

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA

**FACULTAD DE INGENIERIA ECONOMICA
Y CIENCIAS SOCIALES**



**“METODOLOGIA ESTADISTICA PARA LA VALIDACION DE LA
DETERMINACION DE ACIDO DOMOICO POR HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) EN
MUESTRAS DE CONCHA DE ABANICO”**

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN ESTADISTICA

POR LA MODALIDAD DE TESIS

ELBORADO POR:

JOSE WILLIAM CAMERO JIMENEZ

LIMA-PERU

2008

A **mamá Matilde**, a quien le debo el coraje, la sensibilidad y todas las buenas cualidades que hay en mí, y que desde el infinito siempre me guía.

*A mi madre **Marcela** por su amor, cariño y sobre todo su paciencia.*

A mis **hermanos Nérida y Victor** por su ayuda y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de este trabajo fue posible gracias a la colaboración de algunas personas e instituciones que a mi humilde reconocimiento, agradezco:

A Certificaciones del Perú CERPER S.A., por su colaboración en la información experimental realizada en sus laboratorios.

Al Ing. Rolando Urban Tuesta, Gerente de Operaciones de CERPER S.A., por su apoyo incondicional para realizar el tema de tesis en los laboratorios de CERPER S.A., por su constantes comentarios para el mejor desarrollo del tema y los tópicos relacionados al tema. Por su enorme contribución en mi desarrollo profesional. Por tenerlo como un gran maestro.

A Rodolfo Velazco Peña, gran amigo que colaboró con sus comentarios en la parte biológica y química de la tesis.

A mi asesor y gran amigo, Luis Huamanchumo de la Cuba, por su dedicación y apoyo incondicional para sacar adelante la tesis.

A mi familia por su comprensión en los momentos de ausencia al lado de ellos para elaborar la tesis.

INDICE

Pag.

ANTECEDENTES
INTRODUCCION

CAPITULO I: MARCO TEORICO

1.1	La Validación de ensayos de laboratorio en el marco de la ISO / EIC 17025	1
1.1.1	Entorno actual de los laboratorios de ensayo.	1
1.1.2	Validación de métodos de ensayo	3
1.1.3	Parámetros de validación exigidos por el Instituto Nacional de Defensa del Consumidor y de la Propiedad Intelectual (INDECOPI).	5
1.2	Los Moluscos Bivalvos en el Perú	8
2.2.1	Generalidades	8
2.2.2	Maricultura de conchas de abanico: origen y su importancia en el Perú.	9
2.2.3	Exportaciones con tendencia al alza.	12
2.2.4	Francia y EEUU principales destinos de exportaciones peruanas.	13
1.3	Las toxinas marinas en los moluscos bivalvos	14
1.3.1	Generalidades.	14
1.3.2	Intoxicación paralizante de los mariscos (psp).	15
1.3.3	Intoxicación diarreica de los mariscos (dsp)	19
1.3.4	Intoxicación amnésica por mariscos (asp)	21
1.3.5	Intoxicación neurológica por mariscos (nsp)	23
1.3.6	Intoxicación por azaspiracida en mariscos (azp)	26

1.4	Análisis instrumental: Cromatografía Líquida de Alta Resolución	27
1.4.1	Introducción	27
1.4.2	Instrumental	29
1.4.3	Parámetros relevantes	30
1.4.4	Etapas del análisis de una muestra	30

CAPITULO II: METODOLOGIA ESTADISTICA PARA LA VERIFICACION DE LOS PARAMETROS DE VALIDACION

2.1	Verificación del parámetro de veracidad	32
2.1.1	Ensayos de recuperación o adición de patrón.	32
2.1.2	Mediante comparación con otros métodos de análisis	34
2.1.3	Mediante pruebas ínter laboratorio	34
2.1.4	Mediante material de referencia certificado:	34
2.1.5	Mediante pruebas de comparación con otro laboratorio	35
2.2	Verificación del parámetro de precisión	35
2.2.1	Mediante las condiciones de reproducibilidad	35
2.2.2	Mediante las condiciones de repetibilidad	37
2.3	Verificación del parámetro de linealidad.	38
2.3.1	Mediante análisis de regresión de concentraciones estándares y respuestas del equipo.	38
2.4	Verificación del parámetro de límite de detección y límite de cuantificación del método.	39
2.4.1	Mediante la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.	39
2.5	Verificación del parámetro de robustez	40
a.-	Verificación.	41
b.-	Criterio de aceptación	41
2.6	Verificación del parámetro de selectividad-especificidad.	42
2.6.1	Mediante examen visual	42
2.6.2	Mediante adiciones a concentraciones estándares.	42
2.7	Estimación de la incertidumbre	42
2.7.1	Incertidumbre debida al proceso de verificación de la trazabilidad	44
2.7.2	Incertidumbre debida a la heterogeneidad de la muestra	44

CAPITULO III
VALIDACION DE LA DETERMINACION DE ACIDO DOMOICO POR
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) EN
MUESTRAS DE CONCHA DE ABANICO

3.1	Introducción	45
3.2	Equipos	48
3.3	Reactivos	48
3.4	Procedimiento	48
	3.4.1 Preparación de la muestra	48
	3.4.2 Proceso de extracción	49
3.5.	Diseño experimental	50

CAPITULO IV
RESULTADOS Y CONCLUSIONES

4.1	Similaridad de los resultados entre los analista	52
	4.1.1 Prueba de puntos atípicos	53
	4.1.2 Normalidad de los datos	54
	4.1.3. Prueba de homogeneidad de varianzas	56
	4.1.4. Prueba de igualdad de medianas	57
	4.1.5. Evaluación de la similaridad de resultados de los dos analistas	57
4.2	Desarrollo de los parámetros de validación	58
	4.2.1. Evaluación de la veracidad del método	58
	4.2.2 Evaluación de la precisión del método	62
	4.2.3 Evaluación de la exactitud del método	64
	4.2.4 Evaluación de la linealidad del método	64
	4.2.5 Determinación de los límites de detección y cuantificación del método	69
	4.2.6 Determinación de los factores de robustez del método	71
	4.2.7 Evaluación de la selectividad – especificidad	74
	4.2.8 Estimación de la incertidumbre del método	77
4.3	Conclusiones finales	8
	Bibliografía.	84
	Anexos	87

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Pag.

Gráfico Nº 1.1.	Mapa Conceptual del Aseguramiento de la Calidad	4
Gráfico Nº 1.2	Conceptos de Precisión, Veracidad y Exactitud de resultados de ensayo	5
Gráfico Nº 1.3	Anatomía Interna de la Concha de Abanico	9
Gráfico Nº 1.4	Estados de Desarrollo de la Concha de Abanico	10
Gráfico Nº 1.5	Producción de la Concha de Abanico	11
Gráfico Nº 1.6	Exportaciones de Conchas de Abanico del Perú de 1993 a 2006	12
Gráfico Nº 1.7	Principales Países de destino de las Exportaciones de Conchas de Abanico del Perú. 1998-2003	13
Gráfico Nº 1.8	Principales Regiones de Destino de las Exportaciones de Conchas de Abanico del Perú (1990-2003)	14
Gráfico Nº 1.9	Estructuras Químicas de las toxinas PSP	16
Gráfico Nº 1.10	Estructuras Químicas de las Yesotoxinas y de la Adriatoxina.	20
Gráfico Nº 1.11	Estructuras Químicas del Acido Ocadaico, de las Dinofisistoxinas y de las Pectenotoxinas	20
Gráfico Nº 1.12	Estructuras Químicas del Acido Domóico y sus Isómeros	22
Gráfico Nº 1.13	Estructuras Químicas del las Brevetoxinas A y B	24
Gráfico Nº 1.14	Estructuras Químicas de los análogos de las Brevetoxinas BTX-B1, -B2 y -B4 aisladas de mariscos contaminados	24
Gráfico Nº 1.15	Estructuras Químicas del análogo de la Brevetoxinas aislada de mariscos contaminados	25
Gráfico Nº 1.16	Estructuras Químicas de las azaspiracidas	27
Gráfico Nº 1.17	Equipo HPLC	31

Gráfico N° 4.1	Resultados de la prueba de Normalidad Anderson-Darling de las réplicas de los dos analistas	53
Gráfico N° 4.2	Gráfico de Normalidad de la Réplicas realizadas de Acido Domoico del analista 1	55
Gráfico N° 4.3	Gráfico de Normalidad de las Réplicas realizadas de Acido Domoico del analista 2	55
Gráfico N° 4.4	Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene de réplicas realizadas por los dos analistas	56
Gráfico N° 4.5	Gráfico de la prueba de Normalidad Anderson –Darling de los residuos de la curva global de calibración	68
Gráfico N° 4.6	Recta de calibración de los estándares de acido domoico de 0,5 mg/L ; 0,75 mg/L y 1 mg/L de ácido domoico	69
Gráfico N° 4.7	Cromatograma 1. Estándar	74
Gráfico N° 4.8	Cromatograma 2. Muestra	75
Gráfico N° 4.9	Cromatograma 3. Comparación de los cromatogramas del estándar, muestra (concha de abanico) y muestra mas adición estándar.	75
Gráfico N° 4.10	Cromatograma 4. MRC Mus-c	76
Gráfico N° 4.11	Cromatograma 5. Tratamiento 12 hs UV	76
Gráfico N° 4.12	Cromatograma 6. Tratamiento 24 hs UV. Degradación artificial (fotólisis) a MRC Mus-c	77

ÍNDICE DE CUADROS

Pag.

Cuadro Nº 2.1	Valores aceptables de recuperación según la AOAC, en función de la concentración del analito (AOAC, 1993; Huber, 1999)	33
Cuadro Nº 2.2	Diseño experimental de Youden Steiner	41
Cuadro Nº 2.3	Componentes de incertidumbre	43
Cuadro Nº 2.4	Componentes de la incertidumbre de la verificación de trazabilidad	44
Cuadro Nº 2.5	Estimación del componente de la incertidumbre debida la heterogeneidad	44
Cuadro Nº 4.1	Esquema para verificar la similaridad de los resultados de dos analistas	52
Cuadro Nº 4.2	Resultados de la prueba de Grubbs de las réplicas de los dos analistas	53
Cuadro Nº 4.3	Resultados de Acido Domoico de las réplicas realizadas por los dos analistas	54
Cuadro Nº 4.4	Resultados de la prueba de Mann-Whitney de réplicas realizadas por los dos analistas	57
Cuadro Nº 4.5	Resumen de los resultados obtenidos para el estudio de veracidad mediante porcentaje de recuperación para el analista 1	58
Cuadro Nº 4.6	Resumen de los resultados obtenidos para el estudio de veracidad mediante porcentaje de recuperación para el analista 2	59
Cuadro Nº 4.7	Promedio de las recuperaciones de los dos analistas	59
Cuadro Nº 4.8	Resumen de los resultados de porcentaje de recuperación obtenidos por el método de adición estándar	60
Cuadro Nº 4.9	Cuadro de recuperaciones aceptables para verificar la veracidad del la guía de validación de LABCOMPLAINCE	61
Cuadro Nº 4.10	Cuadro resumen de recuperaciones para verificar la veracidad del método	61
Cuadro Nº 4.11	Repeticiones de cada analista del MRC Mus-c	62
Cuadro Nº 4.12	Valores del RSDr y el RSDR y el RSD Horwitz de las repeticiones de cada analista del MRC Mus-c	62
Cuadro Nº 4.13	Valores del RSDr de las adiciones estándares de ácido domoico	63
Cuadro Nº 4.14	Valores del RSDr de las repeticiones del MRC-Mus-c y	63

	de las adiciones estándares	
Cuadro N° 4.15	Valores de los límites de repetibilidad y reproducibilidad del método	63
Cuadro N° 4.16	Valores de la primera curva de calibración para la determinación de ácido domoico	65
Cuadro N° 4.17	Valores de la segunda curva de calibración para la determinación de ácido domoico	65
Cuadro N° 4.18	Valores de la tercera curva de calibración para la determinación de ácido domoico	66
Cuadro N° 4.19	Valores para realizar la curva global de calibración	66
Cuadro N° 4.20	Valores de los estadísticos de la curva de calibración global.	66
Cuadro N° 4.21	Análisis de Varianza de la regresión	67
Cuadro N° 4.22	Intervalos de confianza de la curva global de calibración.	67
Cuadro N° 4.23	Residuos de la curva global de calibración	67
Cuadro N° 4.24	Valores del RSD de las repeticiones de las áreas obtenidas al leer las concentraciones estándares de ácido domoico de 0,5 mg/L ; 0,75 mg/L y 1 mg/L de ácido domoico	69
Cuadro N° 4.25	Determinación de los límites de detección y cuantificación del método	71
Cuadro N° 4.26	Factores de Variabilidad para el Estudio de Robustez	72
Cuadro N° 4.27	Combinaciones y resultados de análisis de robustez	72
Cuadro N° 4.28	Efectos de los factores del análisis de robustez	73
Cuadro N° 4.29	Valores de los Efectos de los factores del análisis de robustez y el efecto máximo permisible	76
Cuadro N° 4.30	Componentes de incertidumbre	78
Cuadro N° 4.31	Esquema para la determinación de la incertidumbre debida a la precisión del método	79
Cuadro N° 4.32	Componentes de la incertidumbre de la trazabilidad	80
Cuadro N° 4.33	Valor del componente de la incertidumbre de la trazabilidad.	80
Cuadro N° 4.34	Valor del componente de la incertidumbre debida a la heterogeneidad	81
Cuadro N° 4.35	Valores de los componentes de la incertidumbre en la determinación de Ácido domoico por HPLC	81
Cuadro N° 4.36	Contribución de los componentes de incertidumbre a la incertidumbre total	82

ANTECEDENTES

El proceso de validación durante los últimos años ha sufrido una implementación enorme de parámetros metrológicos. Los únicos parámetros verificados a comienzos de los 90' eran la veracidad y la precisión (ISO 5725- 2 1994).

Posteriormente EURACHEM publicó su guía de validación (The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics-1998) en la cual los parámetros de validación se incrementaban: Límite de detección del Método, límite de cuantificación del método, sensibilidad y robustez. Pero lamentablemente no expresaban metodologías estadísticas para la verificación del cumplimiento de los parámetros de validación analíticas.

Posteriormente la AOAC Internacional publica su guía de validación para métodos cuantitativos y cualitativos (Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for methods Validation-1999) en el cual describe pruebas estadísticas paramétricas para la validación de métodos analíticos.

Posteriormente la FAO (Basic Statistical Tools and Quality of analytical Procedures–2000) incrementa los parámetros de validación incluyendo la incertidumbre de los resultados de ensayo.

El 2 de febrero del 2003 INDECOPI promulga en el diario El Peruano la Res. N° 0008-2003/INDECOPI-CRT, que es una guía de validación de métodos de ensayo y las directrices para la implementación y evaluación de métodos de ensayo sensoriales. En dicha resolución se especifica los parámetros que tendremos que verificar en todo proceso de validación de métodos analíticos, pero lamentablemente no especifica que pruebas estadísticas se utilizarán en dichas verificaciones.

El Instituto Nacional de Metrología, Normalización y Calidad Industrial (INMETRO), organismo brasileño con las mismas funciones que INDECOPI en su país, publica una guía de validación contemplando pruebas estadísticas paramétricas para todos los parámetros de validación (Orientaciones sobre Validación de métodos de ensayo químicos. DOQ – CGCRE – 008 – 2003).

Actualmente los laboratorios de ensayo a nivel nacional no tienen una guía de validación donde se establece las pruebas estadísticas que se utilizarán para verificar los parámetros de validación. El INDECOPI nos deja al libre albedrío el uso de técnicas estadísticas para estos fines.

Ante esta necesidad la presente tesis contempla delinear una metodología estadística para verificar la validación técnicas analíticas, teniendo como marco normativo la ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”.

INTRODUCCION

Debido a la necesidad de mejorar o adaptar metodologías analíticas a la coyuntura comercial, los diferentes laboratorios de ensayos desarrollan nuevos métodos de ensayo para reemplazar a los ya existentes, con el afán de minimizar costos, tiempo, etc. Instituciones internacionales como FAO, EURACHEM, AOAC, definen parámetros que el proceso de validación debiera de cumplir. Nuestra institución tutelar en este rubro, INDECOPI, también menciona dichos lineamientos, pero no formula ninguna metodología estadística como soporte de verificación del cumplimiento de estos parámetros.

El presente trabajo de investigación permitirá tener una guía práctica para evaluar los parámetros de validación de métodos cuantitativos de ensayo mediante una metodología estadística, de acuerdo a las actuales normas de calidad que exige el entorno competitivo y validar el método de determinación de Acido Domoico en conchas de abanico.

Para lograr el objetivo planteado es importante, en primer lugar especificar los parámetros de validación en métodos de ensayos, luego es importante asociarlos a diferentes estadísticos de inferencia que nos servirán para verificar los el cumplimiento de los parámetros de validación por parte del método de ensayo.

Seguidamente se presentará la aplicación de dicha metodología con datos reales provenientes del Laboratorio Instrumental de Certificaciones del Perú S.A.

Ante esta necesidad la tesis se orienta desarrollar una metodología estadística para la verificación de parámetros de validaciones de pruebas cuantitativas. Esta metodología tiene su aplicación en la validación de la determinación de Ácido Domoico en conchas de abanico por HPLC.

Esta Metodología estadística pretende demostrar que los resultados obtenidos de la determinación de Ácido Domoico en conchas de abanico por HPLC son confiables, según la ISO/EIC 17025. Siendo dichos resultados repetibles, reproducibles, veraces y precisos por lo tanto exactos y responden a los principios experimentales de repetibilidad, reproducibilidad, veracidad, acorde con la ISO/IEC 5725 y los parámetros de validación normados por INDECOPI establecidos en la Res. N° 0008-2003/INDECOPI-CRT.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 LA VALIDACIÓN DE ENSAYOS DE LABORATORIO EN EL MARCO DE LA ISO / EIC 17025.

1.1.1 Entorno actual de los laboratorios de ensayo

Hoy en día, la calidad se utiliza como sello de garantía de cualquier producto industrial. El cliente actual busca que el producto que se dispone a comprar cumpla con una serie de especificaciones y que haya sido producido bajo controles que aseguren su calidad.

La ISO define a la calidad **“conjunto de propiedades o características de un producto o servicio que le confieren aptitud para satisfacer unas necesidades expresadas o implícitas”**.¹

Según esta definición, cuando se utiliza la expresión “de buena calidad” se pretende remarcar la excelencia de un producto o servicio y el cumplimiento de las especificaciones, cualitativas o cuantitativas, acordadas previamente con el cliente y/o definidas por la autoridad competente.

¹ Definición de la Norma ISO 8402

En los tiempos actuales el concepto de calidad va tomando cuerpo en muchas de las actividades humanas. El laboratorio de ensayos no es la excepción. Las crecientes exigencias de calidad de los productos y la necesidad de optimización del proceso productivo hacen necesario disponer de métodos de análisis rápidos y fiables.

Cada actividad humana genera productos con un determinado valor económico. En el caso de los laboratorios, este producto es la información cualitativa o cuantitativa que se obtiene respecto al resultado de ensayo de la muestra a analizar.

El concepto de Calidad se relaciona estrechamente con las buenas prácticas profesionales y la satisfacción del cliente. Para aplicar y sistematizar estas buenas prácticas en todos los sectores del laboratorio es conveniente implementar un adecuado Sistema de Calidad, que asegure una óptima relación laboratorio / cliente.

La estadística aplicada y los conceptos generales de Gestión de Calidad, integran la base indispensable para la construcción del Sistema de Calidad del laboratorio. Puede decirse entonces que esta rama de las matemáticas es el instrumento que "mide" la calidad de los resultados analíticos, siguiendo siempre los lineamientos generales de la norma internacional ISO/IEC 17025, máximo referente en cuanto a requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

El objetivo es brindar una información con mayor credibilidad, útil para la toma de decisiones en el marco económico y comercial de las muestras analizadas.

Es necesario que los ensayos de los laboratorios cumplan determinados requisitos que garanticen la calidad de su desarrollo y a la vez, brinden información sobre las características de la muestra analizada.

La NTP ISO/EIC 17025-2006 ha sido producida como resultado de una amplia experiencia en la implementación de la Guía Peruana GP-ISO/IEC 25:1993 y en la EN 45001 las cuales son ahora reemplazadas. Esta contiene todos los requisitos que los laboratorios de ensayo y calibración tienen que reunir si es que ellos desean demostrar que operan un sistema de la calidad, que son técnicamente competentes y que son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

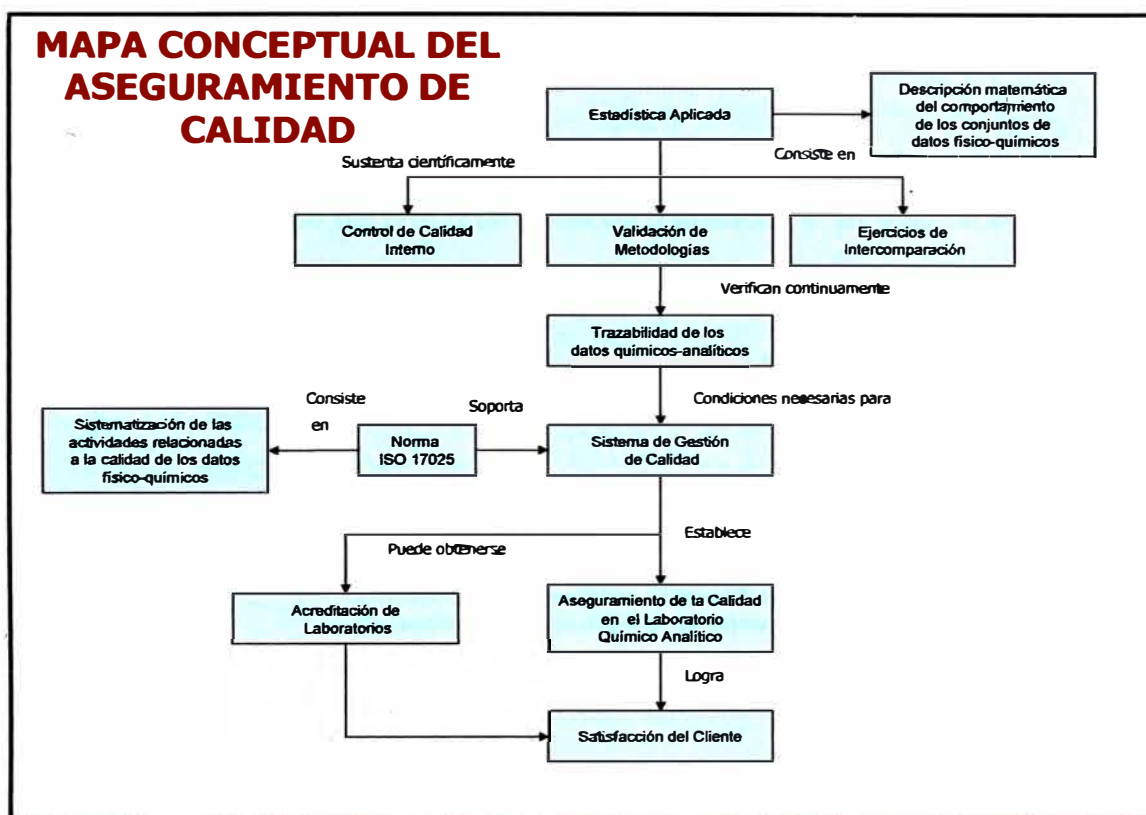
1.1.2 Validación de Métodos de Ensayo

Es fundamental que los laboratorios dispongan de medios y criterios objetivos para demostrar, a través de la validación, que los métodos de ensayo que se ejecutan conducen a resultados confiables y adecuados para la calidad pretendida. Si un método existente fue modificado para atender los requisitos específicos, o un método nuevo es desarrollado, el laboratorio debe asegurarse de que las características de desempeño de un método de ensayo atienden los requisitos para las operaciones analíticas pretendidas.

