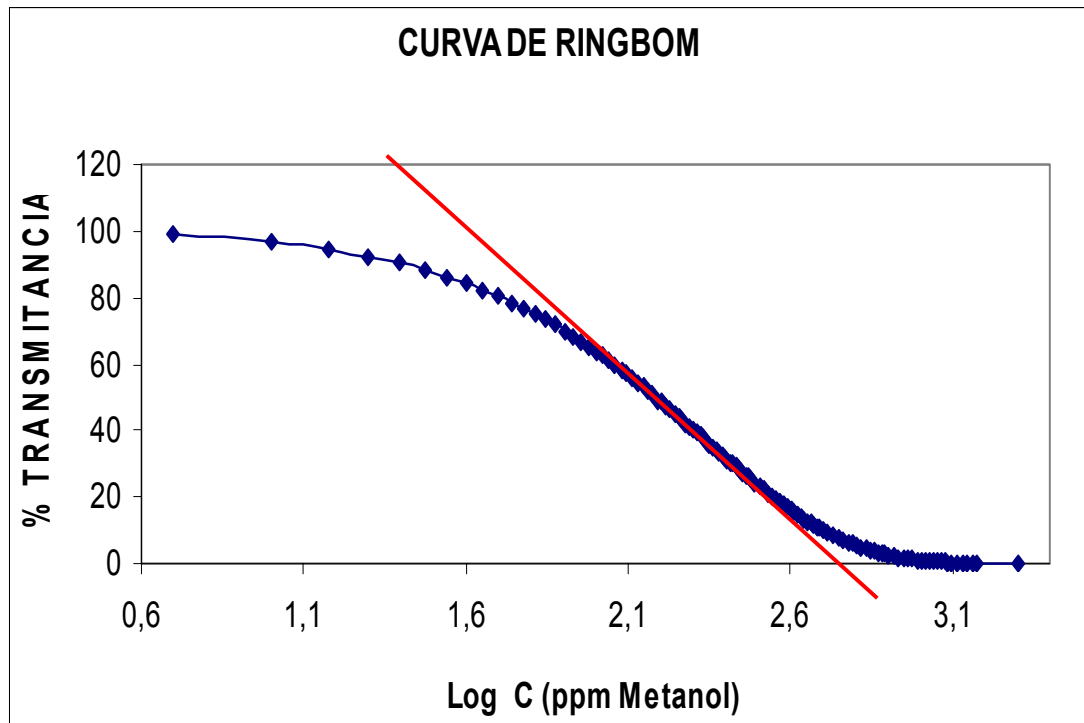
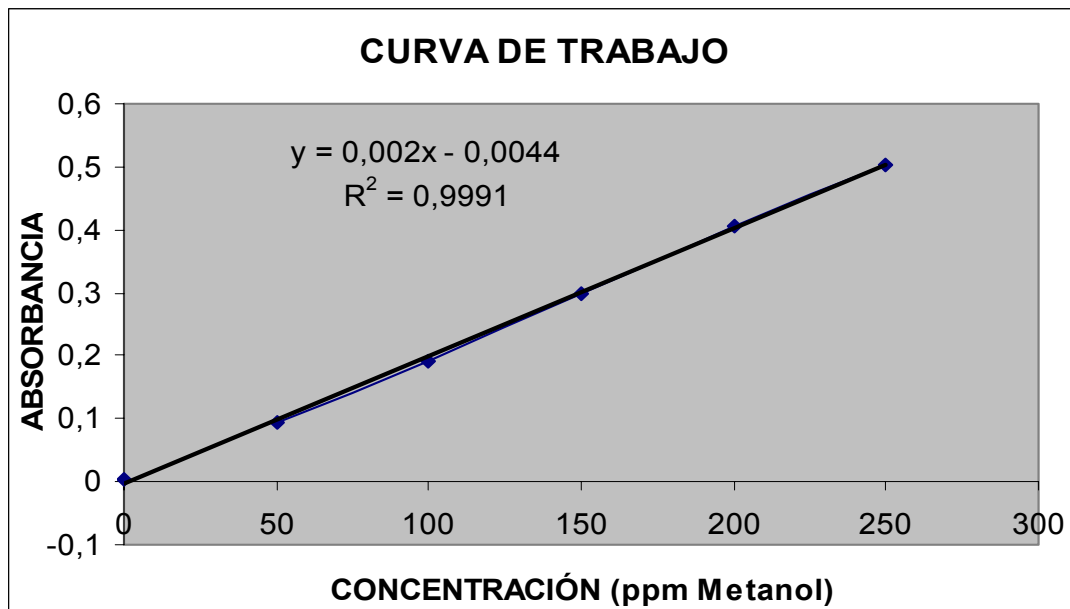


Figura 7. Curva de Trabajo para el análisis de metanol. Espectrofotómetro UV-VIS Génesis 4, a 575 nm.



