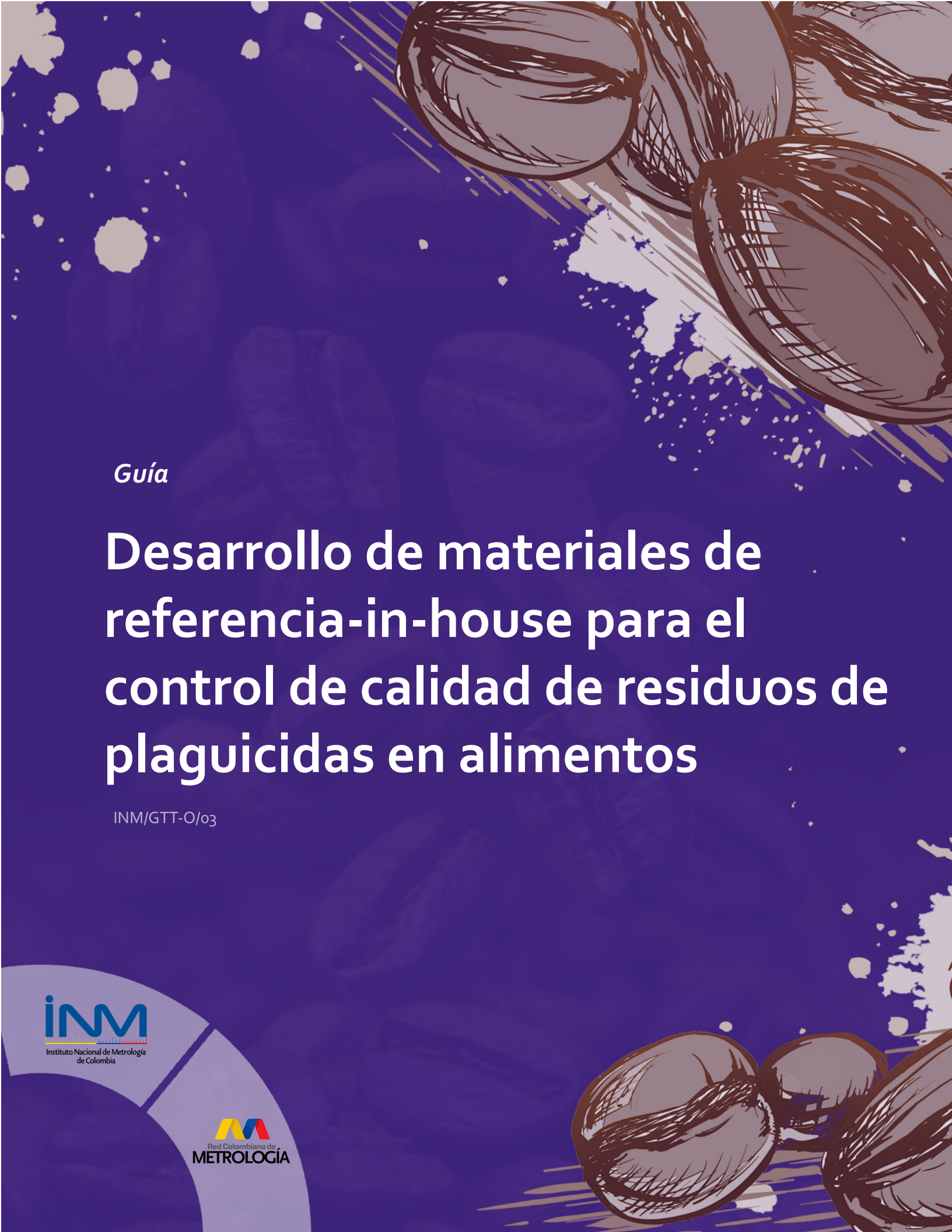




Guía

Desarrollo de materiales de referencia-in-house para el control de calidad de residuos de plaguicidas en alimentos

INM/GTT-O/03

Instituto Nacional de Metrología de Colombia

Directora General

María del Rosario González Márquez

Secretario General

José Álvaro Bermúdez

Subdirectora de Metrología Química y Biología

Edna Julieth Villarraga Farfán

Subdirector de Metrología Física

Jairo Gustavo Ayala Forero

Subdirectora de Servicios Metrológicos y Atención al Ciudadano

Claudia Angélica Guillen

Jefe Oficina Asesora de Planeación

Laura Lorena Rivera Roa

Autores:

Yeraldin Aguilar Ávila, Diego A. Ahumada,
Juliana C. Barrios, Ivonne A. González, Laura
V. Morales, Andrés S. Salinas, Gina A. Torres

Diagramación:

Revsen Özdemir
ozdemir.revsen@gmail.com

ISBN: 978-628-95752-0-0

Para más información y solicitud de copias, contacte a:

Instituto Nacional de Metrología de Colombia
Av. Cra 50 26-55 int. 2
Bogotá, D.C.
Tel. +57 254 22 22
www.inm.gov.co
contacto@inm.gov.co



AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a las personas y entidades que han contribuido a la elaboración de este documento con su objetiva revisión y comentarios.

Un agradecimiento a Johnnatan Giraldo por el apoyo brindado en la ejecución de los ensayos de medición que sirvieron como insumo para elaborar este documento.

Un agradecimiento al laboratorio de Termometría de la Subdirección de Física del INM por el apoyo durante la etapa de procesamiento del material de partida de café verde.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. MARCO CONCEPTUAL	8
1.1 DEFINICIONES SELECCIONADAS	9
1.1.1 Definiciones generales.....	9
1.1.2 Definiciones asociadas a los materiales de referencia	10
1.1.3 Definiciones asociadas a la producción de los MR	11
1.2 ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE LA CALIDAD DE LAS MEDICIONES.....	12
1.2.1 Controles internos de la calidad (IQC)	13
1.2.2 Los MR <i>in-house</i> como herramientas del control interno de calidad.....	15
2. GENERALIDADES EN LA PRODUCCIÓN DE MATERIALES DE REFERENCIA	18
2.1 PLANEACIÓN DE LA PRODUCCIÓN	21
2.1.1 Selección de matrices representativas	21
2.1.2 Propiedades de interés y valores indicativos.....	25
2.2 MUESTREO DE LOTES DE MATERIALES DE REFERENCIA.....	26
2.2.1 Muestreo Aleatorio simple	27
2.2.2 Muestreo Estratificado	27
2.2.3 Muestreo Aleatorio Sistemático	28
2.3 EVALUACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD	29
2.3.1 Generalidades	30
2.3.2 Recomendaciones previas al estudio de homogeneidad	31
2.3.3 Selección del número de unidades	32
2.3.4 Selección del método de medición.....	33
2.3.5 Selección del diseño de experimentos	33
2.3.6 Ejecución del estudio de homogeneidad.....	35
2.3.7 Estudio de tendencias.....	35
2.3.8 Estimación de incertidumbre por homogeneidad	36
2.4 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD	38
2.4.1 Generalidades	39
2.4.2 Recomendaciones previas al estudio de estabilidad	39
2.4.3 Selección del tipo de estudio	40
2.4.4 Estudios de estabilidad clásicos	41
2.4.5 Estudios de estabilidad isócronos	42
2.4.6 Selección del método de medición.....	42
2.4.7 Ejecución de los estudios de estabilidad	44
2.4.8 Ejecución de los estudios de estabilidad	44
2.4.9 Estimación de incertidumbre asociada a la estabilidad	45
2.5 ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE LA PROPIEDAD	47
2.5.1 Opción 1: haciendo uso del estudio de homogeneidad	47
2.5.2 Opción 2: Empleo de un único método en un laboratorio	48
2.5.3 Opción 3: Empleo de dos o más métodos de medición	50
2.6 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MATERIAL.....	53
2.7 REGISTROS Y DOCUMENTACIÓN	54

2.7.1	Documentación soporte para los MR <i>in-house</i>	54
3.	ASPECTOS PRÁCTICOS EN LA PRODUCCIÓN DE MR	56
3.1	PLANEACIÓN.....	58
3.2	PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES	61
3.2.1	Recomendaciones previas a la preparación de los materiales de referencia.....	61
3.2.2	Obtención del material de partida.....	61
3.2.3	Preparación de matrices	62
3.2.4	Preparación de la solución de fortificación	64
3.2.5	Fortificación, estabilización y homogenización	65
3.2.6	Envasado de los materiales.....	67
3.2.7	Consideraciones adicionales.....	67
3.3	ESTUDIO DE HOMOGENEIDAD.....	69
3.3.1	Muestreo.....	69
3.3.2	Secuencia de medición	71
3.3.3	Inspección de datos y evaluación de tendencias.....	72
3.3.4	Análisis estadístico y estimación de incertidumbre por homogeneidad.....	77
3.3.5	Verificación de la homogeneidad	78
3.3.6	Diseño simplificado de homogeneidad :Guía ISO 80.....	78
3.4	ESTUDIO ESTABILIDAD	80
3.4.1	Medición	81
3.4.2	Tratamiento estadístico y estimación de la incertidumbre	83
3.5	ESTABLECIMIENTO DE VALORES de la propiedad.....	87
3.5.1	Empleo de un único método	87
3.5.2	Empleo de dos métodos	89
3.6	ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MATERIAL.....	92
3.6.1	Escenario 1: Uso de los datos del estudio de homogeneidad	92
3.6.2	Escenario 2: Se establece el valor indicativo por una o dos técnicas en un laboratorio	92
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
	ANEXOS	1
	Anexo 1: Incertidumbre objetivo.....	3
	Anexo 2: Estudio de uso.....	6
	Anexo 3: Insumos sugeridos para la preparación de materiales de referencia in-house.....	7
	Anexo 4: Incertidumbres por homogeneidad para los MR in-house.....	8
	Anexo 5: Detección de datos anómalos usando ValidaR.....	9
	Anexo 6: Código para diseño de bloques completamente al azar.....	11

Abreviaturas y símbolos

AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
BIPM	Oficina Internacional de Pesos y Medidas
CCQM	Comité consultivo para la cantidad de sustancia
INM	Instituto Nacional de Metrología de Colombia
iHMR	Material de referencia <i>in-house</i>
IQC	Controles Internos de Calidad
ISO	Organización Internacional de Normalización
LMR	Límites Máximos de Residuos
MR	Material de referencia
MRC	Material de referencia certificado
NR	Nivel de reporte
OAWG	Grupo de Trabajo en Análisis Orgánico del CCQM
QCM	Material de control de calidad
u	Incertidumbre estándar
U	Incertidumbre expandida
VIM	Vocabulario internacional de metrología

low



INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son moléculas químicas utilizadas para prevenir, controlar o eliminar plagas y enfermedades en los cultivos, y son esenciales para la intensificación de la agricultura y la seguridad alimentaria en todo el mundo. El uso de plaguicidas ha sido beneficioso para los agricultores al permitir el mantenimiento y aumento de la productividad de los cultivos. Desde la década de 1940, el uso de plaguicidas ha aumentado de tal manera que otros métodos han sido considerados menos eficaces, en Colombia, por ejemplo, el uso de plaguicidas contribuyó al aumento de la producción de alimentos de 5 a 18 millones de toneladas entre 1948 y 1998. Sin embargo, el uso indiscriminado de plaguicidas y la ausencia de buenas prácticas agrícolas a lo largo de toda la cadena de producción son algunos de los factores que han traído como consecuencia que se hallen residuos de estas sustancias en los alimentos, lo que constituye un riesgo para la salud de los consumidores [1], [2]. Por lo anterior, diferentes organizaciones y gobiernos han establecido, políticas, programas y regulaciones que buscan mitigar la presencia de plaguicidas en los alimentos y, por tanto, sus efectos en la salud humana [3–5].

Una de las medidas que adoptan los gobiernos para garantizar la seguridad alimentaria es el establecimiento de los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas en los alimentos. Los LMR son niveles regulatorios que buscan proteger la salud de los consumidores y asegurar que los alimentos sean inocuos y lo más libres posible de residuos [6]. Estos niveles son fijados por diferentes organismos a nivel nacional, regional e internacional, según criterios científicos y técnicos. Por ejemplo, a nivel internacional, el *Codex Alimentarius* es un organismo que fija LMR para todos los alimentos y piensos con el fin de facilitar el comercio internacional [7]. A nivel regional, en la Unión Europea, los LMR son establecidos por la Comisión Europea con el apoyo científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)[5], [8], [9]. En el caso de Colombia, el Ministerio de la Protección Social es el responsable de definir esta regulación [10].

En este contexto, con el fin de verificar el cumplimiento de los LMR establecidos, se encuentran disponibles diversos métodos químicos que permiten la cuantificación o identificación de estos analitos en alimentos y piensos. Usualmente estos métodos miden de manera simultánea varios analitos a bajas concentraciones, por lo que, suelen ser complejos y contienen diferentes etapas como la homogenización, extracción, limpieza y análisis instrumental. Por lo anterior, y en concordancia con la norma ISO/IEC 17025, es preponderante, no sólo realizar un adecuado proceso de validación o verificación, sino que se debe contar con herramientas adecuadas para el control y aseguramiento de la validez de los resultados [11]. Dentro de estas herramientas, se destacan los materiales de referencia (MR) y los materiales de referencia certificados (MRC), pues a través de estos es posible desarrollar diferentes actividades como controles de calidad rutinarios, validación o verificación de los métodos, ensayos de aptitud, estimación de la incertidumbre [12]–[14]. Desafortunadamente la oferta de MR o MRC es baja y la mayoría de los materiales disponibles son sustancias certificadas en pureza, soluciones calibrantes y existen muy pocos en matrices alimenticias [12]. Lo anterior dificulta encontrar materiales de referencia que cumplan con las características requeridas (matriz-analito-nivel de concentración),



sumado a otros inconvenientes de tipo logístico asociados a la importación de estos materiales.

Por las razones mencionadas, una práctica conveniente es el uso de materiales de referencia producidos en el laboratorio conocidos comúnmente como: MR *in-house* (iHMR), materiales de control de calidad (QCM) o controles internos de calidad (IQC) para suplir, en parte, la necesidad en la validación de métodos y en el control de calidad de los resultados [15]–[18]. Los materiales de referencia preparados en el laboratorio, o *in-house*, son muy recomendables cuando se requiere tener un control que represente lo más fielmente posible las muestras de rutina, cuando se requiera controlar el error sistemático de laboratorio en condiciones de precisión intermedia o cuando no existe un MRC adecuado para la evaluación de las características de desempeño de los métodos.

Por todo lo anterior, el objetivo de la presente guía es brindar un documento orientativo para los laboratorios que consideren preparar sus propios materiales de referencia relacionados con la medición de residuos de plaguicidas en alimentos. Para la elaboración del presente documento, se consideraron algunas de las herramientas de las Guías ISO 80:2014 [18] e ISO 35 [19], la NORMA ISO 17034 [20], así como la experiencia del Instituto Nacional de Metrología en la preparación y caracterización de materiales de referencia en alimentos [21]–[23].

La presente guía se divide en tres secciones, en una primera, se brinda un marco conceptual (Capítulos 1 y 2), que incluye la producción de materiales de referencia y sus alcances en el control y aseguramiento de la calidad. En la tercera sección (Capítulo 3), se ilustra, mediante ejemplos prácticos, las diferentes etapas que se deben desarrollar en la preparación de materiales de referencia, para lo que se presentaron recomendaciones y aspectos prácticos que se documentaron durante la preparación de materiales de referencia *in-house* de residuos de plaguicidas en arroz, banano y café verde desarrollados en el INM.

low





MARCO CONCEPTUAL



1.1 DEFINICIONES SELECCIONADAS

1.1.1 Definiciones generales



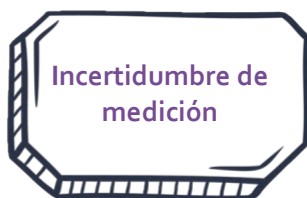
**Material de
referencia**

Material suficientemente homogéneo y estable respecto a una o más propiedades especificadas, el cual ha sido establecido como adecuado para el uso previsto en un procedimiento de medición [24].

Material de referencia caracterizado por un procedimiento metrológicamente válido para una o más propiedades especificadas acompañado de un certificado de material de referencia que provee un valor de la propiedad su incertidumbre asociada y una declaración de trazabilidad metrológica [24].



**Material de
referencia
certificado**



**Incertidumbre de
medición**

Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza [25].

Valor máximo establecido que se determina teniendo en cuenta el uso previsto de una propiedad del material o lote de producción. Este límite superior representa la variabilidad esperada en las mediciones y proporciona una estimación confiable de la incertidumbre asociada al resultado final, asegurando así la calidad y precisión requeridas para su aplicación específica.



**Incertidumbre
objetivo**



Mensurando

Magnitud que se desea medir [25].

El control de calidad (QC) es el proceso o método mediante el cual se examinan los productos o servicios para determinar si se adhieren a los métodos, procedimientos operativos estándar o manuales de calidad establecidos por la infraestructura de aseguramiento de la calidad [26].



Control de calidad

1.1.2 Definiciones asociadas a los materiales de referencia

Caracterización

Determinación de los valores de la propiedad o atributos de un material de referencia, como parte de un proceso de producción [24].

Valor de una cantidad o propiedad, de un material de referencia, que se proporciona únicamente a título informativo [24].

Valor indicativo

Valor certificado

Valor asignado a la propiedad del material de referencia, que está acompañado por la incertidumbre y trazabilidad metrológica establecida, identificado como tal en el material de referencia certificado [24].

La mejor estimación del valor real proporcionado por el productor cuando no se han investigado a fondo todas las fuentes conocidas o sospechadas de sesgo [24].

Valor de referencia

Homogeneidad

Uniformidad en el valor de una propiedad especificada en una porción definida de un material de referencia [24].

Característica de un material de referencia, cuando es almacenado bajo condiciones específicas, para mantener un valor especificado de la propiedad dentro de los límites establecidos por un periodo de tiempo determinado [24].

Estabilidad

Periodo de validez

Intervalo de tiempo durante el cual las propiedades de MR conservan sus valores asignados dentro de sus incertidumbres asociadas [24].

1.1.3 Definiciones asociadas a la producción de los MR

Homogeneidad entre unidades

Uniformidad de un valor de propiedad especificado entre unidades de un lote de producción [19].

Uniformidad de un valor de propiedad especificado dentro de cada unidad de un material de referencia [19].

Homogeneidad dentro de unidades

Valor certificado

Valor asignado a la propiedad del material de referencia, que está acompañado por la incertidumbre y trazabilidad metrológica establecida, identificado como tal en el material de referencia certificado [24].

Límite inferior de la cantidad de un MR, generalmente expresado como una cantidad de masa o volumen, que se puede utilizar en un proceso de medición de modo que los valores o atributos expresados en la documentación del MR correspondiente sean válidos [19].

Cantidad mínima de muestra

Estabilidad a corto plazo

Estabilidad de la propiedad de un material de referencia (RM) durante el período de tiempo y las condiciones esperadas en el transporte del MR hasta el usuario final [19].

Nota: la estabilidad del transporte a menudo se denomina “estabilidad durante transporte”.

Estabilidad de la propiedad de un material de referencia durante un período prolongado de tiempo [19]

Estabilidad a largo plazo

Lote de producción

Cantidad definida de material producido durante un solo ciclo de fabricación, y destinado a tener características y calidad uniformes [14].

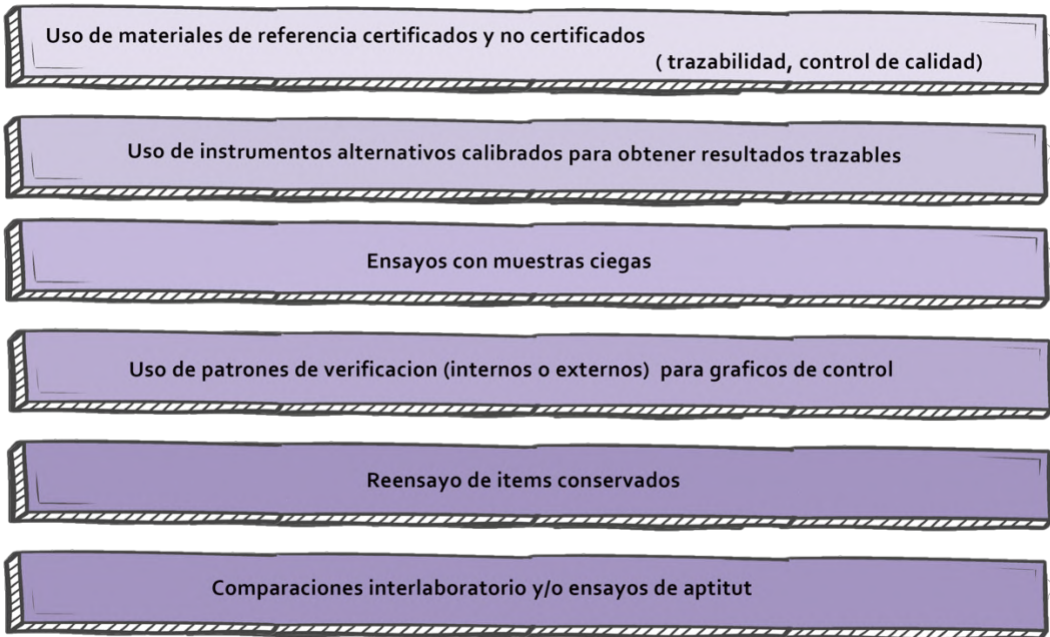


1.2 ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE LA CALIDAD DE LAS MEDICIONES

El aseguramiento de la calidad es el conjunto de actividades planeadas y sistemáticas que se realizan para brindar confianza al cliente [27], [28]. En el caso específico de los laboratorios de ensayo, el objetivo del aseguramiento de la calidad es garantizar que los resultados analíticos sean válidos y que cumplan con los requisitos de los clientes o las normas asociadas. De forma paralela, este aseguramiento de la calidad busca la mejora continua en el desempeño del laboratorio, por lo que el análisis continuo de la calidad de la información obtenida es esencial y debe enfocarse no solo en cumplir sino en exceder la expectativa o los requisitos de los clientes.

El reconocimiento oficial de la competencia técnica a través de la acreditación contribuye a asegurar que los procedimientos son aptos para el propósito. Sin embargo, la naturaleza de la medición incluye la ocurrencia de errores aleatorios y sistemáticos, por tanto, la validación, verificación y el uso de controles de calidad en el tiempo, permiten asegurar que la calidad de los resultados sigue siendo apta para el propósito, así las cosas, el rol de la gestión de calidad es establecer medidas que permitan identificar y minimizar las fallas, mantenerlas en un nivel aceptable, y tomar acciones correctivas o en el mejor de los casos preventivas. La Figura 1, presenta algunas de las actividades que la norma ISO/IEC 17025 menciona se pueden realizar para asegurar la validez de los resultados [11].

Figura 1.
Actividades de
aseguramiento de la
calidad de acuerdo con la
norma ISO/IEC 17025





Por otro lado, el control de calidad se considera como un conjunto de operaciones técnicas destinadas a garantizar la fiabilidad de los resultados para un conjunto específico de muestras [29]. Las prácticas y medidas de control de calidad pueden y deben estar presentes incluso cuando otras actividades de aseguramiento de la calidad no están (totalmente) implementadas, por ejemplo, durante las etapas de desarrollo y validación de los métodos.

Los controles de calidad se clasifican en externos e internos, los primeros consisten en la participación frecuente en ensayos de aptitud u otros esquemas de comparación Inter laboratorio. Los segundos consisten en actividades que realiza el laboratorio de manera autónoma y usualmente al interior de sus instalaciones, por ejemplo, reensayo de ítems, empleo de cartas de control, entre otros [30]. A continuación, se discutirán algunos aspectos referentes al control interno de calidad.

1.2.1 Controles internos de la calidad (IQC)

El control interno de calidad en el laboratorio de análisis químico implica la evaluación continua y crítica de los métodos analíticos y rutinas de trabajo propios del laboratorio, abarca todo el proceso analítico que comienza con la entrada de la muestra al laboratorio y finaliza con el informe de los resultados.

La evaluación de la calidad de los datos obtenidos a través de la medición se basa en tres pilares:

- i. Que sean aptos para el propósito, para lo que debe definirse el nivel máximo de incertidumbre tolerable en relación con la toma de decisiones, definido, por ejemplo, con base en requisitos legales.
- ii. Que se hayan obtenido mediante métodos validados y que los parámetros de desempeño del método analítico y la incertidumbre de los resultados permitan el cumplimiento del propósito.
- iii. Que la incertidumbre estimada en la validación no varíe significativamente en el tiempo de manera que siga cumpliendo con el requisito establecido para la aplicación del método de medición a las muestras de ensayo.

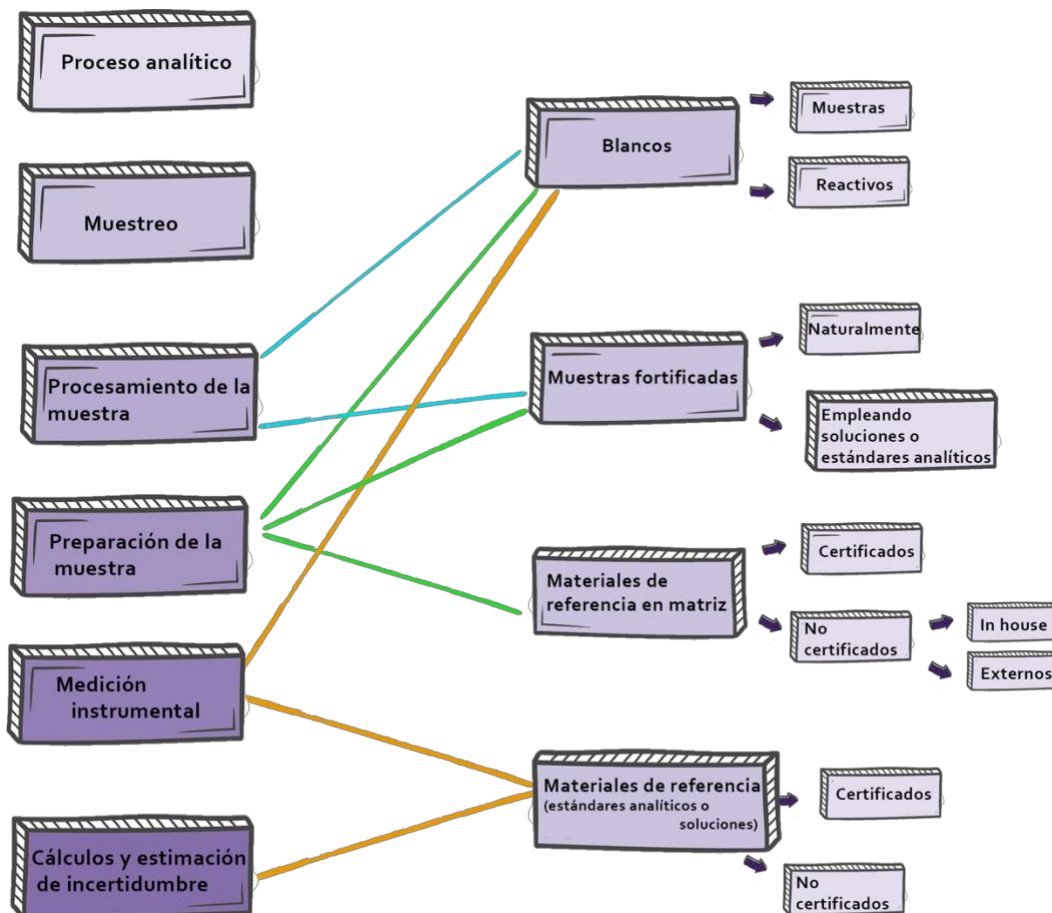
Por lo anterior, el control de calidad es fundamental en las mediciones analíticas para asegurar que los factores o condiciones que afectan la medición y, en consecuencia, la incertidumbre del resultado, son estables durante largos periodos de tiempo y se puedan comparar o actualizar respecto a la validación inicial. En este sentido, debe realizarse de manera rutinaria para poder confirmar continuamente su aptitud para el uso.

Es importante resaltar que el control de calidad del método de análisis pretende, en su forma más elemental, hacer un seguimiento de la precisión del método en condiciones de repetibilidad e intermedias, como parámetro que describe que la dispersión de los datos obtenidos en el análisis se mantiene en intervalos aceptables previamente definidos para el cumplimiento del propósito de la medición. Un control de calidad más completo incluiría

también el seguimiento al sesgo analítico para lo que se requeriría un material de referencia del que se conozcan el valor o valores de las propiedades y sus incertidumbres.

Para el control de calidad interno de los resultados de mediciones químicas de muestras o conjuntos de muestras, se tienen diferentes tipos de materiales entre los cuales se encuentran: diferentes tipos de blancos, soluciones estandarizadas (de verificación), materiales de referencia (MR), materiales de referencia certificados (MRC), entre otros. En la Figura 2, se presenta un esquema del uso de diferentes controles internos de calidad durante el proceso analítico.

Figura 2.
Esquema del uso de
controles de calidad a lo
largo del proceso de
análisis químico



En el desarrollo, validación y seguimiento en rutina de los métodos analíticos, el uso de materiales de control de calidad en matriz, como son las muestras contaminadas y los materiales de referencia en matriz, es esencial, porque permiten la revisión constante de los procesos de preparación de muestra. La diferencia entre estos dos tipos de control es el estatus de homogéneo y estable que tienen los materiales de referencia y que hace que sean controles más confiables que las muestras contaminadas (naturalmente o fortificadas).

Los materiales de referencia en matriz pueden ser adquiridos, pero también pueden elaborarse en el laboratorio, adaptados al propósito de las mediciones de rutina. Estos últimos se conocen como materiales de referencia *in-house*, el adjetivo *in-house* denota que



su fabricación y/o las mediciones para el establecimiento de su estabilidad y homogeneidad las realiza el mismo laboratorio. Su similitud con las muestras de rutina garantiza que los resultados obtenidos de su medición dan cuenta del desempeño del método en las diferentes etapas, por tanto, permite verificar que los procedimientos se encuentran en control estadístico y que la incertidumbre de los resultados permanece dentro de los parámetros establecidos. La guía ISO 80, guía para la preparación interna de materiales de referencia para el control de calidad (MCC) [17], [18], presenta aspectos relevantes de la preparación de estos materiales en general.