La validación de un método de ensayo es un proceso mediante el cual se define requisitos analíticos, que aseguran que el método de ensayo bajo ciertas consideraciones ha desarrollado capacidades consistentes con la aplicación requerida.²

2 (EURACHEM Guide. The fitness for purposes of analytical methods)

Gráfico N° 1.1
Mapa Conceptual del Aseguramiento de la Calidad



Un método de ensayo se valida cuando es necesario verificar que los parámetros ejecutados son los adecuados para resolver un problema analítico en particular.

El laboratorio debe validar:

- Los métodos de ensayo no normalizados³.
- Los métodos de ensayo normalizados modificados, ampliados o aplicados a un alcance diferente al originalmente establecido en la norma.

³ Se denomina métodos normalizados a aquellos métodos de ensayo desarrollados y publicados por organismos de normalización u otras organizaciones cuyos métodos son aceptados por el sector técnico en cuestión. Por ejemplo: ASTM, AOAC, ISO, ANSI, APHA *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*.

- Cuando se requiera demostrar la equivalencia entre dos métodos de ensayo.

1.1.3 Parámetros de Validación exigidos por el Instituto Nacional de Defensa del Consumidor y de la Propiedad Intelectual (INDECOPI).

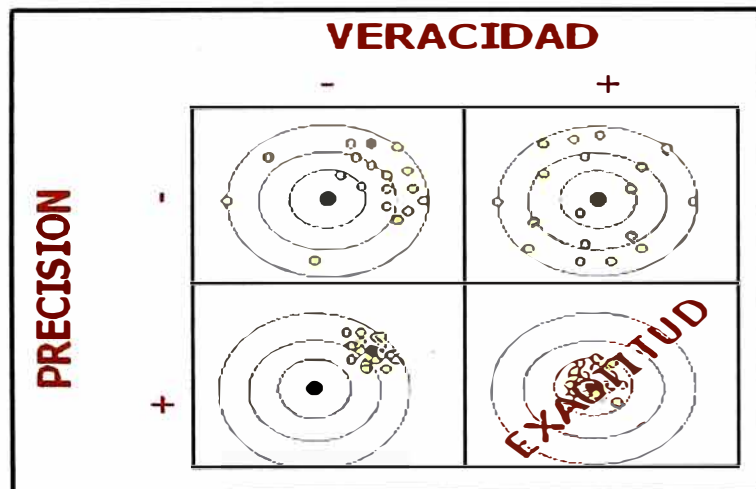
1.1.3.1 Veracidad: Grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor aceptado como referencia.

(ISO 5725 - 1)

1.1.3.2 Precisión: Grado de coincidencia existente entre los resultados independientes de un ensayo, obtenidos en condiciones estipuladas.

(ISO 5725 - 1)

Gráfico N° 1.2.
Conceptos de Precisión, Veracidad y
Exactitud de resultados de ensayo.



- *La precisión depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios y no está relacionada con el valor verdadero o especificado.*

- *La precisión depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios y no está relacionada con el valor verdadero o especificado.*
- *La precisión se expresa generalmente en términos de falta de precisión, calculándose a partir de la desviación típica de los resultados. A mayor desviación típica menor precisión.*
- *“Resultados de ensayos independientes” significa resultados obtenidos sin que exista influencia de un resultado previo sobre el mismo objeto o similar de ensayo. La expresión cuantitativa de la precisión depende en forma crítica de las condiciones estipuladas. Las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad son conjuntos particulares de condiciones extremas.*

1.1.3.2.1 Precisión Intermedia. *La precisión intermedia expresa la variación dentro del laboratorio: diversos días, diversos analistas, diverso equipo, etc.*

1.1.3.2.2 Repetibilidad. *Precisión bajo condiciones de repetibilidad.*

1.1.3.2.3 Reproducibilidad. *Precisión bajo condiciones de reproducibilidad.*

1.1.3.2.4 Condiciones de repetibilidad. *Condiciones bajo las que se obtienen resultados independientes, con el mismo método, sobre idénticas muestras, en el mismo laboratorio, por el mismo operador y utilizando los mismos equipos de medición, durante un corto intervalo de tiempo.*

1.1.3.2.5 Condiciones de reproducibilidad. *Condiciones bajo las que se obtienen resultados independientes, con el mismo método, sobre idénticas muestras, en el mismo laboratorio, por diferentes operadores y utilizando los diferentes equipos de medición, durante un corto intervalo de tiempo.*

- 1.1.3.3 Exactitud:** Grado de concordancia existente entre el resultado del ensayo y un valor aceptado de referencia.
(ISO 5725 - 1)
- 1.1.3.4 Selectividad/Especificidad:** Es el grado por el cual un método puede determinar un analito particular dentro de una mezcla compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla.
(EURACHEM – Guide The fitness for purpose of analytical methods)
- 1.1.3.5 Límite de Detección del Método (LDM) y Límite de Cuantificación del Método (LCM):**
- 1.3.5.1 LDM:** Es la menor cantidad de un analito en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.
(EURACHEM – Guide The fitness for purpose of analytical methods)
- 1.3.5.2 LCM:** Es la concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud.
(EURACHEM – Guide The fitness for purpose of analytical methods)
- 1.1.3.6 Linealidad:** Es la relación entre la concentración de analito y respuesta del método. Esta relación, denominada comúnmente curva patrón o curva de calibración.
Define la capacidad del método para obtener los resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.
(EURACHEM – Guide The fitness for purpose of analytical methods)
- 1.1.3.7 Rango de Trabajo:** Es el intervalo entre la más alta y más baja concentración del analito de la muestra, para la cual se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel apropiado de precisión, veracidad y linealidad.

(Text on validation of analytical procedures. ICH Harmonized Tripartite Guideline)

1.1.3.8 Sensibilidad: Es el cambio en la respuesta de un instrumento de medida dividido por el cambio correspondiente en el estímulo.

(Text on validation of analytical procedures. ICH Harmonized Tripartite Guideline)

1.1.3.9 Robustez: Es la medida de la resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones en el procedimiento.

(EURACHEM Guide The fitness for purpose of analytical methods)

1.1.3.10 Incertidumbre: Un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser atribuidos razonablemente al mensurando.

(EURACHEM – Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas)

1.2 LOS MOLUSCOS BIVALVOS EN EL PERU

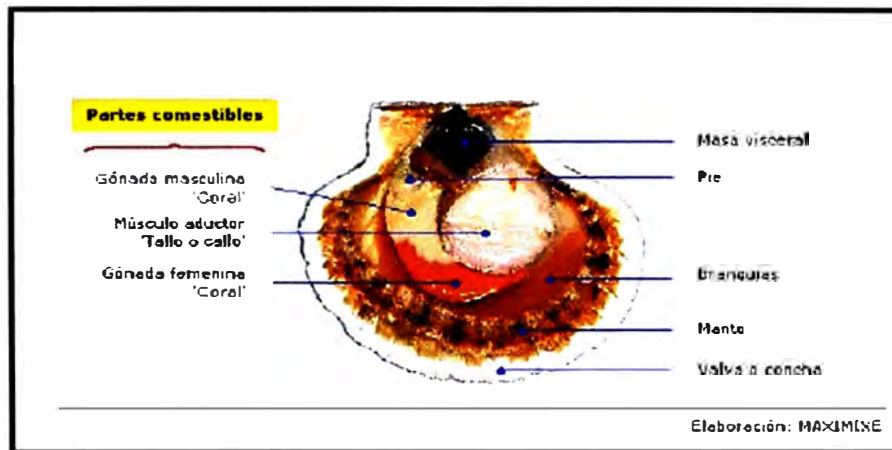
1.2.1 Generalidades

La Concha de Abanico es un molusco filtrador de 2 valvas, conocida científicamente como *Argopecten Purpuratus*, pertenece a la familia Pectinidae, la misma que engloba un gran número de especies conocidas internacionalmente como 'vieiras'.

La especie *Argopecten Purpuratus* habita en zonas costeras que se extienden desde Panamá hasta Coquimbo (Chile), entre profundidades que van desde los 5 m hasta los 30 m, y bajo temperaturas que oscilan entre los 13° y 28 °C. Esta especie se caracteriza por desovar durante todo el año, función que se acentúa con el aumento de la temperatura marina (ej: Fenómeno de El Niño). Actualmente las principales áreas de cultivo de conchas de abanico se encuentran en las costas de Ancash, en zonas como Samanco y Guaynumá,

entre otros; mientras que en Lima, sobresale la zona de Pucusana. Asimismo, destacan bancos naturales ubicados en Pisco, Paracas, Sechura (Piura), Lobos de Tierra (Lambayeque), Bahía de Independencia e Isla San Lorenzo (Lima).

Gráfico N° 1.3
Anatomía Interna de la Concha de Abanico.



1.2.2 Maricultura de conchas de abanico: origen y su importancia en el Perú

Si bien el inicio de la acuicultura de conchas de abanico se remonta a la década del '70 -como parte de programas experimentales-, fue recién en los '80 cuando adquirió enorme interés.

La presencia del fenómeno de El Niño en 1982-1983 incrementó masivamente la población de conchas de abanico, situación que conllevó a la rápida explotación del recurso con fines comerciales (principalmente para el mercado externo), empero este 'boom' fue diluyéndose con el paso de los efectos de dicho fenómeno.

Gráfico N° 1.4
Estados de Desarrollo de la Concha de Abanico



Fue a partir de entonces que surgió la necesidad de mantener una producción de conchas de abanico sostenida, cuya disponibilidad (en abundancia) no dependiera de situaciones coyunturales en su medio natural. De esta forma se propició el desarrollo de cultivos en el mar (o maricultura) como alternativa para la explotación permanente y racional de la especie.

La maricultura, además de ir de la mano con la preservación y el repoblamiento del recurso, ofrece enormes ventajas al permitir controlar los procesos naturales de las conchas de abanico, sin alterarlos, pero sacando de ellos el mayor provecho posible, obteniéndose así favorables resultados tanto biológicos como económicos.

Según estimaciones de la SNP, cada 100 hectáreas de cultivo de conchas de abanico demanda una inversión de US\$ 2 millones, y produce cerca de 140 TM anuales, generando empleos directos para más de 200 personas.

Aunque el cultivo de conchas de abanico en el Perú es relativamente joven, se estima que en la actualidad su producción ya habría superado a la de extracción silvestre.

Gráfico N° 1.5
Producción de la Concha de Abanico



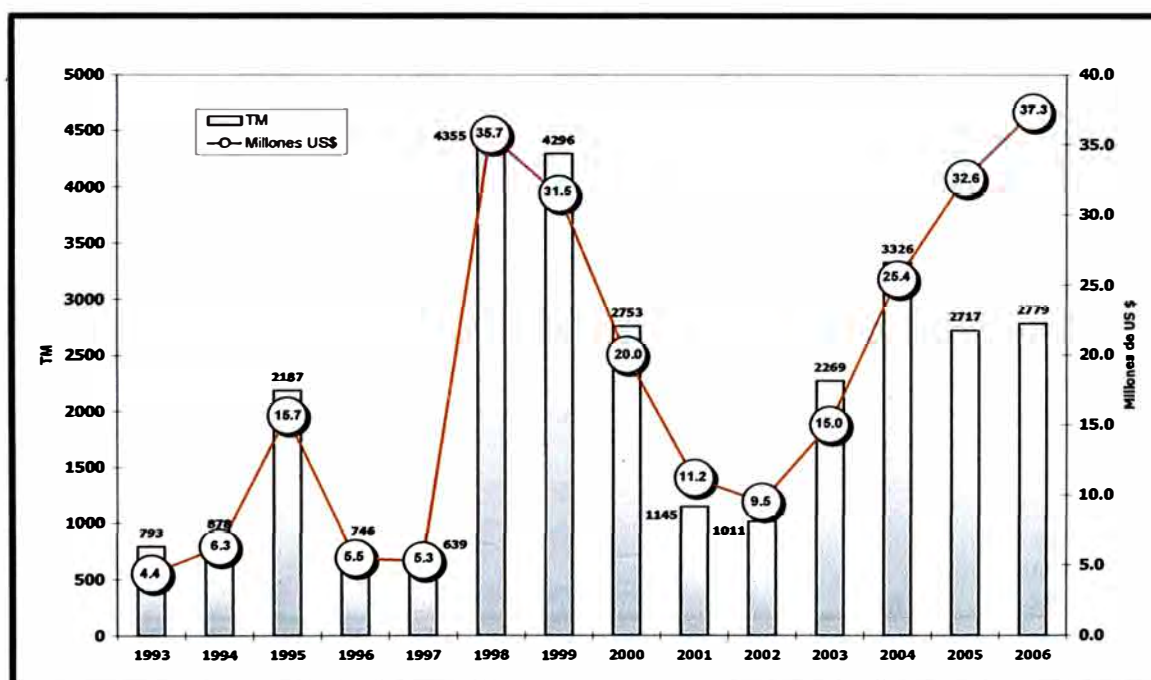
La maricultura de conchas de abanico apunta a seguir expandiéndose, en línea con la actual tendencia mundial de consumo de productos hidrobiológicos, que demanda sobre todo productos acuícolas frente aquellos provenientes de la extracción silvestre, dado que los primeros garantizan seguridad en términos sanitarios y de sostenibilidad.

1.2.3 Exportaciones con tendencia al alza

En el 2003 las ventas al exterior de conchas de abanico crecieron 57,9% hasta los US\$ 15 millones, ante el significativo aumento de los volúmenes enviados (124,4%), que contrarrestó el descenso en los precios promedio de exportación (-29,3%).

Las exportaciones en valores proseguirían con su senda expansiva, aunque podría desacelerarse, frenada por los bajos precios promedio, reflejo del incremento de la competencia asiática, más aún cuando Japón viene aumentando su penetración en el mercado europeo.

Gráfico N° 1.6
Exportaciones de Conchas de Abanico del Perú de 1993 a 2006.



1.2.4 Francia y EEUU principales destinos de exportaciones peruanas

Del total exportado en valores en el 2003, el 55,8% se destinó a Francia, mientras que 23,9% se dirigió a EEUU, destacando éste último por su elevado dinamismo (226,3%), ante los mayores volúmenes embarcados (413,1%).

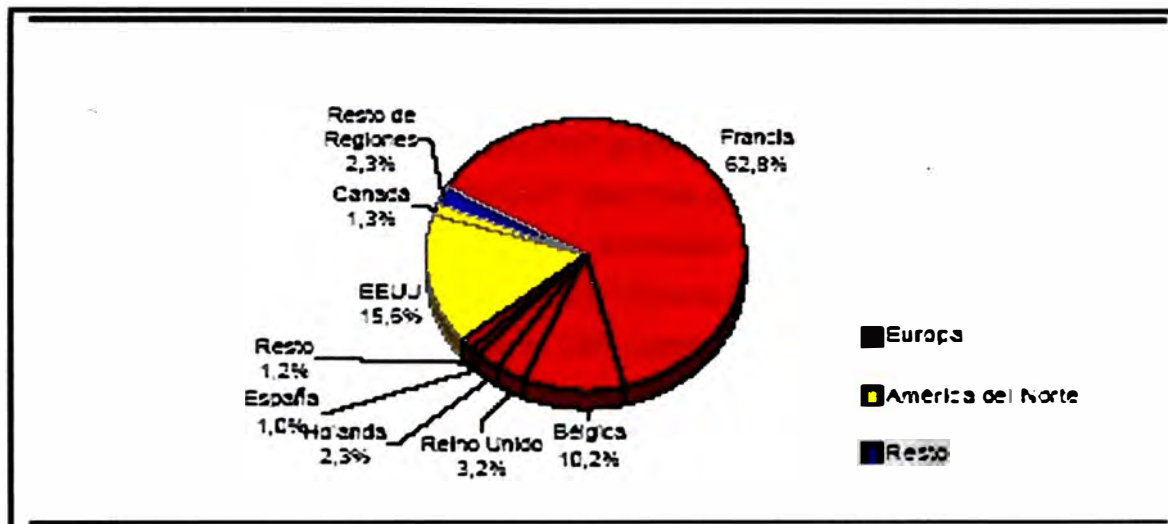
Ambos mercados son a la vez los principales demandantes de vieiras en el mundo, sin embargo la participación de las exportaciones peruanas en Francia y EEUU, son poco representativas con relación a las importaciones de cada uno de dichos países, 5,3% y 0,8%, respectivamente.

Gráfico N° 1.7

Principales Países de destino de las Exportaciones de Conchas de Abanico del Perú. 1998-2003

Países	Miles de US \$			Participación (%)		Tasa de Crec. (%)	
	1998	2000	2003	98-03	2003	98-03	2003
Francia	25689	11492	8394	62.8	55.8	13.1	13.4
EEUU	3849	3721	3596	15.6	23.9	54.7	226.3
Bélgica	5668	1048	2136	10.2	14.4	15.7	1322.5
Reino Unido	150	1188	-	3.2	-	-	-
Holanda	-	349	-	2.3	-	-	-
Canadá	-	166	454	1.3	3	89.2	877.5
Australia	-	697	280	1.3	1.9	-	-
España	121	362	-	1	-	-43.6	-
Suiza	-	216	-	0.9	-	-	-
Nueva Zelanda	-	177	-	0.2	-	-	-
Taiwán	-	54	-	0.2	-	-68.2	-
Suecia	-	0	156	0.2	1	63	-
Italia	78	44	-	0.2	-	-	-
Brasil	-	200	-	0.2	-	-	-
México	-	94	-	0.1	-	-	-
Venezuela	-	16	-	0.1	-	-	-
Japón	-	55	-	0.1	-	-10.9	-
Resto	152	132	2	0.3	0	-27.5	-91.1
Total	35709	20011	15045	100	100	18.9	58.8

Gráfico N° 1.8
Principales Regiones de Destino de las Exportaciones
de Conchas de Abanico del Perú (1990-2003).



1.3 LAS TOXINAS MARINAS EN LOS MOLUSCOS BIVALVOS

1.3.1 Generalidades

En el mar existen unas 4000 especies del fitoplancton microscópico. De estas, hay unas 300 especies que crecen en concentraciones elevadas del orden de 20000 células por mililitro de agua. Suelen dar un color rojizo, y son conocidas como "mareas rojas". La mayoría de estos microorganismos son de tipo dinoflagelados. Los dinoflagelados son microorganismos unicelulares móviles propulsados por flagelos, se reproducen de forma asexual, realizan la fotosíntesis y mayormente son autótrofos. Muchos dinoflagelados pueden entrar en una fase inmóvil formando quistes en el fondo marino siendo bastante resistentes, y vuelven a germinar cuando llegan unas condiciones favorables de crecimiento (Shibamoto y Bjeldanes, 1996).

Existen alrededor de 60 especies de microalgas que producen sustancias tóxicas (ficotoxinas) en el ser humano. Estas sustancias tóxicas son absorbidas mediante filtración (alrededor de 30 litros de agua al día) por los bivalvos (ostras, mejillones, vieiras, almejas) y llegan a nosotros mediante su

consumo. Estas toxinas marinas suelen ser resistentes a la cocción y pueden producir diarreas, parálisis, amnesia, etc. (Lindner, 1994).

Se distinguen 5 grupos de toxinas en los bivalvos:

- Toxinas marinas paralizantes PSP (paralytic seafish poison)
- Toxinas marinas diarreicas DSP (diarrhea seafish poison)
- Toxinas marinas amnésicas ASP (amnesiac seafish poison)
- Toxinas marinas neurotóxicas NSP (neurotoxic seafish poison)
- Toxinas marinas azaspirácidas AZP (azaspiracid poison)

Estas toxinas marinas alteran dos propiedades esenciales. La primera es la de no permitir una buena permeabilidad celular de iones como el sodio, potasio, calcio, cloruro ni tampoco de agua y nutrientes. Y la segunda es la de alterar la intercomunicación entre células debido a una alta afinidad de unión de la toxina a los receptores de membrana (Shibamoto et al. 1996).