3.1.2 Error Fotométrico o Instrumental (EF). El error instrumental se define como:

$$EF = 2 \frac{\sum |X_i - \bar{X}|}{n} \quad (1)$$

Donde:

X_i : Representa los diferentes valores de % T.

\bar{X} : Representa el promedio de los valores de % T.

n : Número de datos (10).

Para determinar el error fotométrico o instrumental (EF), se preparó diez veces un patrón de 150 ppm de alcohol metílico y serán leídos, pasando primero un blanco de reactivos (tabla 7).

Tabla 7. Error fotométrico o instrumental para metanol. Concentración 150 ppm metanol.

Solución #	Concentración (ppm Metanol)	% Transmitancia (575 nm)
1	150.15	50.69
2	154.15	49.77
3	151.15	50.47
4	153.15	50.00
5	154.15	49.77
6	152.65	50.12
7	153.65	49.89
8	151.15	50.47
9	152.15	50.23
10	153.65	49.89

El error fotométrico se calculó mediante la ecuación (1), el valor obtenido para el equipo utilizado es **0.536** % de Transmitancia.

3.1.3 Limite de Detección (LD), Límite de Detección Instrumental (LDI) y Límite de Cuantificación. Aplicando las ecuaciones 2 y 3, se calculó el Límite de Detección del método. Para la determinación del LDI y el LC, se empleo los datos del estándar de 8.00 ppm por presentar un valor bajo de CV de 6.04 % que esta dentro de los límites aceptados por el criterio del laboratorio, que establece que el coeficiente de variación debe ser menor de 10% en valor absoluto (tabla 8).

Tabla 8. Límite de Detección, Límite de detección Instrumental y Límite de Cuantificación para metanol.

Nº	[] Blanco Metanol	[] 5.00 ppm Metanol	[] 8.00 ppm Metanol
1	2.45	5.25	8.05
2	3.15	4.75	7.45
3	3.65	5.25	7.15
4	2.65	4.65	8.02
5	2.65	5.15	7.65
6	3.15	5.65	8.65
7	4.15	5.15	8.01
8	2.15	4.85	7.45
9	3.15	4.65	7.15
10	4.65	5.35	7.25
11	3.65	4.25	8.02
12	4.15	5.24	8.56
13	4.15	5.21	7.65
14	3.15	4.65	7.25
15	3.65	5.15	7.45
16	2.15	4.25	7.95
17	4.65	5.05	8.05
18	3.65	4.15	8.45
19	2.65	4.65	8.25
20	4.15	5.65	7.45
Promedio	3.45	4.95	7.78
Desviación S	0.7809	0.4372	0.4701
CV	22.63 %	8.83 %	6.04 %
LD	5.79 ppm		
LDI	9.19 ppm		
LC	12.48 ppm		

3.1.4 Sensibilidad de Método. Se determinó como la pendiente de la curva de calibración.

La figura 7, muestran los promedios de las curvas de calibración obtenidas a lo largo del proceso de validación; en la figura se observa los promedios de los valores de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación. La sensibilidad para metanol en bebidas alcohólicas es 0.002 ppm y se obtuvo como la pendiente promedio para las curvas realizadas durante todo el proceso de validación.

3.2 VALIDACIÓN

A continuación se muestran las lecturas obtenidas a partir del diseño experimental propuesto, para obtener información acerca de la repetibilidad y la precisión intermedia entre días del procedimiento analítico.

3.2.1 Precisión. Repetibilidad. La tabla 9, presenta los resultados de concentración obtenidos para evaluar la precisión en términos de repetibilidad; para esto se analizaron las soluciones 7 y 8 (tabla 1), diez veces durante un mismo día; En ella se observa unos CV bajos, lo que indica una buena precisión en términos de repetibilidad, ya que se encuentra por debajo del 10 %, límite aceptado para una buena precisión. La prueba de la F para las varianzas obtenidas en cada una de las concentraciones, indica que la concentración (dentro del intervalo lineal) no afecta significativamente la precisión en términos de repetibilidad (tabla 10).

Tabla 9. Datos de Repetibilidad de las lecturas de Metanol.

Concentración	100 ppm 7	150 ppm 8
Lec 1	96.65	150.15
Lec 2	97.15	154.15
Lec 3	98.95	151.15
Lec 4	99.15	153.15
Lec 5	102.32	154.15
Lec 6	97.56	152.65
Lec 7	101.15	153.65
Lec 8	98.15	151.15
Lec 9	103.15	152.15
Lec 10	99.50	153.65
Promedio	99.27	152.60
S	1.3532	1.4034
CV %	2.37	0.92

Tabla 10. Prueba de la F para la repetibilidad de dos concentraciones.

	Varianza
100 ppm	1.8312
150 ppm	1.9695
F Calculada	1.0755
F Tabulada	4.026

Reproducibilidad. La tabla 11, muestra las lecturas obtenidas, para el estudio de la precisión en términos de reproducibilidad, para esto se evaluaron las matrices M1 y M2, correspondientes a muestras de rutina, además de los estándares bajo y alto, utilizados para chequear la respuesta del equipo durante la lectura de los lotes.