En el caso del análisis de residuos de plaguicidas, la oferta de MRC en matriz es muy limitada para la cantidad de combinaciones analitos/matrices requeridas [22], por lo que el documento SANTE/11312/2021 [31] menciona que, aunque la opción preferida para evaluar el desempeño de los métodos es el uso de los MRC, las muestras de control de calidad (MR *in-house*) constituyen una alternativa apropiada, además el documento fomenta el intercambio de estos materiales entre laboratorios con el fin de hacer una revisión de la veracidad del valor y fortalecer la herramienta. No obstante, es importante recordar que los MR *in-house* no constituyen un reemplazo de los MRC y no proveen trazabilidad metrológica al resultado de la medición.

Siendo el objetivo de este documento exponer las ventajas y alcances de la preparación y uso de los MR *in-house* particularmente en la medición de residuos de plaguicidas, se exponen a continuación aspectos del uso de este tipo de materiales en la rutina de análisis.

1.2.2 Los MR *in-house* como herramientas del control interno de calidad

Es ampliamente reconocido que, en la rutina de análisis, las muestras se someten a condiciones que pueden promover la degradación. La guía SANTE [31], propone que las muestras sean analizadas inmediatamente se reciben, sin embargo, en la práctica esto no siempre es posible sobre todo cuando la cantidad de muestras es considerable. Adicionalmente, algunos pasos del pretratamiento de matrices naturales, molienda, triturado y cortado, promueven el intercambio de sustancias químicas, enzimas propias del alimento, la alteración del pH y el aumento de la temperatura, constituyendo condiciones propicias para la degradación y modificaciones de la composición química de la muestra. Por lo anterior, el uso de muestras de control en matriz (fortificadas o contaminadas naturalmente) es esencial.

Una práctica reconocida en el análisis de residuos de plaguicidas es emplear muestras testigo o control para incluirlas en la rutina y hacer un seguimiento del desempeño del método analítico, desde la preparación y la extracción. Adicionalmente, se realiza el seguimiento constante de los porcentajes de recuperación, analizando una muestra fortificada con los analitos de interés y comparando el valor fortificado con el valor obtenido.

La guía SANTE [31] enfatiza en la importancia de la determinación de la recuperación en el nivel de reporte y en los límites máximos permitidos para los plaguicidas de interés. Los



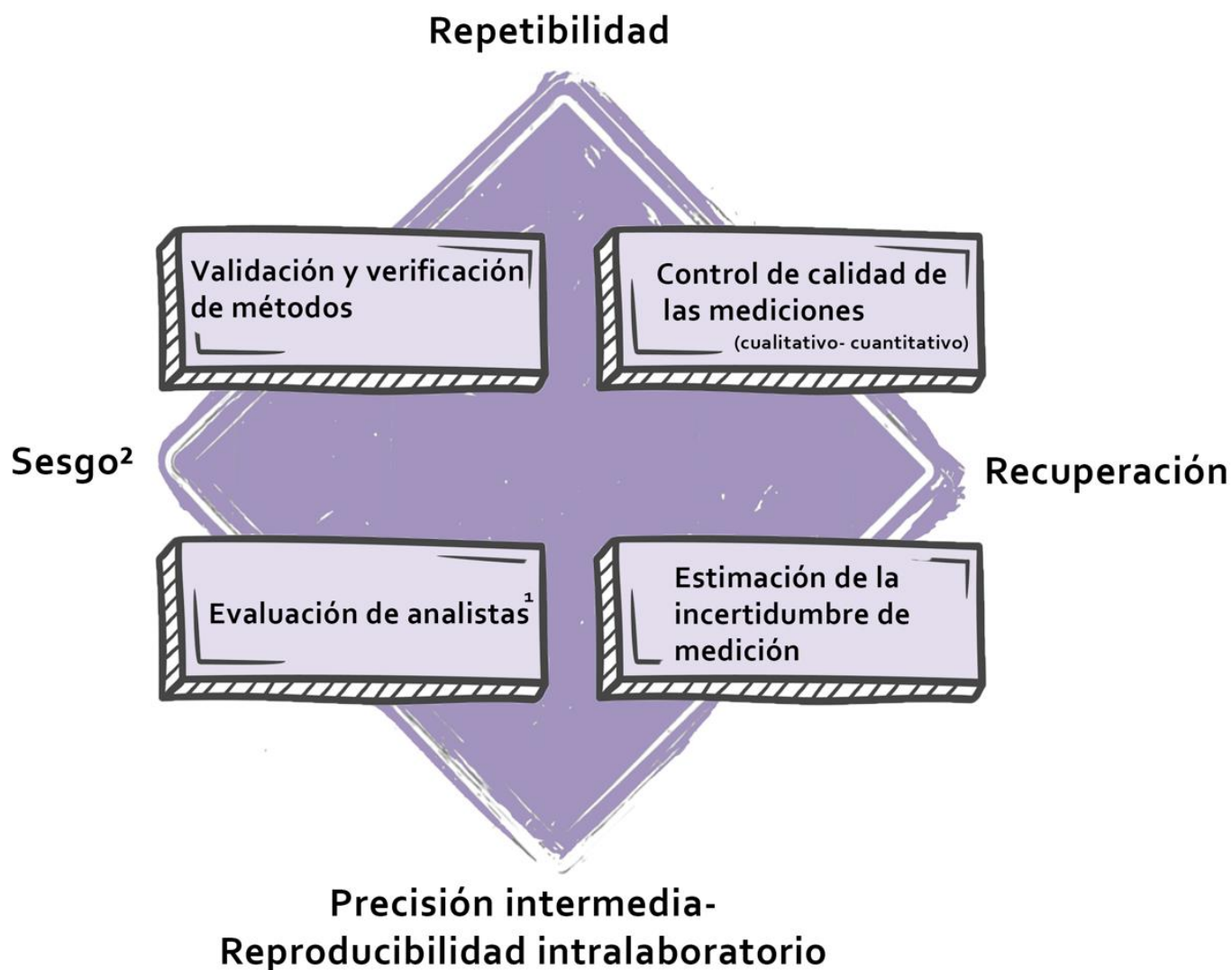
resultados de esta recuperación se consideran aceptables en el intervalo entre $\pm 2\text{RSD}$ de la recuperación media, considerando por defecto un intervalo aceptable por defecto entre 60% y 140%. Estos controles, aunque son apropiados, tienen la limitante de que ofrecen solo un panorama aproximado de la situación en el momento de cada análisis y no permiten el seguimiento de los resultados del método a través del tiempo debido a que no emplean una referencia constante, por tanto, no aportan a la mejora continua de los métodos y en general del desempeño del laboratorio.

Por otra parte, acerca del seguimiento de las recuperaciones en rutina, la guía menciona que, idealmente se debería incluir a todos los analitos en el alcance ó, como mínimo, el 10% de estos en cada lote, al nivel de LOQ o del límite de reporte, y reitera la importancia de verificar que durante el tiempo de los análisis el método siempre conserva un buen desempeño en el límite de reporte.

El uso de los MR *in-house* brinda la posibilidad de tener una mejor perspectiva de la realidad, usando su valor indicativo como referencia para el cálculo de las recuperaciones o bien empleándolo directamente como línea media en las cartas de control, lo que permite evidenciar anticipadamente la presencia de errores sistemáticos sostenidos en el tiempo y tomar acciones de investigación preventivas, además, el diseño de un MR *in-house* con plaguicidas a nivel del LMR y/o el Límite de reporte representa una oportunidad para realizar un seguimiento integral del desempeño del método.

El valor indicativo del MR *in-house* puede hallarse según lo estipulado en la guía ISO 80, a través del promedio de los valores de la propiedad obtenidos en el estudio de homogeneidad, pero también es posible hallar un valor más exacto usando dos técnicas independientes y combinar los resultados (numeral 2.5).

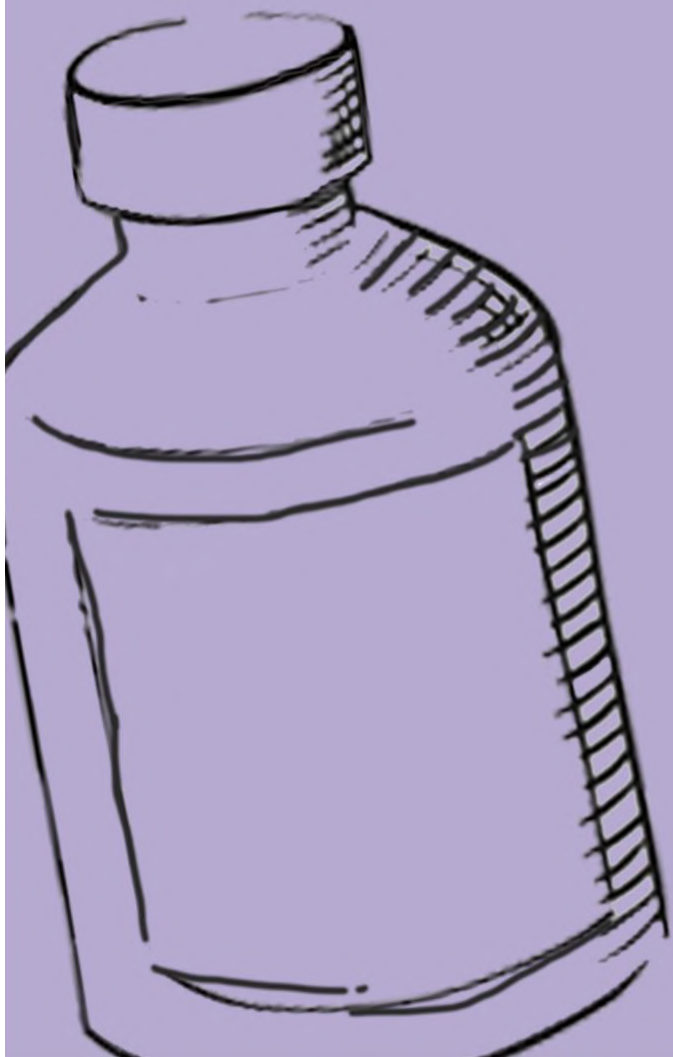
Desde el punto de vista cualitativo, el control también es importante. La guía SANTE, recomienda revisar el sistema en cuanto a la ionización en el espectrómetro de masas y da pautas para considerar la correcta identificación de los plaguicidas de interés, mediante los iones moleculares y/o la relación de intensidades de estos. Siendo el sistema de ionización esencial en el análisis, un MR *in-house* puede diseñarse de manera que, no solo sirva propósitos cuantitativos, sino también cualitativos, facilitando en rutina la correcta identificación de los plaguicidas, además, su uso continuo permitiría la identificación de cambios en la sensibilidad instrumental a través del tiempo, facilitando la investigación de anomalías en los resultados. En la Figura 3 se presenta un diagrama con las aplicaciones generales de un MR *in-house*.



¹ Siempre y cuando el analista no haya participado de la producción del MR y no conozca el valor de la propiedad asignado.

² Mejor calidad de su estimación con caracterización por dos técnicas

Figura 3. Diagrama de aplicaciones de un MR *in-house*





GENERALIDADES EN LA PRODUCCIÓN DE MATERIALES DE REFERENCIA



INTRODUCCIÓN

En el pasado, la certificación de materiales de referencia se entendía en gran parte como un proceso de asignación de valor a un material. Se hizo poco hincapié en características como la homogeneidad o la estabilidad por lo que no se realizaban muchos esfuerzos para incluir los efectos de la heterogeneidad y la degradación de los analitos en la incertidumbre del MRC, incluso si se sugería. Sin embargo, la creciente necesidad de generar mejores referencias ha llevado a que sea necesaria la inclusión de diferentes etapas que permitan garantizar no sólo la calidad del producto, sino asegurar la eficiencia, la disponibilidad de recursos y de personal, así como la inclusión de otras fuentes relevantes dentro del presupuesto de incertidumbre y no solo la debida a la caracterización del material. La Figura 4, presenta un esquema general del proceso de producción de materiales de referencia (MR).

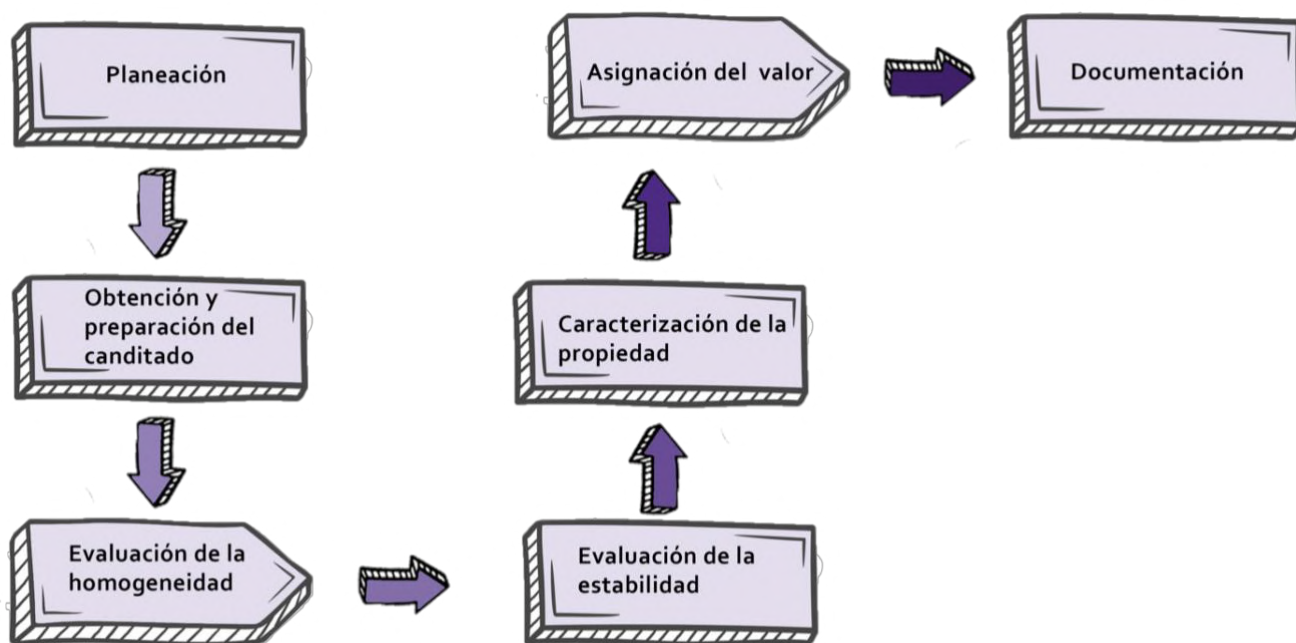


Figura 4. Etapas generales en la producción de MR

2.1 PLANEACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

En general la producción de un MR inicia desde la planeación de esta, etapa en la cual, básicamente el material es concebido para suplir una necesidad y se determina la viabilidad del proyecto, al soportar el cumplimiento de requisitos técnicos y de gestión mínimos.

Para el caso puntual de los MR *in-house*, no es requerida una planeación tan estricta como para un MR que es producido bajo los lineamientos de la NORMA ISO 17034 [20]. Sin embargo, de acuerdo con la Guía ISO 80 [18] la primera etapa en la producción de un material de este tipo es su especificación; consiste en establecer el propósito y el alcance que se pretende cubrir, dentro del esquema de aseguramiento de la calidad de los resultados, resultando crítico la definición del tipo de matriz y su procesamiento, así como las propiedades de interés con sus valores, de modo tal, que se obtenga un material representativo que permita evaluar el desempeño de los métodos cubriendo dos aspectos esenciales:

- La preparación de las muestras comprendiendo extracción, limpieza, secado, reconstitución, derivatización, etc.
- La medición instrumental de la propiedad en la muestra preparada por una técnica adecuada.

A continuación, se describen los criterios que se sugiere tener en cuenta para especificar el material, desde la selección de la matriz y la propiedad de interés.

2.1.1 Selección de matrices representativas

Durante el análisis de residuos de plaguicidas y contaminantes en alimentos, es importante seleccionar correctamente los materiales de referencia (MR) que representen las propiedades fisicoquímicas de las matrices y los analitos. Debido a la variedad de combinaciones posibles, es probable que se necesiten varios MR para representar diferentes matrices. Para facilitar la selección, se presentan dos enfoques útiles: la clasificación de alimentos representativos OCDE/SANTE y el triángulo alimenticio de la AOAC.

i) Clasificación de alimentos representativos OCDE/SANTE:

La DG SANTE de la Comisión Europea ha desarrollado guías actualizadas sobre validación de métodos analíticos de residuos de plaguicidas en alimentos. Basándose en las directrices de la OCDE, el documento orientativo de SANTE (SANTE 11312:2021) clasifica los alimentos y piensos en 10 categorías con productos típicos y representativos en cada una. A continuación, se muestran algunos ejemplos en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación y matrices representativas según SANTE [31]

Origen	Categoría	Categorías típicas de productos básicos dentro del grupo	Alimentos representativos típicos dentro de la categoría
Vegetal	1. Alto contenido de agua	Fruta de pepita	Manzanas, peras
		Fruta de hueso	Duraznos, cerezas, melocotones,
		Otras frutas	Bananos
		Plantas de búlbo	cebollas, puerros
		Hortalizas /cucurbitáceas	Tomates, pimientos, pepinos, melones
		Verduras brasicáceas	Coliflores, brócoli
		Verduras de hoja y hierbas frescas	Lechuga, espinaca, albahaca
		Hortalizas de tallo y tallos	Apio, espárragos
		Legumbres frescas	Arvejas en vaina, habas, habichuelas
		Hongos frescos	Champiñones, setas
		Hortalizas de raíz y tubérculo	Remolacha de azúcar, zanahorias, papas, yuca
	2. Alto contenido de ácido y alto contenido de agua	Frutas cítricas	Limones, mandarinas, naranjas
	3. Alto contenido de azúcar y bajo contenido de agua	Frutas y bayas pequeñas	Fresas, arándanos, frambuesas, uvas
		Miel, frutos secos	Miel, pasas, arándanos secos, ciruelas secas, mermeladas de frutas
	4a. Alto contenido de aceite y muy bajo contenido de agua	Nueces de árbol	Nueces, avellanas, castañas
		Semillas oleaginosas	Canola, girasol, semilla de algodón, soja, maní, ajonjolí, etc.
		Pastas de frutos secos y semillas oleaginosas	Mantequilla de maní, tahini (pasta de ajonjolí), pasta de avellana
	4b. Alto contenido de aceite y contenido intermedio de agua	Frutas y productos grasos	Aceitunas, aguacates y pastas de estos
	5. Alto contenido de almidón y/o proteína con bajo contenido de agua y grasa	legumbres/legumbres secas	Habas, habas secas, frijoles secos (amarillos, blancos/azul marino, marrones, rojos), lentejas
		cereales en grano y sus productos	Granos de trigo, centeno, cebada y avena; maíz, arroz, pan integral, pan blanco, galletas saladas, cereales para el desayuno, pasta, harina.
	6. Productos difíciles y únicos		Lúpulo Cacao en grano y sus productos, café, té, Especias
Animal	Carne (músculo) y mariscos	Músculo rojo	Ternera, cerdo, cordero, res
		Músculo blanco	Pollo, pato, pavo
		Vísceras	Riñón hígado
		Pescado	Bacalao, tilapia, salmón, trucha
	Leche y productos lácteos	Leche	Leche de vaca, cabra y búfala
		Queso	Queso de vaca y cabra
		Derivados lácteos	yogur, crema, suero
	Huevos	Huevos	Huevos de gallina, pato y codorniz
5. Grasa de alimentos de origen animal		grasa de la carne	manteca de cerdo
		Grasa de la leche	Mantequilla

ii) *Triángulo de clasificación de alimentos de la AOAC*

La AOAC desarrolló un modelo para la clasificación de los alimentos en grupos de composición fisicoquímica similar, con base en los niveles relativos de grasas, proteínas y carbohidratos en base seca, organizados en un triángulo dividido en nueve sectores, donde cada vértice de este representa el 100 % de un componente y el vértice siguiente definido como 0% de los otros componentes (Figura 5). Este modelo considera que los alimentos que hacen parte del mismo sector ofrecerán retos analíticos similares. Aunque, el triángulo de clasificación de alimentos de la AOAC fue concebido inicialmente para el análisis de nutrientes, su alcance se extiende a la selección de matrices apropiadas para usar en la preparación de materiales de referencia, muestras fortificadas y blancos de matriz.

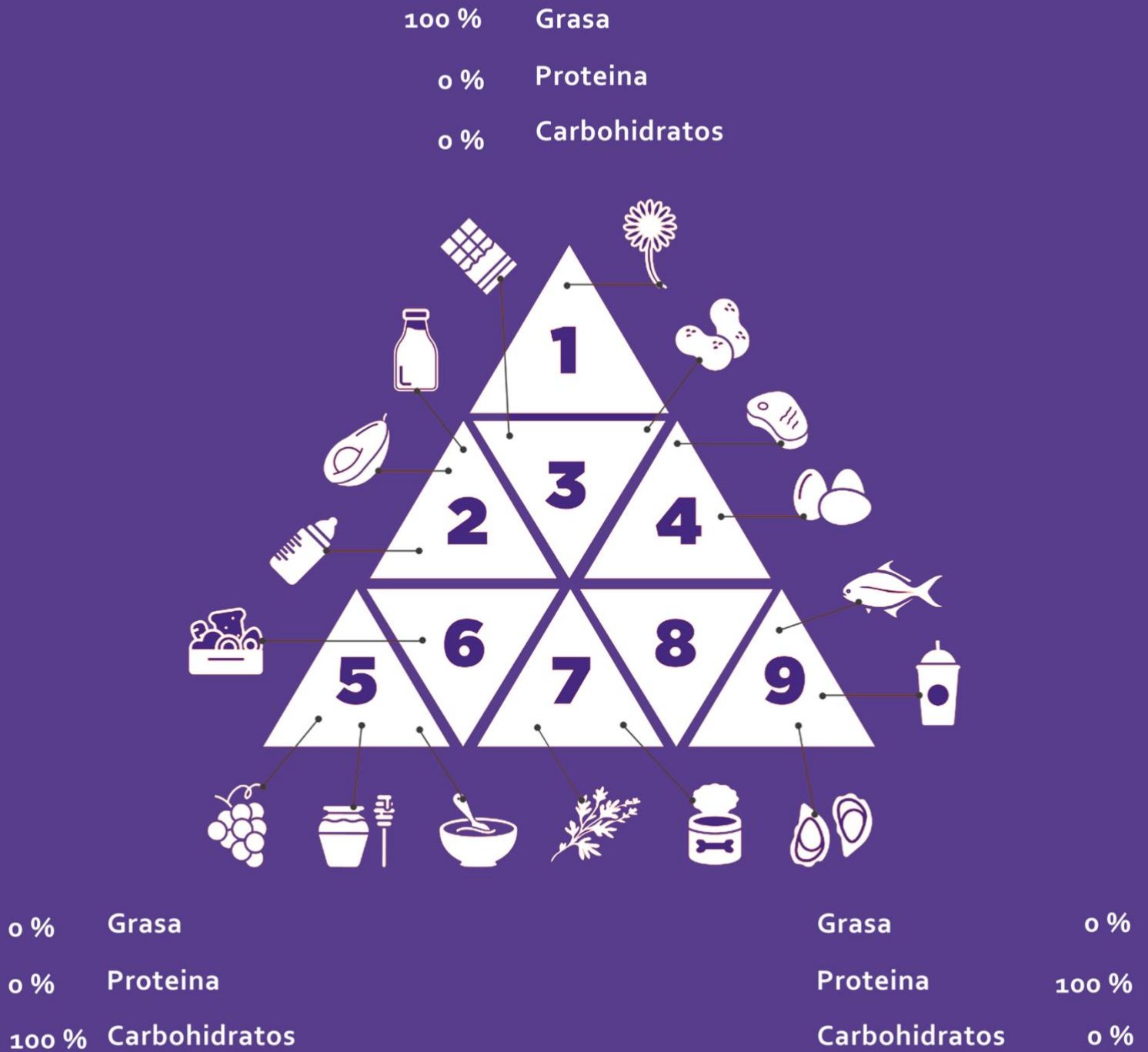


Figura 5. Triángulo de clasificación de alimentos de la AOAC (adaptado de [26])

2.1.2 Propiedades de interés y valores indicativos

Similar a cualquier MR, una mayor utilidad de los MR *in-house* se consigue si estos logran ser caracterizados para aquellas propiedades y en niveles que sean de especial importancia en la aplicación de los métodos de medición que son usados para el ensayo de muestras en rutina. En este sentido, se espera que en la medida de lo posible para cumplir con su propósito, las propiedades del MR *in-house* sean lo más similares a las condiciones en las muestras de ensayo o permitan llevar un control de los parámetros de desempeño de los métodos de medición. Sin embargo, para el caso particular de la medición de residuos de plaguicidas en alimentos resultaría casi que imposible poder cubrir todas las moléculas de interés. Así, para conseguir la especificación de un MR *in-house* de residuos de plaguicidas viable, se ofrecen las siguientes recomendaciones:

- **Mínima cantidad de analitos:** de acuerdo con la recomendación del documento Sante 11312 [31], para la verificación de veracidad en rutina, se evalúa al menos un 10% de los analitos del alcance por sistema de detección.
- **Naturaleza de los analitos:** es de esperar que los analitos seleccionados representen diferentes características, tales como: naturaleza química (orgánica, inorgánica o mixta), familia química, método de preparación (p.e *single* o multiresiduos), técnica de medición (p.e LC-MS o GC-MS), propiedades fisicoquímicas, entre otras. Es deseable que los analitos seleccionados presenten altas estabilidades para que el MR *in-house* tenga un tiempo prudente de vida útil.
- **Propiedades fisicoquímicas de los analitos:** En general se pueden considerar dos parámetros importantes: la masa molecular y la polaridad, representada esta última por el pK_{OW} . En este sentido, se puede seguir la clasificación usada por el Grupo de Trabajo de Análisis Orgánico-OAWG del Comité Consultivo para la Cantidad de Sustancia-CCQM del BIPM [32], [33], que básicamente agrupa los analitos dentro de cuatro clases principales:

Clase	Masa molecular (g/mol)	Polaridad (pK_{OW})
i	< 500	< -2 (no polar)
ii	< 500	> -2 (polar)
iii	> 500	> -2 (no polar)
iv	> 500	< -2 (polar)

- **Nivel de concentración:** de acuerdo con la recomendación del documento Sante 11312 para el ejercicio de verificación de recuperación, el nivel de concentración o valor indicativo de la propiedad puede encontrarse en un intervalo que cubra el nivel de reporte (NR) y 2 a 10 veces el NR, o el MRL, o en su defecto a un nivel crítico para las muestras analizadas o del mismo desempeño de los métodos.



2.2 MUESTREO DE LOTES DE MATERIALES DE REFERENCIA

El muestreo es determinante para asegurar que los estudios que se realizan al material (homogeneidad, estabilidad, caracterización o monitoreo) son representativos y que las conclusiones que se obtienen son válidas y extensivas a todo el lote producido. Sumado a lo anterior, un muestreo adecuado permitirá evaluar diferentes características de manera simultánea, lo que a su vez permite reducir los costos y tiempos de análisis. Por ejemplo, algunas recomendaciones que se realizan para realizar el muestreo en la evaluación de la homogeneidad de lotes recomiendan que para un stock que comprenda "n" unidades individuales de material, el número de unidades que se analizará para determinar la homogeneidad debe ser tres veces la raíz cúbica de "n". Lo anterior implica que para una producción de 600 a 1000 unidades esto equivale a evaluar entre 27 y 30 unidades, las cuales se deben evaluar como mínimo por duplicado. Esto representa un esfuerzo analítico considerable que requerirá mucho tiempo y dinero.

Un estudio del impacto de reducir el número de unidades seleccionadas para la evaluación de la homogeneidad de un MR *in-house* concluyó que, en ciertas circunstancias, 10 unidades analizadas por duplicado eran suficientes. Por lo tanto, para la preparación de un MR *in-house*, puede haber margen para ahorrar costos al reducir el número de unidades seleccionadas para las pruebas de homogeneidad, aunque esto debe evaluarse caso por caso.

La guía ISO 35 recomienda tres tipos de muestreo, los cuales se emplean en otra etapa del proceso de producción, estos tipos de muestreo se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.
Tipos de muestreo
recomendados en la guía
ISO 35

Estrategia	Descripción	Aplicación
Muestreo aleatorio simple	Se toman las muestras del lote de forma aleatoria. Se debe hacer una generación de números aleatorios por software o emplear tablas de muestreo	Estudios de estabilidad Monitoreo Caracterización
Muestreo aleatorio estratificado	Se divide la producción por segmentos de igual tamaño, posteriormente se toman aleatoriamente unidades de cada segmento	Estudios de homogeneidad
Muestreo sistemático	- Se establece un intervalo (n_{sist}) un punto de inicio (n_1) - Se toman unidades cada n veces el intervalo seleccionado ($n_1, n_1+n_{sist}, n_1+2n_{sist} \dots$, etc)	Estudios de homogeneidad

A continuación, se describen los procedimientos generales para realizar los diferentes muestreos.