1.3.2 INTOXICACIÓN PARALIZANTE DE LOS MARISCOS (PSP)

Los dinoflagelados que causan estas toxinas son las del género *Alexandrium* (*A. tamarensis*, *A. minutum*, *A. catenella*, etc.) conocido también como *Gonyaulax*. Las toxinas PSP son un grupo de 21 tetrahidropurinas. La saxitoxina es la más tóxica y la primera que se sintetizó (un derivado cristalino) en 1975. (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004)

1.3.2.1 Propiedades químicas y estructura

Los compuestos de la tetrahidropurina (un anillo de perhidropurina y dos de guanidina) se dividen en cuatro grupos (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004):

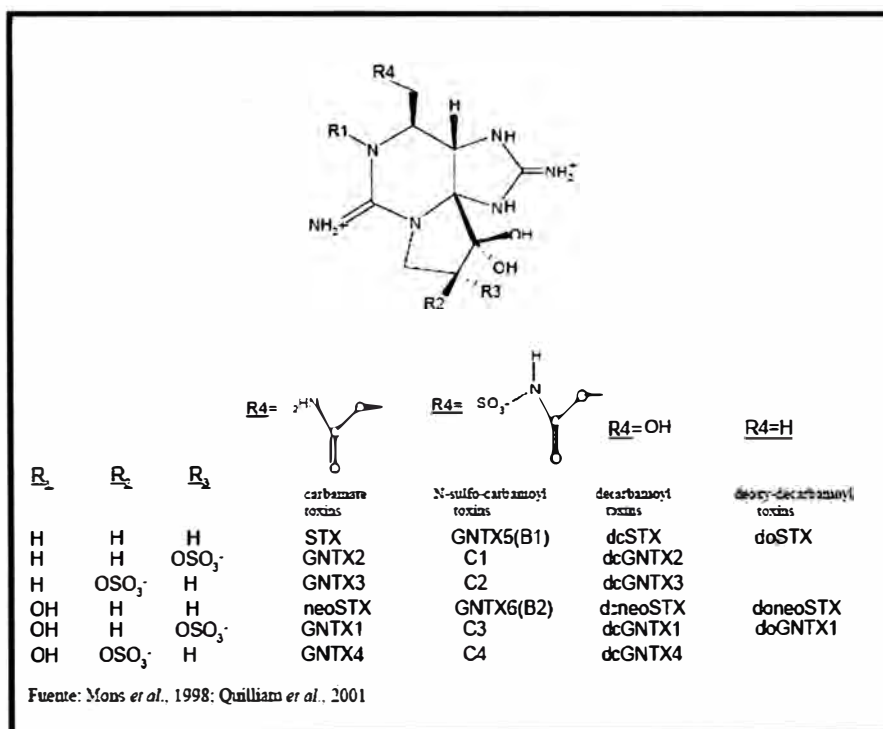
- a. Carbamato. Tenemos la saxitoxina, neosaxitoxina y las gonyautoxinas del uno al cuatro.

- b. N-sulfo-carbamoil. Tenemos gonyautoxina cinco y seis y gonyautoxina C1, C2, C3 y C4.
- c. Decarbamoil (dc). Las mismas que las del grupo uno pero en lugar de un grupo carbamato tenemos un grupo hidroxilo.
- d. Desoxidecarbamoil (do). Tenemos do-saxitoxina, doneo-saxitoxina, do-gonyautoxina 1.

La actividad tóxica se encuentra en el grupo dihidroxi del anillo heterocíclico de cinco carbonos.

Son estables a pH ácido e inestables en medio básico donde se oxidan fácilmente: están ionizados positivamente en sus grupos amino.

Gráfico N° 1.9
Estructuras Químicas de las toxinas PSP



1.3.2.2 Método de análisis

El método tradicional es el bioensayo en ratones. El procedimiento era inyectarles intraperitonealmente 1 ml de extracto de moluscos a ratones de 20 gramos de peso. El nivel de dilución que les ocasionaba la muerte en 15 minutos se definió como unidad ratón (UR) equivalente a 0,18 microgramos de saxitoxina. La dosis mínima letal para el ser humano es de 4 mg, siendo para una dosis de 1 mg intoxicación leve. (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004)

También se realizan ensayos *in vitro* con cortes de hipocampo y mediante el bloqueo de canales de sodio.

Se pueden realizar también inmunoensayos ELISA de absorción enzimática mediante la interacción antígeno anticuerpo.

Análisis químicos caben destacar las técnicas fluorométricas y calorimétricas, técnicas de cromatografía, de electroforesis y espectrometría de masas.

1.3.2.3 Disponibilidad y mecanismos

La filtración transporta las células de dinoflagelados al esófago y estómago de los moluscos. Allí las toxinas se liberan y entran a los órganos digestivos. El mayor porcentaje de toxicidad se encuentra en las vísceras (alrededor de un 96%). Una vez que se han absorbido estas toxinas pueden sufrir algún tipo de biotransformación. Por ejemplo la epimeración de la saxitoxina entre un hidrogeno y un grupo sulfónico disminuye la toxicidad. O la separación de un grupo sulfato mediante hidrólisis ácida aumentando la toxicidad.

Algunos bivalvos tienen mayor tendencia a eliminar estas toxinas rápidamente antes que otros.

Por ejemplo algunos tipos de vieira tienen gran capacidad de acumular toxinas con una tasa de eliminación lenta. También por ejemplo los mejillones acumulan más toxinas que las ostras.

Los mecanismos de acción de la saxitoxina son muy parecidos a los de la tetrodotoxina. Ambos bloquean selectivamente los canales de sodio dependientes de voltaje, que se encuentran en el músculo esquelético y cardíaco, impidiendo la propagación del potencial de acción. El tiempo de bloqueo depende de la velocidad de disociación de la toxina pero la duración de la apertura del canal es función de la concentración. (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004)

El ser humano absorbe la toxina a través del tracto gastrointestinal y la ruta de eliminación principal es la orina. Los síntomas pueden aparecer a los pocos minutos de ingerirlos y suelen derivar en insensibilidad en los labios, manos y pies dificultando la movilidad e incluso llegar al coma o la muerte. La barrera hematoencefálica no se ve afectada ya que las moléculas de saxitoxina son hidrosolubles.

Las PSP con grupos N-sulfocarbamoil son menos tóxicas pero si en condiciones ácidas (jugos gástricos de ratón manipulados a pH 1,1) se transforman en grupos carbamoil su toxicidad aumenta considerablemente.

1.3.2.4 Reglamentación en Europa

La Unión europea ha establecido el límite de toxinas PSP en 80 microgramos equivalentes de saxitoxina por cada 100 g de producto. Y estableció el tratamiento térmico como método de eliminación

parcial para ser más tarde comercializable y apta para su consumo. Los síntomas leves se deben a valores del orden de 120-300 microgramos de STX por persona. (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004)

1.3.3 INTOXICACIÓN DIARREICA DE LOS MARISCOS (DSP)

Las toxinas DSP se acumulan en el tejido adiposo de los bivalvos.

1.3.3.1 *Propiedades químicas y estructura*

Son sustancias liposolubles y se clasifican en tres grupos:

En el primer grupo están el ácido ocadaico (AO) y sus derivados las dinofisistoxinas (DTX). Estas toxinas inhiben la actividad enzimática de la serina-treonina fosfatasa, que esta relacionada con la inflamación del tracto intestinal y la diarrea. El AO, la DTX 1 y la DTX 2 pueden estar aciladas con una serie de ácidos grasos saturados e insaturados desde el C 14 al C 18.

El segundo grupo de toxinas están compuestas por lactonas polieter del grupo de las pectenotoxinas (PTX) de las que se conocen 10.

El tercer grupo esta formado por un compuesto sulfatado, la yesotoxina (YTX), un polieter tipo brevetoxina y su derivado la 45-hidroxiyesotoxina (45-OH-YTX). Se ha observado en ratones que la yesotoxina no causa diarrea y si esta desulfatada daña el hígado.

1.3.3.2 Métodos de análisis

Los métodos más utilizados aquí también es el bioensayo en ratones. Los métodos analíticos utilizados son la cromatografía líquida con detección fluorométrica, acopladas a espectrometría de masas, inmunoensayos y ensayos de inhibición de la fosfatasa. (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004)

1.3.3.3 Disponibilidad y mecanismos

Los mariscos acumulan fácilmente estas toxinas diarreicas pero se desconoce el tiempo de retención. El orden de toxicidad varía, el mejillón es el más tóxico seguido de las vieiras y luego las ostras. El componente tóxico principal es el ácido ocadaico. Este provoca una contracción de larga duración en el músculo liso ya que inhibe la fosfatasa de la miosina.

Los niveles de toxicidad (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004) en el ser humano son de no más de 2 microgramos de AO o 1,8 microgramos de DTX 1 por gramo de hepatopáncreas. Los síntomas son diarreas, náuseas, vómitos y dolores abdominales, no tiene efectos letales. Las tres toxinas DSP a destacar en su efecto diarreico son el AO, la DTX 1 y la DTX 2.

1.3.3.4 Reglamentación en Europa

En 2002 se estableció el límite de la suma de AO más DTX y PTX en 160 microgramos de equivalente por Kg. de producto. La concentración máxima YTX es de 1 mg equivalente por Kg. de producto.

1.3.4 INTOXICACIÓN AMNÉSICA POR MARISCOS (ASP)

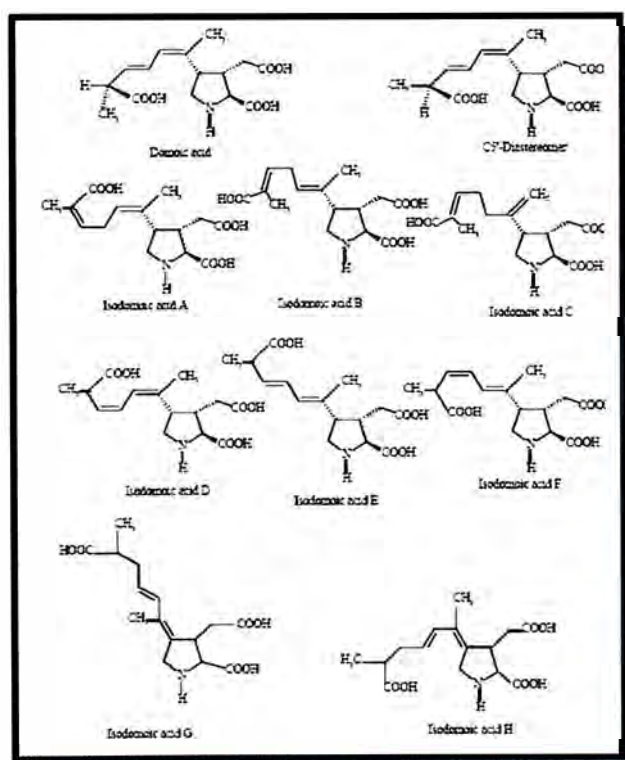
También es conocida como intoxicación por ácido domoico (DAP: domoic acid poison). Aparecen en floraciones de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*

cuyo hábitat se encuentra en los océanos Atlántico y Pacífico, Nueva Zelanda y mar de Japón (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004).

1.3.4.1 Propiedades químicas y estructura

El ácido domoico es un amino ácido cristalino y soluble en agua. Es una potente toxina de la clase de los compuestos cainoides. Produce despolarización al unirse a receptores específicos de neurona. Al poseer un cromóforo fuerte se puede detectar mediante espectroscopia ultravioleta. Tiene 8 isómeros geométricos y un diastereómero.

Gráfico N° 1.12
Estructuras Químicas del Acido Domoico y sus Isómeros.



1.3.4.2 Distribución y mecanismos

Los niveles de absorción mediante filtración dependen según la especie y zona, y esta en función de la cantidad de células de microalgas que se encuentre disponible. La eliminación también depende según este almacenada en tracto gastrointestinal (eliminación más rápida) o en los tejidos. En la almeja y la ostra el ácido domoico reside básicamente en los intestinos.

Los mecanismos de acción tienen lugar en los receptores de amino ácidos excitables como el Lglutamato y L-aspartato y en la transmisión sináptica. El ácido domoico se une a receptores del tipo quisqualato y a la N-metil-D-aspartato (NMDA) abriendo los canales de sodio y despolarizando la membrana. Permite también la entrada de calcio pudiendo provocar la muerte celular. Estas acciones se pueden evitar con feniclidina y APV (D-2-amino-5-fosfonovalerato).

Los síntomas más comunes en el ser humano son vómitos, calambres abdominales, dolor de cabeza y pérdida de memoria. La concentración máxima permitida es de 20 mg de ácido domoico por Kg. de producto.

1.3.5 INTOXICACIÓN NEUROLÓGICA POR MARISCOS (NSP)

Se producen debido a las brevetoxinas polieteres que producen los dinoflagelados *Gymnodinium breve*.

1.3.5.1 Propiedades químicas y estructura

Las brevetoxinas son polieteres cíclicos de entre 10 y 11 anillos, estables al calor y a los ácidos, solubles en lípidos. En la posición 5 se dan uniones específicas a los canales de sodio produciendo un efecto tóxico. (FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004)

Gráfico N° 1.13
Estructuras Químicas del las Brevetoxinas A y B.

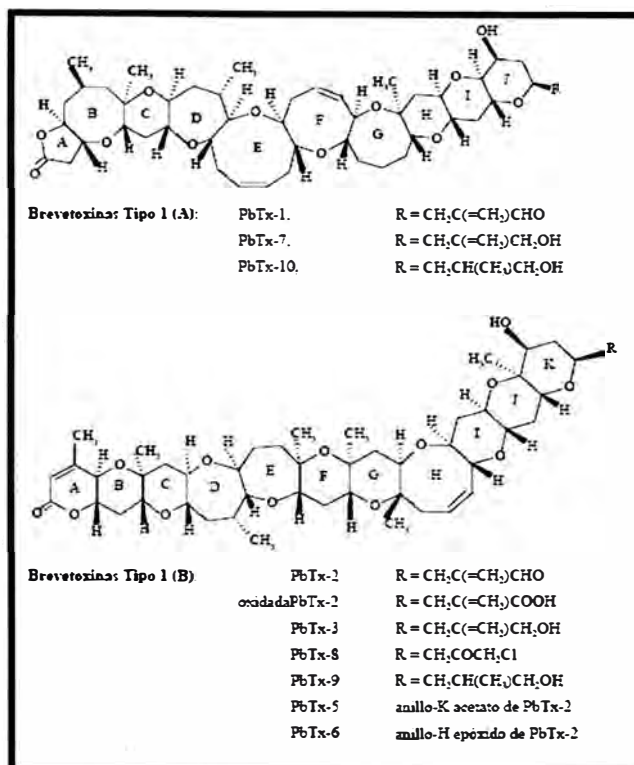


Gráfico N° 1.14
Estructuras Químicas de los análogos de las Brevetoxinas BTX-B1, B2 y -B4 aisladas de mariscos contaminados.

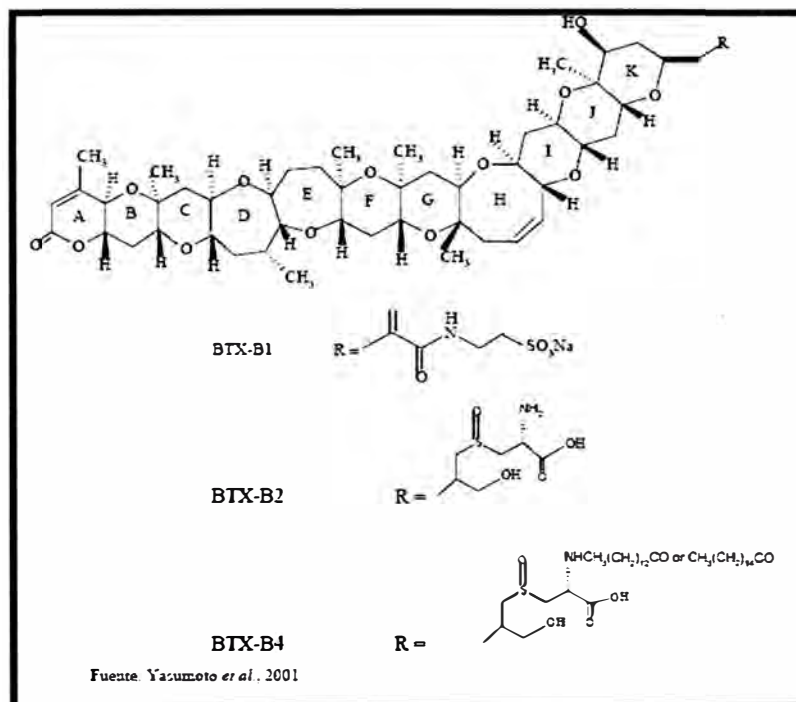
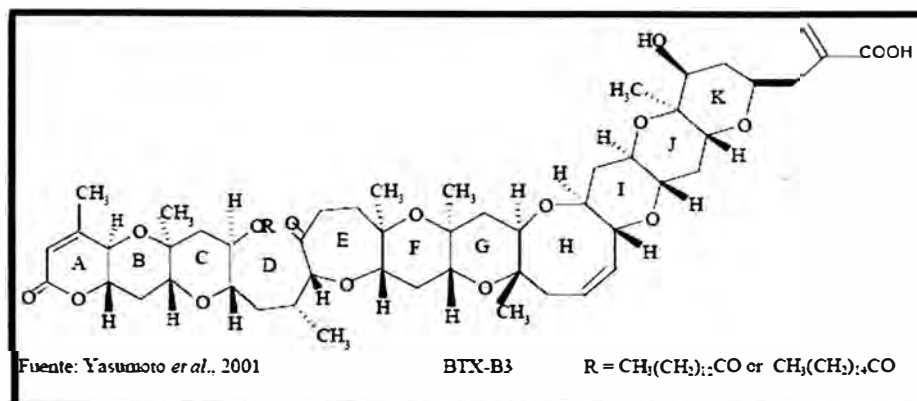


Gráfico N° 1.15
Estructuras Químicas del análogo de la Brevetoxinas
aislada de mariscos contaminados.



1.3.5.2 Distribución y mecanismos

La absorción depende de la especie al igual que su biotransformación que es específica también para cada especie. Por ejemplo en presencia de 5000 células por ml las ostras son capaces de incorporar las toxinas en menos de 4 horas y eliminarlas en menos de 36 horas. Puede haber cambios conformacionales en los anillos de las brevetoxinas disminuyendo su capacidad tóxica.

Son inhibidores enzimáticos de las proteinasas lisosomales que se encuentran en células fagocíticas como los macrófagos y los linfocitos pudiendo tener por tanto efectos inmunológicos. Una exposición en aerosol de la brevetoxina también produce toxicidad, por ejemplo dificultades respiratorias, conjuntivitis y catarros. Los síntomas por consumo son vómitos, diarrea, sudoraciones, arritmias, calambres, parálisis y coma.

También existe toxicidad por contacto directo, por ejemplo al nadar cerca de floraciones, produciendo irritaciones en los ojos y fosas nasales.

No se deben superar valores de 80 microgramos por 100 gramos de producto.

1.3.6 INTOXICACIÓN POR AZASPIRACIDA EN MARISCOS (AZP)

En un principio se pensó que la toxina era la DSP ya que producía síntomas similares. Finalmente se aisló la azaspiracida.

1.3.6.1 *Propiedades químicas y estructura*

La azaspiracida se extrajo de mejillones irlandeses. Es un sólido amorfo sin color. También se han aislado 4 análogos 2 de ellos eran la 8-metilazaspiracida y la 22- demetilazaspiracida.

Poseen una amina cíclica y no tienen anillo carbocíclico ni de lactona.

1.3.6.2 *Distribución y mecanismos*

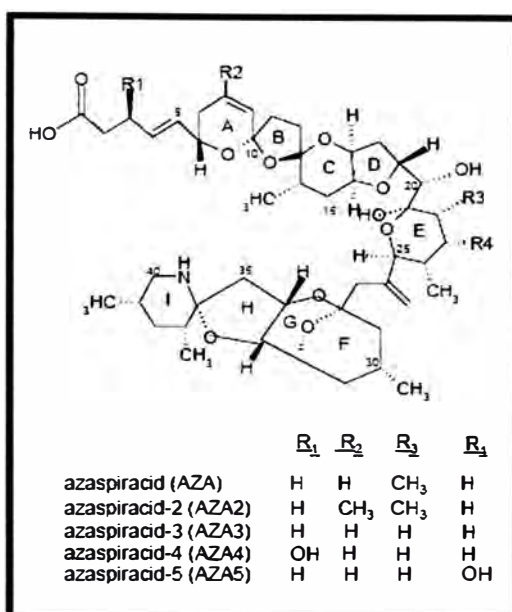
La mayor parte se acumula en las glándulas digestivas, y pueden migrar a otros tejidos. Sus mecanismos de acción se desconocen hasta el momento.

1.3.6.3 *Reglamentación en Europa*

En 2002 se concluyó que los niveles máximos fuesen de 160 microgramos por Kg. de producto.

Los métodos de bioensayo en ratones son los más comunes, considerándose el ensayo de referencia en caso de discrepancia. Como métodos analíticos se usan cromatografía líquida de fluorescencia, de espectrometría de masas y los inmunoensayos.

Gráfico N° 1.16
Estructuras Químicas de las azaspiracidas.



1.4 ANALISIS INSTRUMENTAL: CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

1.4.1 INTRODUCCION

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija.

La cromatografía líquida “clásica” (Sadek, 2002) se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que

requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas.

Dependiendo del tipo de fase fija y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución puede ser:

1.4.1.1 Cromatografía de absorción.

La fase fija es un sólido y se utiliza casi exclusivamente sílice (sílica) y en mucha menor medida alúmina.

1.4.1.2 Cromatografía de reparto.

En casi todos los casos (Sadek, 2002), como fase estacionaria se utilizan compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílica. Se la subdivide en cromatografía en fase normal y fase reversa.

En la cromatografía en fase normal, la fase fija es polar (como por ejemplo agua o trietilenglicol) y los compuestos menos polares eluyen primero.

En la cromatografía en fase reversa, el compuesto unido químicamente es un hidrocarburo alifático y se emplean fases móviles polares. En este caso, las sustancias más polares eluyen primero.

1.4.1.3 Cromatografía iónica.

Se utilizan columnas rellenas con resinas de intercambio iónico para separar y determinar iones.

1.4.1.4 Cromatografía de exclusión por tamaño.

La fase fija está formada (Sadek, 2002) por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros y llevan a cabo un fraccionamiento relacionado con el tamaño molecular.

Las moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas más tiempo.

1.4.2 INSTRUMENTAL

Un equipo para cromatografía líquida de alta resolución puede representarse por el siguiente esquema:

La fase móvil (Sadek, 2002) puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Cuando durante toda la separación se utiliza siempre el mismo solvente, se denomina isocrática, sin embargo es normal realizar un gradiente de composición del solvente a lo largo de la cromatografía para mejorar la eficiencia y acortar la duración del proceso. Estos gradientes de solvente también son realizados en forma automática por las bombas.

La bomba envía al solvente a través de caños de diámetro pequeño, generalmente de acero inoxidable, hacia la válvula inyectora.

Esta consiste en una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo de solvente, la muestra contenida en un aro o loop de volumen calibrado.

Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector. Este produce una señal eléctrica proporcional

a la cantidad de materia y esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo (cromatograma) del tipo.

Idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador calcula además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia.

