



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**IMPORTANCIA DE LA CALIBRACIÓN EN LOS
LABORATORIOS DE QUÍMICA ANALÍTICA**



MANUEL ESPEJO CUADRADO



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

IMPORTANCIA DE LA CALIBRACIÓN EN LOS LABORATORIOS DE QUÍMICA ANALÍTICA

MANUEL ESPEJO CUADRADO

DICIEMBRE 2016

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TUTORES: MARÍA DOLORES HERNANZ VILA, MARÍA ANGELES HERRADOR MORILLO

TRABAJO DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

INDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Concepto de calidad	5
2.2. Validación del método analítico	6
2.2.1. Introducción	6
2.2.2. Propiedades analíticas	7
2.2.3. Propiedades supremas	8
2.3. Trazabilidad	9
2.4. Estándares analíticos. Materiales de referencia	10
3. OBJETIVOS	12
4. METODOLOGÍA	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1. Calibración. Concepto y tipos	13
5.2. Calibración instrumental	14
5.2.1. Calibración de una balanza analítica	16
5.2.2. Calibración de material volumétrico	18
5.2.3. Calibración de un pH-metro	19
5.2.4. Calibración de un espectrofotómetro UV-Visible	20
5.3. Calibración metodológica	21
5.3.1. Método simple, directo o del estándar externo	24
5.3.2. Método del patrón interno	25
5.3.3. Método de la adición estándar o adición patrón	27
6. CONCLUSIONES	29
7. BIBLIOGRAFÍA	30

1. RESUMEN

La química analítica tiene como finalidad el estudio de la composición química de una muestra, mediante métodos de laboratorio analíticos. En cualquier laboratorio de química analítica, el objetivo principal es obtener resultados fiables y consistentes, es decir, resultados de calidad.

Para ello es fundamental constatar que el método que se va a usar se adecua al problema analítico que se presenta. Esto se consigue mediante la validación del método analítico. La validación se realiza mediante una serie de pruebas o procesos que permiten asegurar que se obtendrán resultados de calidad. Mediante estos procedimientos de validación, se obtendrán unas propiedades analíticas del método que indicaran si el método es válido o no para la finalidad con la que se utiliza. La determinación de dichas propiedades o parámetros se consigue entre otros, con el procedimiento de calibración del método de análisis.

Dentro de química analítica existen principalmente dos tipos de métodos, los instrumentales y los no instrumentales como los volumétricos. Para cualquiera que sea el método se requiere una calibración del equipo a utilizar, que es el paso inicial en cualquier proceso analítico. Posteriormente los métodos instrumentales requieren además de una calibración metodológica, que asegura que el procedimiento es válido para el problema concreto que se presenta y el analito que se estudia. Se puede calibrar por tres técnicas, siendo la más simple y rápida la calibración simple o por estándar externo, pero también la que requiere de menos problemas relacionados con el método. La calibración por adición estándar es útil para compensar el efecto que pueden producir otras sustancias a la señal que mide el equipo. Por último, se puede utilizar el método del patrón interno, para aquellos procesos analíticos en los que se produzcan muchas variaciones entre cada operación y eso cause resultados analíticos diferentes. En este trabajo se describen los principales conceptos relacionados con la calidad de los resultados analíticos, se explican, en detalle, y se ilustran con ejemplos, los conceptos de calibración instrumental y metodológica y su implicación decisiva en la obtención de resultados de calidad.

Palabras claves: *calibración instrumental y metodológica, materiales de referencia, trazabilidad, calidad, validación.*

2. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de los laboratorios analíticos es obtener información analítica significativa, es decir, de calidad, que permita adoptar decisiones técnicamente correctas para la resolución de problemas científicos, técnicos o sociales.

La Química Analítica es una ciencia metrología, se basa, por tanto, en la medición de distintos parámetros para obtener resultados analíticos. Para que estos resultados sean de calidad deben ser trazables a referencias o estándares adecuados y para conseguir este reto los analistas deben: seguir una estrategia analítica adecuada, tomar muestras representativas, aplicar métodos de medidas validados, utilizar equipos apropiados que funcionen correctamente, es decir, calibrados y verificados, y utilizar patrones o materiales de referencia adecuados para validar, calibrar y verificar.

2.1. Concepto de calidad

La calidad en el ámbito analítico, tiene dos vertientes o dos puntos de vista claros. La calidad como concepto básico, puede definirse como un conjunto de características, propiedades, atributos o capacidades de una entidad que la hacen mejor, peor, o igual que otras entidades del mismo tipo. La calidad también puede definirse desde un punto de vista más aplicado como la totalidad de características de una entidad que la capacitan para satisfacer las necesidades específicas o implícitas impuestas por el cliente o la legislación (Valcárcel y Ríos, 1992).

En la primera definición se habla de propiedades o características que sirven para evaluar la calidad analítica, que engloba la calidad de los resultados, del proceso analítico y de los materiales y equipos utilizados. Básicamente existen cuatro acciones para el aseguramiento de la calidad analítica: calibración del instrumental a usar, validación del método, verificación de los instrumentos, y realizar controles de calidad, de los resultados (Hernández, 2013).

Desde un punto de vista aplicado, la calidad está representada por la coherencia que debe existir entre la información que el cliente solicita y la que se proporciona en los resultados. Esto se conoce como “fit-for-purpose”. La representividad y coherencia entre la información de ambas partes es un factor decisivo para la calidad de un proceso analítico (Compañó y Ríos, 2002).