2.2.1 Muestreo Aleatorio simple

El muestreo aleatorio simple es un método de selección de n unidades tomadas de un total (N), de tal manera que cada una de las muestras tiene la misma probabilidad de ser elegida. En la producción de materiales de referencia, usualmente cada una de las unidades se enumera al inicio de la producción, es decir durante o posterior a la etapa de envasado y a partir de esta numeración se puede realizar el muestreo aleatorio, en la práctica esto se puede realizar de la siguiente manera:

- i. Determinar el número total de unidades que tiene el lote (N), por ejemplo 100.
- ii. Determinar el número de unidades a muestrear (n) que se requieren para el determinado estudio, por ejemplo 10.
- iii. Numerar lo individuos de 1 a N .
- iv. Asignar a cada una de las unidades un número aleatorio, puede ser empleando un generador de números aleatorios.
- v. Seleccione el número de unidades al azar (n), por ejemplo, tomando los 10 más altos o más bajos números aleatorios.
- vi. Nota: el método elegido debe de asegurar que en cualquier fase de la obtención de la muestra cada individuo que no ha sido sacado previamente tiene la misma probabilidad de ser elegido

2.2.2 Muestreo Estratificado

El muestreo estratificado, es un tipo de muestreo en el cual las porciones de la muestra se extraen de los diferentes estratos y cada estrato se muestrea con al menos una unidad de muestreo. En algunos casos, las porciones son proporciones especificadas determinadas de antemano. Si la estratificación se realiza después del muestreo, las proporciones especificadas no se conocerían de antemano. En la práctica, este tipo de muestreo se puede realizar de la siguiente manera:

- vii. Determinar el número total de unidades que tiene el lote (N), por ejemplo 100.
- viii. Determinar el número de unidades a muestrear (n) que se requieren para el determinado estudio, por ejemplo 10.
- ix. Numerar lo individuos de 1 a N .
- x. Establezca la división de la población (K) o de cada estrato:

$$K=N/n$$

- xi. Seleccione la primera unidad (de las 10 que tiene que seleccionar) al azar, puede ser con el empleo de un generador de números aleatorios. Por ejemplo, se selecciona la unidad 17.
- xii. Posteriormente, seleccione las siguientes unidades sumando K de manera consecutiva al número de la primera unidad, por ejemplo, las siguientes unidades de este ejemplo corresponderían a 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97 y 7.



La selección de la primera unidad determina la muestra completa, por lo que es importante que esta unidad se seleccione al azar. Este tipo de muestreo también se conoce como muestra sistemática de cada k-ésima unidad.

2.2.3 Muestreo Aleatorio Sistemático

Este tipo de muestreo corresponde a una variante del muestreo sistemático y de manera general consiste en escoger cada unidad al azar dentro de cada uno de los estratos formados; es decir, en lugar de tomar sólo una unidad al azar se toman las 10 unidades al azar, dentro de los diferentes estratos.

A continuación, se describe de forma general el procedimiento a seguir para un muestreo aleatorio sistemático tomando como ejemplo un lote de 100 unidades.

- i. Establecer el tamaño del lote ($N = 100$).
- ii. Definir el número de unidades a seleccionar, por ejemplo 10.
- iii. Calcular el tamaño del intervalo (K) o el tamaño de cada estrato:

$$K=N/n$$

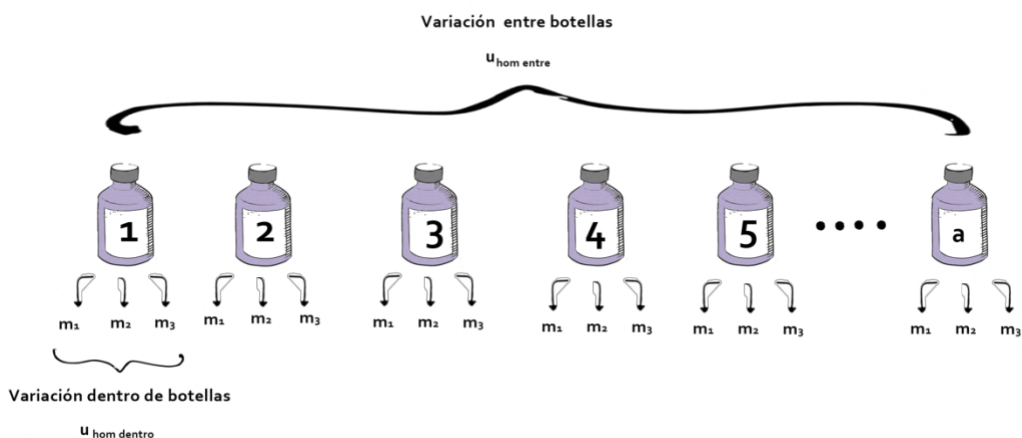
- iv. De forma aleatoria fijar el punto de inicio de los intervalos. Por ejemplo, inicia en la unidad 21.
- v. Numerar de 1 a 10 cada una de las unidades dentro del intervalo de acuerdo con el tamaño de este. Por ejemplo, la unidad 21 se numeraría como 1, la 22 como 2, etc.
- vi. A través de un generador de números aleatorios (números de 1 a 10), seleccione una unidad al azar. Por ejemplo, se selecciona la unidad 7 del estrato, que corresponde a la unidad 27 del lote.
- vii. Posteriormente, sobre el siguiente estrato (de las unidades 31 a 40) numere nuevamente las unidades de 1 a 10.
- viii. Nuevamente a través de un generador de números aleatorios (números de 1 a 10), seleccione la segunda unidad al azar.
- ix. Repita el proceso dentro de los diferentes estratos hasta que obtenga el número total de unidades que requiere (n).

2.3 EVALUACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD

Usualmente, debido a la complejidad de su producción, costos y practicidad, los materiales de referencia se producen como lotes de unidades, por lo que es necesario asegurar que el valor de la propiedad es el mismo para las unidades dentro de la incertidumbre asignada; por lo anterior, durante la producción se deben tomar acciones para lograr una homogeneidad adecuada, y posteriormente, evaluarla y demostrar su adecuación al uso a través de un estudio de homogeneidad.

La homogeneidad de un MR se puede ver desde dos perspectivas, la primera se refiere a la variación de la propiedad de interés entre las unidades del material, por ejemplo, si se prepara un lote de 100 unidades (unidades independientes), hace referencia a la variación que la propiedad puede tener entre cada una de las unidades. Desde otra perspectiva, la homogeneidad de un material también se refiere a la variación de la propiedad dentro de cada unidad del material, por ejemplo, una de las unidades preparadas puede tener una cantidad determinada de un mensurando, pero solo se emplea una submuestra para la medición, por lo cual es necesario conocer cuál es la variación asociada a este submuestreo dentro de la unidad. La Figura 6, ilustra los dos tipos de variación.

Figura 6. Representación de la homogeneidad dentro de unidades y entre unidades



Siempre que se prepare un lote de materiales de referencia, la evaluación de la variación entre las unidades siempre es necesaria o por lo menos un experimento que permita confirmar que la homogeneidad es la misma que se obtuvo en lotes previos. Por otro lado, la evaluación de la homogeneidad en el interior de cada unidad (heterogeneidad dentro de la unidad) aplica siempre y cuando el material tenga características que pueden afectar la variación de la propiedad de interés conforme se toman diferentes alícuotas, por ejemplo, emulsiones, sólidos, coloides, entre otros.

Adicionalmente, para los materiales que pueden presentar un cierto grado de heterogeneidad dentro de la unidad es necesario establecer la mínima cantidad de muestra que se puede tomar, de tal manera que se asegure que las propiedades evaluadas cumplen con lo establecido en la documentación final del material de referencia. En términos prácticos, la homogeneidad o heterogeneidad de un material de referencia se expresa en términos de incertidumbre (u_{hom}), la cual puede contener los siguientes componentes:

- Incertidumbre entre unidades (u_{entre})

- Incertidumbre dentro de la unidad (u_{dentro})

Una vez se estiman estos componentes, u_{hom} se puede estimar a través de la siguiente expresión:

$$u_{\text{hom}} = \sqrt{u_{\text{entre}}^2 + u_{\text{dentro}}^2}$$

Ec.1

2.3.1 Generalidades

El concepto de homogeneidad es relativo, pues el nivel requerido de homogeneidad¹ de un MR *in-house* depende de diversos factores como: (i) la aplicación o el uso del material, por ejemplo, si se requiere un material para controlar la precisión o el sesgo de un método; (ii) el tipo de análisis, cuantitativo o cualitativo y (iii) la comprensión de la variación esperada de la cantidad de muestra utilizada en el proceso de medición bajo control. Sin embargo, independiente de la particularidad del material en todos los casos la homogeneidad o heterogeneidad tenga un efecto despreciable sobre el resultado de la medición del proceso de medición que se espera controlar con el MR *in-house*. En términos prácticos lo anterior implica que, si la incertidumbre del proceso de medición que se desea controlar a través del MRC corresponde a u_{medij} , la incertidumbre asociada a la homogeneidad o heterogeneidad (u_{hom}) del material deberá ser mucho menor.

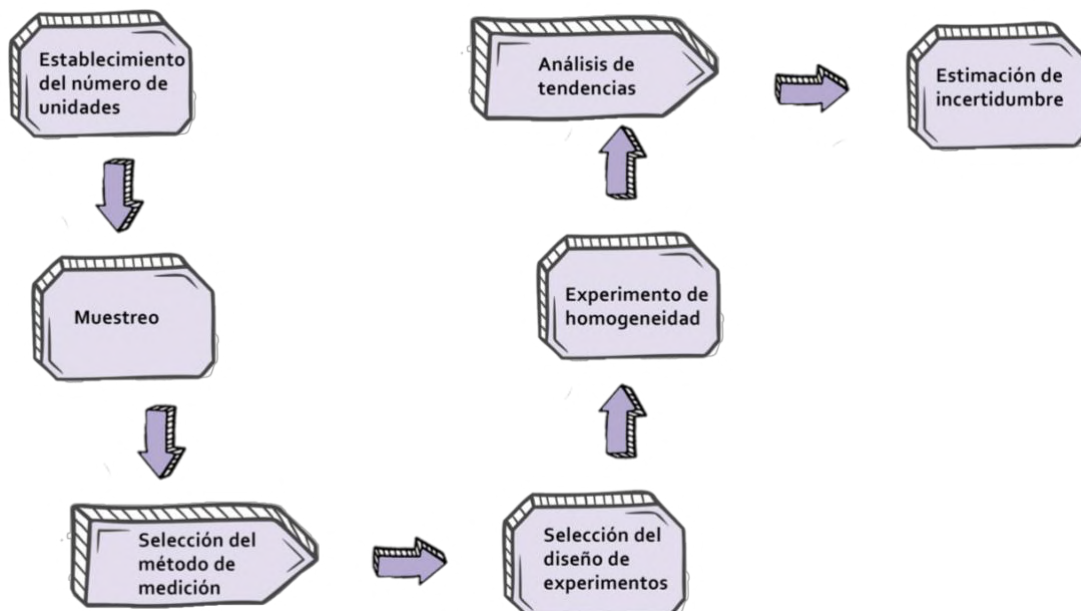
Según establece la Guía ISO 80, para ciertas matrices de MRs *in-house*, como soluciones líquidas que se han preparado mediante procedimientos que involucran filtración (para eliminar partículas) y solubilización completa, en principio, no es necesario realizar una evaluación formal de homogeneidad. Dichos materiales pueden considerarse formalmente como intrínsecamente homogéneos. No obstante, debido al riesgo de contaminación cruzada (por ejemplo, introducido por el envasado) o subdivisión imperfecta, se recomienda realizar un estudio de homogeneidad.

Por otro lado, la Guía ISO 80 establece que para matrices complejas como alimentos, suelos y matrices sólidas que son inherentemente heterogéneas, es indispensable llevar a cabo un estudio más exhaustivo de evaluación de la homogeneidad. Para ello, es indispensable que se elija un número suficiente de unidades, representativas de todo el lote del MR *in-house*. En ciertos casos, se puede elegir una propiedad para representar y cuantificar la homogeneidad de varias propiedades de un tipo general similar. Sin embargo, esto debe basarse en evidencia científica o en experiencias previas de que ciertas propiedades exhiben un comportamiento similar o se sabe que tienen una fuerte tendencia a la distribución homogénea en la muestra.

La Figura 7 presenta los pasos generales que se realizan en un estudio de homogeneidad.

¹ Comúnmente, este criterio se denomina incertidumbre objetivo (u_{obj}) .

Figura 7.
Pasos generales para la
evaluación de la
homogeneidad de un MR
in-house



A continuación, se presentarán algunas generalidades y recomendaciones para el desarrollo de cada de estas etapas, a excepción de la etapa relacionada con el muestreo la cual se presentó en el numeral 2.2.

2.3.2 Recomendaciones previas al estudio de homogeneidad

La Guía ISO 35 brinda algunas recomendaciones para la evaluación de la homogeneidad y brinda detalles completos y ejemplos de enfoques recomendados para el diseño de estudios de homogeneidad y el tratamiento estadístico de los datos de homogeneidad. A continuación, se relacionan algunas de estas recomendaciones:

- Siempre se deben emplear métodos de muestreo para este tipo de estudios (ver numeral 2.2).
- Preferiblemente, usar de muestreos sistemáticos (ver numeral 2.2.3).
- El número de unidades necesario para el estudio de homogeneidad depende del número total de unidades producidas (ver numeral 2.3.3)
- Se deben emplear métodos analíticos validados con un grado suficiente de repetibilidad y selectividad (ver numeral 2.3.4).
- Realizar las mediciones empleando un diseño experimental adecuado (ver numeral 2.3.5).
- No se recomienda descartar datos únicamente con base en criterios estadísticos o sin una causa técnica justificable.
- Llevar a cabo estudios de tendencias (ver numeral 2.3.7)
- Llevar a cabo un análisis estadístico apropiado para estimar la incertidumbre por homogeneidad del material (ver numeral 2.3.8).

2.3.3 Selección del número de unidades

Los estudios de homogeneidad para propiedades cuantitativas suelen tener por objeto proporcionar información sobre la varianza debida a la heterogeneidad y detectar cualquier tendencia que se tenga dentro del lote, a causa de las etapas de procesamiento y envasado del material. Para lograr estos objetivos, el número de unidades que se empleen debe ser suficiente para obtener una estimación razonable de la varianza entre unidades, y permitir lograr una visión clara de las posibles tendencias presentes dentro del lote.

En este sentido, con el propósito de asegurar la idoneidad del estudio de homogeneidad, se recomienda que siempre que se produzca un lote de materiales de referencia de tipo cuantitativo, se emplee la siguiente expresión para la determinación del número de unidades:

$$n = 3\sqrt[3]{N} \quad \text{Ec.2}$$

Donde N corresponde al número total de unidades producido. Por otro lado, en el caso en que se tengan lotes de materiales de referencia que no excedan las 100 unidades, se recomienda hacer uso de alguna de las siguientes expresiones:

$$n = \sqrt{N} \quad \text{Ec.3}$$

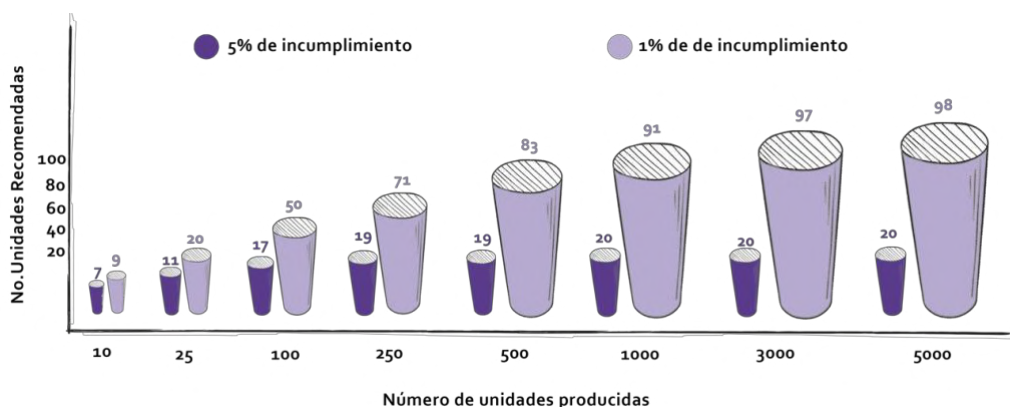
$$n = 0.1 N \quad \text{Ec.4}$$

Por otro lado, si se trata de materiales de referencia de tipo cualitativo, se recomienda que este número de unidades sea superior, para lo cual se puede emplear la siguiente expresión:

$$n = \frac{N}{N\alpha + N} \quad \text{Ec.5}$$

Donde α corresponde al máximo límite de no conformidades o inconformidades (por ejemplo, para un 5% de inconformidades a en la ecuación corresponde a 0.05). La Figura 8 se presenta una gráfica que puede ayudar a seleccionar el número de unidades.

Figura 8.
Número de unidades
recomendado para MR
de tipo cualitativo



2.3.4 Selección del método de medición

Con el propósito de llevar a cabo una adecuada evaluación de la homogeneidad, resulta conveniente seleccionar un método analítico que proporcione la mayor precisión posible (S_r), o por lo menos que se tenga un buen conocimiento acerca de esta propiedad. En este sentido, la Guía ISO 35 recomienda que la precisión del método (S_r) debe ser menor o igual a un tercio de la incertidumbre objetivo (U_{objetivo}).

$$S_r \leq \frac{U_{\text{objetivo}}}{3} \quad \text{Ec.6}$$

El Anexo 1, brinda algunos ejemplos que sirven de guía para el establecimiento de la incertidumbre objetivo de un material. Por otro lado, el Anexo 4 presenta algunas de las incertidumbres obtenidas en la evaluación de homogeneidad de materiales de referencia *in-house* por parte del Instituto Nacional de Metrología, los cuales pueden servir de referencia.

A continuación, se describen otras consideraciones que resultan útiles para seleccionar el método de medición con el que se evalúa la incertidumbre:

- Si se tiene la posibilidad de tener a disposición diferentes métodos, se debe seleccionar el método que tenga la mejor precisión.
- Se recomienda verificar que el método disponible sea lo suficientemente sensible para detectar la variación que se espera (U_{objetivo} por homogeneidad).
- En el caso que el método de medición que se tenga disponible para llevar a cabo las mediciones del estudio de homogeneidad no cumpla con el criterio de repetibilidad, se deben realizar mayor número de réplicas (r_i).

$$\frac{S_r}{\sqrt{r_i}} \leq \frac{U_{\text{objetivo}}}{3} \quad \text{Ec.7}$$

2.3.5 Selección del diseño de experimentos

Una adecuada selección del diseño de experimentos es crucial para realizar un estudio de homogeneidad eficiente. Esta selección, depende de múltiples factores dentro de los que se encuentran: la estabilidad del sistema de medición, la complejidad de la medición, los costos, entre otros.

De manera general, durante la evaluación de la homogeneidad de un MR *in-house*, se realiza una comparación estadística entre la dispersión de las observaciones en varias unidades de un lote de MR *in-house* con la dispersión asociada a al proceso de medición, lo anterior con el propósito de determinar la desviación estándar entre unidades y posteriormente la respectiva incertidumbre. Es así como, para obtener la mejor estimación posible de la incertidumbre entre unidades (U_{entre}), durante el estudio se debe:

- i. Opción 1: realizar todas las mediciones de homogeneidad para una propiedad dada en una sola secuencia de medición, o
- ii. Opción 2: usar un diseño experimental que permita la estimación separada de las varianzas dentro de la secuencia, entre secuencias y entre unidades.

De manera general, los diseños más útiles para este propósito son los diseños completamente al azar (para la opción 1) o de bloques aleatorios simples y los diseños anidados balanceados (para la opción 2). En la Tabla 3 se describen los aspectos relevantes de estos diseños experimentales:

Tabla 3. Características ventajas y desventajas de los diseños de experimentos recomendados en ISO 35.

	Consideraciones	Ventajas	Desventajas	Recomendaciones de aplicación
Completamente al azar	Una sola secuencia con dos observaciones por unidad medidas en orden aleatorio	☺ Ejecución sencilla (depende la rapidez del método). ☺ Cálculos sencillos. ☺ Excel es suficiente para el análisis de datos. ☺ En general es el más empleado. ☺ En MR de tipo cualitativo: permite la evaluación intra e inter-unidades al mismo tiempo. ☺ Puede determinar la u_{hom} completa, pero sin discriminar entre y dentro de unidades.	☹ Puede sobre o subestimar la incertidumbre. ☹ Puede convertir los errores sistemáticos de la medición en aleatorios, es decir puede sobre estimar la incertidumbre. ☹ Si hay heterocedasticidad se requieren métodos más complejos para el análisis de resultados. ☹ En MR de tipo cuantitativo: permite la evaluación de la incertidumbre de una sola variable: entre unidades o dentro de unidades.	▪ Métodos que permiten realizar mediciones rápidas/ no destructivos y/o sin deriva. ▪ Pocas unidades de los MR a evaluar. ▪ MR de tipo cualitativo: sólidos y líquidos. ▪ MR de tipo cuantitativo: líquidos o materiales que se conozca previamente la homogeneidad. ▪ MR de tipo cuantitativo en los que se espera que la heterogeneidad dentro de cada unidad sea muy baja
Bloques al azar	Cada secuencia incluye una observación de cada unidad, y cada ejecución se aleatoriza por separado	☺ Ejecución intermedia (depende de la rapidez del método). ☺ Excel es suficiente para el análisis de datos. ☺ Reduce el efecto de las derivas de los métodos. ☺ Cálculos sencillos ☺ Evita sobre estimación o subestimación de la incertidumbre por problemas de medición. ☺ Puede determinar la u_{hom} completa, pero sin discriminar entre y dentro de unidades.	☹ Si hay heterocedasticidad se requieren métodos más complejos para el análisis de resultados. ☹ En MR de tipo cuantitativo: permite la evaluación de la incertidumbre de una sola variable: entre unidades o dentro de unidades.	▪ Métodos que requieren tiempos largos de ejecución o tienen derivas (baja precisión intermedia-entre días) ▪ Gran número de unidades de los MR a evaluar. ▪ MR de tipo cuantitativo: sólidos y líquidos.
Anidado	Se asignan aleatoriamente cuatro unidades a cada una de las tres corridas y se realizan observaciones duplicadas en cada una, nuevamente en orden aleatorio.	☺ Reduce el efecto de las derivas de los métodos. ☺ Permite emplear diferentes métodos o laboratorios. ☺ Cálculos intermedios. ☺ Evita sobre estimación o subestimación de la incertidumbre por problemas de medición. ☺ Puede determinar la u_{hom} en sus diferentes componentes (entre y dentro). ☺ Brinda más información de los métodos y de los materiales de referencia.	☹ Ejecución compleja ☹ Es necesario un programa estadístico para el suficiente análisis de datos. ☹ Si hay heterocedasticidad se requieren métodos más complejos para el análisis de resultados.	▪ Métodos que requieren tiempos largos de ejecución o tienen derivas (baja precisión intermedia-entredías) ▪ MR de tipo cuantitativo: sólidos con posiblemente alta heterogeneidad dentro de la unidad.

2.3.6 Ejecución del estudio de homogeneidad

Una vez seleccionados el número de unidades, el método el número de réplicas y el diseño de experimentos es necesario pasar a la etapa de ejecución, para lo cual se recomienda de manera general:

- Incluir controles que permitan evaluar si existe algún tipo de contaminación durante las etapas de procesamiento y medición de las diferentes unidades.
- Aleatorice todos los experimentos.
- Evite incluir dentro de la secuencia de medición muestras de clientes u otro tipo de experimento.
- Registre el orden de medición (incluyendo extracciones y limpiezas), así como el de medición en la secuencia instrumental.
- Trate de seleccionar un periodo de tiempo en el cual usted conozca que las condiciones del laboratorio son estables, por ejemplo, una secuencia en la noche.
- Incluya controles que le permitan evaluar la deriva, precisión y en general el comportamiento del instrumento a lo largo del experimento.

El capítulo 3, brinda algunos ejemplos de tipo práctico para la elaboración de las secuencias de medición en este tipo de estudios.

2.3.7 Estudio de tendencias

Los análisis de tendencias permiten identificar si existen problemas durante las etapas de preparación/envasado o durante la etapa de medición. A continuación se explican cada uno de estos análisis.

a. Análisis de tendencias de preparación

Este análisis se debe realizar con el propósito de detectar si la propiedad de interés varía en función del orden de envasado. Lo anterior, sirve como herramienta para evidenciar que los procesos de reducción de contaminación cruzada, estabilización del material y en general el proceso de preparación del material de referencia fue el adecuado. Para realizar esto se puede seguir el siguiente proceso:

- i. Estimar los valores de concentración o de respuesta instrumental (corregida por efectos de las operaciones gravimétricas volumétricas) para cada una de las unidades.
- ii. Construir una gráfica de estos valores en función del número de unidad.
- iii. Revisar si se puede apreciar algún tipo de tendencia a lo largo de todo el intervalo de la ordenada o quizás en algunas secciones, por ejemplo, en las últimas cinco unidades o las primeras cinco.
- iv. En el caso de no observar ninguna tendencia, confirme esto a través de un análisis de regresión.

Nota: la guía ISO 35 [19] sugiere que se realice un análisis de regresión lineal, pero dependiendo del comportamiento obtenido se pueden emplear otros modelos.

b. Análisis de tendencias de medición

Este análisis se debe realizar previo a la estimación de la incertidumbre de medición, pues a través de este se puede detectar si el instrumento presentó algún tipo de deriva que posteriormente pueda llevar a una subestimación o sobreestimación de la incertidumbre de medición. Para realizar esto se puede seguir de manera general el siguiente proceso:

- Estimar los valores de concentración o de respuesta instrumental (corregida por efectos de las operaciones gravimétricas volumétricas).
- Construir una gráfica de estos valores en función del número de medición.
- Revisar si se puede apreciar algún tipo de tendencia a lo largo de todo el intervalo de la ordenada o quizás en algunas secciones, por ejemplo, en las últimas 20 mediciones o las primeras.
- En el caso de no observar ninguna tendencia aparente confirme esto a través de un análisis de regresión.

Nota: la guía ISO 35 [19] sugiere que se realice un análisis de regresión lineal, pero dependiendo del comportamiento obtenido se pueden emplear otros modelos.

Para el caso de análisis de tendencia de medición, en el caso en que se tengan controles durante la secuencia de medición, por ejemplo, un MRC que se mide periódicamente, se puede realizar el análisis de tendencia de medición a través de las observaciones obtenidas de este.

2.3.8 Estimación de incertidumbre por homogeneidad

La guía ISO 35 [19] sugiere emplear el ANOVA para estimar la incertidumbre de homogeneidad de los materiales. A continuación, la Tabla 4 da un resumen de cómo realizar dicha estimación.

Tabla 4.
Resumen de estimación
de incertidumbre entre y
dentro de unidades con
los diferentes diseños
experimentales.

Diseño de experimentos	Componentes del ANOVA	Estimación de incertidumbre
Completamente al azar	- CME entre - CME dentro - n número de unidades - m número de submuestras o réplicas o número de mediciones instrumentales.	$u_{\text{hom}}^2 = \frac{CM_{\text{ENTRE}} - CM_{\text{RESIDUAL}}}{n}$
Bloques al azar	- CME entre - CME bloques - CME dentro - n número de unidades - m número de submuestras o réplicas	$u_{\text{hom}}^2 = \frac{CM_{\text{ENTRE}} - CM_{\text{RESIDUAL}}}{m}$
Anidado	- CME A, donde A es un factor - CME B, donde B es un factor anidado en A - CME C, donde C es un factor anidado en B y en A. - n número de unidades - m número de submuestras o réplicas	$u_{\text{hom dentro}}^2 = \frac{CM_{A(B(C))} - CM_{\text{RESIDUAL}}}{m}$ $u_{\text{hom entre}}^2 = \frac{CM_{A(B)} - CM_{\text{RESIDUAL}}}{n}$

Por otro lado, en el caso en el cual el cuadrado medio residual (CM_{RESIDUAL}) sea mayor que el primer término y se produzca una incertidumbre indeterminada, es necesario emplear la siguiente ecuación para determinar la u_{hom} .

$$u_{hom} = \sqrt{\frac{CM_{RESIDUAL}}{m}} + \sqrt{\frac{2}{v_{CM_{RESIDUAL}}}}$$

Ec.8

Donde $v_{CM_{RESIDUAL}}$ corresponde a los grados de libertad del $CM_{RESIDUAL}$.

Para más información acerca de las consideraciones prácticas de los diseños se recomienda consultar la guía ISO 35 [19].

2.4 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD

En general, la estabilidad de un material de referencia se refiere a la capacidad de este de mantener el valor declarado dentro de los límites especificados durante determinado tiempo cuando es almacenado, o transportado bajo condiciones específicas, es decir, los MR deben ser lo suficientemente estables para su uso previsto, de modo que el usuario final pueda confiar en el valor asignado en cualquier punto dentro del periodo de validez del certificado. Es importante tener en cuenta la estabilidad en las diferentes condiciones a las que puede ser sometido el material, por lo que se debe considerar la estabilidad durante el almacenamiento y en condiciones de transporte, e incluso se puede considerar la estabilidad del material después de la apertura, cuando se permita ser usado en más de una ocasión.

En este sentido, a través de los estudios de estabilidad se busca (i) demostrar que el material es lo suficientemente estable en las condiciones de almacenamiento seleccionadas, (ii) el material puede ser transportado en condiciones “extremas” y (iii) el material puede ser utilizado repetidas veces después de abierto, lo cual sólo aplica para los materiales de múltiples usos. En la práctica, lo anterior implica que para estimar la incertidumbre (u_{est}) asociada a la estabilidad de un material de referencia es necesario realizar tres estudios, usualmente independientes, con los cuales se puede estimar u_{est} a través de la siguiente expresión:

$$u_{\text{estabilidad}} = \sqrt{u_{lp}^2 + u_{cp}^2 + u_{uso}^2} \quad \text{Ec.9}$$

Donde u_{lp} corresponde a la incertidumbre a largo plazo, u_{cp} corresponde a la incertidumbre a corto plazo o condiciones de transporte y u_{uso} corresponde a la incertidumbre asociada al uso del material (después de abierto).