Dado que los detectores de HPLC son no destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él. De esta manera, dependiendo del tamaño del loop de inyección y de la columna, y del tipo de bomba, es posible realizar además de separaciones analíticas, cromatografías preparativas.

1.4.3 PARÁMETROS RELEVANTES

Los parámetros teóricos que caracterizan las separaciones cromatográficas por HPLC son idénticos a los descriptos en cromatografía gaseosa.

En HPLC, en lugar de variar la temperatura de la columna para mejorar la resolución del cromatograma, se cambia la composición de la fase móvil a lo largo de la separación utilizando mezclas de entre dos y cuatro solventes.

1.4.4 ETAPAS DEL ANALISIS DE UNA MUESTRA

Son idénticas a las puntualizadas para cromatografía gaseosa.

En lo que respecta a la optimización de las condiciones experimentales (Lindholm, 2004), en este caso es posible realizar ensayos preliminares orientativos utilizando cromatografía en capa delgada con la misma fase fija que contiene la columna.

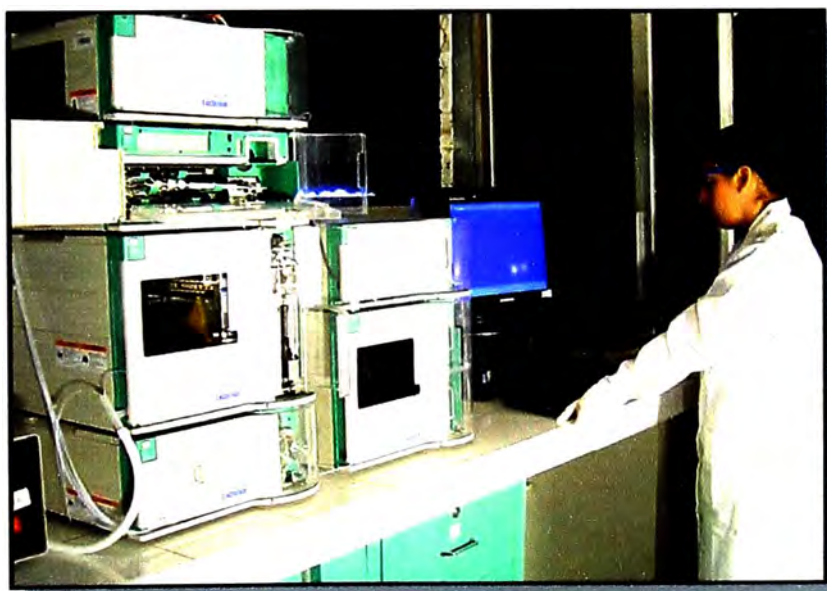
Por otra parte es necesario tener en cuenta que dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los caños y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector.

Para evitar las obstrucciones, los solventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0,45 a 0,22 μm . Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasadores de solvente por vacío o por burbujeo con He y, en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasar los solventes por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil.

1.4.4.1 Procedimiento

Cuando se desarrolla una técnica analítica por HPLC (Sadek, 2002), normalmente se elige en primer lugar una fase fija adecuada y una fase móvil con una composición tal que sea compatible con la fase fija, que disuelva los componentes a analizar y que permita una buena separación. Luego se optimizan las condiciones de flujo de solvente, cantidad de muestra a inyectar y, en el caso de un detector de absorción como el que se empleará en este caso, se determinará la/s longitud/es de onda de detección.

Gráfico N° 1.17
Equipo HPLC.



CAPITULO II

METODOLOGIA ESTADISTICA PARA LA VERIFICACION DE LOS PARAMETROS DE VALIDACION

2.1 Verificación del parámetro de Veracidad.

La Veracidad, se determinará mediante ensayos de recuperación, adición de patrón, comparación con otros métodos de exactitud conocida, comparación con materiales o muestras de referencias certificadas o mediante pruebas interlaboratorio.

2.1.1 *Ensayos de Recuperación o Adición de Patrón:*

La recuperación del analito se puede estimar por el análisis de muestras adicionadas con cantidades conocidas del mismo. Estas muestras pueden ser adicionadas en el rango en el que se encuentra el analito normalmente o en los diferentes niveles en el que se encuentra este (EURACHEM, 1998).

A.- *Verificación*

Se realizará calculando el porcentaje de recuperación según la siguiente fórmula:

Ecuación N° 2.1
Estimador del porcentaje de Recuperación.

$$(\%) \text{ Recuperación} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

C_1 = Concentración determinada de la muestra adicionada o Patrón.

C_2 = Concentración determinada de la muestra no adicionada.

C_3 = Concentración adicionada.

B.- Criterios de aceptación.

El método tendrá recuperación aceptable si el porcentaje de la recuperación se encuentra dentro de los rangos indicados en la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) en función de la concentración del analito. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001) que es la siguiente:

Cuadro N° 2.1
Valores aceptables de recuperación según la AOAC, en función de la concentración del analito (AOAC, 1993; Huber, 1999).

Relación	Unidades	Factor de Recuperación (%)
1	100%	98-102
$10^{(-1)}$	$\geq 10\%$	98-102
$10^{(-2)}$	$\geq 1\%$	97-103
$10^{(-3)}$	$\geq 0.1\%$	95-105
$10^{(-4)}$	100 ppm	90-107
$10^{(-5)}$	10 ppm	80-110
$10^{(-6)}$	1 ppm	80-110
$10^{(-7)}$	100 ppb	80-110
$10^{(-8)}$	10 ppb	98-110
$10^{(-9)}$	1 ppb	98-111

2.1.2 **Mediante Comparación con otros métodos de análisis.**

A.- **Verificación.**

Si existe un método de referencia, podemos comparar los resultados obtenidos de las muestras analizadas por ambos métodos.

B.- **Criterio de Aceptación.**

Estudiando el grado de proximidad entre ellos, para poder concluir mediante una prueba de diferencias T – Student al 95% de confianza. En el caso de datos no paramétricos aplicar el test de Mann- Whitney al 95% de confianza. En ambos casos los test deben ser no significativos.

2.1.3 **Mediante Pruebas Interlaboratorio:**

A.- **Verificación.**

La veracidad de los resultados se cuantificaran mediante pruebas interlaboratorios, utilizando los puntajes Z-score (Z_i).

Ecuación N° 2.2

Puntaje Z-Score de cada laboratorio.

$$Z_i = \frac{(\bar{x}_i - \mu)}{\sigma}$$

\bar{x}_i : Promedio de resultados del laboratorio i -ésimo.

μ : Valor de referencia o valor de consenso del interlaboratorio.

σ : Desviación estándar del valor de referencia o del valor del consenso.

B.- **Criterio de Aceptación.**

Si los puntajes Z-Score son menores o iguales (en valor absoluto) a 2, concluiremos que los resultados obtenidos en el interlaboratorio son veraces.

2.1.4 **Mediante Material de Referencia Certificado:**

A.- **Verificación.**

Si se cuenta con una muestra o material de referencia certificado, se necesitará cuando menos 10 repeticiones de análisis de dicha muestra o material para poder verificar la veracidad de la metodología.

B.- Criterio de Aceptación.

La prueba t-Student debe ser no significativa al 95% de confianza. En el caso de datos no paramétricos aplicar el Test de Wilcoxon al 95% de confianza.

2.1.5 Mediante Pruebas de comparación con otro Laboratorio**A.- Verificación.**

La veracidad de los resultados se verificará comparando el valor de tendencia central (promedio o mediana) de los resultados parciales del otro laboratorio, con los datos obtenidos data obtenida en el nuestro.

B.- Criterios de Aceptación.

Ser no significativo al utilizar el estadístico t – Student al 95% de confianza. Para el caso de datos no paramétricos aplicar el test Wilcoxon al 95% de confianza.

2.2 Verificación del parámetro de Precisión

Para verificar la precisión del método, se realizara con cualquiera de las siguientes condiciones:

- **Condiciones de Reproducibilidad.** Determinada en pruebas interlaboratorios (diferente laboratorio, analista, días, equipos, proveedores, reactivos, etc).
- **Condiciones de Repetibilidad.** Determinada en pruebas intralaboratorios (mismo analista, mismo equipo, intervalo corto de tiempo de análisis y mismos reactivos).

2.2.1 Mediante las condiciones de Reproducibilidad**A.- Verificación.**

La precisión de los resultados se estimará con la desviación estándar relativa de reproducibilidad (RSD_R) del interlaboratorio:

Ecuación N° 2.3
RSD de reproducibilidad.

$$RSD_R = \frac{S_R}{\bar{x}} \times 100\%$$

S_R : Desviación Estándar de Reproducibilidad del interlaboratorio.

\bar{x} : Promedio de los resultados del interlaboratorio.

Comparando el valor teórico de la desviación estándar relativa de reproducibilidad de Horwitz (RSD_R) que se determina de la siguiente manera (The Health and Safety Executive, Biocides and Pesticides Unit; 2001).

Ecuación N° 2.4
RSD de reproducibilidad de Horwitz.

$$RSD_R = 2^{1-0.5 \times \log(\text{Concentración})}$$

En caso que los resultados del interlaboratorio no posean distribución normal el valor de la de la desviación estándar relativa de reproducibilidad (RSD_R) será:

Ecuación N° 2.5
RSD de reproducibilidad para resultados no normales.

$$RSD_R = \frac{S_{zR}}{Me_R} \times 100\%$$

S_{zR} : Desviación Estándar de Reproducibilidad del interlaboratorio respecto a la mediana.

Me_R : Mediana de los resultados del interlaboratorio.

B.- Criterios de Aceptación.

Los valores del RSD_R experimentales deben ser menores o iguales al RSD_R de Horwitz.

2.2.2 Mediante las condiciones de Repetibilidad

A.- Verificación.

La precisión de los resultados se estimará con la desviación estándar relativa de repetibilidad (RSD_r):

Ecuación N° 2.6
RSD de repetibilidad.

$$RSD_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100\%$$

S_r : Desviación Estándar de Repetibilidad del método.

\bar{x} : Promedio de los resultados bajo condiciones de repetibilidad.

Comparando el valor teórico de la desviación estándar relativa de repetibilidad de Horwitz (RSD_r) que se determina de la siguiente manera (The Health and Safety Executive, Biocides and Pesticides Unit; 2001).

Ecuación N° 2.7
RSD de repetibilidad de Horwitz.

$$RSD_r = \frac{2}{3} \times 2^{1-0.5 \times \log(\text{Concentración})}$$

En caso que los resultados del interlaboratorio no posean distribución normal el valor de la de la desviación estándar relativa de repetibilidad (RSD_r) será:

Ecuación N° 2.8
RSD de repetibilidad para resultados con distribuciones no normales.

$$RSD_r = \frac{S_z}{Me} \times 100\%$$

S_z : Desviación Estándar de Repetibilidad respecto a la mediana.

Me: Mediana de los resultados bajo condiciones de repetibilidad.

B.- Criterios de Aceptación.

Los valores del RSD_r experimentales deben ser menores o iguales al RSD_r de Horwitz.

2.3 Verificación del parámetro de Linealidad.

Los métodos instrumentales de análisis se basan en la medida de alguna propiedad física del analito denominada **señal analítica** (absorción, conductividad, potencial o emisión de luz, etc.), relacionada con la naturaleza del analito y su concentración.

Los métodos instrumentales son métodos relativos, en los cuales se compara la señal analítica obtenida para una muestra con la señal obtenida con uno o más patrones.

En este contexto, el calibrado consiste en obtener una relación matemática entre la señal analítica y la concentración / composición de la muestra, siguiendo un proceso en el que intervienen uno o más patrones.

En la práctica, y siempre que es posible, se prefiere trabajar en una situación de linealidad (debido a la ley de Lambert-Beer), en la cual la ecuación que relaciona entre señal analítica y concentración es una línea recta.

2.3.1 Mediante análisis de regresión de concentraciones estándares y respuestas del equipo.

A.- Verificación.

Se leerán 4 concentraciones estándares (x) y con sus respectivas respuestas del equipo (y) se realizará un análisis de regresión lineal.

B.- Criterio de Aceptación.

El análisis de regresión debe ser significativo y poseer un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.999. (Nordisk Metodikkomiteé for Næringsmidler, Procedure No 4 Version 1, 1996, Validation of Chemical Analytical Methods. Finlandia)

2.4 Verificación del parámetro de Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Método.

Los límites de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 1998) son importantes por determinan el la menor concentración que podría leer el método de ensayo y la menor lectura de concentración con precisión del analitos respectivamente.

2.4.1 Mediante la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.

Para determinar el LDM y el LCM seguiremos los siguientes pasos:

1. Hallar una recta de regresión entre la concentración (X) y la respuesta del equipo (Y_1)

Ecuación N° 2.9

$$Y_1 = a_1 + b_1 X$$

2. Estimar la respuesta del equipo para una concentración $X = 0$:

Ecuación N° 2.10

$$Y_{1/X=0} = a_1$$

3. Hallar una recta de regresión entre la concentración (X) y la desviación estándar de la respuesta del equipo (Y_2)

Ecuación N° 2.11

$$Y_2 = a_2 + b_2 X$$

4. Estimar la desviación estándar de la respuesta del equipo para una concentración $X = 0$:

Ecuación N° 2.12

$$Y_{2/X=0} = a_2$$

5. Estimar el LDM y el LCM en la respuesta del equipo de la siguiente manera :

Ecuación N° 2.13

$$LDM_{area} = a_1 + 3a_2$$

Ecuación N° 2.14

$$LCM_{area} = a_1 + 10a_2$$

6. Estimar el LDM y el LCM respecto a la concentración de la siguiente manera :

Ecuación N° 2.15

$$LDM = \frac{LDM_{area}}{b}$$

Ecuación N° 2.16

$$LCM = \frac{LCM_{area}}{b}$$

Donde "b" es la pendiente de la concentración y la respuesta del equipo de la linealidad del método.

2.5 Verificación del parámetro de Robustez.

La Robustez (**Robustness**) de un método de ensayo es la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales. En algunas disciplinas es considerado sinónimo de Resistencia o fortaleza (**Ruggedness**). (FAO ,2000)

A.- Verificación.

El diseño de Youden - Steiner permite estudiar si el factor influye significativamente sobre el resultado. En la cuadro N° H1 se muestran las combinaciones para éste estudio donde las variables que son propias del método se indican con letras mayúsculas (A, B, C, D, E, F, G) y con letras minúsculas (a, b, c, d, e, f, g) corresponden a los factores que han sido alteradas.

Cuadro N° 2.2
Diseño experimental de Youden Steiner

N°	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Factor E	Factor F	Factor G
R1	A	B	C	D	E	F	G
R2	A	B	c	D	e	f	g
R3	A	b	C	d	E	f	g
R4	A	b	c	d	e	F	G
R5	a	B	C	d	e	F	g
R6	a	B	c	d	E	f	G
R7	a	b	C	D	e	f	G
R8	a	b	c	D	E	F	g

A.1 Determinación de los efectos de cada Factor

Los efectos de cada factor son cuantificados de la siguiente manera:

Ecuación N° 2.17

$$Efecto_{Factor(A-a)} = \frac{\sum Ri_A - \sum Ri_a}{4}$$

B.- Criterio de Aceptación.

Los efectos de cada factor (FAO, 2000) deben ser menores o iguales a $2,24S_r$. Esto significa que si el efecto del factor es superior al efecto máximo permisible podemos afirmar que no se puede alterar dichos factores porque los niveles alternativos de dichos factores alteran significativamente el resultado de la determinación del analito en cuestión.

2.6 Verificación del parámetro de Selectividad-Especificidad.

2.6.1 *Mediante Examen Visual:*

A.- *Verificación.*

Adicionar un blanco reactivo a un patrón o concentración estándar y realizar otro ensayo sin adición.

B.- *Criterio de Aceptación.*

Visualizar igualdad en las curvas de ambos gráficos.

2.6.2 *Mediante Adiciones a concentraciones estándares.*

A.- *Verificación.*

Realizar adiciones de blancos reactivos a 5 concentraciones estándares.

B.- *Criterio de Aceptación.*

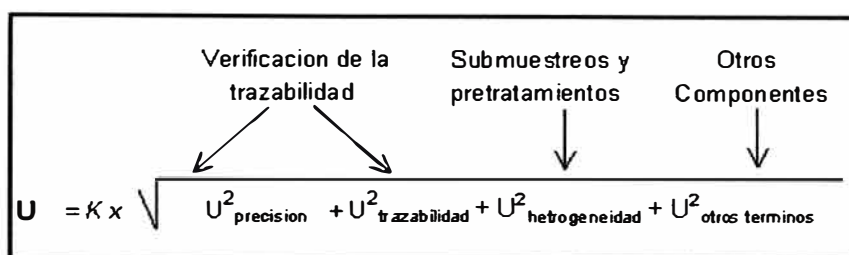
Utilizar una prueba chi-cuadrado entre los valores esperados (concentraciones estándares) y los observados (concentraciones estándares adicionados con los blancos reactivos). La prueba debe ser no significativa al 95% de confianza.

2.7 Estimación de la Incertidumbre.

Para determinar la incertidumbre utilizamos el procedimiento "global" (EURACHEM, 1998), aprovechando la información que se ha generado durante el proceso de verificación de la trazabilidad. La fig.1 muestra la expresión para calcular globalmente la incertidumbre. Se observa que las fuentes de incertidumbre identificadas en la determinación de Acido Domoico pueden agruparse en cuatro componentes:

- 1) Incertidumbre debida a la precisión;
- 2) Incertidumbre debida a la verificación de la trazabilidad;
- 3) Incertidumbre debida a la heterogeneidad de la muestra; y
- 4) Incertidumbre debida a otros términos.

Cuadro N° 2.3
Componentes de incertidumbre.



El cuadro N° 5.38 muestra que los dos primeros términos de la expresión se pueden obtener utilizando la información generada durante el proceso de verificación de la trazabilidad, es decir cuando se analizó el MRC-Mus-c. La incertidumbre debida a la precisión corresponde a la variabilidad experimental del método analítico, y en ella se incluyen las fuentes de incertidumbre asociadas a todas las etapas del método analítico, consideradas de una forma global (precisión de la balanza, etapa de extracción, curva de calibración, la recuperación y la precisión del material volumétrico).

El segundo término, $U^2_{\text{trazabilidad}}$, considera la incertidumbre asociada a asegurar que el método proporciona resultados trazables. Para asegurar esto se ha debido analizar el MRC Mus-c con los consiguientes componentes de variabilidad asociados (incertidumbre del propio material y los mismos términos de incertidumbre asociados a la precisión del método, $U^2_{\text{precision}}$).

El tercer término de expresión considera a la incertidumbre asociada a la heterogeneidad de las muestras de moluscos bivalvos. Esto es debido como el MRC es una muestra homogénea, la $U^2_{\text{trazabilidad}}$ no tiene en cuenta las etapas de homogenización que se tendrán que aplicar a las futuras muestras de rutina. Por último, el cuarto término, y en el caso concreto del análisis de Ácido Domoico se podrían incorporar la incertidumbre asociadas de las muestras de rutina (en caso de analizar muestras que no fueran de moluscos bivalvos).

2.7.1 Incertidumbre debido al Proceso de Verificación de la Trazabilidad

Se calcula teniendo en cuenta la incertidumbre de la referencia y de la precisión del método.

Cuadro N° 2.4
Componentes de la incertidumbre de la verificación de trazabilidad.

$$U_{\text{trazabilidad}} = \sqrt{\left[\frac{U_{\text{CRM}}}{K}\right]^2 + \left[\frac{S}{\sqrt{n}}\right]^2}$$

Donde:

U_{CRM} : Incertidumbre de la muestra de referencia certificada.

K: Factor de cobertura asociado al 95% de confianza de una distribución normal.

S: Desviación estándar asociada a las repeticiones del análisis de la CRM.

n: Número de repeticiones del análisis de la CRM.

2.7.2 Incertidumbre debida a la Heterogeneidad de la Muestra

Este componente de la incertidumbre se estima mediante la desviación estándar de los resultados de muestras en condiciones de homogenizado con el procedimiento analítico en condiciones de repetibilidad.

Cuadro N° 2.5
Estimación del componente de la incertidumbre debida la heterogeneidad.

$$U_{\text{heterogeneidad}} = \sqrt{S^2_{\text{muestras}}}$$

CAPITULO III

VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO POR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) EN MUESTRAS DE CONCHA DE ABANICO

3.1 INTRODUCCION

En los últimos años se ha notado una disminución de aguas libres de riesgo de envenenamiento, probablemente debido a los cambios ambientales locales o globales, la contaminación del agua por nutrientes usados en la agricultura, por desechos industriales o urbanos, el transporte de especies nocivas y sus formas quísticas en el agua de lastre de barcos de carga y el aumento de la temperatura del mar debido al calentamiento global de la atmósfera. Debido a ello, posiblemente cada vez con mayor frecuencia e involucrando a un número creciente de áreas costeras del planeta, se producen floraciones de algas nocivas.

Las algas predominantes en el fitoplancton son las diatomeas, flagelados y dinoflagelados, que se distinguen por su forma de vida y estrategia de reproducción. Entre ellas, las diatomeas del género *Pseudonitzschia* generan una sustancia tóxica llamada ácido domoico, compuesto que causó durante

1987 en Canadá una serie de intoxicaciones en humano, asociadas a pérdidas de la memoria.

El ácido domoico pertenece al grupo de aminoácidos llamados Ocanoicos, los cuales están clasificados como neuroexcitantes que interfieren con los mecanismos de neurotransmisión en el cerebro, de allí su nombre de veneno amnésico de los mariscos o biotoxina ASP (Amnesic Shellfish Poisoning). Este ácido se aisló originalmente de una macroalga llamada Chondria armata por investigadores japoneses³. Para multiplicarse requieren luz presente sólo en la capa superficial, nutriente (nitratos, fosfatos, silicatos, etc.), oligoelementos (hierro, cobre, manganeso, zinc, etc.) y algunas sustancias orgánicas (vitaminas, ácidos húmicos, etc.).

En el mar, estos nutrientes circulan desde las profundidades marinas a la superficie, siendo más fértiles las áreas marinas donde el agua profunda es forzada a elevarse, produciéndose una mezcla vertical o "surgencia". Si bien los florecimientos de algas ocurren en muchas zonas del planeta, son más frecuentes en los mares templados, donde los cambios estacionales son intensos.

El ácido domoico (Pérez, 2002) se une con alta afinidad a receptores de glutamato ubicados en el sistema nervioso central, los que están presentes en alta proporción en neuronas del hipocampo, en centros responsables del procesamiento de la memoria.

