1. OBJETIVO

Ejemplificar una validación (parcial) para un método analítico.

Establecer las directrices que permitan realizar la determinación de características de desempeño para un método espectrofotométrico para la determinación de colorantes.

2. ALCANCE

Método espectrofotométrico para la determinación de colorantes de interés alimentario y medioambiental por espectrofotometría en el visible.

3. RESPONSABILIDADES

3.1 Analistas de Laboratorio (Ejecución).

3.2 Docente (Supervisión).

4. DEFINICIONES

4.1 **Método analítico:** aplicación bien determinada de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado (ejemplo: la determinación de la concentración de un dado analito en una muestra dada)

4.2 **Validación:** Proceso de establecer, mediante evidencia documentada, las características de desempeño y limitaciones de un método analítico, la identificación de influencias que pueden cambiar esas características y en qué medida, de forma de cumplir los requisitos para un uso o aplicación específico previsto.

4.3 **Características de desempeño:** Una característica de desempeño de un método analítico es una propiedad que permite evaluarlo y demostrar que el mismo es adecuado para el uso previsto. Características de desempeño son la precisión, la veracidad, la selectividad, la linealidad, los límites, la robustez, la incertidumbre total.

4.4 **Cifras de mérito:** parámetro matemático-estadístico relacionado con una dada característica de desempeño.

4.5 **Linealidad:** Es la capacidad de obtener respuestas analíticas proporcionales a la concentración del analito en un determinado rango.

4.6 **Rango de Trabajo:** el rango de trabajo (o intervalo de trabajo) de un método analítico es el intervalo de concentraciones de analito en el que el método puede aplicarse con exactitud, precisión y respuesta confiable. Dentro de este rango la señal analítica es proporcional o predecible respecto a la concentración del analito. El método no presenta interferencias significativas ni saturación de la señal.

4.7 **Rango Lineal:** es el rango de concentraciones en el cual se cumple la linealidad.

4.8 **Límite de Detección:** es la mínima concentración de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones experimentales específicas. Se

puede también definir como la mínima concentración de analito que proporciona una señal analítica significativamente distinta de la señal del blanco.

4.9 Límite de Cuantificación: El límite de cuantificación de un método analítico es la concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud. Valores de concentración de analito inferiores al LC y superiores al LD se informan como menor que el LC; que significa detectado, pero no cuantificado.

4.10 Veracidad: grado de concordancia entre el promedio de una serie de medidas y un valor de referencia conocido para el mensurando en cuestión. Se evalúa mediante el sesgo, o la recuperación.

4.11 Precisión: grado de concordancia entre medidas repetidas en determinadas condiciones. Se evalúa mediante la desviación estándar.

5. FUNDAMENTO TEÓRICO.

5.1 Validación de metodologías analíticas

La validación de métodos analíticos es un proceso esencial en el ámbito de la química analítica, ya que permite garantizar que un método empleado para la determinación de una sustancia en una matriz específica es confiable y adecuado para su propósito. Entre los parámetros fundamentales de validación se encuentran, entre otros, la precisión, la veracidad, la exactitud, la linealidad y los límites de detección y cuantificación. En el contexto de la validación de métodos analíticos, las características de desempeño son parámetros que se evalúan para determinar si un método es adecuado para su propósito específico. Estas características proporcionan información sobre la calidad y confiabilidad de los resultados obtenidos mediante el método en cuestión.

La precisión se refiere al grado de concordancia entre resultados obtenidos en mediciones repetidas bajo condiciones similares, lo que implica evaluar la repetibilidad (misma persona, equipo y condiciones) y la reproducibilidad (distintos analistas, equipos, laboratorios, los ensayos interlaboratorios evaluan reproducibilidad). Una alta precisión indica que el método es consistente y minimiza la variabilidad aleatoria en los datos. La precisión se evalúa a partir de la desviación estándar (s), la desviación estándar relativa (RSD) y la desviación estándar relativa porcentual o coeficiente de variación (RSD % o CV%).

La veracidad, por otro lado, mide la cercanía entre el valor obtenido y el valor verdadero o aceptado como referencia. Se determina a través del sesgo y se evalúa mediante la comparación con materiales de referencia certificados o con métodos de alta exactitud previamente validados. Los materiales de referencia son materiales con valores asignados de concentración, propiedades

físicas o químicas, de uno o varios analitos que pueden utilizarse para la calibración. Un material de referencia certificado generalmente se utiliza para evaluar la veracidad de las medidas, viene acompañado de un certificado en el que la concentración de cada analito se informa con su correspondiente incertidumbre.