Tabla 11. Resultados de la lectura por lotes, para el estudio de la reproducibilidad.

Solución	1 (BK₁) [] ppm	2 (BK₂) [] ppm	3 (0.9C) [] ppm	4 (0.09C) [] ppm	5 (M₁) [] ppm	6 (M₂) [] ppm	7 (M₁ + A₁) [] ppm	8 (M₂ + A₂) [] ppm
Lote 1	3.40	2.65	253.40	52.90	5.65	6.15	102.90	154.23
Lote 2	2.65	3.65	250.40	53.65	5.15	4.65	104.15	152.40
Lote 3	3.65	2.65	251.15	55.65	2.15	7.65	102.40	154.73
Lote 4	2.65	2.65	256.15	51.65	4.15	5.15	100.50	154.15
Lote 5	4.15	2.65	252.40	53.40	7.15	5.90	103.40	152.15
Lote 6	4.15	3.40	247.90	50.40	7.65	5.15	103.73	152.65
Lote 7	3.40	3.65	248.15	52.40	4.15	3.65	101.40	152.40
Lote 8	3.40	4.40	252.65	53.40	4.65	3.65	102.23	154.90
Lote 9	3.65	3.40	254.15	55.65	4.65	4.15	102.65	153.40
Lote 10	3.40	1.90	246.90	49.40	3.15	5.15	102.15	155.15
Promedio	3.45	3.10	251.33	52.85	4.85	5.13	102.55	153.62
CV	14.81	23.37	1.19	3.81	34.43	23.92	1.06	0.75

Los coeficientes de variación para los estándares de chequeo (soluciones 3 y 4) descartan cualquier desajuste instrumental durante el estudio de la precisión, La tabla 12, presenta los resultados obtenidos para el estudio de la reproducibilidad; estos se determinaron para diferentes días mediante el análisis de las soluciones

7 y 8, siguiendo el diseño anidado planteado en la figura 2. Los coeficientes de variación 1.45 y 0.99 obtenidos para los estándares 100 y 150 ppm de Metanol respectivamente, indican una reproducibilidad aceptable, ya que sus valores no superan los límites sugeridos.

Al realizar la prueba de la F para los estándares evaluados, se encontró que la concentración no afecta significativamente a la precisión en términos de reproducibilidad (tabla 13).

Tabla 12. Precisión intermedia-Días del método analítico para la determinación de Metanol.

Solución	100 ppm 7	150 ppm 8
Día 1	97.25	148.08
Día 2	99.00	147.75
Día 3	96.00	147.08
Día 4	100.25	149.00
Día 5	96.25	146.25
Día 6	96.08	147.50
Día 7	97.25	148.75
Día 8	97.58	151.25
Día 9	98.00	149.25
Día10	99.00	150.00
Promedio	97.67	148.49
Desviación S	1.4148	1.4728
CV %	1.45	0.99

Tabla 13. Prueba de la F para la reproducibilidad.

	Varianza
100 ppm	2.0017
150 ppm	2.1691
F Calculada	1.084
F Tabulada	4.026

Como se esperaba, La precisión en términos de reproducibilidad es mayor que la obtenida para la repetibilidad; sin embargo sus varianzas no son significativamente diferentes, a ninguno de los niveles de concentración evaluados. Por lo que se asume que el factor día no afecta de forma significativa a la precisión y que el método es repetible y reproducible bajo las condiciones de análisis del laboratorio (Tabla 14). La reproducibilidad proporciona la mayor variabilidad de los resultados ya que se obtiene cuando se varían todos los posibles factores que puedan afectar a un resultado. Por lo tanto, la repetibilidad proporciona la menor variabilidad que puede haber entre resultados ya que se obtienen en intervalos cortos de tiempo sin variar ningún factor.

Tabla 14. Prueba de la F (P = 0.005; una cola) repetibilidad y reproducibilidad.

	100 ppm	150 ppm
Réplicas	1.8312	1.9695
Días	2.0017	2.1691
F calculado	1.093	1.101
F tabulado	3.179	3.179

Tabla 15. Cálculo de las varianzas obtenidas a partir del ANOVA de los resultados del diseño anidado de tres factores.

Varianza	Expresión	Resultado
Repetibilidad, S_R^2	CM_R	2.147 ppm
Entre días, S_D^2	$\frac{CM_D - CM_R}{n}$	3.097 ppm
Intermedia, S_I^2	$S_R^2 + S_D^2$	5.244 ppm

La tabla 15, muestra las varianzas para las fuentes de variación evaluadas, producto del diseño anidado propuesto (figura 2); Además del valor obtenido para la precisión intermedia total SI.

3.2.2 Trazabilidad. La trazabilidad se calculó mediante la recuperación de las matrices aguardiente (matriz 1), ron (matriz 2) y vino (matriz 3). Cada muestra adicionada, se analizó por duplicado en condiciones intermedias, para lo cual, se utilizó el diseño anidado de tres factores propuesto en la figura 3.