El ácido domoico activa estos receptores, abriendo un canal iónico que deja pasar al interior de la neurona altas concentraciones del ión calcio, ocasionando la destrucción de estas células y la pérdida de la memoria de corta duración en los sujetos intoxicados; esta neurodegeneración puede ser irreversible, provocando que los pacientes más graves queden discapacitados de por vida.

Debido a la aparición de brotes de intoxicación por el consumo de mariscos en varias partes del mundo y no teniendo una información certera de que estos brotes se hayan presentado en el Perú o que se hayan evaluado sistemáticamente, es importante tener en cuenta su ocurrencia como problema de salud pública.

La actividad pesquera es una de las tareas económicas de mayor envergadura en el Perú, principalmente la industria de harina y aceite de pescado, le siguen en menor volumen la conservera y el congelamiento de especies hidrobiológicas.

Estas actividades están orientadas en su mayoría a la exportación. Siendo una actividad en auge, es necesario brindar una cobertura sanitaria que garantice la inocuidad de sus productos, para no sufrir restricciones comerciales futuras y poner en riesgo al consumidor, que cada vez es más exigente en aspectos de salud y ambiente. Es por todo ello que se requiere de la implementación de equipos y técnicas de laboratorio confiables, exactas, veraces, precisas, repetibles y un bajo nivel del límite de cuantificación para la evaluación de biotoxinas como el ácido domoico.

Existen varios métodos para medir el ácido domoico: bioensayos (inyección intraperitoneal en ratones) y métodos químicos por cromatografía líquida de alta performance o HPLC (extracción clorhídrica y metanólica), siendo el más aceptado la extracción metanólica por HPLC. En nuestro país, comúnmente se desarrolla el método de bioensayo en ratones, que tiene un límite de detección de 40 ppm (mg/Kg), sin embargo, dada las exigencias internacionales de contar con un método más sensible para la medición de ácido domoico⁶, se realizó el presente trabajo, cuyo objetivo fue validar el método CERPER LE-ME-AD. Determinación de Acido Domoico en moluscos bivalvos (conchas de abanico, navajas, machas, choros, palabritas, almejas,

etc.) por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (límite de cuantificación = 0,82 ppm ó mg/Kg).

3.2 EQUIPOS

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), marca Shimadzu, modelo LC-10A con inyector automático, bomba con sistema de degasificación, horno para la termostatación de la columna, sistema de registro y procesado de datos cromatográficos y detector UV de arreglo de diodos (longitud de onda variable).

Además, se contó con una columna cromatográfica de acero inoxidable C-18 para fase reversa, marca SUPELCO de 15 cm x 4,6 mm de diámetro interno y 5 mm de diámetro de partícula. Las condiciones típicas de operación fueron: sistema isocrático, flujo 1,25 mL/min, volumen de inyección 10 mL, detección UV 242 nm, temperatura del horno 40°C y tiempo de corrida 15 minutos.

3.3 REACTIVOS

Se emplearon los siguientes reactivos: metanol grado HPLC (Merck), acetonitrilo grado HPLC (Merck), agua tridestilada o grado HPLC, ácido trifluoroacético grado espectrofotométrico (Merck) y solución certificada de ácido domoico DACS 1 (Instituto de Biociencias Marinas de Canadá). Además, se prepararon diluciones de la solución certificada del estándar entre los rangos 5-30 mg/mL para la curva de calibración; y la fase móvil consistió de una solución de acetonitrilo: agua: ácido trifluoroacético (10: 89,9: 0,1;v/v).

3.4 PROCEDIMIENTO

3.4.1 Preparación de la muestra

Se tomó aproximadamente 1000 gramos de moluscos bivalvos (concha de abanico) extraídos de la zona sur del Perú. El material de referencia (MUS-1B) se importó del Instituto de Biociencias Marinas de Canadá en Diciembre de 2005. Luego de limpiar con agua dulce el interior y exterior de los bivalvos

para eliminar la arena y otras sustancias extrañas, se separó la carne de la concha, seccionando los músculos aductores y el tejido adherido a la charnela, se recogió aproximadamente entre 100-150 g (Pérez, 2002) de vianda en un recipiente de vidrio. Seguidamente, se acondicionó la vianda para permitir su drenado durante 5 minutos, se desechó el drenado, y se homogeneizó la muestra mediante una licuadora de cuchillas inoxidable hasta obtener una masa homogénea.

En la preparación de moluscos en conserva, se trituró la vianda mezclándola con el líquido de cobertura, posteriormente se homogeneizó en forma semejante a la descrita anteriormente. En el caso de conservas con envases de gran capacidad, se separó la carne dejándola drenar durante unos minutos, recolectando todo el líquido de gobierno. Se determinó el peso de la carne y el volumen del líquido, a fin de poder recombinar posteriormente porciones de cada fracción en cantidades proporcionales.

Se trituró una porción de la vianda, se recombinó con una cantidad proporcional del líquido de gobierno y se homogeneizó como fue descrito anteriormente.

3.4.2 Proceso de extracción

Se pesó 4 g de muestra (Pérez, 2002) preparada directamente en un tubo de centrifuga al que se adicionó 16 mL de metanol 50%; esta muestra se homogeneizó durante 3 minutos en el vortex y después se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se filtraron 1-5 mL del sobrenadante a través de filtros de membrana de 0,45 mm y se inyectaron soluciones patrón de ácido domoico dentro del rango de 5-30 mg/ μ L.

La identificación del ácido domoico se realizó por comparación con el tiempo de retención del patrón, la confirmación se efectuó mediante la adición del patrón a los extractos de las muestras analizadas, observándose un aumento

del área del pico y la ausencia de aparición del desdoblamiento de éste. Se consideró positivo cuando el valor obtenido fue superior a 20 µg AD/g.

Para el cálculo de la concentración de ácido domoico se empleó la siguiente fórmula:

Ecuación Nº 3.1

Concentración de ácido domoico

$$(AD) (\mu\text{g/g}) = \frac{Am}{As} \times \frac{Cs}{Wm} \times D$$

Donde: Am (área del pico de ácido domoico en la muestra), As (área del pico del ácido domoico en el estándar), Cs (concentración de ácido domoico en el estándar, mg/L), D (factor de dilución, 20 mL) y Wm (peso de la muestra, g)

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental es el siguiente:

- 3.5.1 La **similaridad entre los resultados de los analistas** se evaluará realizando un total de 20 repeticiones con dos analistas, 10 repeticiones por cada analista.
- 3.5.2 La **veracidad** se evaluará con 10 repeticiones del valor de referencia (41 mg/Kg) utilizando recuperaciones.
- 3.5.3 La **precisión y repetibilidad** del método se evaluará mediante 20 repeticiones con dos analistas, 10 repeticiones por cada analista.
- 3.5.4 La **exactitud** se evaluará al verificar la veracidad y la precisión del método.
- 3.5.5 La **linealidad** se evaluará al verificar el coeficiente de correlación entre la concentración y la respuesta del equipo, el análisis de varianza de la regresión, el intervalo de confianza del intercepto y la normalidad de los residuos de la regresión entre la concentración y la respuesta del equipo. Se evaluará al realizar las corridas de 5 estándares (2,5 mg/Kg; 5 mg/Kg; 10 mg/Kg y 25 mg/Kg) por triplicado.

- 3.5.6** El **límite de detección y cuantificación del método** se evaluará al realizar triplicados de las lecturas de concentraciones estándares de 0,5 mg/Kg; 0,75 mg/Kg y 1 mg/Kg.
- 3.5.7** La **robustez** se evaluará utilizando el modelo de Youden Steiner con 8 repeticiones para evaluar la robustez en los factores: el peso de muestra, el caudal, la composición de la fase móvil, tipo de columna y el tiempo de la extracción a la inyección.
- 3.5.8** La **incertidumbre** fue evaluada considerando tres factores: precisión, la muestra de referencia certificada y heterogeneidad. La incertidumbre de precisión fue determinada mediante 20 repeticiones, la incertidumbre de la muestra de referencia certificada fue obtenida el certificado de la muestra y la incertidumbre de la heterogeneidad de la muestra fue obtenida mediante 10 repeticiones.

CAPITULO IV

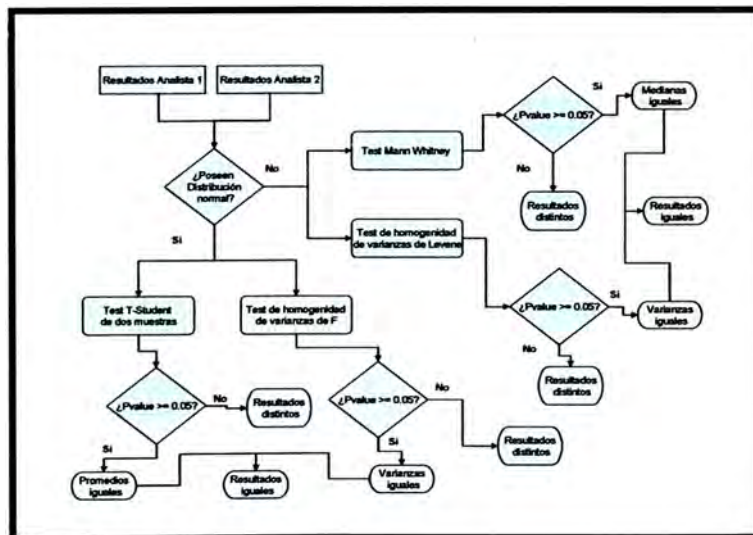
RESULTADOS Y CONCLUSIONES

4.1 SIMILARIDAD DE LOS RESULTADOS ENTRE LOS ANALISTAS

En el proceso de medición uno de los factores sistemáticos que debemos de controlar en una validación es el factor analista. Esto conlleva a demostrar que estadísticamente no existen diferencias significativas entre los resultados que ellos emiten.

El siguientes es el esquema que nos servirá para verificar la similaridad entre los resultados de los analistas.

Cuadro N° 4.1
Esquema para verificar la similaridad de los resultados de dos analistas.

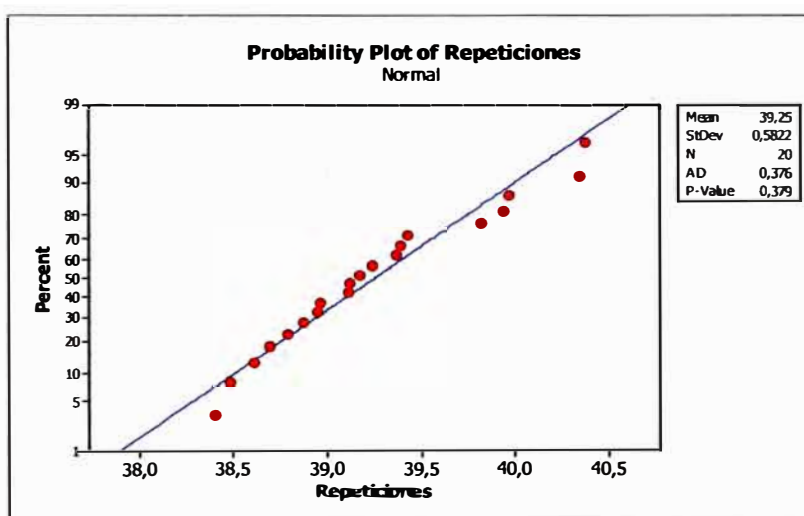


4.1.1 PRUEBA DE PUNTOS ATÍPICOS

4.1.1.1 Contraste de Puntos Atípicos de Grubbs.

Utilizaremos este test para verificar si existen puntos atípicos en el total de repeticiones. Para poder aplicar este test, los datos deben de ser normales. Mediante este Test se prueba si existen datos atípicos (ISO 5725-2, 1994), para eliminarlos del trabajo de investigación.

Gráfico N° 4.1
Resultados de la prueba de Normalidad Anderson-Darling de las réplicas de los dos analistas



Cuadro N° 4.2
Resultados de la prueba de Grubbs de las réplicas de los dos analistas.

Analista 1	Analista 2
39,43	39,39
39,97	39,37
39,12	39,17
39,82	39,11
38,79	38,95
38,69	38,96
38,87	39,24
38,61	40,37
38,48	40,34
38,40	39,94

Promedio	39,25
Máximo	40,37
Mínimo	38,40
Desv. Estándar	0,5824

Valores Experimentales	
G _{baio}	1,460
G _{alto}	1,923

Valores De Tabla	
G al 5%	2,84340573

4.1.1.2 Conclusión

- Los resultados de las repeticiones de los dos analistas en conjunto presentan una distribución normal debido a que el p-value obtenido 0.379 es mayor que el nivel de significancia 0.05. Por lo cual podemos aplicar el test de Grubbs.
- Los resultados nos presentan que los valores extremos (máximo y mínimo) no son puntos atípicos, debido a que los valores experimentales del estadístico de Grubbs bajo y alto (1,460 y 1,923 respectivamente) son menores que el valor teórico de Grubbs al 95% (2,843).

4.1.2 NORMALIDAD DE LOS DATOS

Se evaluó la normalidad mediante el test de Anderson Darling (Marsaglia 2004) de los datos obtenidos al analizar el MRC Mus-c en 2 días distintos, seis muestras independientes por día. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Cuadro N° 4.3
Resultados de Acido Domoico de las réplicas
realizadas por los dos analistas.

Analista 1	Analista 2
39,43	39,39
39,97	39,37
39,12	39,17
39,82	39,11
38,79	38,95
38,69	38,96
38,87	39,24
38,61	40,37
38,48	40,34
38,40	39,94

Gráfico N° 4.2
Gráfico de Normalidad de la Réplicas realizadas de
Acido Domoico del analista 1.

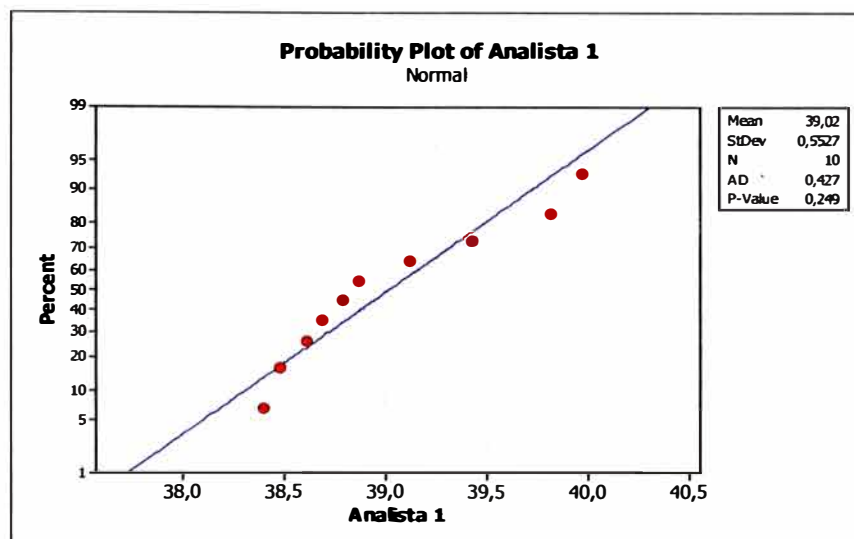
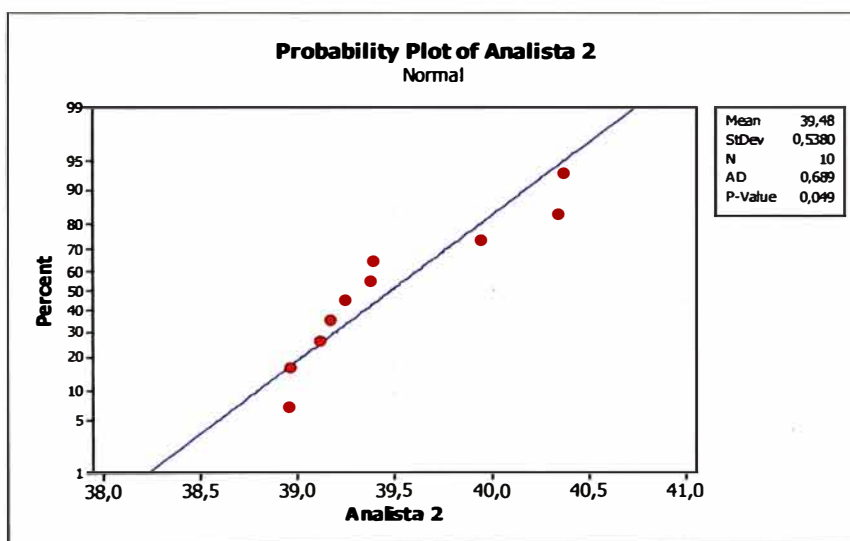


Gráfico N° 4.3
Gráfico de Normalidad de las Réplicas realizadas
de Acido Domoico del analista 2.



4.1.2.1 Conclusión

Los resultados del analista 1 presentan una distribución normal debido a que el p-value obtenido 0.249 es mayor que el nivel de significancia 0.05.

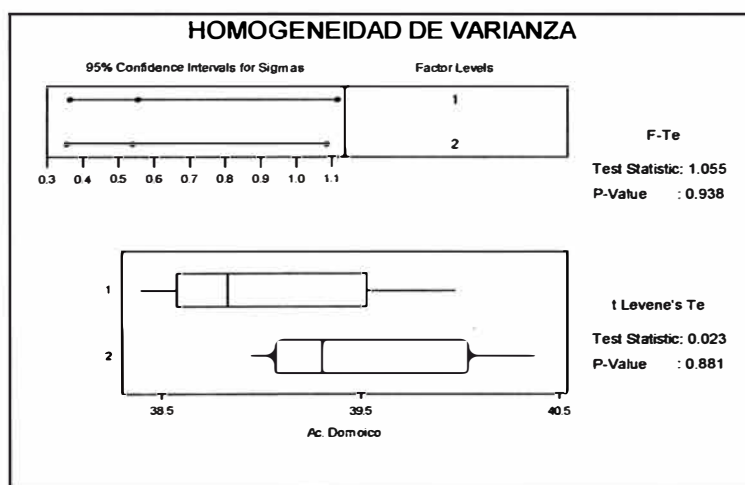
Los resultados del analista 2 no presentan una distribución normal debido a que el p-value obtenido 0.049 es menor que el nivel de significancia 0.05.

Por lo tanto utilizaremos pruebas no paramétricas para verificar la similitud de los resultados de ambos.

4.1.3. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

Mediante el Test de homogeneidad de varianzas de Levene se prueba si las varianzas de los resultados de ambos analistas son iguales.

Gráfico N° 4.4
Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene de réplicas realizadas por los dos analistas.



4.1.3.1 Conclusión

Como el P-Value = 0.881 es mayor que el nivel de significancia 0.05, entonces podemos concluir que los resultados de los analistas tienen igual precisión.

4.1.4. PRUEBA DE IGUALDAD DE MEDIANAS

La igualdad en medidas de tendencia central se evaluará mediante el test de Mann-Whitney.

Cuadro N° 4.4
Resultados de la prueba de Mann-Whitney de réplicas
realizadas por los dos analistas.

Mann-Whitney Test and CI: Analista 1; Analista 2

	N	Median
Analista 1	10	38,830
Analista 2	10	39,305

Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,490
 95,5 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,910;0,030)
 W = 80,0
 Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0640

4.1.4.1 Conclusión

Como podemos observar el P-Value = 0.064 es mayor que el nivel de significancia alfa =0.05, los analistas reportan resultados iguales con respecto a sus promedios.

4.1.5. EVALUACION DE LA SIMILARIDAD DE RESULTADOS DE LOS DOS ANALISTAS

De acuerdo a las pruebas de igualdad de tendencia central (Mann-Whitney) y precisión (Levene) podemos afirmar al 95% de confianza que los dos analistas presentan resultados similares en los resultados de determinación de ácido domoico por HPLC en muestras de moluscos bivalvos, por lo que podemos afirmar que el factor analista no influye significativamente en los resultados de ensayo.

4.2 DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

4.2.1. EVALUACIÓN DE LA VERACIDAD DEL MÉTODO

4.2.1.1 Recuperaciones de las Repeticiones de la muestra de valor de referencia

Para evaluar si la metodología es veraz se realizaron 10 repeticiones de la muestra de valor de referencia MRCs Mus-c (Lot. 200310) con valor de referencia 41 mg/Kg. en 2 días distintos, cinco muestras independientes por día por dos analistas, para verificar si el porcentaje de recuperación obtenido es aceptable.

Cuadro N° 4.5
Resumen de los resultados obtenidos para el estudio de veracidad mediante porcentaje de recuperación para el analista 1.

No	Valor de referencia (mg/Kg.)	Concentración obtenida (mg/Kg.)	Promedio	Recuperación (%)
1	41.00	39.34	39.43	96.16
		39.51		
2	41.00	39.99	39.97	97.49
		39.95		
3	41.00	39.02	39.12	95.40
		39.21		
4	41.00	39.83	39.82	97.12
		39.81		
5	41.0	38.67	38.79	94.61
		38.91		
6	41.0	38.65	38.69	94.37
		38.73		
7	41.0	38.82	38.87	94.79
		38.91		
8	41.0	38.66	38.61	94.16
		38.55		
9	41.0	38.52	38.48	93.84
		38.43		
10	41.0	38.43	38.40	93.65
		38.36		
Promedio =			95.16	
RSD =			1.42	

Cuadro N° 4.6
Resumen de los resultados obtenidos para el estudio de veracidad
mediante porcentaje de recuperación para el analista 2.

No	Valor de referencia (mg/Kg.)	Concentración obtenida (mg/Kg.)	Promedio	Recuperación (%)
1	41.00	39.38	39.39	96.07
		39.40		
2	41.00	39.47	39.37	96.02
		39.27		
3	41.00	39.22	39.17	95.52
		39.11		
4	41.00	39.28	39.11	95.38
		38.93		
5	41.00	38.91	38.95	94.99
		38.98		
6	41.00	38.85	38.96	95.02
		39.07		
7	41.0	39.19	39.24	95.71
		39.29		
8	41.0	40.23	40.37	98.46
		40.51		
9	41.0	40.33	40.34	98.39
		40.35		
10	41.0	40.29	39.94	97.41
		39.59		
Promedio =			96.30	
RSD =			1.37	

Cuadro N° 4.7
Promedio de las recuperaciones de los dos analistas

Promedio de % recuperación final =	95.73
-------------------------------------------	--------------

4.2.1.2 Recuperaciones de las repeticiones de las adiciones de ácido domoico a la matriz.

La veracidad también fue evaluada mediante la adición del analito a la matriz para luego determinar el porcentaje de recuperación. Para tal efecto se adiciono una cantidad de ácido domoico equivalente al 50% de la curva de calibración (es decir 12.50 mg/Kg.) a una muestra de concha de abanico, para dicha adición se utilizó otro reactivo distinto al que fue utilizado para la curva de calibración (Domoic Acid.