Un método con alta veracidad reduce errores sistemáticos, asegurando que los resultados sean representativos de la realidad. La veracidad también puede evaluarse a partir de la recuperación aparente (valor promedio de las medidas repetidas en relación al valor de referencia) o la recuperación de adiciones de estándares (enriquecimiento de muestras o "spiking")

En cuanto a la linealidad, esta se refiere a la capacidad del método para proporcionar respuestas proporcionales a la concentración del analito en un rango específico. Se evalúa mediante la construcción de una curva de calibración y el cálculo del coeficiente de determinación, siendo ideal que la función de calibración se ajuste a un modelo lineal. La evaluación del ajuste de los datos experimentales a una función matemática de calibración se puede realizar mediante estudios matemático-estadísticos. Normalmente se utilizan mínimo cuadrados. Para una espectrofotometría UV-Vis, se busca trabajar bajo las condiciones de cumplimiento de la Ley de Bourguer y Beer. Esta ley indica que A=abC, lo cual matemáticamente es un polinomio de primer grado y la ordenada en el origen vale cero. Cualquier desviación a este modelo, en este tipo de espectrofotometrías, debe estudiarse y buscar el rango en el que la misma se cumpla para establecer en la validación el rango de trabajo (rango dinámico).

Finalmente, los límites de detección y cuantificación son parámetros clave para definir la detectabilidad del método. El límite de detección (del inglés LOD) es la menor concentración del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada con exactitud, mientras que el límite de cuantificación (del inglés LOQ) representa la menor cantidad que puede medirse con precisión y veracidad aceptables. Estos límites son críticos en estudios ambientales, farmacéuticos y de control de calidad, donde la detección y medición de sustancias a niveles de concentración de trazas es fundamental. En conjunto, estos parámetros permiten establecer la confiabilidad de un método analítico y asegurar su aplicabilidad en diversas áreas científicas e industriales.

El presente procedimiento es una guía para la evaluación de algunos parámetros como ser la linealidad, precisión, veracidad y límites (detección y cuantificación) de un método para la determinación de colorantes usados en la industria alimentaria y ambiental.

5.2 Colorantes

A ciertos productos comerciales se les adicionan sustancias químicas (colorantes, aromatizantes) con el objetivo de mejorar sus características organolépticas, de forma de hacerlos más atractivos para el consumidor. En general los colorantes se buscan como imitación de un color natural, para realzar un producto o para asegurar que todas las partidas sean de un color similar, evitando que de lote a lote la diferencia de color sea una causa de insatisfacción en el consumidor. Los colorantes utilizados en esta práctica son: Amarillo Tartrazina (Yellow 5), Azul Brillante (Blue 1), Rojo Punzó 4R (Color Index (CI) 16255) y Sulforrodamina B (Acid Red 52).

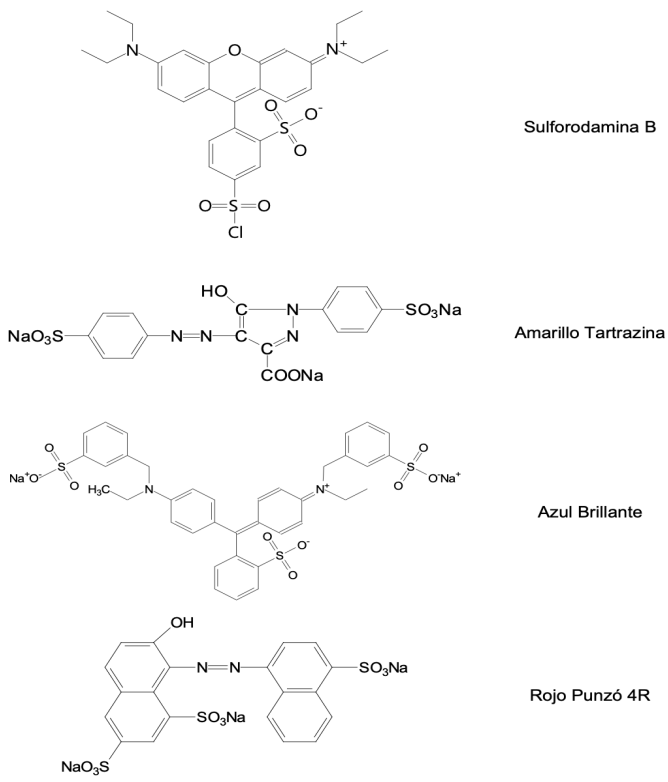

Figura 1: Estructuras químicas de los colorantes

Los tres primeros se encuentran regulados en el Reglamento Bromatológico Nacional en cuanto a su uso en alimentos. La sulforrodamina B se utiliza en diversos campos, incluyendo la hidrología, la investigación celular y el trazado de fugas. Las estructuras de los colorantes mencionados se presentan en la Figura 1.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 6. Dinámica

El trabajo experimental se desarrollará en dos días de laboratorio. Cada subgrupo de trabajo trabajará con un colorante diferente y deberá exponer los resultados al resto del grupo para la discusión general del tema.