Con la concentración de cada una de las muestras adicionadas se elaboró las respectivas rectas de adiciones estándar (figura 4).

Tabla 16. Datos de la concentración encontrada para la elaboración de las rectas de adiciones estándar para las matrices de aguardiente, ron y vino.

	Matriz1 50 ppm	Matriz1 150 ppm	Matriz1 250 ppm	Matriz2 50 ppm	Matriz2 150 ppm	Matriz2 250 ppm	Matriz3 50 ppm	Matriz3 150 ppm	Matriz3 250 ppm
Lec 1	49.40	148.15	250.40	54.90	152.65	251.90	50.9	151.65	249.15
Lec 2	52.90	148.65	247.00	50.65	152.90	249.90	55.40	152.90	247.65
Lec 3	49.15	147.15	247.50	53.15	150.15	248.65	54.40	153.90	246.65
Lec 4	49.90	147.50	246.15	54.40	153.90	252.90	53.40	152.90	247.65
Lec 5	48.90	147.65	248.15	51.90	154.40	247.15	50.90	150.58	251.90
Lec 6	49.65	149.15	247.65	52.40	152.90	248.15	52.90	153.90	247.15
Lec 7	48.65	147.65	247.15	52.40	149.90	247.15	53.40	152.90	250.40
Lec 8	49.90	150.00	246.65	51.65	153.90	248.00	52.90	153.65	247.00
Prom	49.81	148.24	247.58	52.68	152.59	249.23	53.03	152.80	248.44
S	1.3292	0.9661	1.2939	1.4170	1.6943	2.1618	1.5526	1.1616	1.8711
CV %	2.67	0.65	0.52	2.69	1.11	0.87	2.93	0.76	0.75

La tabla 16, muestra una disminución del coeficiente de variación, con el aumento de la concentración para todas las matrices, indicando una variación menos significativa para la recuperación, conforme aumenta la concentración.

En las figuras 8, 9 y 10, se muestran las curvas de adición estándar, para las matrices evaluadas, la recuperación del método se obtuvo como la pendiente promedio de las adiciones para cada matriz, el valor obtenido para la pendiente fue 0.9762, e indica que la recuperación es aceptable ya que se encuentra dentro del intervalo $0.95 < R < 1.05$.

Figura 8. Recta de adiciones estándar para la matriz de Aguardiente. Ca, es la concentración adicionada y Ce, es la concentración encontrada.

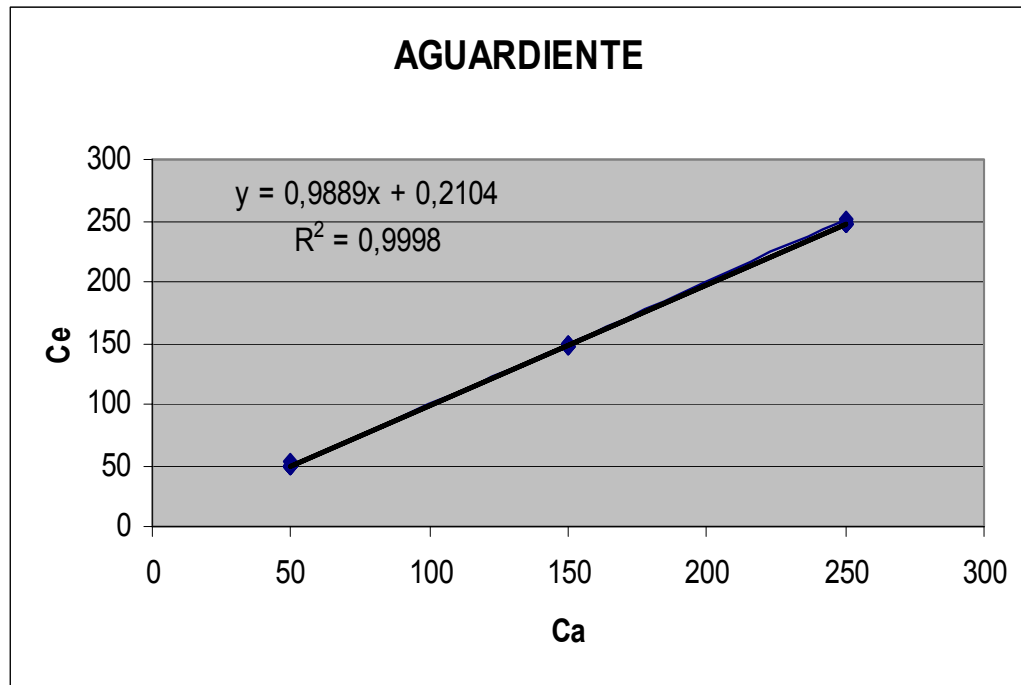


Figura 9. Recta de adiciones estándar para la matriz de Ron. Ca, es la concentración adicionada y Ce, es la concentración encontrada.