Sigma); este estudio se realizó a una muestra homogenizada de la cual se sacaron 10 porciones a las cuales a cada una se le adiciono una alícuota equivalente a 12.5 mg/Kg. y se procedió a realizar el análisis según el método propuesto. Cada una de las 10 porciones se analizó en condiciones de repetibilidad. Se obtuvieron los siguientes resultados (expresados en mg/Kg.).

Cuadro N° 4.8
Resumen de los resultados de porcentaje de recuperación obtenidos por el método de adición estándar.

No	Concentración Inicial	Concentración Agregada (mg/Kg.)	Concentración Obtenida (mg/Kg.)	Promedio (mg/Kg.)	Porcentaje de Recuperación (%)
1	0.00	12.5	12.15	12.23	97.84
			12.31		
2	0.00	12.5	12.33	12.30	98.40
			12.27		
3	0.00	12.5	12.55	12.55	100.36
			12.54		
4	0.00	12.5	12.58	12.50	99.96
			12.41		
5	0.00	12.5	11.95	12.00	96.00
			12.05		
6	0.00	12.5	12.02	12.04	96.28
			12.05		
7	0.00	12.5	12.81	12.75	102.00
			12.69		
8	0.00	12.5	11.83	11.74	93.92
			11.65		
9	0.00	12.5	11.78	11.83	94.60
			11.87		
10	0.00	12.5	11.97	11.95	95.60
			11.93		
			Promedio =	12.19	97.50
			Desv.Estandar =	0.3333	2.6663

4.2.1.3 CONCLUSION

Según el cuadro de recuperaciones aceptables para verificar la veracidad para la concentración en estudio (valores cercanos a 10

ppm) para la concentración en estudio el porcentaje de recuperación debería estar entre 80-110 %

Cuadro N° 4.9
Cuadro de recuperaciones aceptables para verificar la veracidad del la guía de validación de LABCOMPLAINCE.

Active Ingrid. [%]	Analyte ratio	Unit	Mean recovery [%]
100	1	100%	98-102
>=10	10-1	10%	98-102
>=1	10-2	1%	97-103
>=0.1	10-3	0.1 %	95-105
0.01	10-4	100 ppm	90-107
0.001	10-5	10 ppm	80-110
0.0001	10-6	1 ppm	80-110
0.00001	10-7	100 ppb	80-110
0.000001	10-8	10 ppb	60-115
0.0000001	10-9	1 ppb	40-120

Cuadro N° 4.10
Cuadro resumen de recuperaciones para verificar la veracidad del método

Prueba	% de Recuperación			Rango de aceptación	Conclusión
	Min.	Màx.	Prom.		
MRC-Mus-c	93.65	98.46	95.73	80-110 %	Método Veraz
adición estándar	97.86	102.00	97.50	80-110 %	Método Veraz

- Como podemos observar todas las recuperaciones están en el rango aceptable de 80% a 110%, por lo cual podemos afirmar que el método es veraz.

4.2.2 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO

4.2.2.1 Repeticiones de la muestra de referencia certificada de ácido domoico.

Se evaluó la dispersión de los resultados de Acido Domoico en el MRC Mus-c de ambos analistas, para ello se realizaron 10 repeticiones por analista.

Cuadro N° 4.11
Repeticiones de cada analista del MRC Mus-c

N° de Ensayos	Analistas	
	A1	A2
1	39.43	39.39
2	39.97	39.37
3	39.12	39.17
4	39.82	39.11
5	38.79	38.95
6	38.69	38.96
7	38.87	39.24
8	38.61	40.37
9	38.48	40.34
10	38.40	39.94

Cuadro N° 4.12
Valores del RSD_r y el RSD_R y el $RSD_{Horwitz}$ de las repeticiones de cada analista del MRC Mus-c.

Cálculo de Repetibilidad y Reproducibilidad

T1	785.020
T2	30813.906
T3	20.000
T4	200.000
T5	5.354

S_r^2	0.297456
S_L^2	0.049087
S_R^2	0.346542

S_r	0.5454
S_R	0.5887

RSD_r	1.39
RSD_R	1.50

Concentración analito	41.00
$RSD_{Horwitz}$	6,13

4.2.2.2 Repeticiones de las adiciones estándares de ácido domoico.

También se evaluó la dispersión de las 10 muestras en la adición del estándar.

Cuadro N° 4.13
Valores del RSD_r de las adiciones estándares de ácido domoico.

Nro. Muestra	Resultados (mg/Kg.)
1	12.23
2	12.30
3	12.55
4	12.50
5	12.00
6	12.04
7	12.75
8	11.74
9	11.83
10	11.95
Promedio	12.19
Desv. estándar	0.3333
% RSD	2.7348

Cuadro N° 4.14
Valores del RSD_r de las repeticiones del MRC-Mus-c y de las adiciones estándares.

Prueba	% RSD Experiment.	% RSD Horwitz	Criterio de precisión	Conclusión
MRC-Mus-c	1,50	6,13	$RSD_{Exp} < RSD_r \text{ Horwitz}$	El método es preciso
Adición estándar	2,73	7,36	$RSD_{Exp} < RSD_r \text{ Horwitz}$	El método es preciso

Cuadro N° 4.15
Valores de los límites de repetibilidad y reproducibilidad del método.

r	1.53
R	1.65

(Límite de Repetibilidad)
(Límite de Reproducibilidad)

4.2.2.3 CONCLUSION

- Para verificar que el método es preciso el valor de RSD_r del método debe ser menor o igual al $RSD_{r \text{ Horwitz}}$.
- El valor de RSD_r de las repeticiones del MRC-Mus-c (1.39%) y de las adiciones estándares (2.73%) son menores que los valores del $RSD_{r \text{ Horwitz}}$ (6.13% y 7.36% respectivamente), por lo que podemos afirmar que el método es preciso y repetible.
- Se determinaron los valores del límite de repetibilidad (1.53 mg/Kg) y el límite de reproducibilidad (1.65 mg/kg) para utilizarlos como parámetros de precisión en el aseguramiento de calidad de resultados en rutina.

4.2.3 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO

Por definición, como el método es preciso y es veraz, entonces es exacto.

4.2.4 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad es la capacidad (dentro de un rango dado) de producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra; este parámetro es importante por que permite el uso de la estandarización con un solo punto. Para su determinación se preparó 4 estándares de ácido domoico de 2.5; 5.0; 10.0 y 25.0 mg/Kg a partir de diluciones del reactivo NRC-CRM-DA-e DOMOIC ACID de una concentración de 99.4 ug/mL y se inyectaron al equipo por duplicado, esta operación se realizó en tres días distintos para obtener tres curvas independientes a las cuales se les determinó los estadísticos de regresión: la pendiente, la ordenada al origen (intercepto) y el coeficiente de regresión. Para analizar la variación entre las tres curvas se realizó los siguientes:

- Coeficiente de correlación de la regresión,
- El análisis de varianza de la regresión,
- Los intervalos de confianza del intercepto

- El análisis de los residuales.

Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas y gráficos:

Cuadro N° 4.16
Valores de la primera curva de calibración para la determinación de ácido domoico.

Curva 1	
Concentración	Area
2,5	371572
5	765642
10	1576637
25	3884803
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999945535
Coefficiente de determinación R ²	0,999891072
R ² ajustado	0,999836608
Error típico	20097,63929
Observaciones	4

Cuadro N° 4.17
Valores de la segunda curva de calibración para la determinación de ácido domoico.

Curva 2	
Concentración	Area
2,5	376327
5	773496
10	1605083
25	4036222
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999990119
Coefficiente de determinación R ²	0,999980238
R ² ajustado	0,999970357
Error típico	8933,81068
Observaciones	4

Cuadro N° 4.18
Valores de la tercera curva de calibración para la determinación de ácido domoico.

Curva 3	
Concentración	Area
2,5	417353
5	824555
10	1627040
25	3869786
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999843584
Coefficiente de determinación R ²	0,999687192
R ² ajustado	0,999530788
Error típico	33379,81591
Observaciones	4

Cuadro N° 4.19
Valores para realizar la curva global de calibración.

DIA	Concentración (mg/Kg)	Área
1	2,5	371572
	5	765642
	10	1576637
	25	3884803
2	2,5	376327
	5	773496
	10	1605083
	25	4036222
3	2,5	417353
	5	824555
	10	1627040
	25	3869786

Cuadro N° 4.20
Valores de los estadísticos de la curva de calibración global.

Coefficiente de correlación múltiple	0,999472204
Coefficiente de determinación R ²	0,998944686
R ² ajustado	0,998839155
Error típico	48860,89014
Observaciones	12

Cuadro N° 4.21
Análisis de Varianza de la regresión.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	2,25987E+13	2,25987E+13	9465,855584	3,22255E-16
Residuos	10	23873865850	2387386585		
Total	11	2,26225E+13			

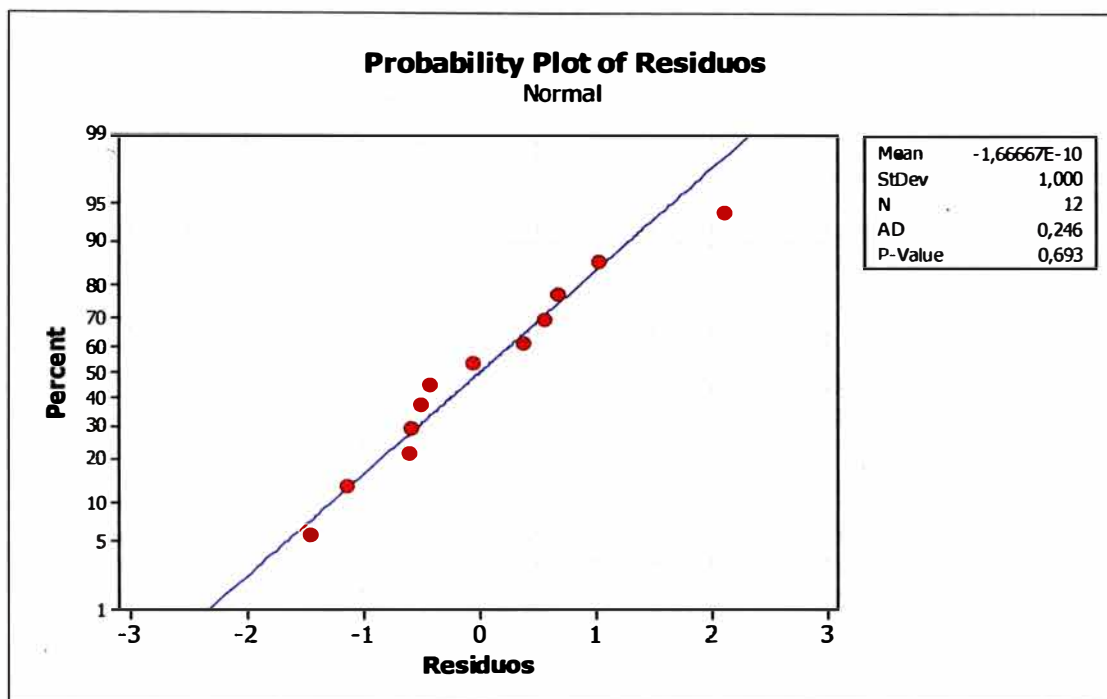
Cuadro N° 4.22
Intervalos de confianza de la curva global de calibración.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	6738,529915	22221,64098	0,303241778	0,767920386	-42774,38028	56251,4401
Concentración	157236,4991	1616,119344	97,29262862	3,22255E-16	153635,5602	160837,438

Cuadro N° 4.23
Residuos de la curva global de calibración.

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico Área</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>
1	399829,7778	-28257,77778	-0,606558892
2	792921,0256	-27279,02564	-0,58554978
3	1579103,521	-2466,521368	-0,052944378
4	3937651,009	-52848,00855	-1,134393148
5	399829,7778	-23502,77778	-0,504491859
6	792921,0256	-19425,02564	-0,416962088
7	1579103,521	25979,47863	0,557654742
8	3937651,009	98570,99145	2,115846185
9	399829,7778	17523,22222	0,376139494
10	792921,0256	31633,97436	0,679029631
11	1579103,521	47936,47863	1,028966169
12	3937651,009	-67865,00855	-1,456736078

Gráfico N° 4.5
Gráfico de la prueba de Normalidad Anderson –Darling de los
residuos de la curva global de calibración.



4.2.4.1 CONCLUSION

- La curva global de calibración relaciona satisfactoriamente la concentración y la respuesta del equipo (área), como se puede ver en su coeficiente de correlación de 0,999472204, superior al valor de 0,999.⁴
- En el análisis de varianza de la regresión el valor de F (9465,855584) es mayor que el valor de F teórico (3,22255E-16), por lo que podemos afirmar que la curva global de calibración es lineal al 95% de confianza.
- El intervalo de confianza del intercepto comprende el cero (-42774,38028; 56251,4401) por lo cual podemos afirmar que el intercepto es cero al 95% de confianza.

⁴ De acuerdo a la guía de validación del Comité Nórdico de Alimentos.

- Los residuos de la regresión tiene un p-value de 0.693 en la prueba de Anderson-Darling, por lo que podemos afirmar que los residuos se distribuyen normalmente al 95% de confianza.
- La curva de calibración que relaciona la concentración y la respuesta del equipo (áreas) es lineal.

4.2.5 DETERMINACION DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.

Los límites de detección y cuantificación serán estimados a partir de la curva de regresión del método y considerando concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

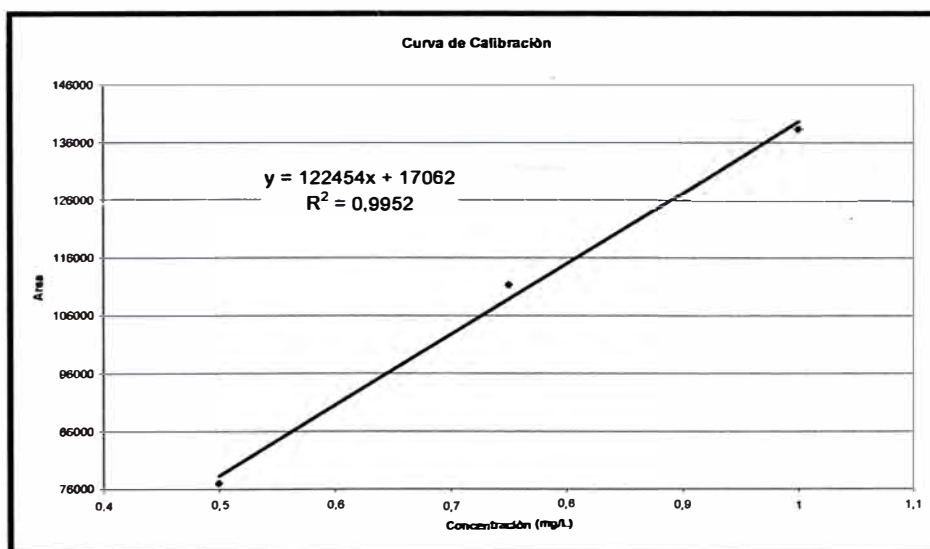
Cuadro N° 4.24

Valores del RSD de las repeticiones de las áreas obtenidas al leer las concentraciones estándares de ácido domoico de 0,5 mg/L ; 0,75 mg/L y 1 mg/L de ácido domoico.

Concentración (mg/L)	Área			Área Promedio	Desv. Estand.	RSD
	1	2	3			
0,5	76424	76806	77955	77061,66667	796,878	1,03407816
0,75	112117	111252	110700	111356,3333	714,238	0,64139889
1	139461	136769	138636	138288,6667	700,531	0,50657152

Gráfico N° 4.6

Recta de calibración de los estándares de ácido domoico de 0,5 mg/L ; 0,75 mg/L y 1 mg/L de ácido domoico.



4.2.5.1 Cálculo de respuesta a concentración cero

El análisis de regresión tomando los valores medios de las áreas de la recta fue:

$$y = 122454x + 17062$$

La estimación de la respuesta a concentración cero es:

$$Y_{bl} = 17062$$

4.2.5.2 Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero

Se efectúa el análisis de regresión tomando concentración como X y desviación estándar como Y.

Se efectúa el análisis de regresión tomando concentración como X y desviación estándar como Y.

X (mg/L)	Y Desv. Std.
0,5	796,877866
0,75	714,238
1	700,531

La recta calculada es: $y = -192.69 X + 881.74$

y se toma $S_{(Concentración=0)} = 881.74$

4.2.5.3 Determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Luego, tomando como pendiente el promedio de las tres curvas en el desarrollo del parámetro de linealidad b: 157236.4991, los índices a calcular son:

Cuadro N° 4.25
Determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Limite de Detección (LD) = $(17062+3 \times 89.954)/157236.4991 =$	0,13 mg/L
Limite de Cuantificación (LC) = $(17062+10 \times 89.954)/157236.4991 =$	0,16 mg/L
LD = $0.28617 \times Fd =$	0,63 mg/Kg
LC = $0.29202 \times Fd =$	0,82 mg/Kg

4.2.5.4 Conclusiones

- El límite de detección del método es 0,63 mg/Kg.
- El límite de cuantificación del método es 0,82 mg/Kg.

4.2.6 DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE ROBUSTEZ DEL MÉTODO

4.2.6.1 PROCEDIMIENTO

La robustez de un método analítico corresponde al estudio de permanecer inalterable a pequeñas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales. Para su determinación se utilizó el diseño de Youden - Steirner, que permite estudiar si el factor influye significativamente sobre el resultado.

En la cuadro N° 6.28 se muestran las combinaciones para éste estudio donde las variables que son propias del método se indican con letras mayúsculas (A, B, C, D, E) y con letras minúsculas (a, b, c, d, e) corresponden a las variables que han sido alteradas. La muestra utilizada para determinar la robustez fue el MRC Mus-c.

Cuadro N° 4.26
Factores de Variabilidad para el Estudio de Robustez.

FACTOR A : Peso de muestra
Estándar (A) 4 g
Variable (a) 3.5 g
FACTOR B : Caudal
Estándar (B) 1.25 mL/min.
Variable (b) 1.5 mL/min.
FACTOR C: Fase Móvil
Estándar (C) Acetonitrilo - Agua - Ac. Trifluoroacético (10 : 89.9 : 0.1)
Variable (c) Acetonitrilo - Agua - Ac. Trifluoroacético (11 : 88.9 : 0.1)
FACTOR D: Columna
Estándar (D) Gemini C-18, 150 x 4.60 mm 5 um. Phenomenex
Variable (d) LiChoCART RP-18, 150 x 4.60 mm 5 um. Purospher
FACTOR E: Tiempo de extracción - Inyección
Estándar (E) 1 hora
Variable (e) 12 horas

Cuadro N° 4.27
Combinaciones y resultados de análisis de robustez.

N°	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Factor E	Resultado
R1	A	B	C	D	E	39,67
R2	A	B	c	D	e	39,48
R3	A	b	C	d	E	39,60
R4	A	b	c	d	e	39,68
R5	a	B	C	d	e	39,18
R6	a	B	c	d	E	39,15
R7	a	b	C	D	e	39,42
R8	a	b	c	D	E	39,21

Cuadro N° 4.28
Efectos de los factores del análisis de robustez.

Parámetro	Diferencia
Efecto (A - a)	$((R1+R2+R3+R4)-(R5+R6+R7+R8))/4$
Efecto(B - b)	$((R1+R2+R5+R6)-(R3+R4+R7+R8))/4$
Efecto(C - c)	$((R1+R3+R5+R7)-(R2+R4+R6+R8))/4$
Efecto(D - d)	$((R1+R2+R7+R8)-(R3+R4+R5+R6))/4$
Efecto(E - e)	$((R1+R3+R6+R8)-(R2+R4+R5+R7))/4$

4.2.6.2 RESULTADOS

Para decidir si un factor tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de S_r y $2,24^5$.

Es decir, por ejemplo, para el factor A el efecto de dicho factor es no significativo si cumple la siguiente relación:

Ecuación 4.1

$$\boxed{\text{Efecto}_{A-a} \leq 2,24 S_r}$$

Cuadro N° 4.29
Valores de los Efectos de los factores del análisis de robustez y el efecto máximo permisible.

Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Factor E
0,3675	0,1075	0,0875	0,0425	0,0325

S_r	0,5454
Efecto máx	1,2217

⁵ De acuerdo a la guía de validación de la FAO.

4.2.6.2 RESULTADOS

- Como los efectos de todos los factores son menores que el efecto máximo (1,2217 mg/Kg) podemos afirmar que el método es robusto para los cambios de: Peso de muestra, caudal, composición de la fase móvil, cambio de columna y tiempo de extracción - inyección.