Es importante resaltar que, si el material producido no se retirará de las instalaciones, es decir no se someterá a condiciones de transporte, en principio no es necesario realizar este estudio, por lo cual la anterior expresión se simplifica a:

$$u_{\text{estabilidad}} = \sqrt{u_{lp}^2 + u_{uso}^2} \quad \text{Ec.10}$$

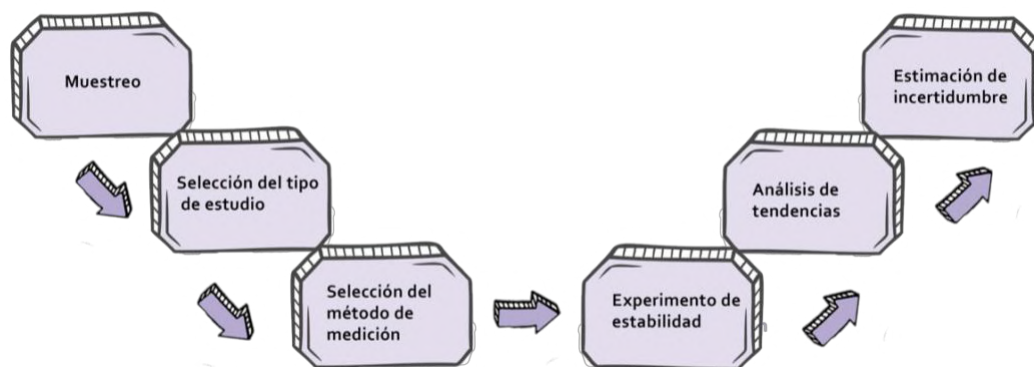
Por otro lado, como se comentó previamente, en el caso en que la presentación del material implique un solo uso o un uso inmediato, por ejemplo, JRC ofrece un MRC de residuos de plaguicidas que una vez abierto se debe consumir inmediatamente, la incertidumbre asociada al uso es igual a cero ($u_{uso}=0$).

2.4.1 Generalidades

El valor de cada propiedad en un material de referencia puede cambiar considerablemente con el tiempo dependiendo de: las condiciones a las que es sometido, la naturaleza de los analitos y la complejidad de las matrices. Algunos materiales cambiansiguendo cinéticas de orden cero durante largos periodos; otros pueden sufrir cambios rápidos autocatalíticos o menos predecibles después de un período de estabilidad y, otros pueden cambiar rápidamente durante un período inicial después del procesamiento y luego permanecer estables durante largos periodos.

Por lo anterior, siempre existe el riesgo de que el valor de una o más de las propiedades cambien inesperadamente durante la vida útil de un material de referencia, teniendo incluso como consecuencia la inviabilidad del material a causa de su inestabilidad. Por lo cual, la realización de los estudios de estabilidad es indispensable en la producción de un MR. La Figura 9 presenta un esquema general del estudio de estabilidad, la cual aplica para cualquiera de los estudios (corto, largo o uso).

Figura 9.
Pasos generales para la
evaluación de la
estabilidad de materiales
de referencia in-house



A continuación, se presentarán algunas generalidades y recomendaciones para el desarrollo de cada de estas etapas, a excepción de las etapas de muestreo y de análisis de tendencias, las cuales se presentaron en los numerales 2.2 y 2.3.7, respectivamente. Por otro lado, el Anexo 2 presenta el esquema general para la estimación de la incertidumbre asociada al estudio de uso.

2.4.2 Recomendaciones previas al estudio de estabilidad

La Guía ISO 35 brinda algunas recomendaciones para la evaluación de la estabilidad y brinda ejemplos de algunos de los enfoques recomendados para el diseño de estos estudios y el tratamiento estadístico de los datos de estabilidad. A continuación, se relacionan algunas de estas recomendaciones:

- Se recomienda para este tipo de estudios realizar muestreos aleatorios simples (ver numeral 2.2.1).

- Considerar la homogeneidad del material y la precisión del método para establecer el número de réplicas a realizar.
- En el caso de realizar el estudio por primera vez, emplear al menos dos unidades por cada uno de los tiempos.
- Las mediciones de los estudios de estabilidad se pueden realizar en condiciones de repetibilidad o de precisión intermedia (ver numeral 2.4.3).
- Se deben emplear métodos analíticos validados con un grado suficiente de repetibilidad y selectividad (ver numeral 2.4.6).
- No se recomienda descartar datos únicamente con base en criterios estadísticos o sin una causa técnica justificable.
- Llevar a cabo estudios de tendencias de medición, previo a la estimación de la incertidumbre (ver numeral 2.3.7)
- Si es posible, realicé seguimiento no sólo a la propiedad de interés sino también a otras propiedades que pueden indicar algún grado de degradación, por ejemplo: contenido de grasa, humedad, contenido microbiológico, entre otros.

2.4.3 Selección del tipo de estudio

Como se comentó previamente, es necesario realizar varios estudios que buscan estimar cada una de las componentes de la estabilidad (numeral 6.1). Por lo anterior y teniendo en cuenta las condiciones y los tratamientos aplicados, los estudios de estabilidad se pueden clasificar en:

a. Estudios de estabilidad en tiempo real

La estabilidad del MR es estudiada bajo las condiciones de almacenamiento que son previstas para este. Esto significa que, en una semana, mes o un año el estudio de estabilidad proporciona información sobre el comportamiento del material durante el período de tiempo determinado.

b. Estudios de estabilidad acelerada

En este estudio se realizan múltiples experimentos, los cuales son realizados bajo las condiciones más extremas de almacenamiento o transporte a las que puede estar sometido el material, con el fin de inducir una más rápida degradación que se podría experimentar en las condiciones de almacenamiento previstas.

Por otro lado, dependiendo de las condiciones de especificadas en la medición², los estudios de estabilidad se clasifican en:

- Estudios de estabilidad clásicos-condiciones de precisión intermedia.
- Estudios de estabilidad isócronos- condiciones de repetibilidad.

² Las “condiciones especificadas” pueden ser condiciones de repetibilidad, condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad (véase la norma ISO 5725-1:1994).

La Tabla 5 presenta algunas recomendaciones para la selección de estos diseños de experimentos.

Tabla 5.
Recomendaciones para la
selección del tipo de
experimento estudios de
estabilidad

	Ventajas	Desventajas	Recomendaciones de aplicación
Tiempo real	☺ Si el MR es inestable se conoce de manera más rápida. ☺ No son necesarias unas condiciones de referencia. ☺ El MR no se somete a las condiciones de referencia.	☹ Se realizan las mediciones bajo condiciones intermedias. ☹ Proporciona menor precisión ☹ Se pueden tener derivas del método de medición que enmascaren la estabilidad o inestabilidad. ☹ Mayor costo, pues se deben realizar mediciones absolutas. ☹ Se requieren métodos de medición validados en condiciones de precisión intermedia.	• Estudios a largo plazo en los cuales no se conoce información acerca de la posible estabilidad. • Estudios a largo plazo para MR de tipo cualitativo.
Isócrono	☺ Se realizan las mediciones bajo condiciones de repetibilidad ☺ Proporciona mejor precisión ☺ Reduce posibilidad de derivas ☺ Menor costo ☺ Simplifica la programación de los recursos del laboratorio. ☺ Se requieren métodos de medición validados en condiciones de repetibilidad.	☹ La inestabilidad del MR se conoce sólo hasta finalizar el estudio. ☹ Si las condiciones de referencia tienen pequeños cambios, se puede afectar la conclusión ☹ Se asume que la transferencia de condiciones no presenta efectos adversos.	• Estudios de uso • Estudios de corto plazo • Estudios acelerados • Estudios a largo plazo en los cuales se conoce que el MR es posiblemente más estable.

2.4.4 Estudios de estabilidad clásicos

En estos estudios, se realiza la medición del material, bajo condiciones idénticas en diferentes periodos de tiempo, en un tiempo cero (en el momento de asignar el valor) y en tiempos subsecuentes con una duración predeterminada. Este tipo de estudios tiene como desventaja que pueden contribuir más ampliamente sobre la incertidumbre debido a que se debe tener en cuenta la variabilidad en el tiempo del sistema de medición lo que podría incidir en una mayor dispersión de los resultados.

A continuación, se explican los pasos generales para el desarrollo de estos estudios:

- Definir el tiempo que se requiere para realizar el estudio, por ejemplo 2 años.
- Seleccionar cada uno de los puntos de muestreo en el tiempo. Por ejemplo: 3 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses y 24 meses.
- Seleccionar al azar las unidades del tiempo cero o.
- Medir cada una de las unidades.
- Posterior a los tres meses, seleccionar nuevamente las unidades al azar.
- Medir nuevamente y se registrar los datos.
- Comparar los dos grupos de datos (0 meses vs. 3 meses).
- Nota: en el caso en que no existan diferencias continuar con el estudio, sin embargo, en el caso en que se encuentren diferencias es necesario tomar las decisiones del caso, por ejemplo, cambiar las condiciones de almacenamiento, envasado, estabilizantes, entre otros. En el capítulo 2.1 se brindan algunos ejemplos.
- Continuar con los muestreos en el tiempo hasta finalizar lo planeado.



Nota: una vez se tengan los datos se sugiere estar realizando comparaciones con los tiempos previos y revisar posibles tendencias.

- x. Cuando se tengan todos los resultados realizar un análisis de regresión.
- xi. Estimar el tiempo de vigencia del material.

2.4.5 Estudios de estabilidad isócronos

Estos estudios implican un almacenamiento bajo condiciones de referencia, estas son condiciones bajo las cuales se espera que las propiedades de interés del material se mantengan estables, y las que serán empleadas como referencia para evaluar las unidades que han sido expuestas a otras condiciones de almacenamiento seleccionadas, en las cuales podría tener lugar una degradación de los analitos.

A continuación, se explican los pasos generales para el desarrollo de estos estudios:

- i. Definir el tiempo que se requiere para realizar el estudio, por ejemplo 2 años.
- ii. Seleccionar cada uno de los puntos de muestreo en el tiempo. Por ejemplo: 3 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses y 24 meses.
- iii. Seleccionar al azar las unidades del tiempo cero o.
- iv. Almacenar las unidades de tiempo o a las condiciones de referencia, por ejemplo - 20 °C.
- v. Posterior a los tres meses, seleccionar nuevamente las unidades al azar.
- vi. Almacenar las unidades a las condiciones de referencia.
- vii. Continuar con los muestreos en el tiempo hasta finalizar lo planeado. Siempre almacenando las unidades a las condiciones de referencia.
- viii. Cuando se tengan todas las unidades retirarlas de la temperatura de referencia y realizar las mediciones en condiciones de repetibilidad.
- ix. Cuando se tengan todos los resultados realizar un análisis de regresión
- x. Estimar el tiempo de vigencia del material.

2.4.6 Selección del método de medición

A continuación, se dan unas recomendaciones generales relacionadas con los métodos a emplear en los estudios de estabilidad de lotes o unidades de MR de tipo cuantitativo:

- Usar métodos que no se vean afectados por la aparición de algunos posibles productos de la degradación del material o los aditivos que se emplearon durante la preparación del MR (selectividad adecuada del método).
- Para estudios con diseños isócronos:
 - Usar métodos suficientemente precisos (en condiciones de repetibilidad), tal que a desviación estándar de repetibilidad (s_r) sea menor la incertidumbre de estabilidad ($u_{\text{est objetivo}}$) de la propiedad de interés. En caso contrario, se debe aumentar el número de réplicas (r_i) para que se cumpla la siguiente condición:

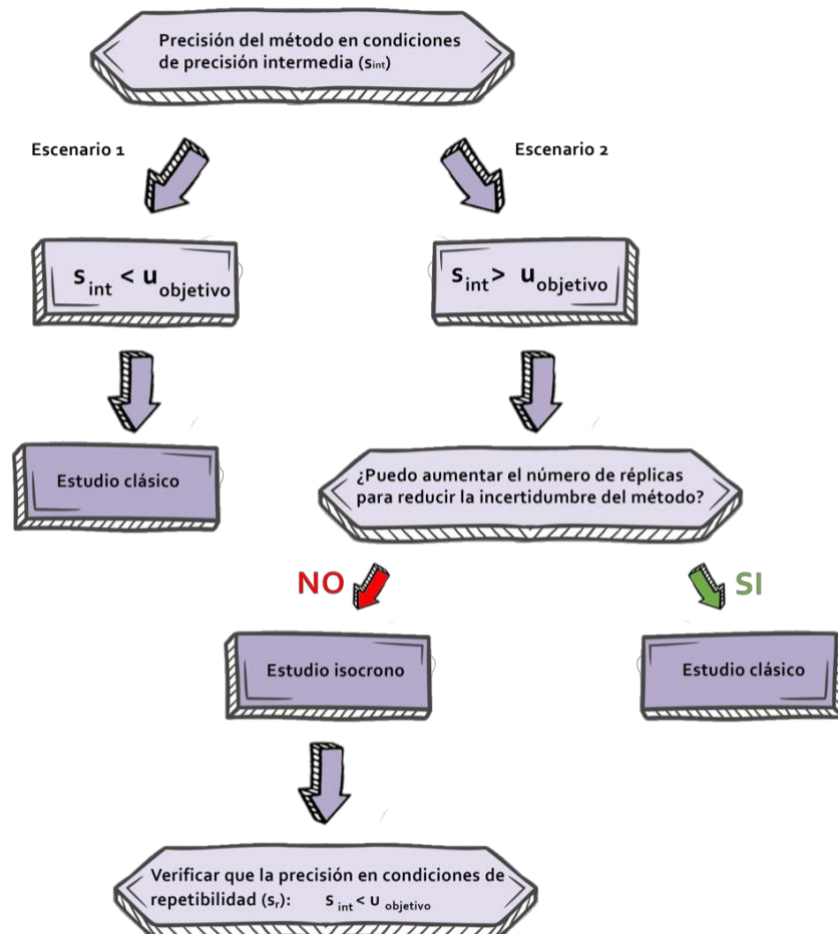
$$\frac{s_r}{\sqrt{r_i}} \leq u_{\text{estab objetivo}}$$

Ec.11

- En el caso en que el método no tenga una deriva significativa no es necesario realizar una cuantificación absoluta.
- Se debe asegurar que la sensibilidad del método puede detectar los posibles cambios en la concentración del material de referencia.
- Para estudios con diseños clásicos:
 - Usar un método que tenga una precisión (entre días), menor que la incertidumbre objetivo.
 - Se deben realizar cuantificaciones absolutas, para lo cual debe seleccionar una referencia estable.
 - Se debe asegurar que la sensibilidad del método puede detectar los posibles cambios en la concentración del material de referencia.

La Figura 10 presenta un esquema sugerido para la selección del tipo de estudio de acuerdo con las características del método.

Figura 10.
Selección del tipo de
estudio de acuerdo con la
precisión del método



2.4.7 Ejecución de los estudios de estabilidad

Una vez establecidos los tiempos, número de unidades, el método, el número de réplicas y el tipo de experimento es necesario pasar a la etapa de ejecución, para lo cual se recomienda de manera general:

- Considerar todas las recomendaciones que se dan para los estudios de homogeneidad (ver numeral 2.3.2).
- Evite en la misma secuencia mezclar experimentos, por ejemplo, estudio de uso y estudio de corto plazo.
- En el caso de estudios de tipo clásico:
 - Asegúrese de emplear un MR o MRC para la cuantificación, que tenga una vigencia más amplia que el tiempo que usted definió para su estudio de estabilidad.
 - Trate de analizar su material de referencia *in-house* con otro material de referencia (en matriz).
 - Asegúrese que medir repetidas veces durante la secuencia los niveles de calibración.
 - Si emplea curva de calibración, asegúrese de que la incertidumbre por la regresión es despreciable o se cumple con el criterio establecido en la Ecuación 11.
 - Mida uno de los niveles de calibración periódicamente.
- En el caso de estudios de tipo isócrono:
 - Se recomienda el uso de estándares internos.
 - Incluya un nivel de calibración como control de calidad (QC) dentro de la secuencia, el cual debe ser medido periódicamente.
 - Evite los problemas de deriva a través del empleo de estándares internos o secuencias de medición rápidas y en condiciones estables.

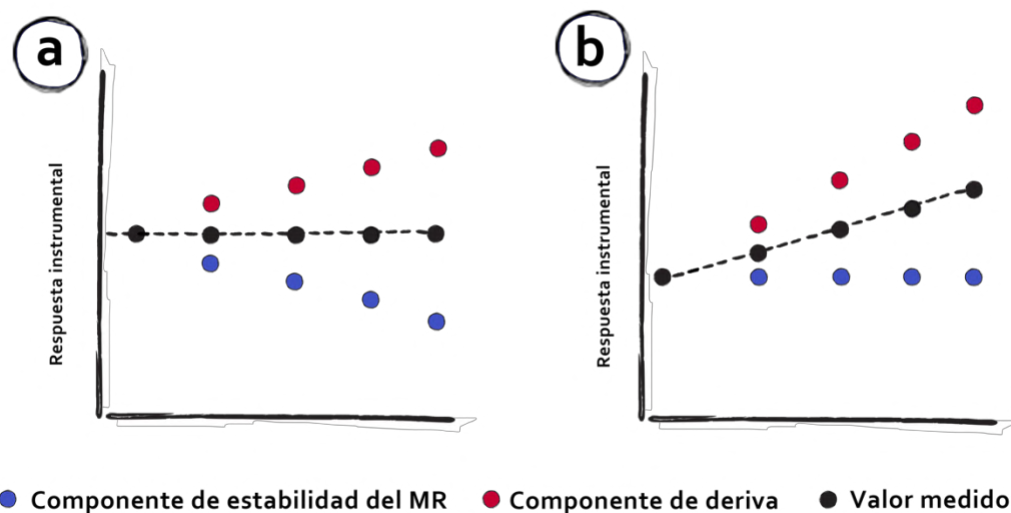
El capítulo 3, brinda algunos ejemplos de tipo práctico para la elaboración de las secuencias de medición en este tipo de estudios.

2.4.8 Ejecución de los estudios de estabilidad

El análisis de tendencias durante esta etapa busca asegurar que posible variación de la concentración que tenga un determinado material, sea en realidad producto de una descomposición o concentración del analito de interés y no que sea producto de la deriva instrumental del equipo.

La Figura 11 ilustra dos ejemplos hipotéticos en los cuales la deriva del instrumento puede afectar las conclusiones del estudio. La Figura 11a, presenta un ejemplo en el cual la deriva del instrumento (puntos rojos) enmascara la inestabilidad de un material (puntos azules), lo cual lleva a la conclusión de que el material es estable (puntos negros). Por su parte la Figura 11b, presenta un caso en que el material es estable, pero existe una deriva que lleva a concluir que el material se está concentrando. Este tipo de variaciones o deriva se puede

Figura 11.
Ejemplos de la influencia
de la deriva instrumental
sobre el estudio de
estabilidad



Por lo anterior y tal vez con mayor importancia, el análisis de tendencias de medición en los estudios de estabilidad puede tener implicaciones más severas en las conclusiones que se realicen del estudio de estabilidad.

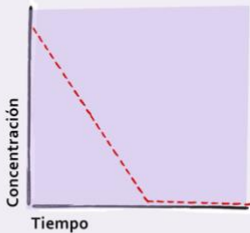
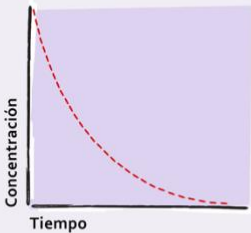
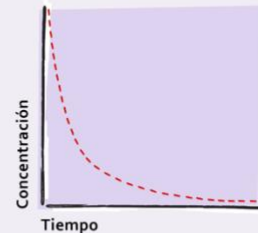
El análisis de tendencias de medición se puede realizar siguiendo las recomendaciones del numeral 2.3.7. Por otro lado, en el caso en que se tenga el orden de extracción y limpieza de un proceso de medición, se sugiere que se realice este mismo análisis con estas dos variables.

El capítulo 3, brinda algunos ejemplos de tipo práctico relacionados con estos análisis de tendencias.

2.4.9 Estimación de incertidumbre asociada a la estabilidad

La guía ISO 35 sugiere emplear el análisis de regresión para estimar la incertidumbre de estabilidad de los materiales. Este análisis de regresión se debe aplicar para varios modelos cinéticos (orden 0, 1, 2, entre otros) y en el caso de que el modelo de regresión sea significativo, se debe estimar la constante cinética. La Figura 12 muestra la estimación de k para varios modelos cinéticos.

Figura 12.
Estimación de las
constantes de velocidad
para diferentes ordenes

	Orden 0	Orden 1	Orden 2
Ley de Velocidad	$v = \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = k$	$v = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = k[A]$	$v = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = k[A]^2$
Concentración vs tiempo			
Ejemplo de unidades de k, constante de velocidad	$\frac{\text{mol}}{\text{L} \times \text{s}}$	$\frac{1}{\text{s}}$	$\frac{1}{\text{mol} \times \text{L} \times \text{s}}$

Por otro lado, una vez se evalúa si la regresión es significativa en varios modelos cinéticos, se debe decidir que estimador se debe emplear para la estimación de incertidumbre asociada a la estabilidad (u_{esta}). En caso en que la regresión sea significativa se puede estimar la incertidumbre de acuerdo con las recomendaciones mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Consideraciones
para la estimación de
incertidumbre por
estabilidad

Estudio	Componentes del ANOVA	Estimación de incertidumbre
Largo plazo	Cinética de orden 1: $u_{\text{largo plazo}} = k \cdot (t_{m1} + t_{\text{cert}})$	t_{m1} corresponde al tiempo en el cual se va a realizar el primer control de estabilidad (tiempo de monitoreo 1) y t_{cert} es el tiempo de vigencia del material, el cual se establece de acuerdo con el requisito de incertidumbre de este.
	Cinética de orden 2: $u_{\text{largo plazo}} = C_0 \cdot e^{-k t_c}$	Donde $t_c = t_{m1}, t_{\text{cert}}$ y C_0 corresponde a la concentración inicial del material o a 100 %, si se desea expresar la incertidumbre en porcentaje.
	Cinética de orden 3: $u_{\text{largo plazo}} = \frac{C_0}{k \cdot t_c + C_0 + 1}$	Donde t_c corresponde a t_{m1}, t_{cert} y C_0 corresponde a la concentración inicial del material o a 100 %, si se desea expresar la incertidumbre en porcentaje.
Corto plazo	Ejemplo para cinética de orden 1: $u_{\text{corto plazo}} = k \cdot (t_{\text{transp}})$	t_{transp} corresponde al tiempo en que el material sale del laboratorio y es dispuesto nuevamente a la temperatura de almacenamiento. Usualmente este tiempo es entre 1 y 7 días.

NOTA: en el caso en que la regresión no fuera significativa k puede ser reemplazado por la desviación estándar de la pendiente (s_b).



El capítulo 3, brinda algunos ejemplos de tipo práctico relacionados con la estimación de incertidumbre.

2.5 ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE LA PROPIEDAD

Los Materiales de Referencia Certificados (MRC) proporcionan una referencia de medición trazable al Sistema Internacional de Unidades, lo que permite establecer cadenas de trazabilidad metrológica y lograr comparabilidad de resultados en los laboratorios. Sin embargo, el proceso de medición de estas propiedades es exhaustivo, costoso y requiere cumplir múltiples requisitos de la norma ISO 17034.

Por otro lado, los materiales de referencia *in-house* se utilizan internamente en los laboratorios para el control rutinario de procesos, evaluación del personal y validación de métodos. Estos materiales son específicos para el uso interno del laboratorio.

Los materiales de referencia *in-house* se utilizan comúnmente para controlar el sesgo, evaluar la precisión del método y la reproducibilidad intra-laboratorio. Además, se pueden utilizar para detectar cambios en los procesos de medición y controlar errores sistemáticos.

Para establecer los valores de propiedad en los materiales de referencia *in-house*, existen diferentes enfoques. El más simple implica utilizar los resultados de la evaluación de homogeneidad. También se puede obtener el valor de propiedad a través de mediciones independientes o utilizando dos técnicas de medición independientes para obtener el valor de mejor calidad.

En resumen, tanto los MRC como los materiales de referencia *in-house* son importantes en los procesos de medición, pero tienen objetivos y usos diferentes.

2.5.1 Opción 1: haciendo uso del estudio de homogeneidad

El valor indicativo de la propiedad de interés del MR *in-house* es influenciado por la heterogeneidad de este, por tanto, al considerar esta variación en la estimación del valor indicativo se tiene una buena aproximación pues se considera intrínsecamente la variación probable de los valores debida a la heterogeneidad entre alícuotas o unidades a lo largo del lote producido.

En este sentido, la guía ISO 80 sugiere que, una forma eficaz de determinar un valor de propiedad indicativo es utilizar el promedio global de las observaciones obtenidas del estudio de homogeneidad. En consecuencia, el intervalo dentro del cual se espera razonablemente que se sitúen los valores de propiedad puede estimarse mediante la desviación de este valor medio global.

Así mismo, la desviación de la media global obtenida puede utilizarse para establecer los límites de alerta de los gráficos de control cuando el MR *in-house* se emplee en la rutina dentro del esquema de aseguramiento de la calidad de los resultados. Convencionalmente, los límites de alerta y acción (también descritos como límites de acción inferior y superior) se establecen en dos y tres veces la desviación estándar, respectivamente.

2.5.2 Opción 2: Empleo de un único método en un laboratorio

El empleo de un único método en un laboratorio es quizás la práctica más común en el desarrollo de materiales de referencia *in-house*. Para esto es importante considerar que el establecimiento de un valor de referencia no se debe realizar de la misma manera en la que se procesa una muestra de rutina, sino que se deben considerar diferentes elementos que permitirán reducir la incertidumbre y mejorar la estimación del valor. La Tabla 7 presenta algunos ejemplos de cambios que permiten mejorar la cuantificación y reducir la incertidumbre en la obtención de un valor de referencia para el material.

Tabla 7.
Posibles cambios que se pueden realizar para mejorar la estimación del valor de referencia

Situación	Mejora	Observaciones
El laboratorio analiza dos submuestras del homogeneizado	El laboratorio mide 7 submuestras del MR.	El incremento de las mediciones independientes reduce considerablemente la incertidumbre asociada a la precisión del método.
El laboratorio construye una curva de calibración con 5 puntos o niveles de concentración	El Laboratorio cuantifica empleando bracketing en lugar de la curva de calibración.	Se elimina la fuente asociada a la interpolación de la muestra en la curva de calibración.
El laboratorio diluye todas las muestras 5 veces para reducir los efectos de la matriz.	El laboratorio diluye la muestra para que la respuesta obtenida tenga la mejor precisión instrumental y elimine los efectos de la matriz*	Usualmente se diluyen las muestras en un determinado factor y posteriormente se interpola en una curva de calibración que es relativamente amplia, pues no se conoce la concentración de las muestras. Sin embargo, para un MR si se conoce la concentración, por lo cual se pueden diseñar diluciones para que la medición instrumental se realice en donde el equipo permita obtener los mejores valores de precisión.
El laboratorio analiza hasta 40 muestras de manera simultánea, lo cual tarda cerca de 3 días.	El Laboratorio sólo mide en un día 7 submuestras independientes y la secuencia de medición no incluye otras muestras	Al incluir en la rutina una gran cantidad de muestras se aumenta la probabilidad de errores de tipo sistemáticos y aleatorios, por lo cual al realizar por ejemplo en un solo día la extracción, limpieza y análisis instrumental se pueden lograr obtener resultados más exactos.
El laboratorio analiza diferentes tipos de muestras en la rutina con una curva de calibración preparada en extractos de una matriz similar.	El laboratorio emplea adición patrón	El método de adición patrón elimina la mayoría de los efectos de la matriz y si el instrumento es lo suficientemente sensible es posible realizar diluciones de los extractos (lo cual reduce aún más los efectos de la matriz), de tal manera que los valores obtenidos de concentración resultan ser mejores estimaciones del valor real.
	El laboratorio prepara los puntos de calibración en la misma matriz e inclusive emplea el mismo blanco que se empleó para preparar el MR.	Al realizar la calibración en el mismo blanco que se empleó para preparar el MR se asegura que se eliminan todos los problemas asociados a efecto matriz e interferentes.
El laboratorio emplea un solo ion para la cuantificación del analito	El laboratorio incluye más de un ion para la cuantificación de las muestras	El empleo de una segunda alternativa para la cuantificación permite verificar que no se tengan errores asociados a interferentes. Por ejemplo, a través de la cuantificación del error relativo.

En conclusión, se deben realizar algunos cambios en el método de rutina del laboratorio con el propósito de reducir la incertidumbre y los errores sistemáticos del método, el número y dificultad de cambios dependerá de la incertidumbre objetivo que se espere (ver Anexo A1). De igual manera, se recomienda previo a esta mejora conocer la concentración que se desea cuantificar y estudiar cuidadosamente el presupuesto de incertidumbre del método con el propósito de reducir el número de cambios y tener una mayor eficiencia en estos.

La Figura 13 presenta una propuesta para el establecimiento de un valor de referencia a través de un único método de medición. Nótese que la Figura 13, propone realizar diferentes cuantificaciones de la muestra, para lo cual se recomienda que entre estas cuantificaciones (q_1, q_2, q_n) se evite compartir curvas de calibración de tal manera que estas sean lo más independientes posibles; de hecho, es recomendable que se realicen en condiciones de precisión intermedia.