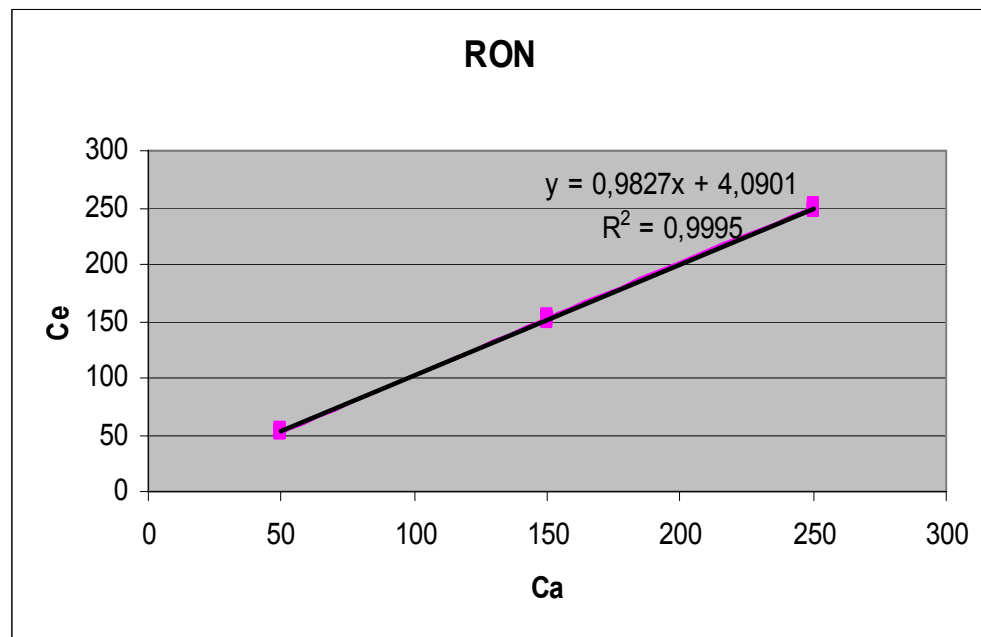
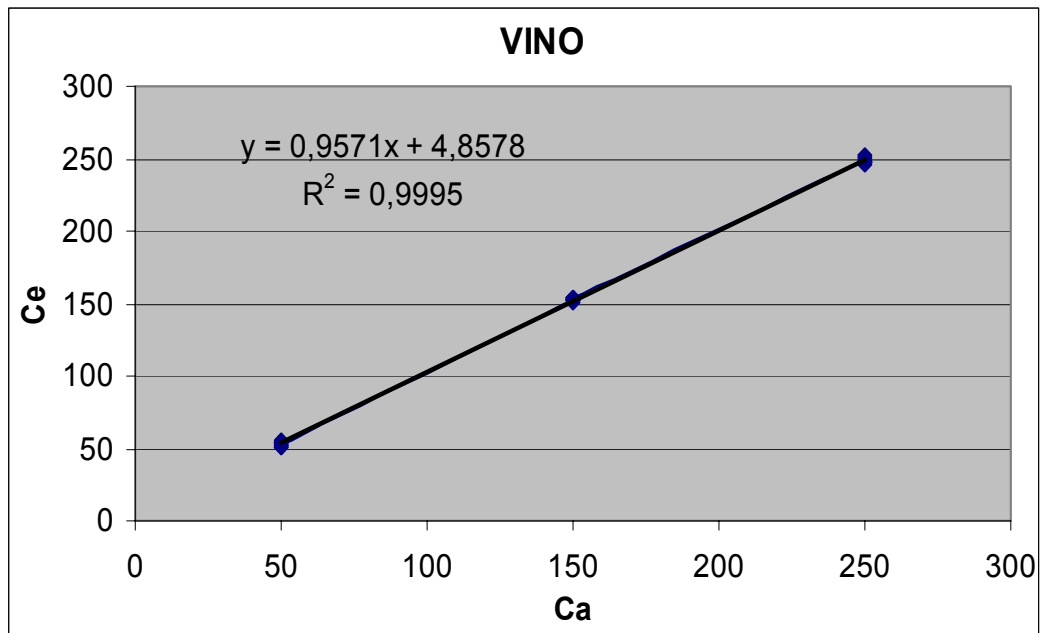


Figura 10. Recta de adiciones estándar para la matriz de Vino. Ca, es la concentración adicionada y Ce, es la concentración encontrada.



En La tabla 17, se muestran los valores que se sustituyeron en la ecuación (4), y hallar el valor F calculado; debido a que este, es menor que F tabulado, se concluye que el sesgo constante y proporcional del método, para las matrices evaluadas y con la metodología especificada, no son significativos. Por tanto, los resultados obtenidos con el método para el análisis de metanol son trazables.

Tabla 17. Valores de los términos de la ecuación (4) y F calculado y tabulado.