4.2.7 EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD – ESPECIFICIDAD

4.2.7.1 PROCEDIMIENTO

Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes, en la matriz de la muestra. Para determinar si el método es selectivo se tomó las siguientes referencias:

1. Comparación de los cromatogramas de un estándar de ácido domoico con una muestra de concha de abanico, para verificar que en el mismo tiempo de retención no existe interferencias por matriz. Ver Cuadro 5.34
2. Reacción degradativa mediante "Fotólisis", exponiendo el MRC a la luz UV para comprobar la disminución o desaparición de la señal del analito. Ver Cuadro 5.37

Gráfico N° 4.7
Cromatograma 1. Estándar

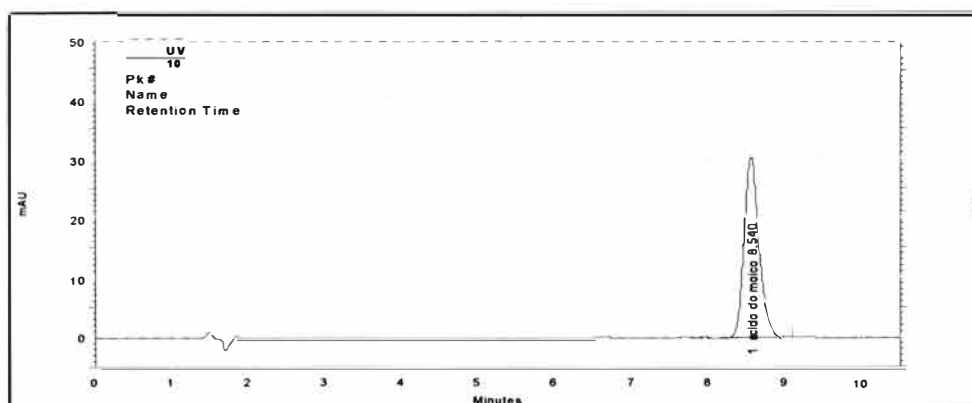


Gráfico N° 4.8
Cromatograma 2. Muestra

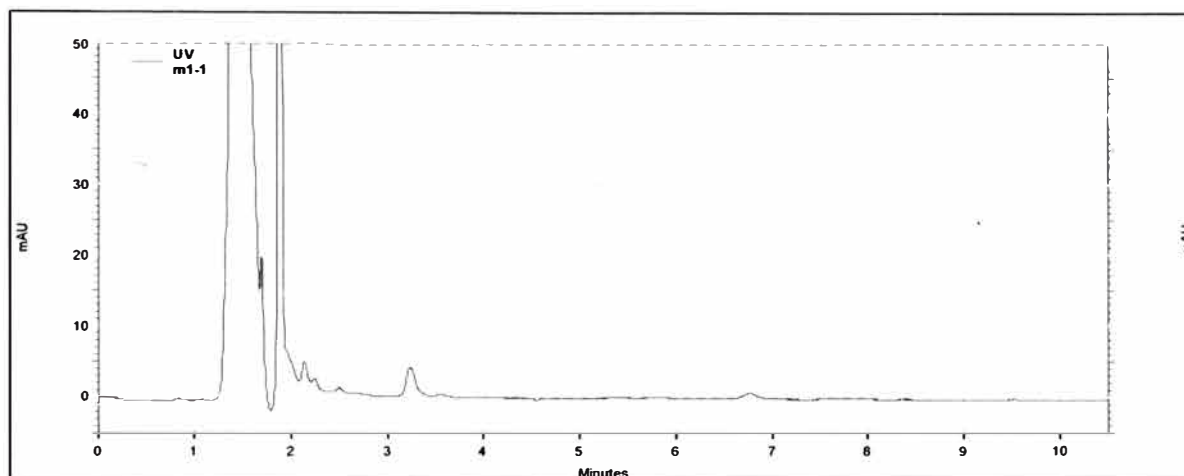


Gráfico N° 4.9
**Cromatograma 3. Comparación de los cromatogramas del estándar,
muestra (concha de abanico) y muestra mas adición estándar.**

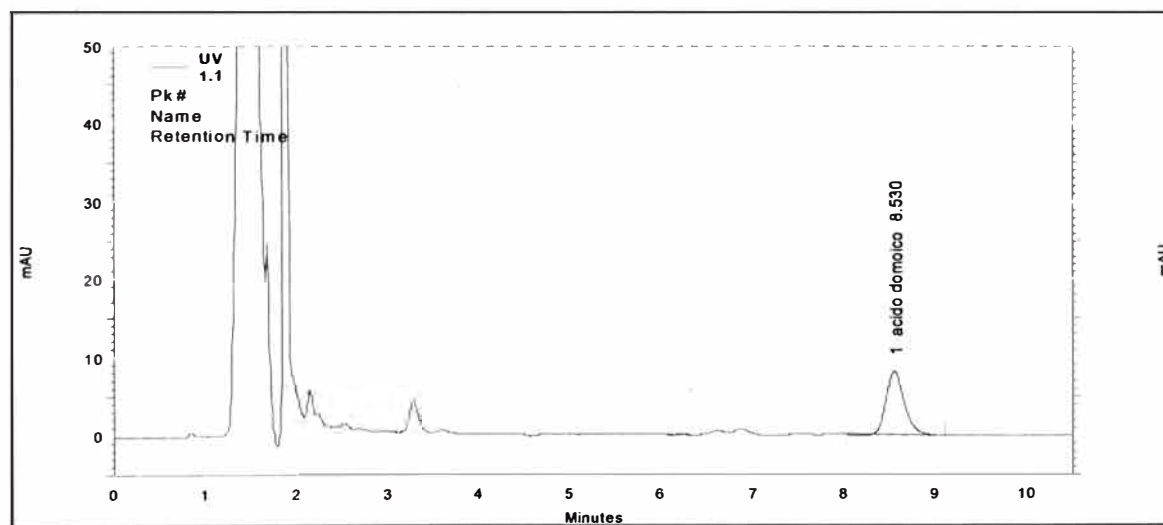


Gráfico N° 4.10
Cromatograma 4. MRC Mus-c

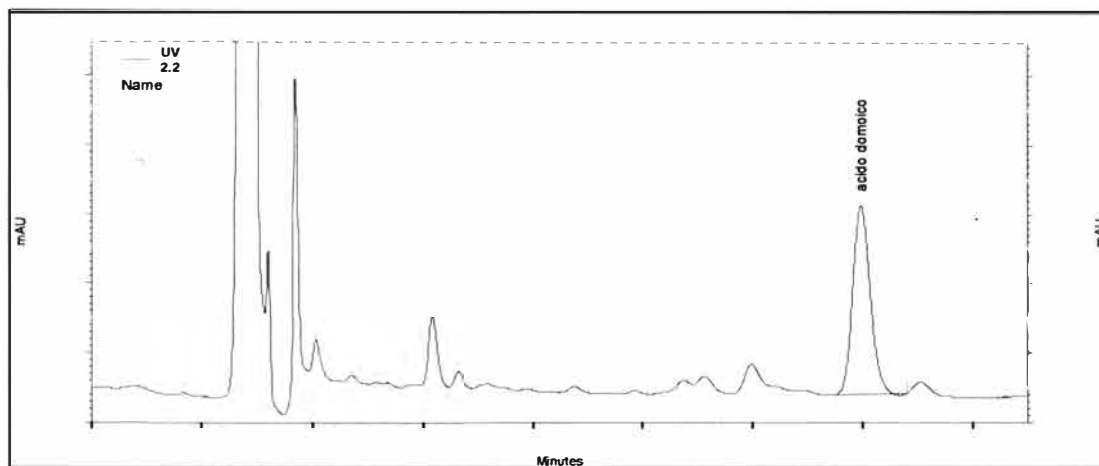


Gráfico N° 4.11
Cromatograma 5. Tratamiento 12 hs UV.

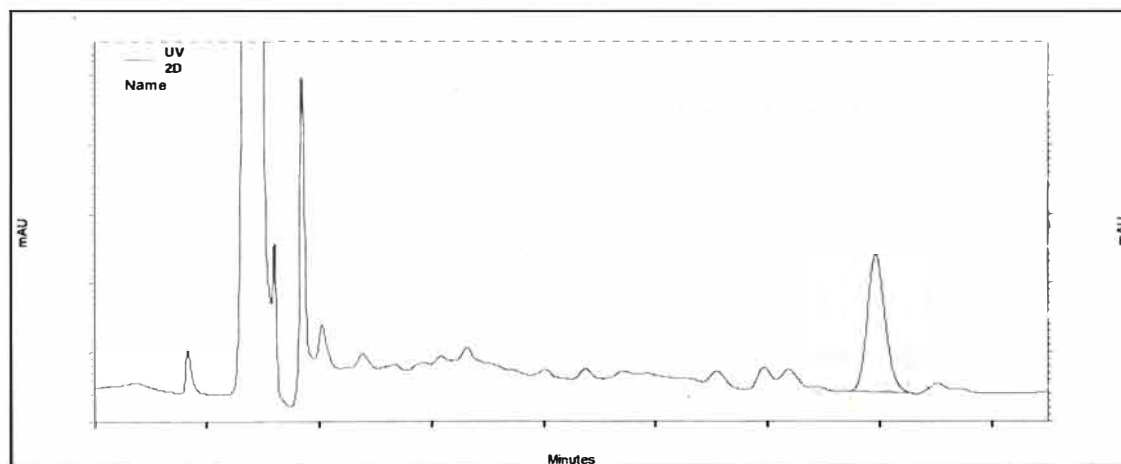
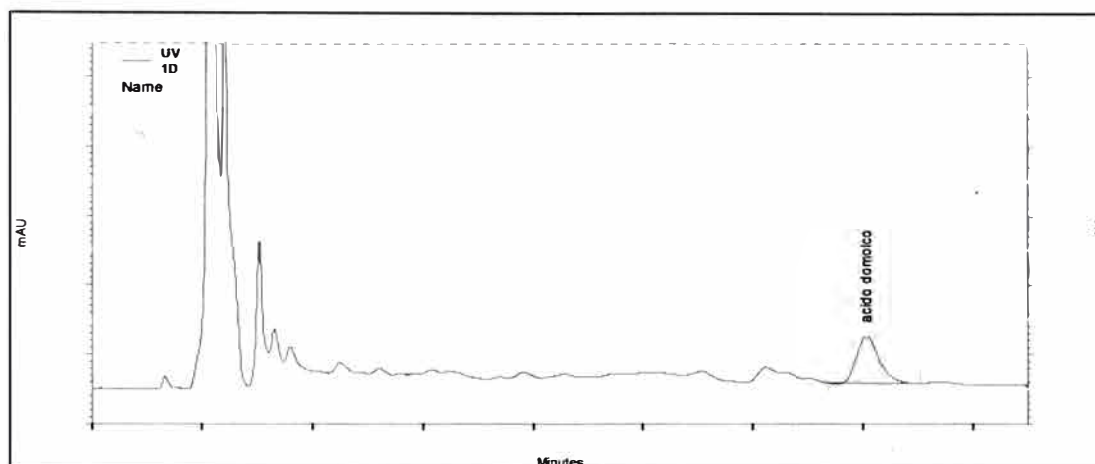


Gráfico N° 4.12
Cromatograma 6. Tratamiento 24 hs UV.
Degradación artificial (fotólisis) a MRC Mus-c.



4.2.7.2 CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados de los cromatogramas mostrados en el cuadro 6.34 no existen interferencias por matriz en el tiempo de retención (8.5 minutos), demostrado por el porcentaje de recuperación del estándar evaluado en el desarrollo del parámetro de veracidad. Además, en los cromatogramas de el cuadro 6.37 se comprueba la disminución de la señal del pico de ácido domoico y no existe interferencias con sus productos de degradación, por lo tanto el método es selectivo y específico.

4.2.8 ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

4.2.8.1 IDENTIFICACION DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Para determinar la incertidumbre utilizamos el procedimiento "global", aprovechando la información que se ha generado durante el proceso de verificación de la trazabilidad. La fig.1 muestra la expresión para calcular globalmente la incertidumbre. Se observa que las fuentes de incertidumbre identificadas en la determinación de Acido Domoico pueden agruparse en cuatro componentes:

- 1) Incertidumbre debida a la precisión;
- 2) Incertidumbre debida a la verificación de la trazabilidad;
- 3) Incertidumbre debida a la heterogeneidad de la muestra; y
- 4) Incertidumbre debida a otros términos.

Cuadro N° 4.30
Componentes de incertidumbre.

$$U = K \times \sqrt{U^2_{\text{precisión}} + U^2_{\text{trazabilidad}} + U^2_{\text{heterogeneidad}} + U^2_{\text{otros terminos}}}$$

El cuadro N° 5.38 muestra que los dos primeros términos de la expresión se pueden obtener utilizando la información generada durante el proceso de verificación de la trazabilidad, es decir cuando se analizó el MRC-Mus-c. La incertidumbre debida a la precisión corresponde a la variabilidad experimental del método analítico, y en ella se incluyen las fuentes de incertidumbre asociadas a todas las etapas del método analítico, consideradas de una forma global (precisión de la balanza, etapa de extracción, curva de calibración, la recuperación y la precisión del material volumétrico).

El segundo término, $U^2_{\text{trazabilidad}}$, considera la incertidumbre asociada a asegurar que el método proporciona resultados trazables. Para asegurar esto se ha debido analizar el MRC Mus-c con los consiguientes componentes de variabilidad asociados (incertidumbre del propio material y los mismos términos de incertidumbre asociados a la precisión del método, $U^2_{\text{precisión}}$). El tercer término de expresión considera a la incertidumbre asociada a la heterogeneidad de las muestras de moluscos bivalvos. Esto

es debido como el MRC es una muestra homogénea, la U² trazabilidad no tiene en cuenta las etapas de de homogenización que se tendrán que aplicar a las futuras muestras de rutina. Por ultimo, el cuarto termino, y en el caso concreto del análisis de Acido Domoico se podrían incorporar la incertidumbre asociadas de las muestras de rutina (en caso de analizar muestras que no fueran de moluscos bivalvos).

4.2.8.2. ESTIMACION DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DE INCERTIDUMBRE

4.2.8.2.1 INCERTIDUMBRE DEBIDA A LA PRECISION

Cuadro N° 4.31
Esquema para la determinación de la incertidumbre debida a la precisión del método.

$U_{\text{precision}} = \frac{S}{\sqrt{N}}$	Donde : S: Desviacion estandar de los 20 resultados obtenidos al analizar el MRC. N: Numero de veces que se analiza la muestra de rutina en condiciones intermedias (normalmente, N=1)
$U_{\text{precision}} = \frac{0.5887}{\sqrt{1}}$	
$U_{\text{precision}} = 0.5887 \text{ mg/Kg}$	

La incertidumbre debida a la precisión corresponde a la precisión del método analítico y se obtuvo a partir del análisis del MRC.

4.2.8.2.2 INCERTIDUMBRE DEBIDA AL PROCESO DE VERIFICACION DE LA TRAZABILIDAD

Se calcula teniendo en cuenta la incertidumbre de la referencia y de la precisión del método.

Cuadro N° 4.32
Componentes de la incertidumbre de la trazabilidad.

$$\text{Utrazabilidad} = \sqrt{\left[\frac{U_{\text{CRM}}}{K}\right]^2 + \left[\frac{S}{\sqrt{n}}\right]^2}$$

Donde: El primer termino de la expresi3n corresponde al cuadrado de la incertidumbre est3ndar del MRC (es decir corresponde a la incertidumbre expandida del CRM dividida por el factor de cobertura K) y el segundo termino corresponde a la incertidumbre del valor medio obtenido al analizar 20 veces el MRC.

Cuadro N° 4.33
Valor del componente de la incertidumbre de la trazabilidad.

$$\text{Utrazabilidad} = \sqrt{\left[\frac{2}{2}\right]^2 + \left[\frac{0.5887}{\sqrt{20}}\right]^2}$$

Utrazabilidad = 1.0173 mg/Kg

4.2.8.2.3 INCERTIDUMBRE DEBIDA A LA HETEROGENEIDAD DE LA MUESTRA

Para calcular la incertidumbre de la heterogeneidad, se realizo la homogenizaci3n de aprox. 50 g de muestras de m3sculo, g3nadas y v3sceras de conchas de abanico las cuales fueron contaminadas con Acido Domoico (12.50 mg/Kg.), para dicha adici3n se utiliz3 otro reactivo distinto al que fue utilizado para la curva de calibraci3n (Domoic Acid .Sigma). Luego se analizaron 10 muestras en

condiciones del homogenizado con el procedimiento analítico en condiciones de repetibilidad.

Cuadro N° 4.34
Valor del componente de la incertidumbre debida la heterogeneidad.

$$U_{\text{heterogeneidad}} = \sqrt{S^2_{\text{MUESTRAS}}}$$

$$U_{\text{heterogeneidad}} = 0.3333 \text{ mg/Kg}$$

4.2.8.2 ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE FINAL

La incertidumbre final de los resultados se obtiene combinando los cuatro términos de incertidumbre estándar del cuadro N° 4.35 y multiplicando por el factor de cobertura K.

Cuadro N° 4.35
Valores de los componentes de la incertidumbre en la determinación de Acido domoico por HPLC.

Termino, X	Incertidumbre estándar ,U(X) mg/Kg.	Concentracion (mg/Kg.)	Incertidumbre estándar relativa,U(X) _R
Precision	0,5755	39,10	0,0147
Trazabilidad	1,0173	41,00	0,0248
Heterogeneidad	0,3333	12,39	0,0269
Total	1,9261	0,0664

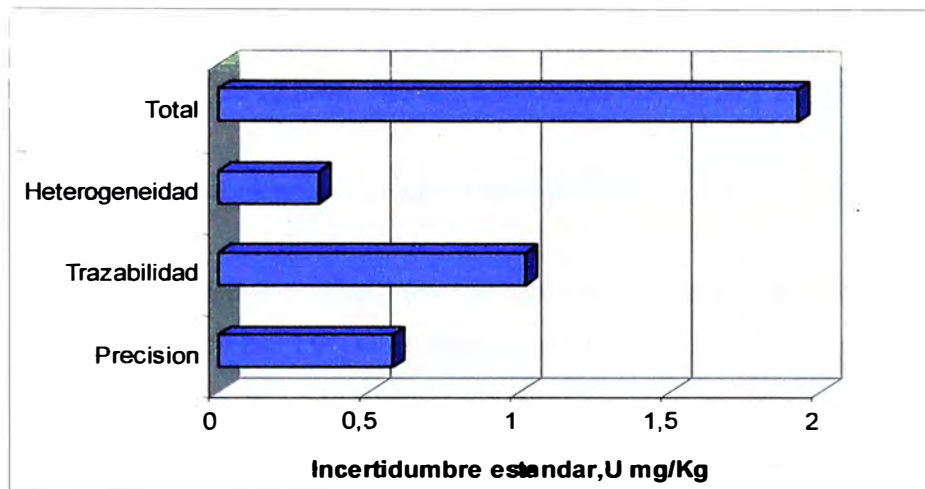
La incertidumbre en términos absolutos es:
 $U_{\text{expandida}} = K \times U = 2 \times 2.00 = 4.00 \text{ mg/Kg.}$

La incertidumbre en términos relativos es:
 $U_{\text{relativa}} = K \times U_R = 2 \times 0.0664 \times C = 0.1328 \times C \text{ mg/Kg.}$

$U_{\text{relativa}} = 0.1328 \times C \text{ mg/Kg.}$

La incertidumbre en términos relativos considera que la incertidumbre varía linealmente con la concentración.

Cuadro N° 4.36
Contribución de los componentes de incertidumbre a la incertidumbre total.



4.2.8.3 CONCLUSION

- La incertidumbre se ha calculado en ambos casos utilizando un factor de cobertura de $K= 2$. Por tanto, hay aproximadamente un 95% de probabilidad de que la concentración verdadera de ácido domoico de rutina este contenida dentro del intervalo proporcionado por la concentración obtenida al analizar la muestra de rutina y su incertidumbre asociada, U.

4.3. CONCLUSIONES FINALES

- Los analistas reportan resultados similares al 95% de confianza.
- Los resultados del método son veraces.
- Los resultados del método son precisos y repetibles.
- El límite de repetibilidad del método es de 1,53 mg/Kg.
- El límite de reproducibilidad del método es de 1,65 mg/Kg.
- Los resultados del método son exactos.
- La relación entre la concentración y la respuesta del equipo (área) es lineal al 95% de confianza.
- El límite de detección del método es 0,63 mg/Kg.

- El límite de cuantificación del método es 0,82 mg/Kg.
- El método es selectivo y específico.
- El método es robusto para los cambios de: Peso de muestra, caudal, composición de la fase móvil, cambio de columna y tiempo de extracción - inyección.
- La incertidumbre relativa del método al 95% de confianza es $U = 0.1328 \times C$ mg/Kg.
- Por todo lo anterior podemos afirmar que el método de determinación de ácido domoico por HPLC en moluscos bivalvos fue validado por lo tanto es confiable para su uso en su alcance.
- La metodología estadística planteada da criterios técnicos sumamente robustos para decidir si la técnica analítica cumple o no cumple con los parámetros analíticos asociados a la validación de dicha técnica analítica.
- De esta manera se tiene una metodología estadística robusta, como guía la validación de técnicas analíticas de laboratorios a nivel nacional.

BIBLIOGRAFÍA.

1. AOAC Internacional (1999), Qualitative and Cuantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation.
2. EURACHEM, (1998), The fitness for Purpose of analytical Methods.
3. FAO (2000), Basic statistical Tools.
4. INDECOPI (2003), NTP-ISO 17025. Requisitos generales para la competencia técnica de los laboratorios de calibración y ensayo.
5. INDECOPI (2003), Guía de Validación de Ensayos Sensoriales. El Peruano 2-02-2003.
6. INMETRO (2003), Orientaciones sobre Validación de métodos de ensayo químicos. DOQ – CGCRE – 008 – 2003
7. International Standards Organization (1994), ISO-5725-1: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions.
8. International Standards Organization (1994), ISO-5725-2: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
9. International Standards Organization (1994), ISO-5725-6: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 6: Use in practice of accuracy values.
10. Montgomery D., (2001), Applied Statistics and Probability for Engineers. Jhon Wileys & Sons, INC.
11. Montgomery D., (2005), Control Estadístico de Calidad.
12. Montgomery D., (2001), Design and analysis of Experiments. Jhon Wileys & Sons, INC.

13. Shibamoto T; Bjeldanes L. F. 1996 Introducción a la toxicología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).
14. Lindner, Ernst 1994 Toxicología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
15. Marsaglia G., Marsaglia J., 2004 , Evaluating the Anderson-Darling distribution. The Florida State University. Western Oregon University.
16. Giles D., 2000, A Saddlepoint Approximation to the Distribution Function of the Anderson-Darling Test Statistic. Econometrics Working Paper EWP 0005. University of Victoria.
17. Mandel J., 1972, Improvement of Precision by Repeated Measurements Application to Analytical Control Methods. Columbia University, New York.
18. Thavatchai Vorapongsathorn T., Taejaroenkul S., Viwatwongkasem C., 2004, A comparison of type I error and power of Bartlett's test, Levene's test and Cochran's test under violation of assumptions. Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(4) : 537-547.
19. Cochran, W.G. 1947. Some consequences when the assumptions for the analysis of variance are not satisfied. Biometrics, 3: 22-38
20. AMC Technical Brief, Robust statistics: a method of coping with outliers. Analytical Methods Comité, Royal Society of Chemistry 2001, No.6 Apr 2001.
21. Kumar Sinha S., Sequential Application of Multivariate outlier test: a Robust Approach. Dalhousie University Halifax. Nova Scotia July 1997.
22. J. Lindholm, 2004. Development Validation of HPLC Methods for analytical and Preparative Purposes. Faculty of Science and Technology, Uppsala University.
23. Soto C., Cuello M., Alfonso Y., Cabrera O., Sierra G., 2002, Validación de una técnica colorimétrica para la determinación de carbohidratos. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.
24. Romero M., 2001. desarrollo de nuevas Metodologías analíticas en el control de calidad de la industria Farmacéutica. Universitat Autònoma de Barcelona.
25. Pérez R., Validación de la metodología para la determinación de ácido domoico (biotoxina asp) en moluscos bivalvos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), Rev Peru Med Exp Salud Publica 2002; 19(3).