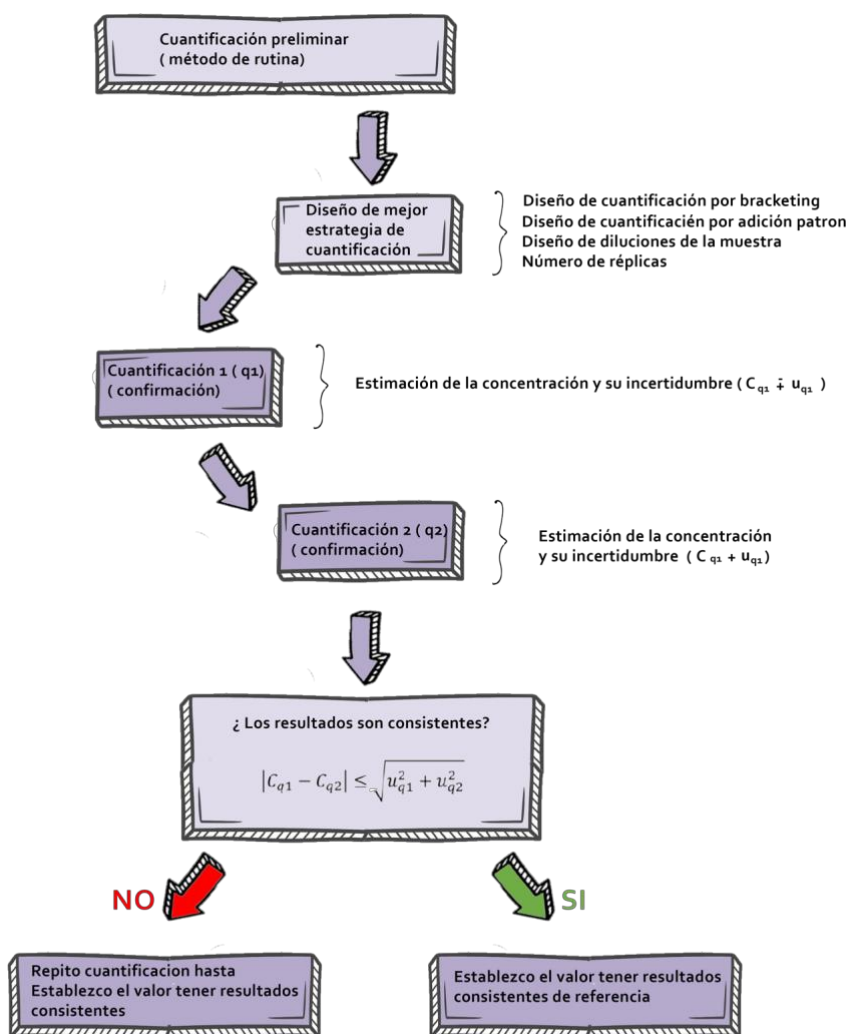


Figura 13. Esquema propuesto para el establecimiento de un valor de referencia a través de un método



En esta estrategia, se tratan los errores de tipo sistemático de cada uno de los métodos, como un error aleatorio, lo cual se incluye en la incertidumbre del valor de referencia. Para que esto sea cierto, los métodos deben:

- La recuperación con cada método debe ser aceptable, es decir entre 70 -120%.
- No se deben tener diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de los métodos.
- Tener principios diferentes o por lo menos no deben ser afectados por el mismo tipo de interferentes.

Para la aplicación de esta estrategia, el laboratorio puede contar con los dos métodos en el laboratorio o puede realizar un estudio colaborativo con otros laboratorios para establecer el valor de referencia, para lo cual se sugiere revisar un ejemplo que se encuentra disponible en la ISO 35 o el protocolo de la IUPAC [34] para estudios interlaboratorio.

Por otro lado, y con el propósito de asegurar una incertidumbre de medición adecuada mediante cualquiera de los métodos seleccionados, es necesario realizar una serie de mejoras de acuerdo con las sugerencias del numeral 2.5. La Figura 14 muestra una propuesta para el establecimiento del valor de referencia mediante esta aproximación.

2.5.3 Opción 3: Empleo de dos o más métodos de medición

En esta estrategia, se tratan los errores de tipo sistemático de cada uno de los métodos, como un error aleatorio, lo cual se incluye en la incertidumbre del valor de referencia. Para que esto sea cierto, los métodos deben:

- La recuperación con cada método debe ser aceptable, es decir entre 70 -120%.
- No se deben tener diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de los métodos.
- Tener principios diferentes o por lo menos no deben ser afectados por el mismo tipo de interferentes.

Para la aplicación de esta estrategia, el laboratorio puede contar con los dos métodos en el laboratorio o puede realizar un estudio colaborativo con otros laboratorios para establecer el valor de referencia, para lo cual se sugiera revisar un ejemplo que se encuentra disponible en la ISO 35 o el protocolo de la IUPAC [34] para estudios interlaboratorio.

Por otro lado, y con el propósito de asegurar una incertidumbre de medición adecuada mediante cualquiera de los métodos seleccionados, es necesario realizar una serie de mejoras de acuerdo con las sugerencias del numeral 2.5. La Figura 14 muestra una propuesta para el establecimiento del valor de referencia mediante esta aproximación.

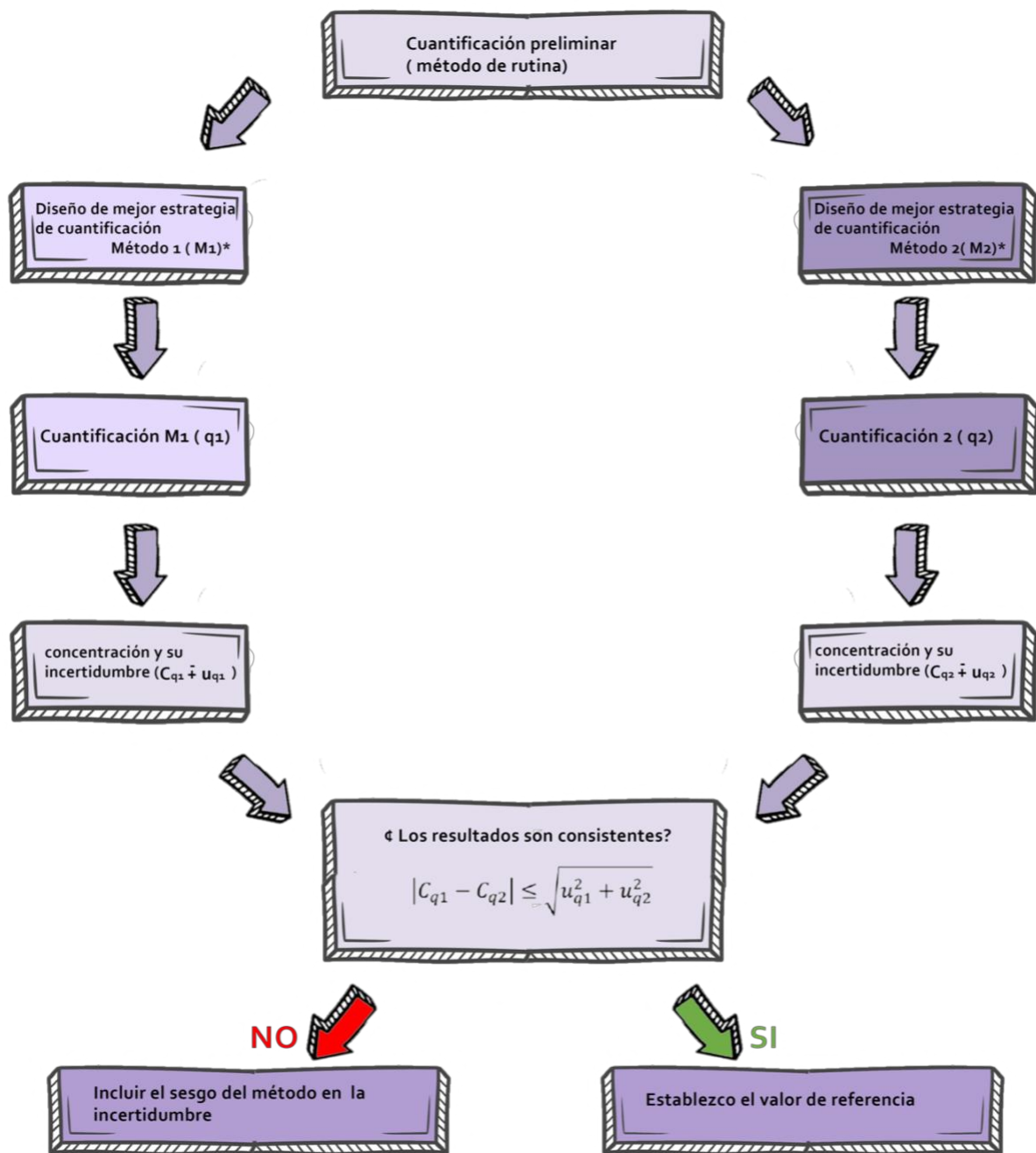


Figura 14. Esquema propuesto para el establecimiento del valor de referencia a través de dos métodos independientes.

En el caso de métodos independientes, el valor de referencia (v_{ref}) puede estimarse a través del promedio de los resultados obtenidos por cada uno de los métodos a través de la siguiente expresión:

$$v_{ref} = \frac{\sum_{i=1}^n C_{qi}}{n} \quad \text{Ec.12}$$

Donde n corresponde al número de métodos y C_{qi} corresponde a la concentración estimada por el i método.

Por otro lado, en el caso en que los resultados sean consistentes, es decir el sesgo entre ellos no sea significativo y asumiendo que los métodos cumplen los requisitos mencionados previamente, la incertidumbre estándar del valor de referencia (u_{vref}) puede ser estimada mediante la siguiente expresión: Por otro lado, en el caso en que los resultados sean consistentes, es decir el sesgo entre ellos no sea significativo y asumiendo que los métodos cumplen los requisitos mencionados previamente, la incertidumbre estándar del valor de referencia (u_{vref}) puede ser estimada mediante la siguiente expresión:

$$u_{vref} = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_{i=1}^n u_{qi}^2} \quad \text{Ec.13}$$

Donde u_{qi} corresponde a la incertidumbre estándar de medición obtenida por el método i .

Finalmente, en el caso en que los métodos no sean consistentes se debe establecer un componente de incertidumbre asociado al error sistemático (u_{bias}), para lo cual la Ecuación 13 se transforma en:

$$u_{vref} = \frac{1}{n} \sqrt{u_{sesgo}^2 + \sum_{i=1}^n u_{qi}^2} \quad \text{Ec.14}$$

Dicho componente puede ser estimado mediante la siguiente expresión:

$$u_{bias} = \frac{\max_{i=n} (|v_{ref} - C_{qi}|)}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec.15}$$



2.6 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MATERIAL

De manera general, la incertidumbre de un material de referencia se estima mediante la siguiente expresión:

$$u_{MR} = \sqrt{u_{\text{homo}}^2 + u_{\text{esta}}^2 + u_{\text{medición}}^2} \quad \text{Ec.16}$$

Dónde los términos $u_{\text{medición}}$ y u_{homo} hacen referencia a las incertidumbres asociadas a homogeneidad del lote, a la estabilidad y la medición de la propiedad, las cuales son estimadas de acuerdo con los numerales 2.3.8, 2.4.9 y 2.5, respectivamente.

Por otro lado, en el caso en que el material de referencia que requiere el laboratorio no contenga ningún valor indicativo, por ejemplo, un material para controlar o evaluar sólo la precisión del método, la ecuación 16 se reduce a:

$$u_{MR} = \sqrt{u_{\text{homo}}^2 + u_{\text{esta}}^2} \quad \text{Ec.17}$$

Finalmente, para estimar la incertidumbre expandida del MR *in-house*, se recomienda multiplicar la incertidumbre estándar combinada (ecuaciones 16 o 17), por un factor de cobertura (k) de 1.96, para lo cual se asume que los resultados siguen una distribución normal.

$$U_{MR} = k u_{MR} \quad \text{Ec.18}$$

2.7 REGISTROS Y DOCUMENTACIÓN

Respecto a los registros asociados a la preparación de los MR *in-house*, se sugiere considerar todos los requisitos relacionados a los registros técnicos y control de registros de la norma NTC 17025:2017 dado que estos desarrollos se enmarcan en la actividad de ensayo de los laboratorios. Especialmente se recuerda el numeral 7.5 "El laboratorio debe asegurar que los registros técnicos para cada actividad de laboratorio contengan los resultados, el informe y la información suficiente para facilitar, si es posible, la identificación de los factores que afectan el resultado de la medición y su incertidumbre de medición asociada y posibiliten la repetición de la actividad del laboratorio en condiciones más cercanas posibles a las originales. Los registros deben incluir la fecha, la identidad del personal responsable de cada actividad del laboratorio y de comprobar los datos y los resultados. Las observaciones, los datos y los cálculos originales se deben registrar en el momento en que se hacen y deben identificarse con la tarea específica"

En este sentido y en cumplimiento del requisito, el laboratorio debería mantener los registros de:

- Origen y preparación del material.
- Embotellado
- Muestreo
- Mediciones de homogeneidad
- Mediciones de estabilidad
- Mediciones de la propiedad

2.7.1 Documentación soporte para los MR *in-house*

La Guía ISO 31 da las recomendaciones sobre el contenido de los certificados y etiquetas para los materiales de referencia, los cuales pueden ser tenidos en cuenta para la documentación de los IQC o MR *in-house* preparados.

- *Hoja de información*

La información que debe estar disponible y en lo posible documentada en una hoja de información de los MR *in-house* debe incluir al menos:

- Nombre y descripción del material
- Identificación del material y/o número de lote
- Fecha de preparación
- Uso previsto del MR *in-house*
- Indicaciones de manipulación, almacenamiento y uso del MR *in-house*
- Valores indicativos, si aplica
- Mínima cantidad de uso
- Información sobre la vida útil esperada
- Precauciones de seguridad que deban aplicar los usuarios.

- *Etiquetas*

Cada unidad del MR *in-house* preparado debe estar claramente etiquetada. La etiqueta debe contener en lo posible la siguiente información:

- Nombre y descripción del material;
- Identificación del material y/o número de lote
- Indicaciones de peligro y seguridad, cuando aplique
- Condiciones ambientales del área de almacenamiento, incluidas la temperatura y la humedad;
- Fecha de preparación;
- Fecha de caducidad prevista.
- Cantidad contenida en la unidad;
- Número de unidad individual



ASPECTOS PRÁCTICOS



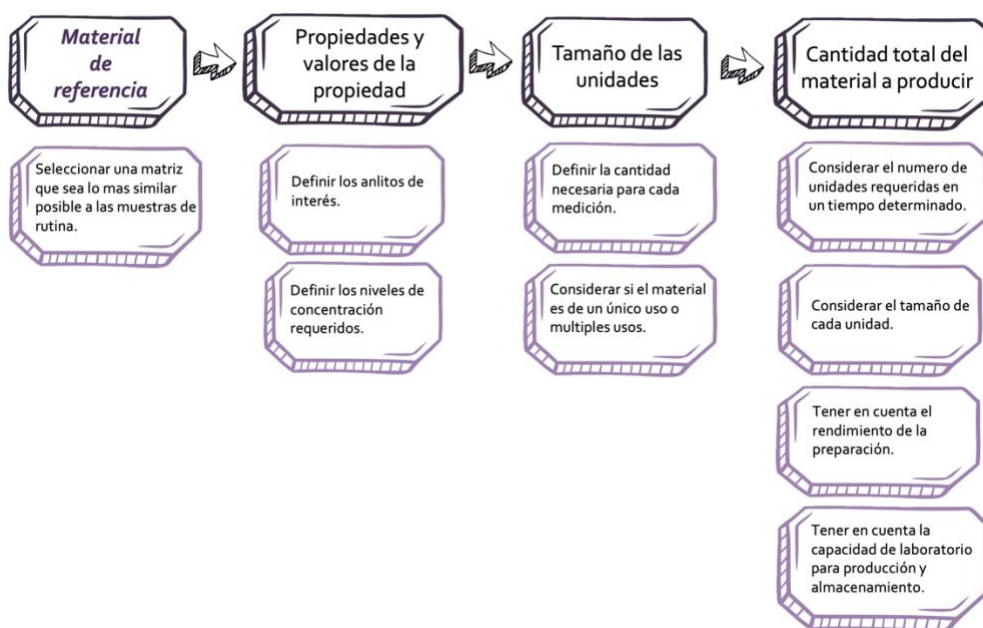
La Guía ISO 31 da las recomendaciones sobre el contenido de los certificados y etiquetas. El propósito de este capítulo es aplicar los conceptos presentados en los capítulos I y II y, proporcionar aspectos prácticos a considerar durante la producción de materiales de referencia *in-house*, para la determinación de residuos de plaguicidas en matrices de alimentos. Para ello, en el INM se llevó a cabo la producción de tres materiales de referencia *in-house* utilizando tres diferentes matrices, los cuales serán descritos detalladamente en esta sección.

Como se mencionó en la Figura 4, la producción de materiales de referencia involucra diferentes etapas que, dependiendo del tipo de material de referencia a producir, deben ser llevadas a cabo, para ello, en una primera parte se describirá el proceso de planeación o especificación del material, posteriormente los aspectos de preparación y finalmente, lo concerniente a la evaluación de la homogeneidad y estabilidad de los materiales.

3.1 PLANEACIÓN

La planeación de la producción es una etapa que aplica estrictamente para productores de materiales de referencia certificados y no necesariamente para producciones de materiales de referencia *in-house*, sin embargo, resulta ser una herramienta importante para establecer los objetivos y requerimientos de la producción. De hecho, la guía ISO 80, considera como etapa previa a la producción, la especificación del material, esto, con el fin de obtener un material que sea representativo de las muestras reales de rutina y que esté disponible en cantidad suficiente para el uso previsto. La Figura 15, presenta las consideraciones generales realizadas durante la etapa de planeación.

Figura 15.
Consideraciones
realizadas para la
producción de MR *in-house*



Una vez considerados los aspectos presentados en la Figura 15 y los grupos de matrices presentados en el capítulo 2 (ver numeral 2.1.1), se seleccionaron banano, arroz y café,



como matrices representativas y que se adecuan al propósito de la presente guía. Por otro lado, la Tabla 8 presenta los analitos que fueron seleccionados, para lo cual se consideró: (i) la experiencia del INM en su determinación, (ii) la compatibilidad con las técnicas cromatográficas disponibles y en algunos casos (iii) su uso en Colombia.

Tabla 8.
Especificación de MR *in-house* de matrices fortificadas con plaguicidas

Matriz Clasificación Santé 11312:2021	Analito	Masa molecular (g/mol)	No. CAS	pK _{ow}	Familia	Técnica sugerida	
						LC-MS	GC-MS
Banano/Grupo 1 Arroz/Grupo 5 Café verde/Grupo 6	Abamectina (B1a)	873.1	265-610-3	4.4	Abamectinas	Sí	No
	Acetamiprid	222.7	135410-20-7	0.8	Neonicotinoides	Sí	Difícil
	Alacloro	269.8	15972-60-8	3.1	Cloroacetamidas	Sí	Sí
	Azoxistrobina	403.4	131860-33-8	2.5	Estrobilurinas	Sí	Sí
	Benalaxilo	325.4	98243-83-5	3.7	Acilalaninas	Sí	Sí
	Clorpirifos	350.6	220-864-4	4.7	Organofosforados	Sí	Sí
	Difenoconazol	406.3	119446-68-3	4.4	Triazol	Sí	Difícil
	Dimetoato	229.3	60-51-5	0.7	Organofosforados	Sí	Sí
	Dimetomorf	387.9	110488-70-5	2.7	Morfolina	Sí	Difícil
	Flutriafol	301.3	76674-21-0	2.3	Triazol	Sí	Sí
	Malation	330.4	204-497-7	2.8	Organofosforados	Sí	Sí
	Metamidofos	141.1	10265-92-6	-0.8	Organofosforados	Sí	Difícil
	Monocrotofos	223.2	6923-22-4	-0.2	Organofosforados	Sí	Difícil
	Propamocarb	188.3	24579-73-5	-1.2	Carbamatos	Sí	Difícil
	Spirodiclofen	411.3	148477-71-8	5.8	Ácido tetrónico	Sí	Sí
	Spiromesifen	370.5	283594-90-1	4.6	Ácido tetrónico	Sí	Sí
	Spynosin-A	732.0	131929-60-7	2.8	Spinosad	Sí	No
	Spynosin-D	746.0	131929-63-0	3.2	Spinosad	Sí	No
	Tebuconazol	307.8	107534-96-3	3.7	Triazol	Sí	Sí
	Tiactoprid	252.7	111988-49-9	1.3	Neonicotinoides	Sí	Difícil
	Tiamethoxam	291.7	153719-23-4	-0.1	Neonicotinoides	Sí	Difícil
	Trifloxistrobina	408.4	141517-21-7	4.5	Estrobilurinas	Sí	Sí

Considerando que se parte de matrices adquiridas comercialmente y que es poco probable encontrar residuos de los plaguicidas de interés, se hace necesario realizar un proceso de fortificación, para lo cual se consideraron las recomendaciones realizadas por la guía SANTE.

Finalmente, la Figura 16, presenta un resumen de todas las consideraciones realizadas para la planeación de la producción de estos materiales de referencia.



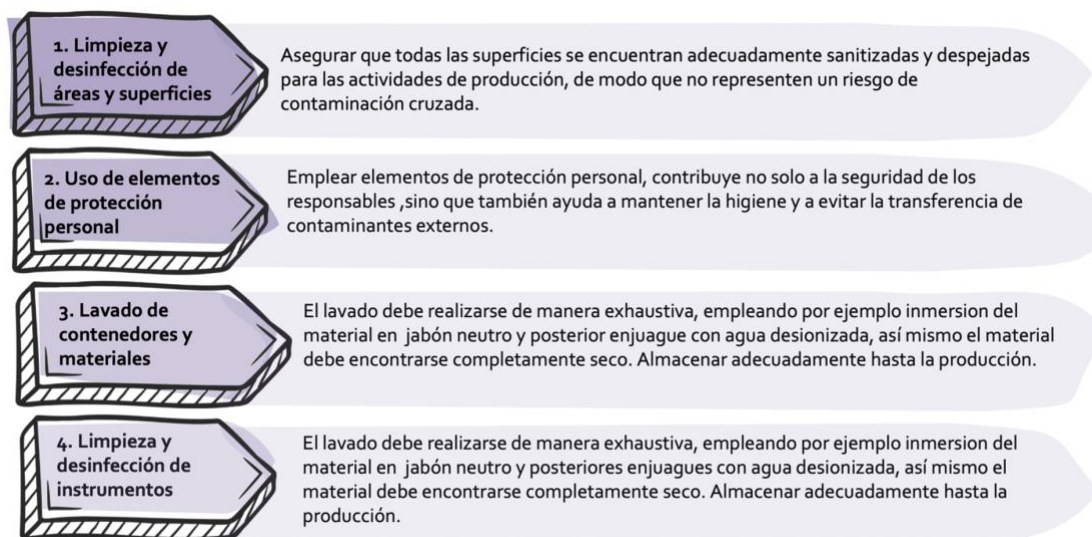
Figura 16. Resumen de consideraciones realizadas para la producción de MR *in-house*

3.2 PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES

3.2.1 Recomendaciones previas a la preparación de los materiales de referencia

Es importante considerar que la etapa de preparación es un proceso que debe ser llevado a cabo de manera meticulosa, con el fin de evitar cualquier contaminación que pueda afectar la homogeneidad del material. En este sentido, se brindan algunas recomendaciones generales.

Figura 17.
Recomendaciones
previas a la
preparación de los
materiales.



Por otro lado, el proceso de preparación de materiales considera los siguientes pasos.

- Obtención del material de partida (ver numeral 3.2.2).
- Preparación de las soluciones de fortificación (numeral 3.2.3)
- Fortificación (ver numeral 3.2.4).
- Fortificación del material (ver numeral 3.2.5)
- Estabilización, mediante secado del material (ver numeral 3.2.5).
- Homogenización (ver numeral 3.2.5).
- Envasado del material (ver numeral 3.2.6)

A continuación, se brindarán recomendaciones para la preparación de los materiales de referencia *in-house* en las matrices seleccionadas.

3.2.2 Obtención del material de partida

Para el caso de los materiales propuestos, las matrices fueron obtenidas en mercados locales. Se recomienda realizar una evaluación preliminar con el fin de establecer si las matrices contienen los analitos de interés, si están por debajo del límite de detección, y si deben ser o no



fortificadas con los analitos de interés. Si las matrices contienen los analitos de interés, pueden utilizarse sin necesidad de realizar la fortificación³. En este último caso, es importante asegurarse de que los niveles de concentración presentes en las matrices sean adecuados para el propósito establecido en la etapa de especificación del material.

Por otro lado, respecto al estado de las matrices frescas como en el banano o frutas en general, se recomienda emplear frutas en estados de madurez intermedio, en los cuales sea posible realizar el procesamiento, matrices muy maduras pueden generar menores rendimientos y pardeamiento.

3.2.3 Preparación de matrices

Como se ha mencionado anteriormente la homogeneidad y la estabilidad son las principales características de cualquier material de referencia, por lo que en algunos casos puede ser necesario realizar algunas actividades adicionales durante la producción; lo anterior, con el propósito de incrementar la homogeneidad o estabilidad del material. En matrices sólidas, con el propósito de lograr un material homogéneo usualmente se aplican procesos de trituración, molienda y tamizado, lo anterior considerando que la homogeneidad física tiene una relación directa con la química. Así mismo, el uso de conservantes, antioxidantes, radiación, uso de atmosfera inerte, o deshidratación, por ejemplo, pueden ser estrategias para emplear para asegurar que los materiales conservarán mejor sus propiedades en el tiempo, sin embargo, se debe asegurar que su adición no supone ser una interferencia en la determinación de las propiedades de interés. En este contexto, la Figura 18 presenta los diferentes procesos que se emplearon.

Como se puede observar en la Figura 18, para el caso específico del banano, se encuentra que fue necesario realizar la adición de estabilizantes, los cuales se emplean para evitar la oxidación de la matriz e inhibir el crecimiento de microorganismos. En este caso en particular y de acuerdo con ensayos previos, se adicionó una solución de ácido ascórbico al 1% y metabisulfito de sodio al 0.1%. Es importante tener en cuenta que, al adicionar sustancias estabilizantes, se debe asegurar que no interfieren con las mediciones analíticas.

Por su parte para la matriz de café, se encuentra que durante el procesamiento se empleó hielo seco, lo anterior se realizó con dos propósitos: (i) evitar el calentamiento y degradación de la matriz durante el proceso y (ii) contribuir a obtener un material de partículas más pequeñas y por consiguiente más homogéneo. Cabe destacar que el laboratorio puede seleccionar el método de preparación más adecuado acorde con su capacidad, recursos y necesidades específicas. La Figura 19 presenta el proceso aplicado para banano y café verde.

³ Considere que la cuantificación preliminar, usualmente se realiza sobre el material húmedo, y con el propósito de estabilizar los materiales se suele eliminar la humedad de este, por lo cual la concentración en el material final puede incrementar.

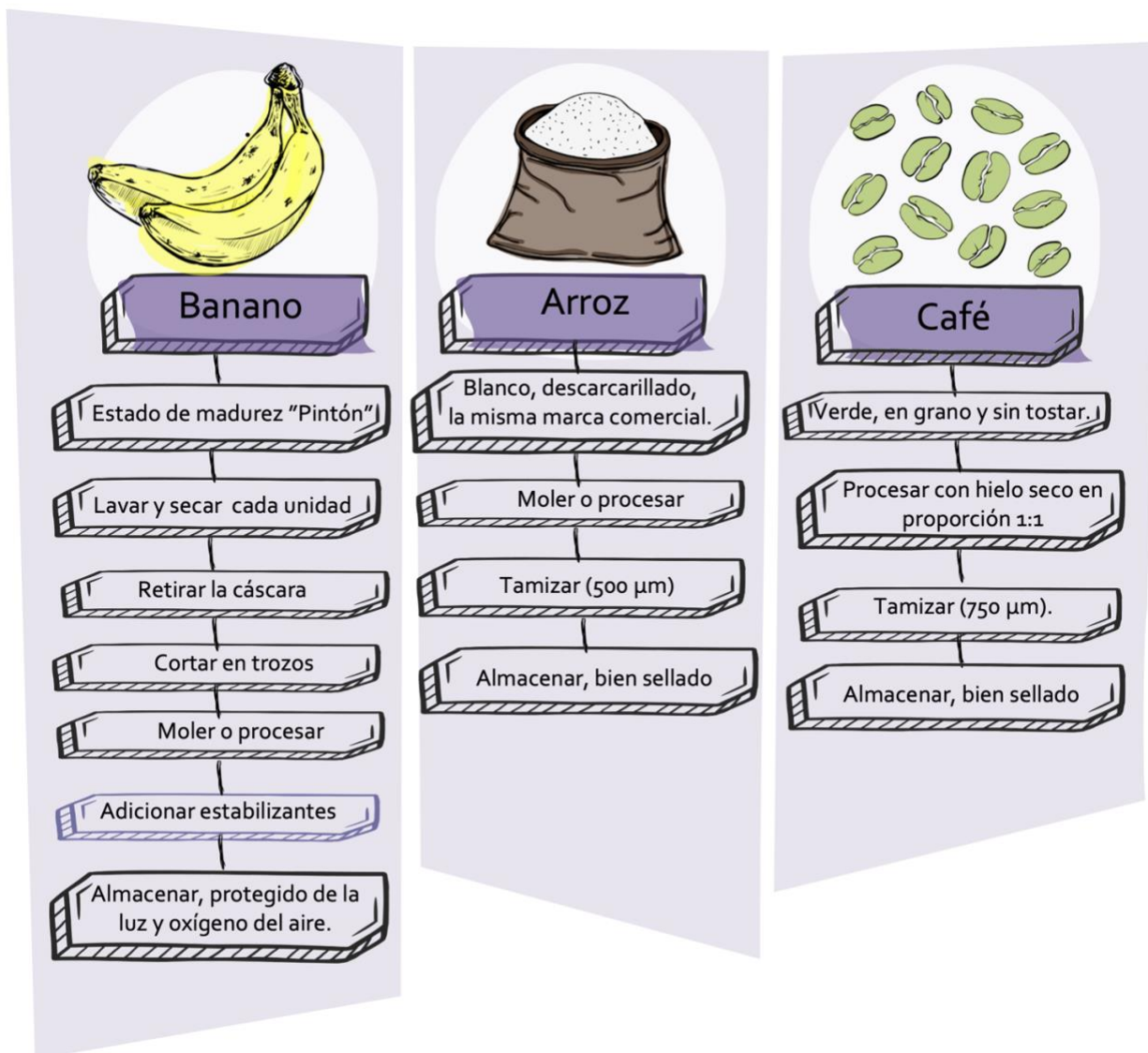


Figura 18. Esquema general de preparación de los diferentes candidatos a material de referencia *in-house*.

Figura 19.
Obtención de la matriz
de banano y café

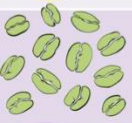


3.2.4 Preparación de la solución de fortificación

En el caso de que la matriz seleccionada no contenga los analitos de interés, es necesario fortificar con estos. Para ello, se sugiere realizar la preparación de una solución de fortificación. En la experiencia del INM, la preparación gravimétrica es la mejor alternativa; en la cual se utilizaron soluciones madre entre 500 mg/kg y 1000 mg/kg, como soluciones de partida. Se recomienda emplear solventes acordes y compatibles con la matriz, en especial que eviten que esta se desnaturalice. Por ejemplo, si se emplea un solvente de baja polaridad en una matriz con un alto contenido de grasa, es posible que se genere la extracción de la grasa, y por consiguiente una separación de fases.