Termino	Valor
$\bar{C}a$	150
$\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^q C^2 a_{,ij}$	262500
Se	2.1825
R	0.9762
δ_{cte}	3.0528
p	3
q	3
$n = p * q$	9
F	3.819
$F_{tabulado}$	4.995

3.3 INCERTIDUMBRE

La incertidumbre del procedimiento y la variabilidad de las de las matrices de las muestras de rutina, se calculó a partir del ANOVA de las concentraciones encontradas obtenidas al analizar las muestras adicionadas siguiendo el diseño propuesto en la figura 3. La tabla 18, muestra las varianzas que se calcularon a partir del ANOVA (tabla 4).

Tabla 18. Cálculo de las varianzas de la matriz y de la precisión a partir del ANOVA de la tabla 4.

Varianza	Expresión	Resultado
Precisión intermedia, S_I^2	MS_I	4.708 ppm
Matriz, S_{matriz}^2	$\frac{MS_{matriz} - MS_I}{2}$	1.121 ppm

- **Incertidumbre del procedimiento:**

La incertidumbre del procedimiento se calculó a partir de la ecuación (6), reemplazando tanto la precisión S_I^2 , (tabla 18), como los valores de R , p_s , cada uno de ellos se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Incertidumbre del procedimiento.

R	S_I^2	p_s
0.9762	4.708	2
U_{proc}	± 1.572 ppm	

- **Incertidumbre de la variabilidad de las matrices de la muestra de rutina:**

Esta incertidumbre se calcula a partir de la ecuación (7) y la varianza de la matriz, S_{matriz}^2 , obtenida en la tabla 18.

Tabla 20. Incertidumbre de la variabilidad de las matrices.

S_{matriz}	R
1.121 ppm	0.9762
U_{matriz}	± 1.148 ppm

- **Incertidumbre de la verificación de la trazabilidad:**

Esta incertidumbre se calcula a partir de la ecuación (8) cuyos términos se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Valores de los términos de la ecuación (8).

Término	Valor
S_e	2.1825
R	0.9762
\bar{C}_a	150
$\sum \sum (C_{a,ij} - \bar{C}_a)$	60000

La tabla 22, muestra los valores de la incertidumbre de la verificación de la trazabilidad para los tres niveles de concentración evaluados durante los estudios de la trazabilidad.

Tabla 22. Incertidumbre de la verificación de la trazabilidad.

[] ppm	Incertidumbre
50	± 1.581 ppm
150	± 1.291 ppm
250	± 1.581 ppm

- **Calculó de la incertidumbre total**

La tabla 23, muestra el aporte a la incertidumbre global de cada una de las fuentes estudiadas de los tres niveles de concentración evaluados.

Tabal 23. Incertidumbre aportada por cada una de las fuentes estudiadas.

Fuente	50 ppm	150 ppm	250 ppm
Procedimiento	1.572	1.572	1.572
Matriz	1.148	1.148	1.148
Trazabilidad	1.581	1.291	1.581
Total	± 4.301	± 4.011	± 4.301
CV %	8.60	2.67	1.72

Figura 11. Principales fuentes de incertidumbre evaluadas.

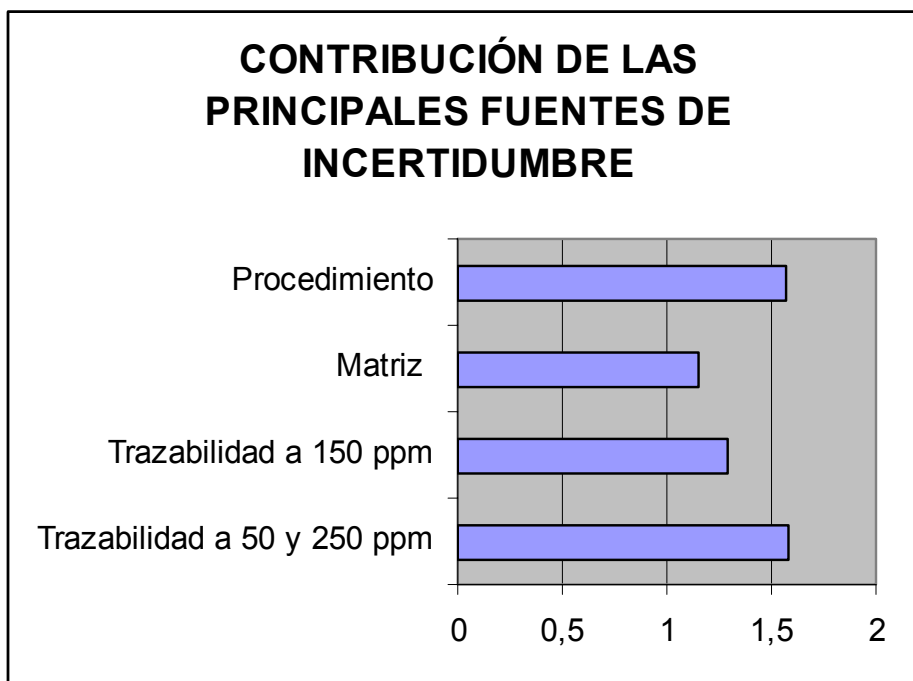
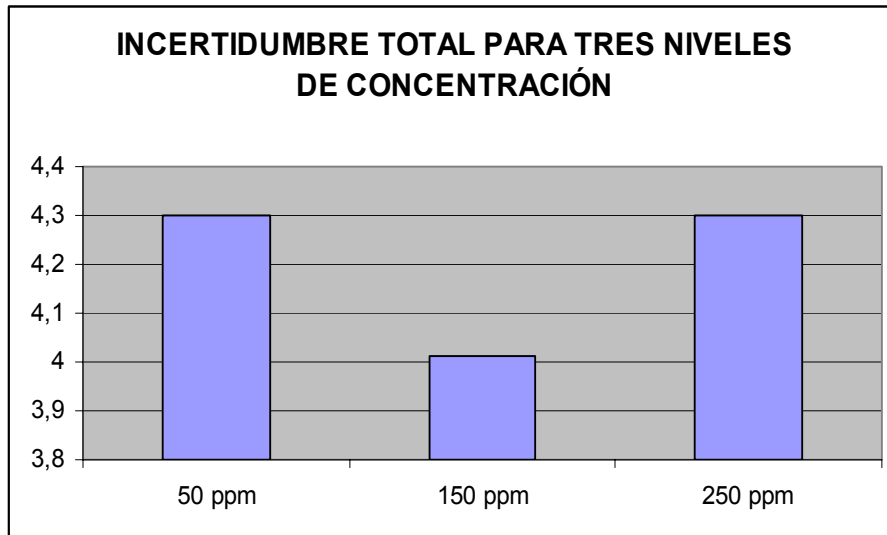