26. AMC Technical Brief, The amazing Horwitz function. Royal Society of Chemistry 2004 , AMC Technical Brief No.17 July 2004
27. Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler (NMKL). Procedure No 5 version 1: 1997, Estimation and expression of measurement uncertainty in chemical analysis. Finlandia
28. Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler (NMKL). Procedure No 4 version 1: 1996, Validation of Chemical Analytical Methods. Finlandia.
29. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Food and Nutrition papers 80, Marine biotoxins, 2004.
30. Sadek P., The HPLC Solvent Guide. Second Edition. Wiley – interscience 2002.
31. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos de Ensayo (1998). Madrid.
32. Grubbs, F. E. 1969. Procedures for detecting outlying observations in samples. Technometrics 11.1.
33. Stefansky, W. (1972), Rejecting Outliers in Factorial Designs, Technometrics, Vol. 14, pp. 469-479.
34. Stephens, M. A. (1974). EDF Statistics for Goodness of Fit and Some Comparisons, Journal of the American Statistical Association, Vol. 69, pp. 730-737.
35. Stephens, M. A. (1976). Asymptotic Results for Goodness-of-Fit Statistics with Unknown Parameters, Annals of Statistics, Vol. 4, pp. 357-369.
36. Stephens, M. A. (1977). Goodness of Fit for the Extreme Value Distribution, Biometrika, Vol. 64, pp. 583-588.
37. Stephens, M. A. (1979). Tests of Fit for the Logistic Distribution Based on the Empirical Distribution Function, Biometrika, Vol. 66, pp. 591-595.
38. Snedecor, George W. and Cochran, William G. (1989), Statistical Methods, Eighth Edition, Iowa State University Press.
39. Levene, H. (1960). In Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling, I. Olkin et al. eds., Stanford University Press, pp. 278-292.

ANEXOS

ANEXO A

PRUEBA DE PUNTOS ATÍPICOS DE GRUBBS

La prueba de Grubbs (Grubbs 1969, Stefansky 1972) se utiliza para detectar puntos atípicos en un conjunto de datos univariados. Se basa en asumir que el conjunto de datos se distribuye normalmente. Es decir, usted debe primero verificar que sus datos se puedan razonablemente aproximar por una distribución normal antes de aplicar la prueba del Grubbs.

La prueba de Grubbs detecta un punto atípico a la vez (Kumar 1997). Este punto atípico es eliminado del conjunto de datos y se itera la prueba hasta que no se detecta ningún punto atípico. Sin embargo, las iteraciones múltiples cambian las probabilidades de la detección, y la prueba no se debe utilizar para los tamaños de muestra igual o menores a $n = 6$.

A1.1 Hipótesis:

Ho: El punto extremo no es atípico.

Ha: El punto extremo es atípico.

A1.2 Estadístico Experimental:

$$G = \frac{\max |Y_i - \bar{Y}|}{S_Y}$$

A1.3 Estadístico Tabular:

El estadístico tabular sería:

$$G_{\text{teórico}} = \frac{N-1}{N} \sqrt{\frac{t_{(\alpha/2N; N-2)}^2}{N-2 + t_{(\alpha/2N; N-2)}^2}}$$

A1.4 Decisión:

La hipótesis nula (Ho) sería rechazada si $G > G_{\text{Teórico}}$. Caso contrario el valor extremo no sería punto atípico al “ $1-\alpha$ ” % de confianza.

ANEXO B

PRUEBA DE NORMALIDAD DE ANDERSON DARLING

La prueba de Anderson-Darling (Stephens, 1974) se utiliza para probar si una muestra de datos proviene de una población con una distribución específica. Es una modificación de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y da más peso a las colas que la prueba de K-S. La prueba de K-S es distribución libremente en el sentido que los valores críticos no dependen de la distribución específica que es probada.

La prueba de Anderson-Darling hace uso la distribución específica en calcular valores críticos. Esto tiene la ventaja de permitir una prueba más sensible y la desventaja que los valores críticos se deban calcular para cada distribución. Actualmente, las tablas de valores críticos están disponibles para las distribuciones: normal, lognormal, exponencial y Weibull.

Las tablas de valores críticos en este manual se puede ver en Stephens (1974, 1976, 1977, y 1979), puesto que esta prueba se aplica generalmente con un programa estadístico del software que imprima los valores críticos relevantes.

B.1 Hipótesis:

Ho: El conjunto de datos posee una distribución normal.

Ha: El conjunto de datos no posee una distribución normal.

B.2 Estadístico Experimental:

El valor experimental de la prueba Anderson-Darling es AD que se estima de la siguiente manera:

$$AD = \sum_{i=1}^n \frac{1-2i}{n} \{ \ln(Fo[Z_i]) + \ln(1 - Fo[Z_{n-i}]) \} - n$$

Además:

F_o: Es la distribución acumulada de los valores estandarizados normalmente.

Z_i: Es el valor estandarizado normalmente del resultado X_i.

n: Es el total de observaciones del conjunto de datos.

B.3 Estadístico Tabular:

El valor teórico de la prueba Anderson-Darling al 95% de confianza es:

$$AD_{\text{tabla}} = \frac{0.752}{1 + \frac{0.75}{n} + \frac{2.25}{n^2}}$$

Donde:

n: Es el total de observaciones del conjunto de datos.

B.4 Decisión:

La hipótesis nula (H₀) sería rechazada si A-D > AD_{tabla}. Caso contrario el conjunto de datos se distribuye normalmente "1-α" % de confianza.

ANEXO C

PRUEBA DE BARTLETT

La prueba de Bartlett (Snedecor y Cochran, 1983) se utiliza para probar si las muestras de k tienen varianzas iguales. Las varianzas iguales a través de muestras se llaman homogeneidad de varianzas o Homocedasticidad. Algunas pruebas estadísticas, por ejemplo el análisis de la varianza, asumen que las varianzas son iguales a través de grupos o de muestras. La prueba de Bartlett se puede utilizar para verificar esa asunción (Mandel, 1972).

La prueba de Bartlett (Thavatchai, Taejaroenkul y Viwatwongkasem, 2004) es sensible a las salidas de la normalidad. La prueba de Levene (Cochran, 1947) es una alternativa a la prueba de Bartlett que es menos sensible a las salidas de la normalidad.

C.1 Hipótesis:

Ho: Los grupos poseen igual varianza.

Ha: Al menos uno de los grupos no posee igual varianza respecto al resto.

C.2 Estadístico Experimental:

El valor experimental de la prueba Bartlett se estima de la siguiente manera:

$$T = \frac{(N - k) \times \ln(S_p^2) - \sum_{i=1}^k (N_i - 1) \times \ln(S_i^2)}{1 + \left(\frac{1}{3(k-1)} \right) \left(\left(\sum_{i=1}^k \frac{1}{N_i - 1} \right) - \left(\frac{1}{N - k} \right) \right)}$$

Donde:

N : Tamaño total del conjunto de datos.

k : Cantidad de subgrupos del conjunto de datos.

N_i : Tamaño total de cada subgrupo de datos.

S_i : Desviación Estándar de cada subgrupo de datos.

Además:

$$S_p^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(N_i - 1)S_i^2}{N - k}$$

C.3 Estadístico Tabular:

El valor teórico de la prueba de Bartlett es:

$$T_{\text{tabla}} = X_{(\alpha, k-1)}^2$$

C.4 Decisión:

La hipótesis nula (H_0) sería rechazada si $T > T_{\text{tabla}}$. Caso contrario el conjunto de datos es homocedástico al “ $1-\alpha$ ” % de confianza.

ANEXO D

PRUEBA DE LEVENE

La prueba de Levene (Levene 1960) se utiliza para probar si las k muestras tienen varianzas iguales. Las varianzas iguales a través de muestras se llaman homogeneidad de la varianzas o también Homocedasticidad. Algunas pruebas estadísticas, por ejemplo el análisis de la varianza, asumen que las varianzas son iguales a través de grupos o de muestras. La prueba de Levene se puede utilizar para verificar esa asunción.

La prueba de Levene es un alternativa a la prueba de Bartlett. La prueba de Levene es menos sensible que la prueba de Bartlett a las salidas de la normalidad. Si usted tiene evidencia fuerte que sus datos hacen en hecho venga de un normal, o casi normal, distribución, entonces prueba de Bartlett tiene un mejor funcionamiento.

D.1 Hipótesis:

Ho: Los grupos poseen igual varianza.

Ha: Al menos uno de los grupos no posee igual varianza respecto al resto.

D.2 Estadístico Experimental:

El valor experimental de la prueba de Levene se estima de la siguiente manera:

$$W = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k (\bar{Z}_i - \bar{Z}_{..})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (\bar{Z}_{ij} - \bar{Z}_i)^2}$$

Donde: $Z_{ij} = |Y_{ij} - Y_i|$

Además:

N : Tamaño total del conjunto de datos.

k : Cantidad de subgrupos del conjunto de datos.

N_i : Tamaño total de cada subgrupo de datos.

Y_{ij} : Observación j-esima del grupo i-ésimo

Y_i : Promedio del grupo i-ésimo.

Z_i : Promedio de las variables Z_{ij} , del grupo i-ésimo.

D.3 Estadístico Tabular:

El valor teórico de la prueba de Levene es:

$$W_{\text{tabla}} = F_{(\alpha, k-1, N-k)}$$

D.4 Decisión:

La hipótesis nula (H_0) sería rechazada si $W > W_{\text{tabla}}$. Caso contrario el conjunto de datos es homocedástico al "1- α " % de confianza.

ANEXO E

ANÁLISIS DE VARIANZA

El Análisis de Varianza (**ANOVA, según terminología inglesa**) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que el promedio de un grupo de puntuaciones es distinta al del promedio de otro grupo de puntuaciones.

E.1 Hipótesis:

Ho: Los grupos poseen igual promedio.

Ha: Al menos uno de los grupos no posee igual promedio respecto al resto.

E.2 Estadístico Experimental:

El valor experimental del ANOVA se estima de la siguiente manera:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^k N_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2}{k-1} \div \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{N-k}$$

Donde:

N : Tamaño total del conjunto de datos.

k : Cantidad de subgrupos del conjunto de datos.

N_i : Tamaño total de cada subgrupo de datos.

Y_{ij} : Observación j-esima del grupo i-ésimo

Y_{ii} : Promedio del grupo i-ésimo.

E.3 Estadístico Tabular:

El valor teórico de la prueba de Levene es:

$$F_{\text{tabla}} = F_{(\alpha, k-1, N-k)}$$

E.4 Decisión:

La hipótesis nula (H_0) sería rechazada si $F > F_{\text{tabla}}$. Caso contrario los "k" tiene igual promedio al "1- α " % de confianza.

ANEXO F

VERACIDAD EN RESULTADOS DE ENSAYO

La veracidad de un método analítico es el grado de concordancia de los resultados de la prueba generados por el método y el valor verdadero o valor de referencia. El valor verdadero o de referencia para el estudio de veracidad se puede obtener de varias maneras.

Una alternativa (Romero, 2001) es comparar los resultados del método con resultados de un método de referencia establecido. Este acercamiento asume que la incertidumbre del método de referencia está sabida. En segundo lugar, la veracidad puede ser determinada analizando una muestra con concentraciones conocidas, por ejemplo, un material de referencia certificado, y comparar el valor medido con el valor verdadero según lo provisto del material.

La recuperación puede ser determinada (Soto, Cuello, Alfonso, Cabrera, Sierra, 2002) comparando la respuesta del extracto con la respuesta del material de referencia disuelto en un solvente puro. Porque este experimento de veracidad mide la eficacia de la preparación de la muestra, el cuidado se debe tomar para mimico la preparación real de la muestra tan de cerca como sea posible.

La concentración debe cubrir la gama de la preocupación y debe incluir particularmente una concentración cerca del límite de la cuantificación. La recuperación prevista depende de la matriz de la muestra, el procedimiento de proceso de la muestra y de la concentración del analito.

El manual del AOAC para verificar métodos incluye una tabla con datos estimados de la recuperación adecuada para asegurar el cumplimiento de la veracidad en función de la concentración del analito.

Active Ingred. [%]	Analyte ratio	Unit	Mean recovery [%]
100	1	100%	98-102
≥ 10	10-1	10%	98-102
≥ 1	10-2	1%	97-103
≥ 0.1	10-3	0.1 %	95-105
0.01	10-4	100 ppm	90-107
0.001	10-5	10 ppm	80-110
0.0001	10-6	1 ppm	80-110
0.00001	10-7	100 ppb	80-110
0.000001	10-8	10 ppb	60-115
0.0000001	10-9	1 ppb	40-120

ANEXO G

ECUACION DEL RSD DE HORWITZ PARA ACEPTAR LA REPETIBILIDAD

Esta ecuación fue definida por Horwitz et al, de consideraciones prácticas de muchos estudios colaborativos para diferentes matrices en la American Organization Analytical Chemistry (AOAC).

La ecuación es definida (AMC Technical Brief, 2004) como:

$$\%RSD_R = 2^{1-0.5\log(C)}$$

Donde:

%RSD_R: Es el coeficiente de variación (conocido también como desviación estándar relativa) del interlaboratorio.

C: Concentración del analito en la muestra en fracción decimal.

Por ejemplo para una muestra de 4% de grasa el % RSD_R sería:

$$\%RSD_R = 2^{1-0.5\log(0.04)} = 3.24669$$

Horwitz observó que los valores para RSD_r (el Coeficiente de variación de la repetibilidad) estaban generalmente entre la mitad y dos tercios del RSD_R.

Por esta razón, las aceptabilidades de la capacidad de repetibilidad están propuestos como los valores de Horwitz (Leea y Ramseyb, 2001) para RSD_R x 0.67.

$$\%RSD_r = 0.67 \times 2^{1-0.5\log(0.04)}$$

Por lo cual podemos afirma que para valores de RSD_r experimental menores que el RSD_r de Horwitz los resultados analíticos son repetibles, por lo tanto precisos.

ANEXO H

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO

Los límites de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) son importantes por determinan el la menor concentración que podría leer el método de ensayo y la menor lectura de concentración con precisión del analitos respectivamente.

Para determinar el LDM y el LCM seguiremos los siguientes pasos:

1. Hallar una recta de regresión entre la concentración (X) y la respuesta del equipo (Y_1)

$$Y_1 = a_1 + b_1 X$$

2. Estimar la respuesta del equipo para una concentración $X = 0$:

$$Y_{1/X=0} = a_1$$

3. Hallar una recta de regresión entre la concentración (X) y la desviación estándar de la respuesta del equipo (Y_2) :

$$Y_2 = a_2 + b_2 X$$

4. Estimar la desviación estándar de la respuesta del equipo para una concentración $X = 0$:

$$Y_{2/X=0} = a_2$$

5. Estimar el LDM y el LCM en la respuesta del equipo de la siguiente manera :

$$LDM_{area} = a_1 + 3a_2$$

$$LCM_{area} = a_1 + 10a_2$$

6. Estimar el LDM y el LCM respecto a la concentración de la siguiente manera :

$$LDM = \frac{LDM_{area}}{b}$$

$$LCM = \frac{LCM_{area}}{b}$$

Donde "b" es la pendiente de la concentración y la respuesta del equipo de la linealidad del método.

ANEXO I

ROBUSTEZ DE UN MÉTODO DE ENSAYO

La Robustez (**Robustness**) de un método de ensayo es la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales. En algunas disciplinas es considerado sinónimo de Resistencia o fortaleza (**Ruggedness**).

I.1 Diseño Experimental

El diseño de Youden - Steiner permite estudiar si el factor influye significativamente sobre el resultado. En la cuadro N° H1 se muestran las combinaciones para éste estudio donde las variables que son propias del método se indican con letras mayúsculas (A, B, C, D, E, F, G) y con letras minúsculas (a, b, c, d, e, f, g) corresponden a los factores que han sido alteradas

Cuadro N° 11
Diseño experimental de Youden Steiner

N°	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Factor E	Factor F	Factor G
R1	A	B	C	D	E	F	G
R2	A	B	c	D	e	f	g
R3	A	b	C	d	E	f	g
R4	A	b	c	d	e	F	G
R5	a	B	C	d	e	F	g
R6	a	B	c	d	E	f	G
R7	a	b	C	D	e	f	G
R8	a	b	c	D	E	F	g

I.2 Determinación de los efectos de cada Factor

Los efectos de cada factor son cuantificados de la siguiente manera:

$$Efecto_{Factor(A-a)} = \frac{\sum Ri_A - \sum Ri_a}{4}$$

I.3 Efecto máximo permisible.

El efecto máximo permisible es igual a $2,24S_r$. Esto significa que si el efecto del factor es superior al efecto máximo permisible podemos afirmar que no se puede alterar dichos factores porque los niveles alternativos de dichos factores alteran significativamente el resultado de la determinación del analito en cuestión.

ANEXO J

PRUEBA DE MANN-WHITNEY

La prueba Mann-Whitney es un método no paramétrico (Montgomery, 2001) aplicado a dos muestras independientes, cuyos datos han sido medidos al menos en una escala de nivel ordinal. La prueba calcula el llamado estadístico U, cuya distribución para muestras con 20 o más observaciones se aproxima bastante bien a la distribución normal.

J.1 Hipótesis:

Ho: Los dos grupos poseen igual mediana.

Ha: Los dos grupos poseen diferente mediana.

J.2 Estadístico Experimental:

El valor experimental del test de Mann-Whitney es:

$$Z = \frac{U - \mu_u}{\sigma_u}$$

$$U = \min \left\{ \begin{array}{l} R_1 - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} \\ R_2 - \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} \end{array} \right.$$

$$\mu_u = \frac{n_1 n_2}{2}$$

$$\sigma_u = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}$$

Donde:

n_1 : Tamaño de muestra del grupo 1.

n_2 : Tamaño de muestra del grupo 2.

R_1 : Rango del grupo 1.

R_2 : Rango del grupo 2.

J.3 Estadístico Tabular:

El valor teórico de la prueba de Levene es:

$$Z_{\text{tabla}} = Z_{(1-\alpha/2)}$$

J.4 Decisión:

La hipótesis nula (Ho) sería rechazada si $Z > Z_{\text{tabla}}$. Caso contrario los dos grupos tienen igual mediana al "1- α " % de confianza.

ANEXO K

PRUEBA T-STUDENT DE DOS MUESTRAS

En la mayor parte de los casos no se conoce varianza o desviación estándar real de ninguna población. En general la única información que es posible obtener es la de medias muestrales (X_1 y X_2), las varianzas muestrales (S_1^2 y S_2^2) y las desviaciones estándar de las muestras (S_1 y S_2). Si se hace la suposición de que las muestras se obtienen de manera aleatoria e independiente a partir de las poblaciones respectivas que tienen una distribución normal y que las varianzas poblacionales son iguales (es decir $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$), se puede usar la prueba t de varianzas combinadas (Montgomery, 2001) para determinar si existe una diferencia significativa entre las medias de las dos poblaciones.

K.1 Hipótesis:

Ho: Los dos grupos poseen igual promedio.

Ha: Los dos grupos poseen diferente promedio.

K.2 Estadístico Experimental:

El valor experimental del test t-Student de dos muestras es:

$$t = \frac{(X_1 - X_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{S_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Donde:

$$S_p^2 = \frac{S_1^2 (n_1 - 1) + S_2^2 (n_2 - 1)}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

S_p^2 = varianza combinada

X_1 = media de la muestra tomada de la población 1

S_1^2 = varianza de la muestra tomada de la población 1

n_1 = tamaño de la muestra tomada de la población 1

X_2 = media de la muestra tomada de la población 2

S_2^2 = varianza de la muestra tomada de la población 2

n_2 = tamaño de la muestra tomada de la población 2

Si se hace la suposición de que las muestras se obtienen de manera aleatoria e independiente a partir de las poblaciones respectivas que tienen una distribución normal y que las varianzas poblacionales diferentes (es decir $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$)

$$t = \frac{(X_1 - X_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)}}$$

Los grados de libertad se calculan de la siguiente manera

$$g.l = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2 / (n_1 - 1) + \left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2 / (n_2 - 1)}$$

K.3 Estadístico Tabular:

El valor teórico de la prueba t-Student de dos muestras es:

$$t_{\text{tabla}} = t_{(1-\alpha/2, gl)}$$

K.4 Decisión:

La hipótesis nula (H_0) sería rechazada si $t > t_{\text{tabla}}$. Caso contrario los dos grupos tienen igual promedio al "1- α " % de confianza.

ANEXO L

**DETERMINACION DE LAS DESVIACIONES DE REPETIBILIDAD Y
REPRODUCIBILIDAD Y LOS LÍMITES DE REPETIBILIDAD Y
REPRODUCIBILIDAD**

- Las fórmulas para determinar las desviaciones de repetibilidad (S_r) y reproducibilidad (S_R) (ISO 5725-2, 1994) son:

$$\begin{array}{l}
 \boxed{T_1 = \sum n_i \bar{Y}_i} \quad \boxed{T_2 = \sum n_i \bar{Y}_i^2} \quad \boxed{T_3 = \sum n_i} \quad \boxed{T_4 = \sum n_i^2} \\
 \boxed{T_5 = \sum (n_i - 1) S_i^2} \quad \boxed{S_r^2 = \frac{T_5}{T_3 - p}} \quad \boxed{S_i^2 = \left[\frac{T_2 T_3 - T_1^2}{T_3(p-1)} - S_r^2 \right] \left[\frac{T_3(p-1)}{T_3^2 - T_4} \right]} \\
 \boxed{S_R^2 = S_i^2 + S_r^2}
 \end{array}$$

Donde:

p: Número de analistas.

n_i : Número de repeticiones de cada analista.

\bar{Y}_i : Promedio de las repeticiones del analista i-ésimo.

S_i^2 : Varianza de las repeticiones del analista i-ésimo.

- Las fórmulas para determinar los límites de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) al 95% de confianza para duplicados (ISO 5725-6, 1994) son :

$$\boxed{
 \begin{array}{l}
 r = 2,8 \times S_r \\
 R = 2,8 \times S_R
 \end{array}
 }$$