La concentración de la mezcla de fortificación debe ser definida de acuerdo con la cantidad de matriz, la concentración final deseada, entre otros. La Tabla 9. presenta las relaciones empleadas durante la producción.

Tabla 9.
Relación matriz/solución
de fortificación sugerida

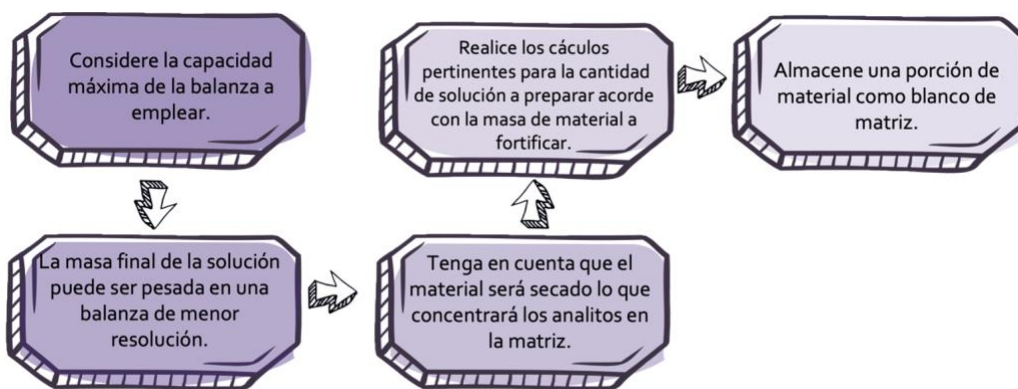
Matriz	Relación	Composición
	1: 0.75	Por cada kg de harina de arroz, 0.75 kg de solución de fortificación.
	1:0.4:0.1	Por cada kg de pulpa de banano, 0.4 kg de solución conservante, y 0.1 kg de solución de fortificación.
	1:0.4:0.1	Por cada kg de café verde molido, 0.4 kg de solución conservante y 0.1 kg de solución de fortificación.

Para la preparación de la solución empleada en la fortificación se siguieron las siguientes instrucciones:

- i. Pesar un recipiente con tapa limpio y seco, y registre su masa.
- ii. Adicionar la masa requerida de cada analito y registrar. Tarar después de cada adición.
- iii. Una vez termine de adicionar todos los analitos de la mezcla, retirar el sistema de la balanza. Colocar en cero la balanza.
- iv. Pesar nuevamente, y adicionar acetona de acuerdo con la masa total requerida.
- v. Registrar la masa final, tapar y agitar muy bien la mezcla. Almacenar refrigerado hasta su uso. Si va a almacenar por un periodo prolongado, se sugiere almacenar a -20°C .

La Figura 20 brinda algunas recomendaciones adicionales para la preparación de la solución de fortificación.

Figura 20.
Recomendaciones
generales para la
preparación gravimétrica
de la solución de
fortificación



Por otro lado, la solución estabilizante se preparó al 1% y 0.1% (m/v) de ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, respectivamente. Para ello, se emplearon reactivos grado alimenticio y una solución acuosa de etanol (20%) como solvente, la solución puede ser almacenada en refrigeración hasta su uso.

3.2.5 Fortificación, estabilización y homogenización

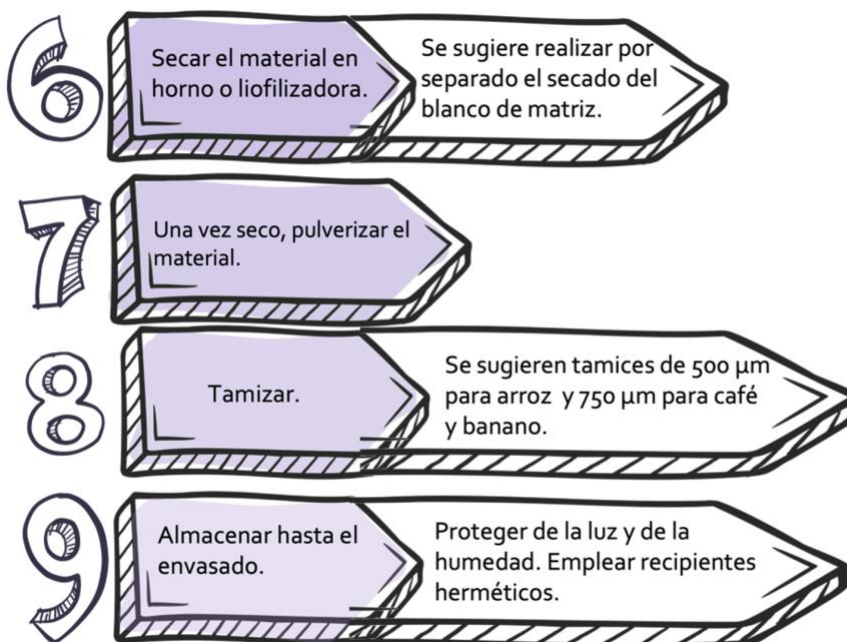
Una vez se cuenta con las soluciones de fortificación, estabilizantes y con la matriz preparada, se realiza el proceso de fortificación y homogenizado. Es importante considerar que, acorde con la capacidad del material e instrumentación empleados puede ser requerido realizar el proceso por partes, en este caso, es indispensable que una vez se fortifique, se realice un proceso de homogenizado manual o mecánico a todo el material, de modo que se asegure una mejor distribución de los analitos. La Figura 21 presenta las instrucciones generales de este proceso.

Figura 21.
Fortificación y
homogenizado de los
materiales



Posterior a la fortificación, se procede a realizar el secado de cada uno de los materiales fortificados, según los pasos siguientes:

Figura 22. Proceso de
secado de cada MR
producido.



La Tabla 10, presenta los parámetros de secado empleados para cada matriz.

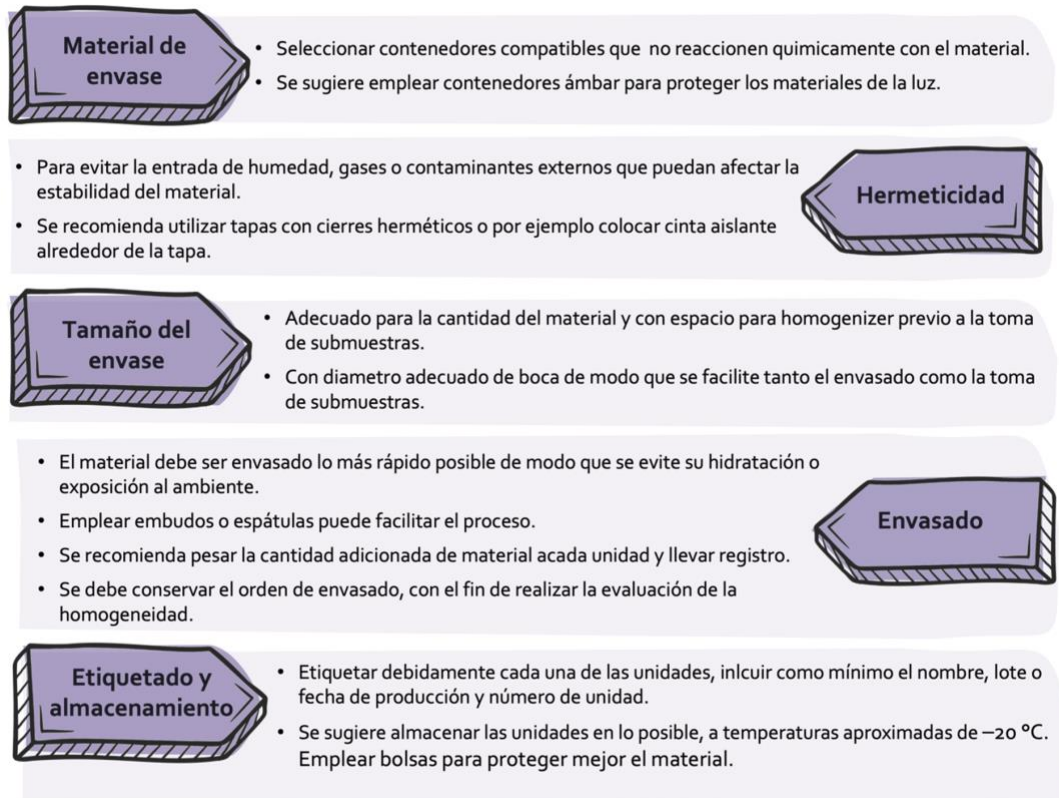
Tabla 10.
Parámetros de secado
empleados en cada
matriz

Matriz	Equipo	Condiciones	Tiempo
	Horno de convección	40 °C	Mínimo 24 h
	Liofilizadora	< -80 °C < 0.03 mbar	Hasta secado total
	Liofilizadora	< -80 °C < 0.03 mbar	Hasta secado total

3.2.6 Envasado de los materiales

Una vez que el material ha sido secado, pulverizado y tamizado, se realiza su envasado. La selección de los contenedores o envases en los cuales se almacenará el material es crucial, ya que estos desempeñarán un papel importante en la protección del material contra factores externos y contribuirán a su estabilidad. La Figura 23, presenta algunas recomendaciones a tener en cuenta durante este proceso.

Figura 23.
Recomendaciones
generales para el
envasado de los
materiales



3.2.7 Consideraciones adicionales



Adicional a las recomendaciones brindadas en los numerales 3.2.1 a 3.2.6, se recomienda :

- El personal debe realizar practicar buenas practicas de laboratorio durante todo el proceso, en especial durante el manejo de sustancias quimicas e instrumentos de laboratorio.
- Durante el secado de los materiales, no abrir la estufa/horno, ni introducir ningún otro tipo de material.
- Realizar el secado de los blancos y de las diferentes matrices por separado, de modo que se evite contaminación cruzada.
- Realizar seguimiento de las condiciones ambientales durante todo el proceso.
- Contar con un adecuado sistema de gestión de calidad que asegure que los instrumentos empleados cuenten con las verificaciones o calibraciones vigentes, según sea requerido.

3.3 ESTUDIO DE HOMOGENEIDAD

Evaluar la homogeneidad de un material de referencia, permite garantizar que el valor de la propiedad se encuentra distribuido de manera uniforme a lo largo de todo el lote producido y dentro de las porciones del material. Acorde con las recomendaciones de la guía ISO35, esta evaluación incluye las siguientes etapas:

- Muestreo (numeral 3.3.1).
- Determinación analítica (numeral 3.3.2).
- Inspección de datos (numeral 3.3.3).
- Evaluación de tendencias (numeral 3.3.3).
- Estimación de la incertidumbre (numeral 3.3.4).
- Verificación del grado de homogeneidad (numeral 3.3.5)

A continuación, se describen cada una de estas etapas.

3.3.1 Muestreo

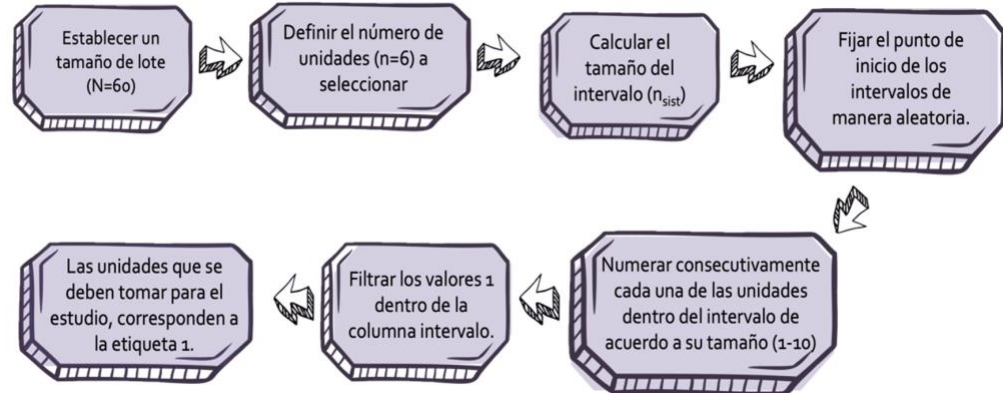
Para una evaluación exitosa de la homogeneidad es necesario evaluar esta característica en un número de unidades que represente el lote producido. Para definir el número de unidades se aplicó la estrategia presentada en la Tabla 11.

Tabla 11.
Ejemplos de estimación
de número de botellas
para cada uno de los
lotes producidos.

Tamaño del lote	Número mínimo de unidades ($N_{\min}$)	Ejemplo
> 100 unidades	$\sqrt[3]{N_{\text{prod}}}$	Para un lote de 3000 unidades $N_{\text{prod}} = 3000$ $N_{\min} = \sqrt[3]{3000} = 14.4$ Conclusión: Se deben tomar mínimo 15 unidades para el estudio de homogeneidad
< 100 unidades (lotes pequeños)	$\approx N_{\text{prod}} \times 10\%$	Para un lote de 60 unidades $N_{\text{prod}} = 60$ $N_{\min} = 60 \times 10\%$ $N_{\min} = 6$ Conclusión: Se deben tomar mínimo 6 unidades para el estudio de homogeneidad

Una vez definido el número de unidades, y considerando que la durante la evaluación de la homogeneidad se busca evaluar que el valor de la propiedad se mantenga a lo largo del lote producido, así como dentro de las porciones de cada unidad, se recomienda emplear una estrategia de muestreo, de modo que se asegure que las unidades seleccionadas representan el lote producido, dentro de estas estrategias se puede implementar un muestreo aleatorio sistemático o un muestreo aleatorio estratificado. A continuación, se enlistan los pasos generales para realizar estos muestreos, tomando como ejemplo un lote de 60 unidades.

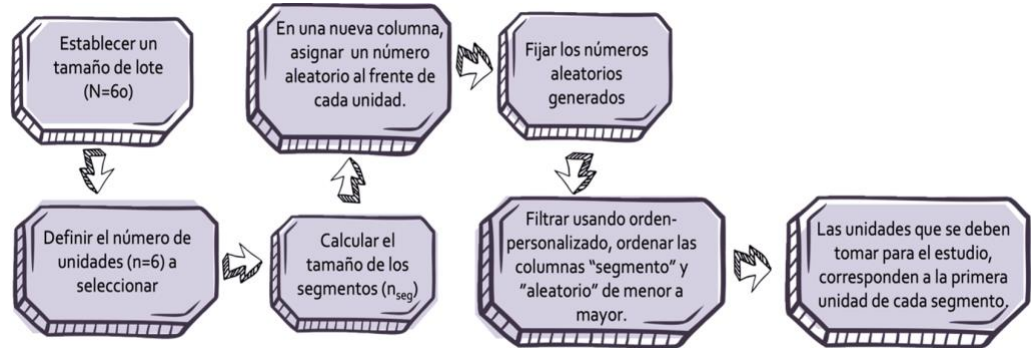
Figura 24.
Muestreo aleatorio
sistemático.



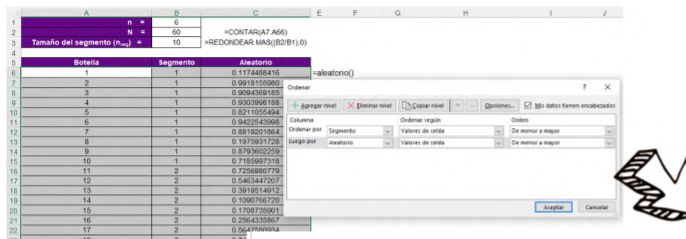
A continuación, se muestra un ejemplo en el cual se empleó un programa de procesamiento de datos tradicional como open office o Microsoft Excel:

	A	B	C	D
1	n =	6		
2	N =	60	=CONTAR(A7:A66)	
3	Tamaño del intervalo (n_sist) =	10	=REDONDEAR.MAS((B2/B1),0)	
4	Punto de inicio (n_i) =	7	=ALEATORIO.ENTRE(1,60)	
5				
6	Botella	Intervalo	Propósito	
7	1	5		
8	2	6		
13	n_i=7	1	Homogeneidad	
14	8	2		
15	9	3		
16	10	4		
17	11	5		
18	12	6		
19	13	7		
20	14	8		
21	15	9		
22	16	10		
23	17	11		
24	18	12		
25	19	13		
26	20	14		
27	21	15		
28	22	16		
29	23	17		
30	24	18		
31	25	19		
32	26	20		
33	27	21		
34	28	22		
35	29	23		
36	30	24		
37	31	25		
38	32	26		
39	33	27		
40	34	28		
41	35	29		
42	36	30		
43	37	31		
44	38	32		
45	39	33		
46	40	34		
47	41	35		
48	42	36		
49	43	37		
50	44	38		
51	45	39		
52	46	40		
53	47	41		
54	48	42		
55	49	43		
56	50	44		
57	51	45		
58	52	46		
59	53	47		
60	54	48		
61	55	49		
62	56	50		
63	n_i+8-n_sist=57	1	Homogeneidad	
64	57	2		
65	58	3		
66	59	4		

Figura 25.
Muestreo aleatorio
estratificado.



A continuación, se presenta un ejemplo de cómo puede ser realizado el muestreo empleando programas ofimáticos convencionales.



Botella	Segmento	Aleatorio	Propósito
1	1	0.1174488416	Homogeneidad
8	1	0.1975931728	
6	1	0.9422543998	
2	1	0.9918155980	
15	2	0.1090766720	Homogeneidad
14	2	0.1708735901	
20	2	0.8358886050	
23	3	0.0531697940	Homogeneidad
34	4	0.1736060307	Homogeneidad
45	5	0.0325954277	Homogeneidad
55	6	0.0152091440	Homogeneidad

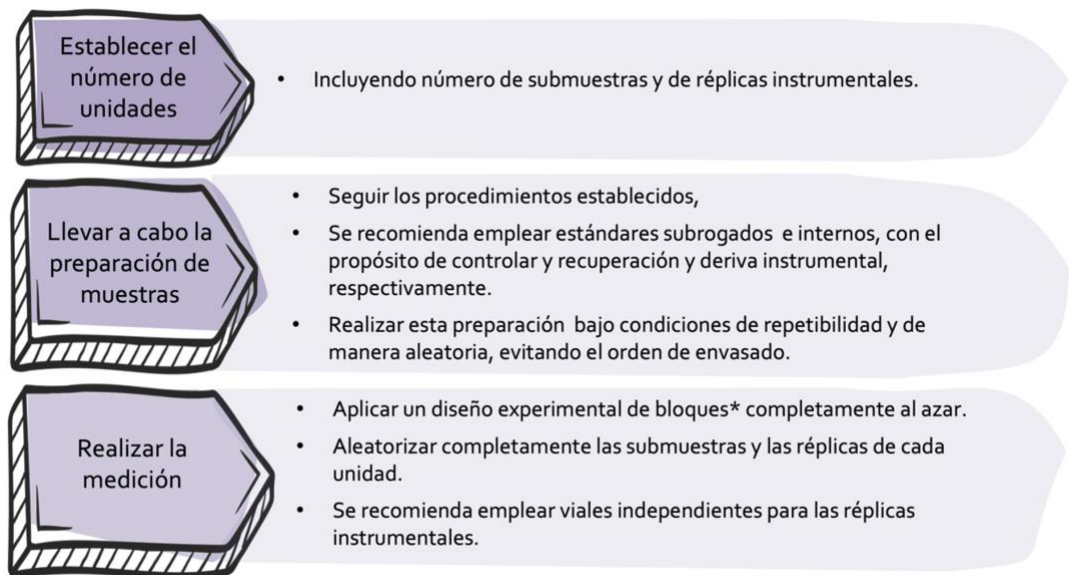
3.3.2 Secuencia de medición

El establecimiento de una adecuada secuencia de medición es un punto crítico, pues mediante esta se asegura:

- La aleatorización de los experimentos.
- Una adecuada evaluación de la deriva.
- Un adecuado control de calidad del instrumento

La Figura 26 presenta la estrategia recomendada para establecer la secuencia de medición.

Figura 26. Estrategia para la secuencia de medición



*Otro diseño puede ser seleccionado ver numeral 2.3.5

A continuación, se muestra un ejemplo para la realización de diseño de bloques para 2 submuestras y 2 réplicas instrumentales de cada una.

	A	B	C
1	#	Aleatorio	Nombre muestra
2	1	=ALEATORIO()	B1-E1_01
3	2	=ALEATORIO()	B1-E1_02
4	3	=ALEATORIO()	B1-E2_01
5	4	=ALEATORIO()	B1-E2_02
6	5	=ALEATORIO()	B1-E3_01
7	6	=ALEATORIO()	B1-E3_02

	A	B	C	D
1	#	Aleatorio	Nombre muestra	Orden aleatorio
2	1	0.62073451	B1-E1_01	B1-E2_02
3	2	0.73942668	B1-E1_02	B1-E3_01
4	3	0.57621143	B1-E2_01	B1-E2_01
5	4	0.06126838	B1-E2_02	B1-E1_01
6	5	0.39550689	B1-E3_01	B1-E1_02
7	6	0.75214752	B1-E3_02	B1-E3_02

Como se puede observar en la anterior Figura, posterior a la conformación de los grupos o bloques de medición se debe aleatorizar cada bloque (última columna).

Es importante Incluir en la secuencia de medición blancos de reactivos y de procedimiento para verificar que no exista algún tipo de contaminación cruzada. Así mismo, estos permiten facilitar el equilibrio del sistema instrumental.

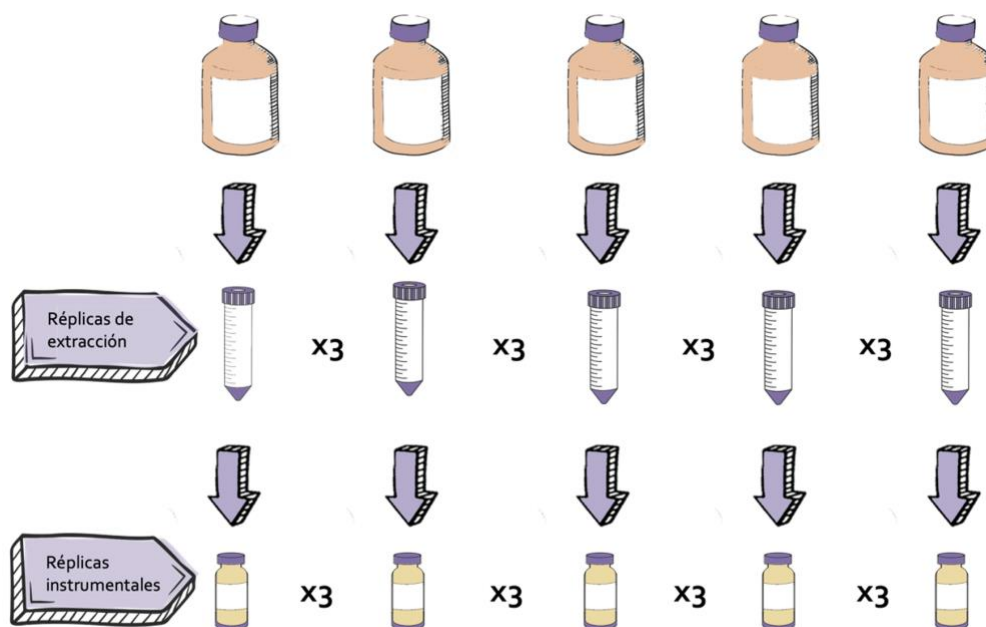
Finalmente, se recomienda entre los bloques de medición, incluir siempre una muestra de control de calidad, la cual corresponde a un nivel de calibración, idealmente en blanco de matriz. Esta muestra de control de calidad debe incluir los analitos de interés y estándares internos empleados en las muestras bajo estudio a una concentración cercana a la estimada en las muestras, tal como se muestra a continuación.

Inyección No.	Nombre muestra
1	Blank_rvos.01
2	Blank_rvos.02
3	NQC.01
4	NQC.02
5	B15-E12_01
6	B23-E2_02
7	B34-E3_03
8	B45-E3_01
9	B1-E3_01
10	B55-E3_02
11	NQC.03

3.3.3 Inspección de datos y evaluación de tendencias

La Figura 27 resume el esquema general que se puede realizar en el estudio de homogeneidad realizado para los diferentes lotes producidos. Para este caso se seleccionó un diseño en bloques, considerando que la deriva del equipo es relativamente alta para el propósito.

Figura 27.
Esquema general de la
ejecución del estudio de
homogeneidad



Los resultados obtenidos de este diseño son presentados en la Tabla 12.

Tabla 12.
Datos de estudio de
homogeneidad ejemplo

No. Unidad	1	15	23	34	45	55
Replica 1	4.477	4.227	4.634	4.354	4.077	4.054
Replica 2	4.165	4.666	4.714	4.218	4.494	4.176
Replica 3	4.640	4.197	4.456	4.020	4.524	4.370
Replica 4	4.470	4.931	4.121	4.656	3.736	4.529
Replica 5	4.414	4.262	4.532	4.631	4.533	3.702
Replica 6	3.847	4.705	3.717	4.247	4.272	4.413
Replica 7	4.583	4.511	4.262	4.584	4.602	4.300
Replica 8	4.169	4.672	4.502	4.533	4.081	4.425
Replica 9	4.287	3.839	4.394	4.591	4.392	4.369

Como se mencionó en el numeral 2.3.7, previo a la evaluación de la homogeneidad del material, se debe realizar una inspección para detectar posibles problemas durante el proceso de medición y de producción. A continuación, se sugieren algunas acciones a considerar durante la inspección.

- Realizar la integración de los cromatogramas y aplicar las correcciones pertinentes debidas a factores de dilución o uso de estándares internos, según aplique.
- Obtener las respuestas para cada unidad o los valores de concentración, en caso de haber realizado la cuantificación.

- Aplicar una prueba estadística como Grubbs o Dixon a 95 % y 99 % de nivel de confianza, para detectar posibles anómalos.
- Realizar un análisis exploratorio y posteriormente de regresión con el propósito de evaluar objetivamente los resultados.

Es importante resaltar que estas pruebas se aplican con el fin de identificar datos sospechosos, sin embargo, en caso de obtener como resultado la presencia de datos anómalos y acorde con las recomendaciones de la guía ISO35, se sugiere **NO** descartar datos a menos de que exista un criterio técnico. Para lo cual se sugiere:

- Verificar que las integraciones son adecuadas,
- Verificar los controles de calidad y blancos,
- Llevar a cabo una nueva medición de una unidad o submuestra sospechosa en un breve período de tiempo;
- Repetir una secuencia de medición completa o un experimento completo afectado por varios valores atípicos.

El Anexo 5, muestra un ejemplo de cómo aplicar pruebas estadísticas para la detección de datos anómalos mediante el aplicativo [ValidarR](#)⁴.

a. Tendencias de medición

A continuación, se describe el paso a paso para realizar este análisis de tendencias de medición:

- Ordenar los datos obtenidos para los controles de calidad y muestras, en el **orden de medición**,
- Realizar una inspección visual, graficando las respuestas contra el orden de medición.
- Finalmente, aplicar un análisis de regresión lineal para evaluar una tendencia estadísticamente significativa. A continuación, se ilustra cómo realizar esta evaluación empleando un programa tradicional:

	B	C	D
	Nombre muestra	Orden de inyección	Respuesta instrumental
5			
6	NQC.01	1	1954.1
7	NQC.02	2	1938.2
8	NQC.03	3	1960.4
9	NQC.04	4	1943.9
10	NQC.05	5	1954.4
11	NQC.06	6	1927.5

=ESTIMACION.LINEAL(D6:D11;C6:C11;1;1)

F	G	H	I
Pendiente	-2.883	1956.507	Intercepto
u(pendiente)	2.939	11.445	u(intercepto)
r ²	0.194	12.294	s(y)
F	0.962	4.000	Grados de libertad
SS regresión	145.440	604.548	SS residual

⁴ ValidaR, es un aplicativo desarrollado por el Instituto Nacional de Metrología, el cual se encuentra disponible en <https://validar.inm.gov.co/validaR/>

Posteriormente, con el propósito de contar con evidencia objetiva de la evaluación de la homogeneidad, se procede a realizar una prueba *t* a un nivel de confianza del 95%, tal como se muestra a continuación:

	F	G	H
18	Pendiente	-2.8829	
19	Uncert. De pendiente	2.939	
20	t-value	0.5038	=ABS(G78/G79)
21	Grados de libertad	4	
22	t-value crítico	2.03	=DISTR.T.INV(0.05,G21)
23	p-value	0.634	=1-DISTR.F.N(G15,G21,1,VERDADERO)

Para este caso, ya que *t*-value < *t*-value crítico, lo cual evidencia que la pendiente no es significativa, por lo tanto, se concluye que no hay de tendencia de medición. Esta misma evaluación puede ser realizada en el aplicativo [ValidaR](#) en el módulo de regresiones, pero con la ventaja que se puede emplear otro tipo de modelos de regresión. Obtener una tendencia significativa en la medición puede llevar a una conclusión errónea acerca de la homogeneidad del material (ver Figura 11), en caso de obtener se pueden implementar las siguientes estrategias:

- Aplicar una corrección a los datos basada en una función de transformación adecuada antes de realizar un análisis de varianza posterior;
- Emplear análisis de covarianza.
- Emplear los controles medidos durante la secuencia para realizar la corrección.
- Rechazar las secuencias de medición afectadas y repetir las mediciones después de eliminar o controlar la fuente de la deriva.

b. Tendencias de envasado

Por otro lado, para realizar la tendencia de envasado se sugiere:

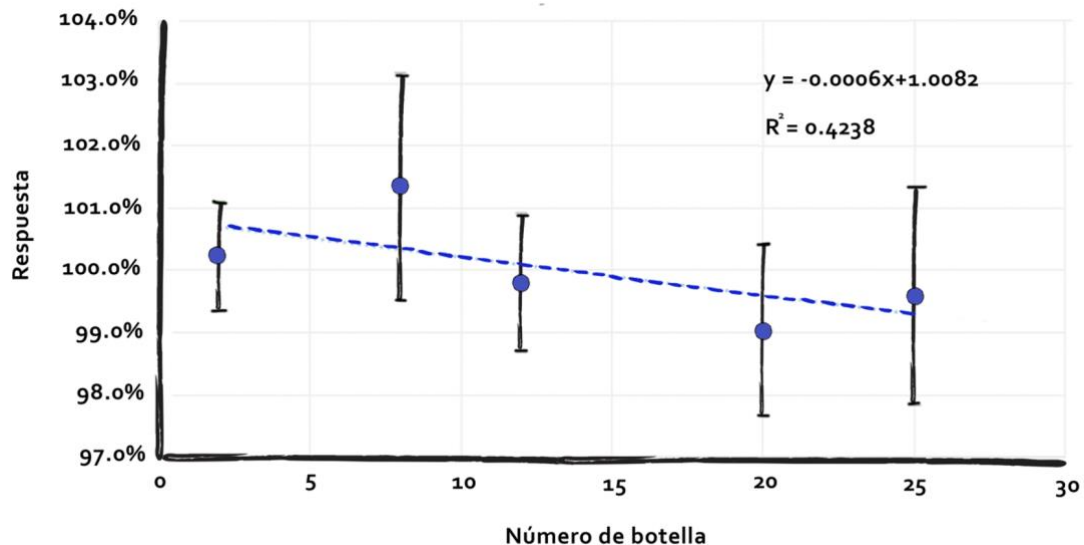
- Ordenar los datos de la propiedad de interés (respuesta instrumental o concentración) para las muestras bajo estudio en estricto **orden de envasado**. Transformar los promedios de cada unidad ($\bar{x}_{\text{unidad}}$) relativos al promedio de las observaciones para todas las unidades ($\bar{\bar{x}}_{\text{unidad}}$).

$$\text{Respuesta relativa} = \frac{\bar{x}_{\text{unidad}}}{\bar{\bar{x}}} \times 100 \%$$

Ec.19

- Graficar la respuesta relativa contra el orden de envasado para evaluar visualmente la existencia de una tendencia. La figura 28 presenta un ejemplo de la evaluación gráfica de tendencias de envasado.