Figura 12. Incertidumbre total para tres niveles de concentración.



Los coeficientes de variación de la incertidumbre total con respecto a la concentración evaluada, indican que esta es menos significativa a niveles de concentración superiores a 150 ppm, y que esta representará niveles superiores al 8.60 % a concentraciones menores a 50 ppm.

Como lo muestra la figura 12, los valores de incertidumbre para los 3 niveles de concentración evaluados, no difieren significativamente por lo que puede asumirse, que se comporta de manera constante a lo largo del intervalo evaluado.

3.4 ENSAYO INTERLABORATORIOS

El Laboratorio Departamental de Salud Pública de Santander, solicitó su participación en el programa interlaboratorios para el aseguramiento de la calidad para el monitoreo de metanol en bebidas alcohólicas, organizado por el INVIMA, sin embargo y aunque el laboratorio ya está inscrito, no llegaron las muestras a

tiempo, lo cual imposibilitó la comprobación de la trazabilidad, y confiabilidad de los resultados mediante la comparación con otros laboratorios, quedando esta información pendiente para el reporte del trabajo final de grado, pero no así para información de uso interno del laboratorio.

4. CONCLUSIONES

El método de análisis para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas por colorimetría en el espectrofotómetro UV-VIS Génesis 4 en el laboratorio de Medicamentos y Bebidas Alcohólicas de la Secretaria de Salud Publica, presenta los valores de trabajo que se resumen a continuación (tabla 24).

Tabla 24. Intervalo de trabajo y calibración instrumental para análisis de Metanol.

Variable	Valor
Intervalo lineal	50 a 250 ppm de Metanol
Error instrumental	0,536 %T
Correlación lineal	0,9994
LD	5.79 ppm
LDI	9.19 ppm
LC	12.48 ppm
Sensibilidad	0.002

Los niveles de rendimiento especificados que se obtuvieron demuestran que el método de análisis de metanol es adecuado para su aplicación en el análisis de bebidas alcohólicas, bajo las condiciones particulares y requerimientos del laboratorio.

La metodología diseñada para el proceso de validación presentó resultados prácticos acordes con los diseños teóricos propuestos.

La evidencia estadística permite determinar una buena confiabilidad del método analítico en el laboratorio y por tanto, la generación de seguridad en las intervenciones en eventos de interés en la salud pública.

El método utilizado para el análisis de metanol en bebidas alcohólicas, presenta una precisión aceptable en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Se demostró que el método analítico es trazable a un nivel interno, quedando pendiente constatar dicha trazabilidad mediante un ensayo interlaboratorios.

La incertidumbre no presentó diferencias significativas dentro del intervalo de concentraciones evaluado, por tanto se puede asumir como constante, sin embargo su variación es más significativa a concentraciones menores.

Se aplicó satisfactoriamente la propuesta para el cálculo global de la incertidumbre, hecha por Maroto y Col, demostrando ser práctica, lo cual prueba que el proceso se puede realizar paralelamente con el trabajo rutinario analítico del laboratorio, sin el requerimiento de dedicación exclusiva.

RECOMENDACIONES

Se recomienda controlar adecuadamente la temperatura (20° C) durante la lectura de las muestras en el espectrofotómetro, ya que pequeños cambios producen cambios significativos en la respuesta del equipo.