6.2 Materiales y Equipos

Los ensayos serán llevados a cabo en los espectrofotómetros UV-Vis Genesys 10 S (Thermo-Scientific) del laboratorio de Química Analítica – Tecnólogo Químico de la Facultad de Química (UdelaR) previamente calificados. Se utilizarán cubetas de 1,00 cm de camino óptico, los/as estudiantes seleccionarán que tipo de cubetas son las más adecuadas según el material disponible en el laboratorio.

Se cuenta con las siguientes disoluciones stock (colorantes en agua ISO grado II o desionizada):

- Disolución de amarillo tartrazina (AT): 49,8 $mg.L^{-1}$
- Disolución de rojo punzó (RP): 50,7 $mg.L^{-1}$
- Disolución de azul brillante (AB): 50,1 $mg.L^{-1}$
- Disolución de sulforrodamina B (SB): 50,9 $mg.L^{-1}$

Como disolvente para realizar las diluciones necesarias se utilizará agua ISO grado II o desionizada

6.3 Procedimiento

DÍA 1: En este día se realizarán los espectros de cada sustancia por parte de cada equipo de trabajo y se discutirá la longitud de onda de trabajo. También se realizan ensayos de linealidad y precisión.

A continuación se dan pautas para la evaluación de las características de desempeño mencionadas en la parte 5.1.

6.3.1 Linealidad

6.3.1.1 A partir de los espectros de absorción Vis obtenidos para cada colorante seleccionar la longitud de onda de trabajo para la validación analítica.

6.3.1.2 A partir de diluciones adecuadas de las soluciones stock construir, por duplicado, una curva de calibración en el rango 0,5 – 10,0 $mg.L^{-1}$ (discutir con el docente cuántos puntos incluir en la misma, y qué tan espaciados estarán). Para la construcción de la curva, se graficará Absorbancia (a la longitud de onda elegida para cada colorante) vs. concentración ($mg.L^{-1}$).

6.3.1.3 Calcular las concentraciones exactas de cada nivel de concentración, según el colorante que le haya tocado para la validación.

La mitad de los integrantes del subgrupo preparará una curva completa y registrará los resultados midiendo el valor de A por duplicado para nivel de concentración (incluyendo el blanco como un punto más de la curva), la otra mitad preparará otra curva independiente y procederá de la misma forma.

6.3.1.4 Seleccionar el modelo de mejor ajuste a los puntos experimentales para cada curva independiente, utilizando como criterios la inspección visual, el valor del coeficiente de determinación (R^2) y el estudio de los residuos. Establecer las funciones de calibración para cada curva justificando como llegan a la misma y expresarla adecuadamente según las magnitudes medidas y sus unidades. Realizar el gráfico de calibración mediante un diseño adecuado. Este gráfico se genera mediante una tabla en la que tendrán los datos originales de A y C (concentraciones exactas) y una columna donde restan a cada señal la señal del blanco, las columnas para generar el gráfico serán C y Acorr (A medida - A blanco).

6.3.1.5 Discutir sobre la linealidad de la metodología en el rango de trabajo estudiado. *¿Se cumple la ley de Bouguer y Beer?*

De acuerdo a la validación ya realizada por varias generaciones de estudiantes de un curso de Química Analítica de la Facultad de Química, se ha establecido un criterio de aceptación que aplica a esta metodología analítica. En cada validación, de acuerdo al contexto se deberán establecer criterios adecuados para aceptación (ya sea de la experiencia del laboratorio, adecuación al uso o cumplimiento de métodos estándares).

6.3.1.6 Para este caso el ensayo se considera aceptable si las pendientes entre el duplicado no difieren entre sí en más de un 10%, a partir de haber previamente establecido el rango lineal.

6.3.2 Precisión

6.3.2.1 Se tomará la disolución de valor nominal 2,0 mg L^{-1} para evaluar precisión. Para ello medir las dos disoluciones que fueron preparadas en el ensayo de linealidad más tres diluciones adicionales preparadas en forma independiente por operadores diferentes.

6.3.2.2 Medir el valor de A de cada disolución (5 en total preparadas de forma independiente).

6.3.2.3 A partir de los valores de absorbancia medidos, calcular la desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa porcentual (RSD %). *¿Cómo clasificaría este tipo de precisión en relación al método que está validando?*

6.3.2.4 Registrar toda la información en forma detallada y realice los cálculos para evaluar este parámetro. Se considera aceptable si el RSD % es menor o igual a 5% para esta metodología.