Figura 28.
Estudio de tendencias de
envasado



- iii. Llevar a cabo un análisis de regresión lineal para probar una tendencia estadísticamente significativa, lo cual se puede realizarse por ejemplo empleando la función matricial de estimación lineal de los softwares convencionales, tal como se muestra a continuación:

B		C
Unidad		Respuesta instrumental relativa promedio
25		
26	2	100.22%
27	8	101.34%
28	12	99.81%
29	20	99.04%
30	25	99.58%

=ESTIMACION.LINEAL(D6:D11;C6:C11;1;1)	

D	E	F	G
26	Pendiente	-0.0006	1.0082
27	u(pendiente)	0.0004	0.0065
28	r ²	0.424	0.0076
29	F	2.2099	3.0000
30	SS regresión	0.0001	0.0002

Intercepto	
u(intercepto)	
s(y)	
Grados de libertad	
SS residual	

- iv. Para interpretar los resultados se debe llevar a cabo una prueba de significancia de la pendiente por medio de una prueba t a un nivel de confianza del 95%, tal como se muestra a continuación:

D	E	F
32	Pendiente	-0.0006
33	Uncert. De pendiente	0.000
34	t-value	1.4866 =ABS(E32/E33)
35	Grados de libertad	3
36	t-value crítico	3.18 =DISTR.T.INV(0.05,E35)
37	p-value	0.451 =1-DISTR.F.N(E29,E35,1,VERDADERO)

- v. Evaluar si t-calculado, mediante la comparación con el t-crítico, es menor. En este caso, se evidencia que la pendiente no es significativa, por lo tanto, se concluye que no hay de tendencia de envasado.

Alternativamente, al observar que el $p\text{-value} > 0.05$, se concluye que no hay de tendencia de envasado (asumiendo un nivel de confianza del 95 %).

- vi. En caso de obtener tendencias de envasado significativas, se deben considerar los siguientes aspectos:
- No es apropiado aplicar correcciones matemáticas para eliminar las tendencias que surgen del procesamiento del candidato
 - Estimar un componente de incertidumbre por este efecto. Por ejemplo, para un lote preparado de 60 unidades, en el cual se tiene una tendencia de significativa con una pendiente de $0.06 \text{ \%/unidad de material}$ la incertidumbre por este efecto se estimaría como:

$$u_{\text{deriva}} = \frac{\frac{0.06\%}{1 \text{ unidad}} \times 60 \text{ unidades}}{\sqrt{3}} = 2.07 \%$$

3.3.4 Análisis estadístico y estimación de incertidumbre por homogeneidad

Para realizar la evaluación de estos datos, se empleó el software estadístico [R](#). Para ello, es necesario inicialmente almacenar un archivo con los datos categorizados por número de unidad y considerando el bloque acorde a la secuencia de medición, como se muestra a continuación.

	B	C	D
13	Unidad	Bloque	Azoxystrobin
14	1	8	4.477
15	1	2	4.165
16	1	6	4.640
17	1	4	4.470
18	1	5	4.414
19	1	1	3.847
20	1	9	4.583
21	1	7	4.169
22	1	3	4.287
23	15	2	4.227
24	15	7	4.666
25	15	3	4.197
26	15	9	4.931
27	15	4	4.262
28	15	6	4.705
29	15	8	4.511
30	15	5	4.672
31	15	1	3.839

Posteriormente, se realiza un análisis de varianza de dos vías. Para lo cual se ejecutó el código que se presenta en el Anexo 5. A continuación se presentan los resultados:

Tabla 13. Análisis de varianza obtenido para el estudio de homogeneidad.

Fuente	GL	SC	CM	Valor de F	Valor de p
Entre	5	0.232	0.0463	4.018	0.00478
Bloques	8	3.264	0.408	35	8.65x10 ⁻¹⁶
Residual	40	0.461	0.0115		

Como se mencionó en el numeral 2.3.8 (ver Tabla 4), la estimación de incertidumbre se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$u_{hom}(\%) = \frac{\sqrt{\frac{CM_{ENTRE} - CM_{RESIDUAL}}{m}}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ec.20}$$

Dónde,

$$CM_{ENTRE} = 0.0463$$

$$CM_{RESIDUAL} = 0.0115$$

$$m = 9$$

$$\bar{x} \equiv \text{Gran promedio} = 4.357$$

Por lo cual la incertidumbre corresponde a:

$$u_{hom}(\%) = \frac{\sqrt{\frac{0.0463 - 0.0115}{9}}}{4.357} \times 100 = 2.98\%$$

3.3.5 Verificación de la homogeneidad

El resultado obtenido debe evaluarse para determinar si el material es lo suficientemente homogéneo para su uso como *MR in-house*. Para ser útil como *MR in-house*, la incertidumbre por homogeneidad entre unidades debe ser inferior a la incertidumbre objetivo establecida (ver Anexo 1.) Para el caso de este material, se estableció como incertidumbre objetivo el 25 % del valor máximo establecido en la regulación de la Unión Europea, por lo cual se encontró que el material es lo suficientemente homogéneo. Otra opción, es emplear un tercio o un cuarto de la precisión (en condiciones de intra-reproducibilidad o intermedias) del método que se desea controlar con el material producido.

3.3.6 Diseño simplificado de homogeneidad :Guía ISO 80

Para el caso en que se cuente con una incertidumbre debida a la homogeneidad, obtenida a partir de estudios previos o reportes de literatura para materiales similares, la Guía ISO 80, considera un enfoque simplificado realizar esta verificación. Para lo cual se debe:

- Seleccionar al azar un número g de las unidades en su forma final embalada, donde $g \geq 10$.



Nota 1: en el caso de no tener tendencias de envasado realizar muestreos aleatorios.

Nota 2: en el caso de tener tendencias de envasado, preferiblemente hacer uso de muestreos sistemáticos o estratificados.

- Tomar mínimo dos submuestras de ensayo de cada unidad usando técnicas apropiadas de homogenización para minimizar las diferencias entre las submuestras de ensayo.
- Llevar a cabo el procedimiento de medición en orden aleatorio y bajo condiciones de repetibilidad, de modo tal que la desviación de la medición pueda distinguirse de cualquier tendencia en el lote de muestras.

Nota: Preferiblemente hacer uso de diseños experimentales.

- Obtener el resultado de medición en la propiedad evaluada para cada una de las submuestras.
- Por medio de un ANOVA calcular la desviación estándar dentro de las unidades (S_d) y la desviación estándar entre unidades (S_s).
- Estimar la incertidumbre por homogeneidad entre unidades como se discutió previamente.

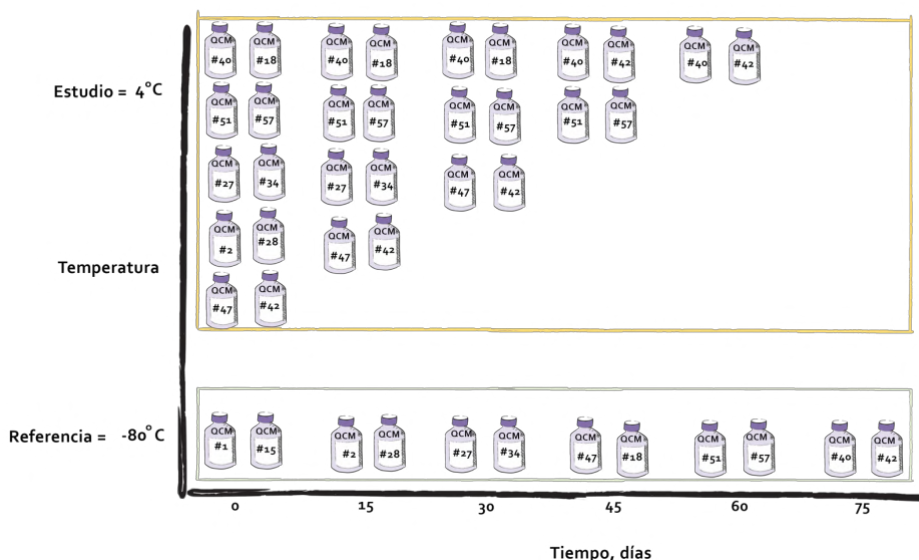
3.4 ESTUDIO ESTABILIDAD

Como se mencionó en los capítulos anteriores, la estabilidad es la característica del material que permite garantizar que el valor de la propiedad declarado se mantiene dentro de la incertidumbre, durante el tiempo y bajo las condiciones establecidas. Para realizar la evaluación de la estabilidad, adicional a las recomendaciones del numeral 2.4.1, se recomienda:

- Establecer las condiciones del estudio durante la etapa de especificación del material o planeación, por ejemplo: tipo de aproximación, número de unidades, tiempos, condiciones de estudio y número de réplicas.
- Realizar el estudio posterior al estudio de homogeneidad, de modo que se garantice previamente que el material es suficientemente homogéneo. En este sentido, el muestreo de las unidades empleadas para evaluar la estabilidad puede ser realizado completamente al azar, excepto si se ha identificado una tendencia significativa en el orden de envasado (ver 3.3.3), para lo cual se recomienda otro tipo de muestreo por ejemplo Muestreo Aleatorio Sistemático o muestreo estratificado (ver 2.2.2 o 2.2.3).
- Realizar el estudio sobre las unidades en su presentación final.

Una de las aproximaciones propuestas por la guía ISO 35, para la evaluación de la estabilidad de los materiales es utilizar un diseño isócrono (ver numeral 2.4.5, para más detalles). La Figura 29 muestra un esquema general de un estudio de estabilidad isócrono, que se empleará como ejemplo. Como se presenta en la figura, este estudio fue realizado a 4°C teniendo como temperatura de referencia -80°C , dos unidades del material fueron llevadas a temperatura de referencia cada 15 días, para un total de 6 puntos en el tiempo, incluyendo el tiempo 0.

Figura 29. Vista general de un estudio de estabilidad isócrono





A continuación, se presentan algunas consideraciones a tener en cuenta durante el desarrollo de este tipo de estudio.

- Almacenar bajo temperatura de referencia las muestras seleccionadas, al mismo tiempo, someter a condiciones de estudio las demás muestras.
Nota: Como temperaturas de estudio pueden ser empleadas temperaturas de refrigeración y temperaturas de referencia $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Mantener las muestras asignadas a t_0 (tiempo inicial) a la temperatura de referencia. Registrar la fecha de inicio de estudio.
- En cada punto del estudio llevar las muestras desde la temperatura de estudio a la temperatura de referencia, se sugiere hacerlo aproximadamente a la misma hora.
- Registrar siempre los tiempos de muestreo, así como cualquier otra información que se considere relevante.
- Nota: para el caso de estudios cortos (por ejemplo, condiciones de transporte o acelerados) registre la hora del muestreo.
- El estudio finaliza cuando todas las muestras se encuentren en la condición de referencia. En este punto, las muestras están listas para ser medidas.

3.4.1 Medición

Una vez finalizado el estudio, se procede a realizar la medición, para ello se recomienda:

- Permitir la climatización de las muestras a temperatura ambiente.
- Homogeneizar el material previo a la toma de sub-muestras.
- Preparar las muestras acordes con los procedimientos establecidos.
- En la medida de lo posible hacer uso de estándares subrogados y de estándares internos, para controlar y detectar problemas de recuperación y deriva instrumental, respectivamente.
- Procesar las muestras en orden aleatorio, es decir, evitando procesar en estricto orden de tiempo de estudio.
- Realizar la medición en condiciones de repetibilidad.
- Para las réplicas instrumentales, procurar usar viales independientes.
- Aplicar un diseño de experimentos, por ejemplo, bloques completamente al azar, especialmente cuando se trata de secuencias de medición muy largas (ver 2.3.5).

Una vez realizada la medición, y se han aplicado los factores de dilución (f_d) y correcciones según aplique, se sugiere evaluar la presencia de anómalos y la deriva instrumental, como se muestra en el Anexo 5 y el numeral 2.3.7, respectivamente.

En caso de tener una tendencia de medición significativa, la cual puede generar falsas conclusiones acerca de la estabilidad, se pueden implementar las siguientes estrategias:

- Rechazar las secuencias de medición afectadas y repetir las mediciones después de eliminar la fuente de la tendencia;

- Llevar a cabo una medición de la propiedad empleando una calibración analítica más frecuente, de tal manera que se elimine la tendencia.
- Aplicar una corrección a los datos basada en una función de transformación adecuada (por ejemplo, una regresión lineal) antes de realizar un análisis de varianza posterior;

Posteriormente, se sugiere calcular la respuesta relativa de la respuesta instrumental o propiedad medida de cada uno de los tiempos, respecto al tiempo (t_0) del estudio dentro de cada bloque de medición ($t_0=100\%$), la siguiente figura muestra un ejemplo de cómo se puede realizar esta transformación.

	H	I	J	K
	Secuencia	Tiempo	Bloque	Respuesta relativa (%)
14	Blank_01	-	B1	-
15	Blank_02	-		-
16	QC_01	-		-
17	QC_02	-		-
18	B2-E2_02	t1		$+(H17/SH\$22)*f_d*100$
19	B42-E1_01	t5		$+(H18/SH\$22)*f_d*100$
20	B18-E1_03	t3		$+(H19/SH\$22)*f_d*100$
21	B57-E2_01	t4		$+(H20/SH\$22)*f_d*100$
22	B27-E2_02	t2		$+(H21/SH\$22)*f_d*100$
23	B15-E1_03	t0	B2	$+(H22/SH\$22)*f_d*100$
24	QC_03	-		-
25	B18-E2_03	t3		$+(H24/SH\$27)*f_d*100$
26	B2-E2_01	t1		$+(H25/SH\$27)*f_d*100$
27	B27-E1_01	t2		$+(H26/SH\$27)*f_d*100$
28	B15-E2_01	t0		$+(H27/SH\$27)*f_d*100$
29	B57-E1_03	t4		$+(H28/SH\$27)*f_d*100$
30	B42-E2_03	t5		$+(H29/SH\$27)*f_d*100$
31	QC_04	-	Bj	-
32	...			

Para evaluar el ajuste a diferentes órdenes de cinética de reacción, se utiliza este primer conjunto de datos correspondientes al orden cero (x). Luego, se aplican transformaciones como $\ln(x)$, $1/x$ y $1/x^2$, para obtener las cinéticas de orden 1, 2 y 3, respectivamente. A continuación, se muestra cómo se obtienen estos datos.

	H	I	J	K	L	M	N
12							
13							
14	Secuencia	Tiempo	Bloque	Orden cero	Orden 1	Orden 2	Orden 3
15	Blank_01	-		Respuesta relativa (%)	ln(Respuesta relativa)	1/Respuesta relativa	1/Respuesta relativa²
16	Blank_02	-		-	-	-	-
17	QC_01	-		-	-	-	-
18	QC_02	-		-	-	-	-
19	B2-E2_02	t1		$+(H17/(\$H\$22)*f_a*100)$	$+LN(K19)$	$+1/K19$	$+1/(K19^2)$
20	B42-E1_01	t5	B1	$+(H18/(\$H\$22)*f_a*100)$	$+LN(K20)$	$+1/K20$	$+1/(K20^2)$
21	B18-E1_03	t3		$+(H19/(\$H\$22)*f_a*100)$	$+LN(K21)$	$+1/K21$	$+1/(K21^2)$
22	B57-E2_01	t4		$+(H20/(\$H\$22)*f_a*100)$	$+LN(K22)$	$+1/K22$	$+1/(K22^2)$
23	B27-E2_02	t2		$+(H21/(\$H\$22)*f_a*100)$	$+LN(K23)$	$+1/K23$	$+1/(K23^2)$
24	B15-E1_03	t0		$+(H22/(\$H\$22)*f_a*100)$	$+LN(K24)$	$+1/K24$	$+1/(K24^2)$
25	QC_03	-		-	-	-	-
26	B18-E2_03	t3		$+(H24/(\$H\$27)*f_a*100)$	$+LN(K26)$	$+1/K26$	$+1/(K26^2)$
27	B2-E2_01	t1		$+(H25/(\$H\$27)*f_a*100)$	$+LN(K27)$	$+1/K27$	$+1/(K27^2)$
28	B27-E1_01	t2	B2	$+(H26/(\$H\$27)*f_a*100)$	$+LN(K28)$	$+1/K28$	$+1/(K28^2)$
29	B15-E2_01	t0		$+(H27/(\$H\$27)*f_a*100)$	$+LN(K29)$	$+1/K29$	$+1/(K29^2)$
30	B57-E1_03	t4		$+(H28/(\$H\$27)*f_a*100)$	$+LN(K30)$	$+1/K30$	$+1/(K30^2)$
31	B42-E2_03	t5		$+(H29/(\$H\$27)*f_a*100)$	$+LN(K31)$	$+1/K31$	$+1/(K31^2)$
32	QC_04	-		-	-	-	-
33	...		B _i				

3.4.2 Tratamiento estadístico y estimación de la incertidumbre

Una vez obtenidos los datos transformados para cada orden de cinética, se realiza la evaluación estadística y posterior estimación de la incertidumbre por estabilidad a largo plazo (U_{ELP}) o en condiciones de almacenamiento. A continuación, se describe el procedimiento para llevar a cabo esta evaluación, tomando como ejemplo los resultados de la cinética de orden cero, de un estudio ejecutado siguiendo un diseño isócrono a 75 días, los datos se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Datos ejemplo de estudio de estabilidad para la cinética de orden cero

Muestra	B15	B2	B27	B18	B57	B42
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
E1_01	100.0	101.0	101.0	98.0	101.0	99.0
E1_02	100.0	100.0	98.0	99.0	102.0	98.0
E1_03	100.0	102.0	101.0	101.0	102.0	100.0
E2_01	100.0	98.0	102.0	102.0	99.0	98.0
E2_02	100.0	102.0	101.0	102.0	98.0	102.0
E2_03	100.0	102.0	98.0	100.0	98.0	101.0

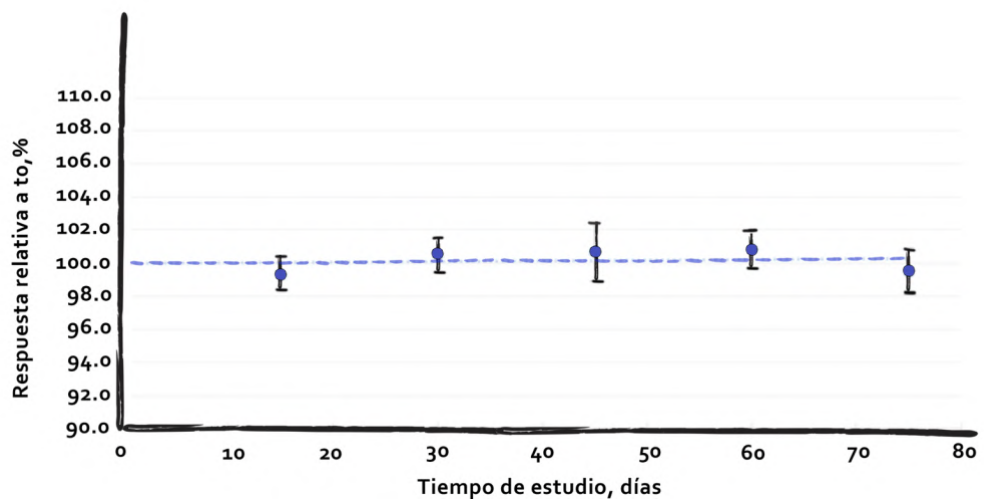
Inicialmente se realiza la evaluación del ajuste de los datos a un modelo lineal, de modo que se evidencie si existe o no una regresión significativa. Para ello:

- Categorizar los datos de respuesta o medición de la propiedad por unidad y tiempo del estudio, tal como se muestra a continuación:

	K	L	M	N	O
	Punto estudio	Tiempo (días)	Respuesta relativa a t_0 (%)	Promedio (%)	CV (%)
56					
57	t_0	0	100.0	100.0	0.0
58		0	100.0		
59		0	100.0		
60		0	100.0		
61		0	100.0		
62		0	100.0		
63	t_1	15	99.0	99.3	1.0
64		15	98.0		
65		15	101.0		
66		15	99.0		
67		15	100.0		
68		15	99.0		
69	t_2	30	99.0	100.5	1.0
70		30	101.0		
71		30	101.0		
72		30	100.0		
73		30	100.0		
74		30	102.0		

- ii. Graficar los promedios de respuesta o medición de la propiedad en función del tiempo del estudio, de modo que se pueda hacer una primera inspección visual del comportamiento de la estabilidad, tal como se muestra a continuación:

Figura 30.
Análisis preliminar en el estudio de estabilidad.



- iii. Llevar a cabo un análisis de regresión lineal sobre los datos usando la función de "Estimacion.lineal", como se muestra a continuación:

	Q	R	S	T
		=ESTIMACION.LINEAL (\$M\$57:\$M\$92,\$L\$57 :\$L\$92,1,1)		
71	Pendiente			Intercepto
72	u(pendiente)			u(intercepto)
73	r ²			s(y)
74	F			Grados de libertad
75	SS regresión			SS residual



	Q	R	S	T
71	Pendiente	0.00413	99.98413	Intercepto
72	u(pendiente)	0.00819	0.37203	u(intercepto)
73	r ²	0.00741	1.25912	s(y)
74	F	0.25381	34.00000	Grados de libertad
75	SS regresión	0.40238	53.90317	SS residual

- iv. Para interpretar los resultados se debe llevar a cabo una prueba de significancia de la pendiente por medio de una prueba *t* a un nivel de confianza del 95%, tal como se muestra a continuación:

	R	S	T
78	Pendiente	0.0041	
79	Uncert. De pendiente	0.008	
80	t-value	0.5038	=ABS(\$78/\$79)
81	Grados de libertad	34	
82	t-value crítico	2.03	=DISTR.T.INV(0.05,\$81)
83	p-value	0.945	=1-DISTR.F.N(R74,\$81,1,VERDADERO)

- v. Los resultados indican que el *t*-value < *t*-value crítico, por lo que es posible concluir que la pendiente no es significativa, por lo tanto, se concluye que no hay una degradación de la propiedad de interés, es decir, la propiedad se ha mantenido estable en el tiempo de estudio.
- vi. Alternativamente, al observar que el p-valor > α=0.05, se concluye que no se presenta degradación significativa al tiempo del estudio.
- vii. Ahora bien, dado que no hay una tendencia o degradación significativa de acuerdo con el modelo de regresión lineal aplicado, la incertidumbre u_{ELP} se estima de la siguiente manera:

$$u_{ELP} = u_{pendiente} \times (t_{estudio} + t_{vigencia})$$

Donde:

$u_{pendiente}$ = error de la pendiente

$t_{estudio}$ = tiempo de duración del estudio de estabilidad

$t_{vigencia}$ = tiempo de vigencia inicial

- viii. Para el ejemplo, y considerando un tiempo de vigencia inicial de 365 días, se obtendría una u_{ELP} de:

$$u_{ELP} = 0.0041 \times (75 + 290)$$


$$u_{ELP}=1.506\%$$

- ix. Evaluar si la u_{ELP} estimada cumple con la incertidumbre objetivo del material.

Finalmente, en el caso en que el modelo de regresión no sea significativo, se debe emplear la constante cinética para estimar la incertidumbre del material, conforme se presenta en la Tabla 6.

3.5 ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE LA PROPIEDAD

De acuerdo con lo presentado en el numeral 2.5, es posible realizar el establecimiento de valores de las propiedades de interés (ver 1.1). Para esto, el numeral 2.5 propone tres mecanismos posibles, los cuales dependerán del nivel rigurosidad que se quiera alcanzar.

A continuación, se describen algunas recomendaciones prácticas para llevar a cabo el establecimiento de los valores de las propiedades usando las estrategias de un método en un laboratorio (ver numeral 2.5.2) y dos métodos independientes (ver numeral 2.5.3).

Es importante mencionar, que el establecimiento de valores de las propiedades que se propone a continuación dista en gran proporción de un proceso de certificación de materiales de referencia. En este sentido, es importante que el laboratorio debe definir el nombre más apropiado para el valor de la propiedad, para esto se sugiere revisar los conceptos propuestos en el capítulo 1.

3.5.1 Empleo de un único método

Esta opción puede ser empleada cuando no se tienen dos técnicas de principio de medición diferente o en el caso en que propiedad de interés o analito en particular únicamente puede ser determinado por una técnica. En esta estrategia, se pretende realizar la mejor estimación posible de la propiedad,

- Seleccionar aleatoriamente cuatro unidades del lote del MR producido. Sin embargo, cada botella se medirá en un día diferente y con una calibración independiente como se describe a continuación:
 - Para una de las unidades, realizar la preparación (extracción y limpieza) de las muestras acorde con lo procedimientos establecidos, se sugiere tomar al menos cinco submuestras de cada unidad.
 - Preparar los niveles de calibración. En este aspecto se sugiere emplear calibraciones analíticas que reduzcan la incertidumbre, por ejemplo: bracketing.
 - Llevar a cabo la medición instrumental por la técnica de medición seleccionada,
 - Realizar la cuantificación para cada analito en cada una de las submuestras.
 - Estimar la concentración para la botella, por ejemplo, empleando el promedio de las cinco submuestras.
 - Estimar la incertidumbre estándar para la concentración de la botella.

Al final, se tendrán cuatro valores de concentración con su respectiva incertidumbre. La tabla 15, muestra como ejemplo los resultados de la cuantificación obtenida para un analito, la cual fue realizada en 4 días diferentes con 5 submuestras por unidad.

Tabla 15.
Resultados obtenidos en
la medición de la
propiedad

n	Valor medido LC-MS/MS (µg/kg)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1	5.14	5.03	5.11	5.10
2	5.07	5.15	5.14	5.02
3	5.09	5.04	5.03	5.01
4	5.12	5.01	5.10	5.15
5	5.01	5.11	5.05	5.13
s	0.05	0.06	0.05	0.06
$\bar{X}$	5.09	5.07	5.09	5.08

Es importante considerar, que debido a que en cada uno de los días se emplea la misma calibración analítica, los resultados obtenidos de la medición de cada una de las botellas no son mediciones independientes, por lo anterior la incertidumbre del componente de precisión del método corresponderá a:

$$u_{\text{precisión}} = s_d \quad \text{Ec.21}$$

Donde s_d corresponde a la desviación estándar de las mediciones realizadas para cada botella, es decir la desviación estándar del día.

Una vez se ha estimado la incertidumbre de la concentración para cada una de las botellas, se procede a realizar la mejor estimación posible de la propiedad, la cual corresponderá al promedio de estos valores ($\bar{X}$) y su incertidumbre ($u_{\text{propiedad}}$) se estima a partir de la siguiente expresión:

$$u_{\text{propiedad}} = \frac{1}{m} \sqrt{\sum_{i=1}^m u_i^2} \quad \text{Ec.22}$$

Donde m corresponde al número de mediciones independientes, es decir el número de botellas medidas independientemente, en el ejemplo $m=4$.

La Tabla 16 muestra un resumen de los resultados obtenidos en el establecimiento del valor de la propiedad y su incertidumbre.

Tabla 16.
Resultados obtenidos en
la medición de la
propiedad

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Promedio día (µg/kg)	5.09	5.07	5.09	5.08
u precisión (µg/kg)	0.050	0.059	0.045	0.064
u medición (µg/kg)	0.053	0.063	0.048	0.068
Valor de la propiedad	5.082 µg/kg			
u _{propiedad} (µg/kg))	0.029 µg/kg			

En el ejemplo anterior, se encuentra que los promedios entre las diferentes botellas no varían de manera significativa; sin embargo en algunos casos puede existir una variación entre las mediciones, la cual suele ocasionarse por la deriva del método de medición, asumiendo que el material es estable. En este sentido, debe incluirse un componente asociado a la deriva del método durante la medición de la propiedad. Este componente se puede estimar a través de la siguiente expresión:

$$u_{\text{deriva}} = \frac{X_{\text{máximo}} - X_{\text{mínimo}}}{2\sqrt{3}} \quad \text{Ec.23}$$

Donde $X_{\text{máximo}}$ y $X_{\text{mínimo}}$ corresponde a el mayor y el menor promedio obtenidos en la evaluación de cada una de las botellas. Por lo cual, la ecuación 22 se transforma a la siguiente expresión:

$$u_{\text{valor de la propiedad}} = \frac{1}{m} \sqrt{\sum_{i=1}^m u_{\text{precisión } i}^2 + u_{\text{deriva}}^2} \quad \text{Ec.24}$$

3.5.2 Empleo de dos métodos

Si el laboratorio cuenta con dos métodos independientes de medición, se sugiere que la medición de la propiedad(es) de interés se realice mediante cada uno de estos, considerando las recomendaciones del numeral 2.5.3.