Se requiere que el laboratorio tenga y ejecute un plan sistemático de mantenimiento de los equipos analíticos, en este caso el espectrofotómetro, de manera que no se presenten limitaciones en el trabajo por falta de insumos o repuestos adecuados, y que ante cualquier falla se pueda recurrir al servicio de revisión y diagnóstico especializado.

Continuar la participación del laboratorio de Medicamentos y Bebidas Alcohólicas, en los ejercicios de interlaboratorios, tomando las acciones correctivas a que haya lugar para mejorar el desempeño para cada método de análisis.

Modificar y actualizar el proceso de validación del método en el laboratorio de Medicamentos y Bebidas Alcohólicas, cuando se realice un cambio de equipo.

Mejorar la disponibilidad de recursos en el laboratorio de Medicamentos y Bebidas Alcohólicas, de tal manera que cuenten con una cantidad de insumos, materiales y reactivos que agilicen los procesos de montaje y validación de otros métodos analíticos realizados por el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. Ed 15. 1990.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. Recommendation for the definition, estimation and use of the detection limit. En : Analyst. Vol. 112 (Feb. 1987)

CASTILLO AGUILAR, Beatriz y GONZALES HERNANDEZ, Rolando. Protocolo de validación de métodos para la cuantificación de fármacos. En: Rev Cubana Farm. (1997); 30 (1).

DELGADO MIRABET, Dulce Maria. Aspectos fundamentales en la validación de métodos de ensayo. Cuba, 2004. Instituto de Investigaciones en Normalización.

EURACHEM. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2 ed. EURACHEN, 2000. Disponible en internet <URL:<http://www.eurachem.bam.de/index.htm>>.

FERRÉ, Joan y RUIS, Xavier F. Introducción al diseño estadístico de experimentos. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

GREEN, J. A practical guide to analytical method validation. En : Analytical Chemistry News & Features (May. 1996); p. 305A-309A.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Administración de la calidad y aseguramiento de la calidad. Bogotá : ICONTEC, 1994. : il. (NTC 8402)

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Requisitos generales relativos la competencia de laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá : ICONTEC, 2001. : il. (NTC-ISO-IEC 17025)

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Estadística: Vocabulario y símbolos. Parte 1: Probabilidad y términos estadísticos en general. Ginebra: ISO, 1993. (ISO 3534-1).

_____. Estadística: Vocabulario y símbolos. Parte 2: Control de calidad estadístico. Ginebra: ISO, 1993. (ISO 3534-2).

_____. Exactitud (veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados. Parte 1: Principios generales y definiciones. Ginebra: ISO, 1994. (ISO 5725-1).

_____. Exactitud (veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados. Parte 2: Método básico para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad de un método estándar de medición. Ginebra: ISO, 1994. (ISO 5725-2).

MANCERA NIEVES, Luz Stella y CADENA CAMACHO, Sandra M. Validación y estandarización de técnicas para el análisis de algunos parámetros fisicoquímicos del agua potable. Bucaramanga, 2002, 12-67 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

MAROTO SÁNCHEZ, Alicia. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Tarragona, España. 2002. 1-304 p. Tesis de grado (Doctor en Química). Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica.

MAROTO, Alicia. et al. Estrategias para el cálculo de la incertidumbre. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

_____. Cálculo de incertidumbre en medidas físicas: medida de una masa. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

_____. Cálculo de incertidumbre en medidas químicas: análisis cromatográfico. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

_____. Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples. En : Anal. Chim. Acta, 446 (2001); p. 133-145.

_____. Incertidumbre y precisión. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

_____. Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays. En : Anal. Chim. Acta, 440 (2001); p. 171-184.

MILLER, J.C y MILLER, J.N. Estadística para química analítica. Bogotá : Limusa, 1999. p. 12-85.

RUI, Jordi. et al. Determinación de la trazabilidad en medidas químicas. . España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

RUI, Jordi. et al. Exactitud y trazabilidad. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

_____. Trazabilidad en medidas físicas mediante calibración directa: calibración de una balanza. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

_____. Trazabilidad en medidas físicas mediante calibración directa: calibración de material volumétrico. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

RUIS, Xavier F. et al. La validación de métodos analíticos. España, 2002. Universidad de Rovira y Virginia. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados.

SÁNCHEZ M, Diana L. Validación de métodos para la determinación en aguas superficiales de metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinotérreos (calcio y magnesio) por volumetría con EDTA. Bogota, 2002. Trabajo de grado (Licenciatura en Química). Universidad Distrital.

SECRETARIA DE SALUD DE BOGOTA. Estandarización de metodologías analíticas en el Laboratorio de Salud Pública. Bogota, 2002.

THOMPSON, Michael; ELLISON, Stephen y WOOD, Roger. Directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis por un solo laboratorio. En : Pure Appl. Chem. Vol. 74, No. 5 (2002); p. 835–855.