Antes de retirarse el Día 1 deberán alcanzar los siguientes objetivos:

- **Comprender la importancia y la complejidad de una validación analítica**
- **Para una aplicación dada, buscar las condiciones de trabajo más adecuadas para comenzar el proceso de validación para una espectrofotometría en el visible.**
- **Conocer el rango lineal de una sustancia dada según los conocimientos adquiridos y contar con una función de calibración del día. Verificar si se trabajó en condiciones adecuadas y se cumplió con las especificaciones dadas.**
- **Conocer la precisión del método, evaluando algunas fuentes de variabilidad que se discuten en clase y establecer si el equipo de trabajo cumple con la aptitud de acuerdo a la especificación dada.**
- **Contar con registros adecuados, prolijos, y completos validados por el jefe de laboratorio (en este caso el docente a cargo).**

DÍA 2: En la segunda parte del trabajo de validación se estimarán los límites de detección y cuantificación del método y la veracidad mediante un ensayo de intercomparación de laboratorios. Se espera generen registros completos, adecuados y los datos serán validados por el jefe del laboratorio (en este caso el docente del práctico).

6.3.3 Límite de Detección y Cuantificación

6.3.3.1 Conocido el rango lineal de la sustancia en estudio, preparar una curva de calibración del día. Discutir con el docente cuántos puntos son adecuados y verificar que la pendiente obtenida se mantengan en especificaciones respecto al DÍA 1 (no difiera más del 10% de las anteriores).

6.3.3.2 Realizar 6 réplicas independientes a partir de la disolución stock del colorante correspondiente, de concentración aproximadamente 0,1 $mg.L^{-1}$ (la concentración de esta solución es baja para esta espectrofotometría, discuta con el docente el uso de blanco o de diluciones bajas cuando se estiman los límites)).

6.3.3.3 A partir de las medidas de A obtenidas para las 6 disoluciones y de la curva de calibración obtenida en el día, estimar ambos límites. Verifique que el modelo de mejor ajuste haya sido acorde al cumplimiento de la Ley de Bourguer y Beer.

6.3.3.4 Calcular el LD y el LC para cada colorante, utilizando los criterios:

$$LD = \frac{3s_b}{b} \qquad LC = \frac{10s_b}{b}$$

(valores en $mg.L^{-1}$)

siendo b la pendiente de la curva de calibración (de una función lineal sin ordenada el origen) y Sb la desviación estándar de las señales de A de la disolución de 0,1 $mg.L^{-1}$.

6.3.4 Veracidad

Para este ensayo se le entregará a cada subgrupo de trabajo una disolución denominada "Muestra control", esta muestra será testeada como si fuera un ensayo interlaboratorio. El jefe del laboratorio cuenta con un certificado de análisis con los valores certificados y su incertidumbre para cada colorante.

6.3.4.1 Se medirá la absorbancia de las muestras control de cada colorante, y se calculará la concentración del colorante en dicha disolución control utilizando la curva de calibración del día. Verifique si la muestra puede determinarse directamente o si debe realizar algún proceso adicional. Una vez decidido esto, realice la determinación por triplicado. e, por triplicado.

6.3.4.2 En caso de que los valores de concentración sean promediables, calcular la concentración promedio ($\bar{c}$), y la desviación estándar (s) de los valores de concentración obtenidos. Los valores de concentración serán promediables si el CV% es mejor a 5%.

6.3.4.3 Expresar la concentración de cada muestras control como un intervalo de confianza al 95%, utilizando la siguiente expresión:

$$IC\ concentración\ (95\%) = \left(\bar{c}\ \pm t_{0,05,n-1}.\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$$

Debate final

- **Luego de contar con todos los datos y que los mismos estén validados por el jefe del laboratorio (docente), se realizará una discusión conjunta donde cada grupo expondrá al resto qué resultados obtuvo de su validación.**
- **Se deberá concluir sobre cada parámetro y finalmente sobre la exactitud del método bajo las condiciones de trabajo.**
- **En caso de lograr exactitud ¿cómo mejoraría el procedimiento, qué recomendaciones haría? ¿Qué fuentes de error o puntos críticos identificaron en el proceso?**
- **Finalmente, se les pedirá que expliquen cómo completaría la validación, es decir cómo planificaría ensayos para otros parámetros que no fueron estudiados en esta instancia.**
- **El informe final deberá reflejar todos los aspectos discutidos.**

7. REGISTROS.

FO5-25.v1 - Formulario de registro para la determinación de características de desempeño de un método espectrofotométrico UV-Vis para la determinación de colorantes

8. REFERENCIAS.

8.1 "Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org"

8.2 VIM, Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 3ª Edición en español 2012. Traducción de la 3ª edición del VIM 2008. Disponible en línea para descargar en: https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf Acceso 20/01/2025

9. ANEXOS. No corresponde.

10. MODIFICACIONES. No corresponde, primera versión.

Elaborado por:	Dr Pablo Buccino
Revisado por:	TQ Martín Regina