- Seleccionar aleatoriamente al menos 4 unidades del lote del MR producido, las cuales serán evaluadas en dos días diferentes por las dos técnicas,
- Preparar los niveles de calibración en el intervalo adecuado,
- Realizar la preparación de las muestras acorde con lo procedimientos establecidos, se sugiere tomar como mínimo cinco submuestras de cada unidad,
- Llevar a cabo la medición instrumental por cada una de las técnicas de medición seleccionadas (p. e. 1-Q1: LCMS y 1-Q2: GC-MS)
- Repetir la medición empleando el segundo grupo de unidades en un día diferente, una unidad para cada técnica. Se sugiere emplear una calibración independiente. (p. e. 2-Q1: LCMS y 2-Q2: GC-MS)
- Realizar la cuantificación de cada una de las submuestras.

Tabla 17. Datos establecimiento del valor por dos técnicas

N	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
	Valor medido Q1: LC-MS/MS (µg/kg)		Valor medido Q2: GC-MS (µg/kg)	
1	3.51	3.70	3.56	3.67
2	3.63	3.50	3.52	3.45
3	3.68	3.72	3.58	3.72
4	3.55	3.69	3.68	3.75
5	3.70	3.63	3.71	3.78
s	0.08	0.09	0.08	0.13
$s_{\text{método}}$	0.08		0.11	
$\bar{X}$	3.61	3.65	3.61	3.67
$\bar{X}_{\text{método}}$	3.63		3.64	
$u_{\text{precisión}}$	0.04	0.04	0.04	0.06
$u_{\text{método}}$	0.05		0.07	
Valor indicativo ± u	3.64 ± 0.09			

Para obtener la incertidumbre debida al método se realiza la combinación de las incertidumbres de precisión de cada día, en concordancia con la ecuación 22, sin embargo, es importante asegurar primero que los datos obtenidos son consistentes, para ello se emplea la siguiente ecuación:

$$|\bar{C}_{Q1 \text{ d1}} - \bar{C}_{Q1 \text{ d2}}| \leq \sqrt{u_{Q1d1}^2 + u_{Q1d2}^2} \quad \text{Ec.25}$$

Reemplazando, se obtiene:

$$|3.61 - 3.65| \leq \sqrt{0.04^2 + 0.05^2}$$

$$0.04 \leq 0.06$$

A partir de los resultados presentados como ejemplo, es posible concluir que los datos del método 1 (Q₁) son consistentes entre los dos días de medición (d₁ y d₂), por lo tanto, es posible realizar la combinación de la incertidumbre:

$$u_{\text{método}}^2 = (u_{Q1 \text{ d1}}^2 + u_{Q1 \text{ d2}}^2) \quad \text{Ec.26}$$

Reemplazando, se obtiene:

$$u_{\text{método}} = 0.06 \text{ µg/kg}$$

Este proceso se realiza para los datos obtenidos empleando la segunda técnica de medición. Posteriormente, se realiza la evaluación de la consistencia de los resultados, pero esta vez para asegurar que los datos obtenidos por ambas técnicas son equivalentes.

$$|3.63-3.64| \leq \sqrt{0.05^2 + 0.07^2}$$

$$0.01 \leq 0.09$$

En este caso, ya que se cumple el supuesto, se concluye que los resultados obtenidos por los dos métodos Q_1 y Q_2 son consistentes. Por lo tanto, el mejor estimado del valor de la propiedad se puede establecer por el promedio aritmético de las observaciones obtenidas por ambos métodos y la incertidumbre correspondiendo a la combinación de las obtenidas para cada método los métodos.

$$u_{\text{valor de la propiedad}} = \sqrt{u_{Q1}^2 + u_{Q2}^2}$$

$$u_{\text{valor de la propiedad}} = 0.09 \mu\text{g/kg}$$

Finalmente, la incertidumbre expandida del valor indicativo puede ser estimada multiplicando la incertidumbre estándar por el correspondiente factor de cobertura, en este caso 1.96 para un nivel de confianza del 95%

3.6 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MATERIAL

Una vez se ha evaluado la homogeneidad del material, su estabilidad y establecido los valores indicativos de la propiedad, cada una con su incertidumbre, se procede a combinar estas contribuciones para obtener la incertidumbre del material.

Dependiendo de la estrategia usada para el establecimiento de los valores indicativos, se obtienen dos escenarios posibles para estimar la incertidumbre global del material. A continuación, se describen estos posibles escenarios.

3.6.1 Escenario 1: Uso de los datos del estudio de homogeneidad

En el caso en que el material no requiera un valor de la propiedad y se pretenda emplear, para, por ejemplo, el control de la precisión, confirmación o identificación, las dos contribuciones a la incertidumbre del material corresponden:

- Homogeneidad (u_{hom})
- Estabilidad (u_{est})

De modo que la incertidumbre del material de referencia *in-house* (u_{MRih}) se obtiene de la siguiente manera:

$$u_{\text{MRih}} = \sqrt{u_{\text{hom}}^2 + u_{\text{est}}^2} \quad \text{Ec.27}$$

Mientras que, la incertidumbre expandida del material se obtiene al multiplicar la incertidumbre estándar obtenida por el correspondiente factor de cobertura, en este caso 1.96 para un nivel de confianza del 95%

$$U_{\text{MRih}} = 1.96 * u_{\text{MRih}} \quad \text{Ec.28}$$

3.6.2 Escenario 2: Se establece el valor indicativo por una o dos técnicas en un laboratorio

En el caso en que se realice la medición de la propiedad y el valor se pretenda emplear para: el control del sesgo, la evaluación de la precisión, entre otros, se tendrán tres contribuciones a la incertidumbre del material:

- Homogeneidad (u_{hom})
- Estabilidad (u_{est})
- Establecimiento de valor de la propiedad ($u_{\text{propiedad}}$)



De modo que la incertidumbre del material de referencia *in-house* (u_{MRih}) se obtiene de la siguiente manera:

$$u_{MRih} = \sqrt{u_{hom}^2 + u_{est}^2 + u_{valor\ de\ la\ propiedad}^2}$$

Ec.29

Mientras que, la incertidumbre expandida del material se obtiene al multiplicar la incertidumbre estándar obtenida por el correspondiente factor de cobertura, en este caso 1.96 para un nivel de confianza del 95%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. Settimi *et al.*, "Development of a new categorization system for pesticides exposure to support harmonized reporting between eu member states," *Environ. Int.*, vol. 91, pp. 332–340, 2016, doi: 10.1016/j.envint.2016.02.034.
- [2] J. Zhu, J. Wang, Y. Ding, B. Liu, and W. Xiao, "A systems-level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 149, no. October 2017, pp. 26–35, 2018, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.10.066.
- [3] Comisión Europea, "Un Pacto Verde Europeo." https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_es%0A (accessed Jan. 23, 2023).
- [4] Codex Alimentarius, "Plaguicidas." <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/> (accessed Jan. 19, 2023).
- [5] "No Title." <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:01976Lo895-20071008> (accessed Jan. 12, 2023).
- [6] J. L. Fernández Moreno, F. J. Arrebola Liébanas, A. Garrido Frenich, and J. L. Martínez Vidal, "Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1111, no. 1, pp. 97–105, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.108.
- [7] Codex Alimentarius, "Residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos." <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/es/> (accessed Mar. 24, 2023).
- [8] C. Europea, "Residuos de plaguicidas en alimentos y piensos." <https://eur-lex.europa.eu/ES/legal-content/summary/pesticide-residues-in-food-and-animal-feed.html> (accessed Mar. 24, 2023).
- [9] P. Kuchheuser and M. Birringer, "Pesticide residues in food in the European Union: Analysis of notifications in the European Rapid Alert System for Food and Feed from 2002 to 2020," *Food Control*, vol. 133, p. 108575, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108575>.
- [10] Ministerio de la Protección Social de Colombia, "RESOLUCION NÚMERO 2906 DE 2007." <https://www.mincit.gov.co/temas-interes/reglamentos-tecnicos/rt-conjuntos/resolucion-2906-del-22-de-agosto-de-2007-1.aspx>
- [11] ISO/IEC, "ISO/IEC 17025:2017(es) Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración." 2017.
- [12] H. Saldanha, B. Sejerøe-Olsen, F. Ulberth, H. Emons, and R. Zeleny, "Feasibility study for producing a carrot/potato matrix reference material for 11 selected pesticides at EU MRL level: Material processing, homogeneity and stability assessment," *Food Chem.*, vol. 132, no. 1, pp. 567–573, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.071.
- [13] J. F. Huertas Pérez, B. Sejerøe-Olsen, A. R. Fernández Alba, H. Schimmel, and M. Dabrio, "Accurate determination of selected pesticides in soya beans by liquid chromatography coupled to isotope dilution mass spectrometry," *Talanta*, vol. 137, pp. 120–129, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.01.020.
- [14] A. Valverde, A. Aguilera, and A. Valverde-Monterreal, "Practical and valid guidelines for realistic estimation of measurement uncertainty in multi-residue analysis of pesticides," *Food Control*, vol. 71, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.017.
- [15] M. T. Pereyra, B. S. Fernández Band, and A. G. Lista, "Measurement uncertainty estimated from accuracy assessment by using an in-house reference material: Two case studies for the extraction of total PAH in industrial wastewater sludges," *Microchem. J.*, vol. 119, pp. 145–151, 2015, doi: 10.1016/j.microc.2014.12.001.
- [16] H. Emons, "The 'RM family' - Identification of all of its members," *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 10, no. 12, pp. 690–691, 2006, doi: 10.1007/s00769-005-0046-z.

- 
- [17] S. Wood and A. Botha, "The new ISO Guide 80: Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs)," *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 19, no. 6, pp. 477–480, 2014, doi: 10.1007/s00769-014-1084-1.
- [18] ISO, "Guide 80:2014 Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs)." Geneva, Switzerland, 2014.
- [19] ISO, "Guide 35:2017 Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability." Geneva, Switzerland, 2017.
- [20] ISO, "17034 General requirements for the competence of reference material producers." Geneva, Switzerland, 2016.
- [21] D. A. Garzón, D. A. Ahumada, J. P. Abella Gamba, J. Ágreda, and E. Castillo, "Quantification of Arsenic, Cadmium, Mercury and Lead in Pineapple: Method Development, Validation and Evaluation of In-House Reference Materials," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 31, no. 6, pp. 1296–1305, 2020, doi: 10.21577/0103-5053.20200015.
- [22] L. V Morales *et al.*, "Development of Avocado Reference Material for Pesticide Residue Analysis," *J. AOAC Int.*, vol. 105, no. 4, pp. 1051–1059, Aug. 2022, doi: 10.1093/jaoacint/qsac034.
- [23] Instituto Nacional de Metrología de Colombia, "No Title." <https://inm.gov.co/web/2-nuevos-materiales-de-referencia-de-cadmio-en-polvo-de-cacao-ofrece-inm-de-colombia-a-la-industria-cacaotera/> (accessed Jan. 23, 2023).
- [24] ISO, "Guide 30:2015 Reference materials — Selected terms and definitions (ISO Guide 30:2015)." Geneva, Switzerland, 2015.
- [25] JCGM, *JCGM 200:2012 International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM)*, 3rd ed. 2012.
- [26] NACRW REFERENCE MATERIAL WORKING GROUP, *Reference Material Use in Trace Analysis*, 1st ed. 2020.
- [27] N. Elassy, "The concepts of quality, quality assurance and quality enhancement," *Qual. Assur. Educ.*, vol. 23, no. 3, pp. 250–261, 2015, doi: 10.1108/QAE-11-2012-0046.
- [28] ISO, "ISO 9000:2015 Quality management systems — Fundamentals and vocabulary." Geneva, Switzerland, 2015.
- [29] International Atomic Energy Agency, *Development and use of reference materials and quality control materials*. Vienna, Austria, 2003.
- [30] Eurachem/CITAC, *Guide to quality in analytical chemistry - An aid to accreditation*, 3rd ed. 2016.
- [31] SANTE, "ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED SANTE 11312/2021." European Commission, pp. 1–57, 2021.
- [32] OAWG-CCQM, "Working Group on Organic Analysis: Strategy 2021-2030." <https://www.bipm.org/documents/20126/2071059/CCQM-OAWG+Strategy+document+2021-2030.pdf/786d14ba-829d-9c77-7481-19529759e19a?version=1.1&t=1624286282004&download=true>
- [33] D. A. Ahumada *et al.*, *Guía para la selección y uso de ensayos de aptitud*. 2021.
- [34] W. Horwitz, "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of," *Pure Appl. Chem.*, vol. 60, no. 6, pp. 855–864, 1988.
- [35] J. S. M. Dabrio, S. Grimalt Brea, P. Shegunova, S. Harbeck, B. Sejerøe-Olsen, A.R. Fernández-Alba, "The certification of the mass fraction of pesticides in cucumber: ERM®-BC403 EUR 29243 EN," 2018. doi: 10.2760/897400.





ANEXOS



Anexo 1: Incertidumbre objetivo

De acuerdo con el vocabulario internacional de metrología (VIM), la incertidumbre objetivo se define como "la incertidumbre de la medición especificada como un límite superior y elegida con base al uso previsto de los resultados de la medición". En vista de lo anterior y conforme lo presenta el presente documento a lo largo de la producción de un material de referencia, se deben definir las siguientes incertidumbres objetivo:

- Incertidumbre objetivo del MR (u_{TMR}).
- Incertidumbre objetivo por homogeneidad (u_{Thom}).
- Incertidumbre objetivo por estabilidad (u_{Test}).
- Incertidumbre objetivo por medición (u_{Tmed}).

En este sentido, a continuación, se brindan algunos ejemplos que se espera sirvan de guía para el establecimiento de la incertidumbre objetivo de un material.

A.1.1 Incertidumbre objetivo del MR (u_{TMR}).

Considerando que un material de referencia puede ser empleado para el control del error sistemático y aleatorio y que en la medición de residuos de plaguicidas se permiten incertidumbres estándar de hasta el 25 % ($u_{máxima\ del\ ensayo}$) [31]. Se requiere que el MR tenga una incertidumbre entre un cuarto y un tercio, con el propósito de que sirva como una referencia adecuada para el control de calidad. En este sentido, se puede establecer la incertidumbre objetivo a través de la siguiente expresión:

$$u_{TMR} = \frac{1}{4} u_{máxima\ del\ ensayo} - \frac{1}{3} u_{máxima\ del\ ensayo} \quad \text{Ec.A.1}$$

Es decir, para el caso de residuos de plaguicidas la u_{TMR} podría encontrarse entre:

$$u_{TMR} = \frac{1}{4} 25\% \text{ y } \frac{1}{3} 25\% = (6.25\%, 8.33\%)$$

A.1.2 Incertidumbre objetivo por homogeneidad (u_{Thom}), estabilidad (u_{Test}) y medición (u_{med})

Considerando que la incertidumbre de un material de referencia viene dada por la siguiente expresión:

$$u_{TMR} = \sqrt{u_{homo}^2 + u_{esta}^2 + u_{medición}^2} \quad \text{Ec.A.2}$$

La manera más sencilla de establecer la incertidumbre objetivo, asociada a cualquiera de estos tres componentes (u_{Thom} , u_{Test} y u_{med}), es asumir que los tres componentes tienen la misma importancia, por lo cual la incertidumbre objetivo vendría dada por la siguiente expresión:

$$u_T(\text{homo, esta o medición}) = \frac{u_{TMR}}{3} \quad \text{Ec.A.3}$$

Reemplazando los valores obtenidos en el ejemplo anterior, se tendría que la u_T para cualquiera de estos tres componentes podría estar entre 2.09 % y 2.78%.

A.1.3 Incertidumbre objetivo de homogeneidad y estabilidad: sin valores de referencia.

En algunas ocasiones, no se requieren valores de referencia sobre los materiales, por lo cual la obtención de una incertidumbre adecuada depende sólo de los términos de estabilidad y homogeneidad (ver numeral 2.4.6).

Por ejemplo, la guía ISO 13528 sugiere que la homogeneidad de un MR de referencia es apta si la incertidumbre por homogeneidad es inferior al 30 % de la desviación estándar del ensayo de aptitud (σ_{pt}). Por lo anterior y considerando que, para un ensayo de aptitud de residuos de plaguicidas, se establecen $\sigma_{pt} = u_{\text{máxima del ensayo}}^5$, se puede plantear que la u_{Thomo} corresponde a:

$$u_{Thomo} = 0.3 \times u_{\text{máxima del ensayo}} \quad \text{Ec.A.4}$$

Lo anterior implica, que una homogeneidad del 7.5 %.

En este sentido y considerando que para un material de referencia que no requiere un valor de referencia, la incertidumbre viene dada por:

$$u_{MR} = \sqrt{u_{homo}^2 + u_{esta}^2} \quad \text{Ec.A.5}$$

Se puede establecer que la incertidumbre objetivo asociada a estabilidad corresponde a:

$$u_{Testa} = \sqrt{u_{TMR}^2 - u_{Thomo}^2} \quad \text{Ec.A.6}$$

De esta manera y considerando la incertidumbre objetivo obtenida en Ec.A.1 para u_{TMR} y la incertidumbre por homogeneidad obtenida a partir de la expresión Ec.A.4 se tiene que la $u_{Testa} = 3.62$ %.

En el ejemplo anterior, considere que los materiales de referencia empleados en un ensayo de aptitud usualmente tienen tiempos de vida útil inferiores a los materiales de referencia certificados o los que se emplean para control de calidad. Por lo anterior, posiblemente en la ISO 13528 dan más importancia a la

⁵ Para este caso se empleó la incertidumbre máxima que la guía SANTE XXX establece, sin embargo, se puede emplear: los resultados de la validación del método (en condiciones de intra-reproducibilidad o precisión intermedia) o la ecuación de Horwitz.



homogeneidad (7.5%) que a la estabilidad (3.62%), por lo cual este esquema deber ser empleado con precaución.

A.1.4 Reportes de literatura

Una cuarta opción para estimar la incertidumbre es realizar una revisión en la cual se incluyan publicaciones científicas, reportes de materiales de referencia y en general literatura relacionada con la producción de materiales de referencia. En este sentido se recomienda revisar:

- Bases de datos de publicaciones, tales como Science direct, Springer, entre otras.
- Bases de datos de MR, como la de COMAR.
- Materiales de referencia producidos previamente como las de: JRC, INM, CENAM, NMIIJ, entre otros.
-

Por otro lado, el anexo A4 relaciona algunos resultados obtenidos por el INM para la etapa de homogeneidad.

Por ejemplo, el Joint Research Center publica en su página web la siguiente información para el MRC ERM-BC403- Cucumber [35]. Desde donde se podría establecer que una incertidumbre objetivo para la homogeneidad de un MR de residuos de plaguicidas podría ser 5.11 %, la cual es la máxima incertidumbre que ellos obtuvieron para este material. Es importante señalar que esto aplicaría si el material que se produce dentro del laboratorio tiene características similares en cuanto a:

- Tipo de procesamiento y envasado del material
- Tipo de matriz
- Tipo de analito
- Concentración del analito.

Nótese que se estableció una incertidumbre objetivo para homogeneidad empleando el valor más alto de incertidumbre y no el promedio de las incertidumbres. Lo anterior, se realizó considerando que se requiere establecer una incertidumbre objetivo para un MR “*in-house*” y no un MRC.

Anexo 2: Estudio de uso

En el caso de materiales de referencia que puedan ser empleados múltiples veces en un determinado periodo de tiempo, se recomienda evaluar la estabilidad del MR bajo estas condiciones de uso. Para ello considere las siguientes recomendaciones:

- Se debe tener claramente identificado el proceso de toma de submuestras, sellado y reapertura del material a evaluar.
- Si se cuenta con el estudio de homogeneidad entre unidades y la $u_{\text{hom entre}}$ es muy baja, se puede tomar una sola unidad para realizar este estudio.
- Se debe contar con un método acorde con las recomendaciones del numeral 2.3.4.
- Se recomienda realizar el estudio a través de un diseño isócrono.
- Evaluar un intervalo de tiempo razonable y que sea coherente con la cantidad disponible.

A continuación, se da un ejemplo de cómo realizar este estudio para un material de referencia que contiene cerca de 50 g y en la rutina se emplean cerca de 7 g para cada medición.

- Se toman dos unidades al azar.
- Una de las unidades se almacena en las condiciones de referencia seleccionadas, por ejemplo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- La segunda unidad se abre y se toma una alícuota de cerca de 8 g de acuerdo con las indicaciones o al protocolo establecido.
- Se almacena la alícuota en las condiciones de referencia, asegurándose que el recipiente sea hermético y el material no se expondrá a condiciones de humedad altas.
- La unidad abierta, se cierra nuevamente (de acuerdo con las indicaciones) y se almacena la unidad que se abrió en las condiciones de almacenamiento, por ejemplo $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Pasado un tiempo, por ejemplo 3 días, se toma una nueva alícuota de la unidad abierta previamente y se repiten los pasos c, d y e.
- Se repite el paso f hasta que el material se agote.
- Una vez se termine el MR, se retiran todas las alícuotas y la unidad almacenada en el literal b de las condiciones de referencia.
- Se miden todas las alícuotas de acuerdo con el procedimiento seleccionado.
- Se realiza un análisis de regresión (respuesta o concentración vs tiempo) para evaluar si existe una tendencia significativa.

Nota 1: en el caso en que la regresión no sea significativa, se puede asumir que la incertidumbre asociada a uso es igual a cero ($u_{\text{uso}} = 0$).

Nota 2: en el caso en que la regresión sea significativa se debe estimar la incertidumbre, de acuerdo con las recomendaciones del numeral 2.4.



Anexo 3: Insumos sugeridos para la preparación de materiales de referencia in-house

A.3.1 Equipos

- Balanza analítica con resolución mínima de 0.1 mg
- Balanza con división de escala mínima de 0.01 g
- Horno o estufa de secado convencional: horno de convección y de calentamiento eléctrico, con capacidad de alcanzar 100 °C, de manera tal que permita controlar que la variación de temperatura durante el secado no exceda los 5 °C.
- Extractor, licuadora o molino con cuchilla de fresada plana
- Procesador de alimentos
- Tamiz de 500 µm y 750 µm
- Batidora de pedestal con tazón y cuchillas metálicas
- Cuchillo
- Termohigrómetro
- Ultra congelador
- Refrigerador
- Liofilizadora con capacidad suficiente
- Cabina de flujo laminar
- Cabina de extracción

A.3.2 Materiales

- Recipientes de aluminio para secado
- Recipientes plásticos con tapa, de capacidad suficiente para la preparación y homogenizado del material
- Recipientes de vidrio, PTFE o PEAD, para la preparación de las soluciones
- Frascos plásticos ámbar (deben ser irradiados con luz ultravioleta (UV)) con tapa.
- Bolsas aluminizadas con selle hermético
- Hielo seco

A3.3 Reactivos

- Acetona
- Agua ultrapura
- Soluciones madre de plaguicidas preparadas a partir de estándares analíticos con pureza > 95%, preparados en solvente adecuado para asegurar completa solubilidad

A3.4 Preparación solución conservante

La solución conservante corresponde a la mitad de la cantidad de pulpa fresca obtenida en un porcentaje del 70%, con una composición de 10% de ácido ascórbico y 0.1% de metabisulfito de sodio disueltos en agua ultrapura.

Anexo 4: Incertidumbres por homogeneidad para los MR in-house

Tabla A4.1. Incertidumbre por homogeneidad para los MR *in-house* preparados

Analito	Incertidumbre por homogeneidad (%)		
	Arroz	Banano	Café verde
Abamectin	0.336%	0.270%	0.501%
Acetamiprid	0.499%	1.032%	0.616%
Alachlor	0.612%	0.744%	0.209%
Azoxystrobin	2.978%	4.930%	0.255%
Benalaxyl	0.617%	1.504%	0.372%
Chlorpyrifos	0.887%	0.426%	0.396%
Difenoconazole	2.275%	3.476%	0.800%
Dimethoate	0.632%	1.742%	0.674%
Dimethomorph	0.302%	0.530%	0.640%
Flutriafol	1.785%	2.538%	0.335%
Malathion	2.881%	3.950%	0.191%
Methamidophos	0.639%	0.861%	0.513%
Monocrotofos	2.077%	3.415%	0.169%
Propamocarb	0.373%	1.301%	0.473%
Spirodiclofen	0.843%	1.092%	1.551%
Spiromesifen	0.225%	1.955%	1.538%
Spynosin-A	0.931%	1.225%	0.173%
Spynosin-D	0.261%	0.693%	0.428%
Tebucanazole	0.737%	1.822%	0.526%
Thiacloprid	0.807%	2.073%	0.989%
Thiamethoxam	0.398%	1.748%	0.723%
Trifloxystrobin	3.987%	3.907%	1.017%

Anexo 5: Detección de datos anómalos usando ValidaR

El aplicativo [ValidaR](#) incorpora la prueba de Dixon y Grubbs para la detección de datos anómalos, y de manera simultánea realiza la evaluación del supuesto de normalidad de los datos, empleando las pruebas de Shapiro-Wilk y Anderson-Darling.

A continuación, se presenta un ejemplo de su uso para esta evaluación empleando el siguiente conjunto de datos:

No. Unidad	2	8	12	20	25
Replica 1	2.0754	2.1180	2.0592	2.0812	2.0167
Replica 2	2.0418	2.1182	2.0351	1.9986	2.0421
Replica 3	2.0981	2.1213	2.0724	2.0748	2.0428
Replica 4	2.0638	2.0921	2.0376	2.0390	2.0650
Replica 5	2.0504	2.0990	2.0261	2.0150	2.0151
Replica 6	2.0761	2.1259	2.0489	2.0149	2.0407
Replica 7	2.0592	2.0623	2.0982	2.0483	2.0757
Replica 8	2.0497	2.0504	2.0698	2.0548	2.1337
Replica 9	2.0822	2.0168	2.0725	2.0506	2.0461

- Copiar y pegar los datos en el aplicativo en la sección "Inicio, ingreso de datos", usando una columna para el grupo de datos de cada unidad.
Nota: la evaluación puede ser realizada también sobre todo el conjunto de datos, empleando una única columna.

- Seleccionar la serie de datos a evaluar (columna) en la sección "Normalidad y datos anómalos" y nivel de confianza a la que se verificará el supuesto de normalidad y la ausencia de datos anómalos, se sugiere realizar esta evaluación al 95% y/o 99% de nivel de confianza.

1. Diríjase al submódulo [Inicio, ingreso de datos](#) y ponga s

2. Escoja la columna con la serie de datos de interés:

col.1

3. Escoja un nivel de confianza para las pruebas:

☐ 90% ☒ 95% ☐ 99%

4. Presione el siguiente botón para generar los resultados:

Calcular pruebas estadísticas

- Oprimir “*Calcular pruebas estadísticas*”, el aplicativo arrojará una salida con los resultados de las diferentes pruebas de inspección de datos: supuesto de normalidad y ausencia de datos anómalos por los enfoques de Grubbs y Dixon.

Resultados

Normalidad de los datos:

Prueba de Shapiro-Wilk

La prueba de Shapiro-Wilk no encontró evidencia para afirmar que la muestra estadística no proviene de una población con distribución normal, a un nivel de confianza del 95 %.

Valor p de la prueba: 0.8315

Resultados estadísticamente no significativos al nivel de confianza escogido.

Conclusión: La muestra parece pertenecer a una población con distribución normal.

Prueba de Anderson-Darling

La prueba de Anderson-Darling no encontró evidencia para afirmar que la muestra estadística no proviene de una población con distribución normal, a un nivel de confianza del 95 %.

Valor p de la prueba: 0.81485

Resultados estadísticamente no significativos al nivel de confianza escogido.

Conclusión: La muestra parece pertenecer a una población con distribución normal.

Ausencia de posibles datos anómalos:

Prueba de datos anómalos de Grubbs para un único dato

La prueba de Grubbs para un único dato no encontró valores sospechosos de ser anómalos a un nivel de confianza del 95 %.

Valor p de la prueba: 0.24333

Resultados estadísticamente no significativos al nivel de confianza escogido.

Conclusión: No se detectaron datos anómalos.

Prueba de datos anómalos de Grubbs para un dato en cada extremo

La prueba de Grubbs para un dato en cada extremo no encontró valores sospechosos de ser anómalos a un nivel de confianza del 95 %.

Valor p de la prueba: 0.49853

Resultados estadísticamente no significativos al nivel de confianza escogido.

Conclusión: No se detectaron datos anómalos.

El aplicativo, presenta como resultados los valores de probabilidad para cada prueba y su respectiva conclusión. Para el caso de los datos anómalos, la prueba de Grubbs evalúa dos datos anómalos en un extremo o en cada uno los dos extremos de un grupo de datos, mientras que la prueba de Dixon evalúa si el dato mayor o menor en un extremo en un grupo de datos resulta ser un dato anómalo.



Anexo 6: Código para diseño de bloques completamente al azar

```
# Instalar la librería 'readxl' si no está instalada
if (!require(readxl)) {
  install.packages("readxl")
}

# Cargar la librería 'readxl'
library(readxl)

# Ruta y nombre de archivo de Excel
ruta_archivo <- "ruta/del/archivo/datos.xlsx"

# Leer el archivo de Excel
datos <- read_excel(ruta_archivo)

# Realizar el ANOVA
modelo <- aov(Azoxystrobin ~ Botella + Bloque, data = datos)
resultado <- summary(modelo)

# Mostrar los resultados
print(resultado)
```