Además, todos los laboratorios de química analítica, deberán asegurar su calidad y competencia mediante el cumplimiento de los sistemas de calidad vigentes, siendo la norma ISO 9001/2008 y la norma ISO 17025/2005 necesarias implantación y cumplimiento en el ámbito analítico. La guía Eurachem (Eurolab, 2016) engloba todos estos aspectos en seis principios de las buenas prácticas analíticas. En ellos, se describe que es necesario medidas analíticas para satisfacer los requisitos acordados “fit-for-purpose”, la necesidad de la utilización de métodos y equipos probados (validación, calibración y verificación), de la evaluación del desempeño técnico del laboratorio mediante controles de calidad, y de la obligación de la definición de procedimientos adecuados de control y por último, del aseguramiento de calidad.

2.2. Validación del método analítico

2.2.1. Introducción

Validar un método analítico, es verificar y documentar su calidad y su adecuación a unos determinados requisitos establecidos, es decir que se verifica si es adecuado siempre para su finalidad, para el problema analítico que se presenta (Rius y cols., 2000). La validación de la metodología analítica es clave para asegurar la calidad del análisis químico.

El objetivo de la validación es obtener resultados precisos, reproducibles y confiables. Esto se puede conseguir con una calibración tanto instrumental, del equipo, como del método a validar. También es necesario un correcto uso de estándares de referencia, la presencia de personal analítico cualificado, y tener todo el proceso bien descrito y documentado. (OMS, 2002). Por tanto el objetivo de resultados precisos y confiables, solo se puede conseguir con procedimientos de análisis validados.

Según el tipo de método utilizado la actuación respecto a la validación será distinta. Los métodos analíticos se pueden agrupar principalmente en dos grandes grupos, los métodos normalizados y los métodos no normalizados. Se consideran métodos normalizados aquellos que están desarrollados por un organismo reconocido y son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente. Los métodos no normalizados son desarrollados por un tercero o que han sido adaptados por el laboratorio a partir de un método normalizado (IAAC, 2010). Los métodos normalizados no necesitan ser validados, a no ser que se le hayan incorporado mejoras, que sea usado para una especificación para la que no estaba validado, o que se utilice diferente instrumental. Si se deberán validar (Eurolab, 2016):

- Métodos no normalizados
- Métodos cuyo control de calidad indica que han sufrido modificaciones con el tiempo
- Métodos nuevos con los que se quiera demostrar la equivalencia con uno anterior, de referencia.

Para validar un método, existen una serie de propiedades que tienen como finalidad demostrar que cumple con los requisitos analíticos para los que se ha desarrollado. Estos se conocen como propiedades analíticas.

2.2.2. Propiedades analíticas

Son las propiedades o criterios que definen los requisitos analíticos y que un método debe tener para poder resolver el problema analítico (Eurolab, 2016). Según Valcárcel (1999) son indicadores de calidad que permiten evaluar, comparar y validar diversas facetas de la química analítica de forma fundamental y eficaz. Dentro de las propiedades analíticas, no todas tienen el mismo nivel de importancia. Existen clasificaciones de jerarquía según la trascendencia que tenga para garantizar la calidad del método tal como se aprecia en la Figura 1.

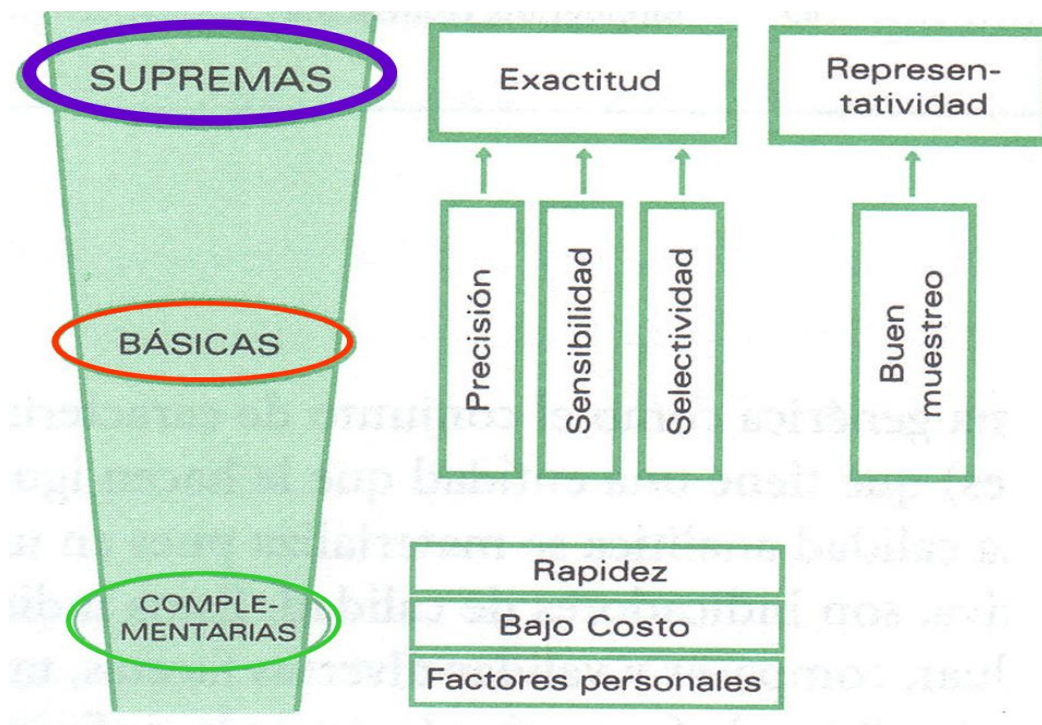


Figura 1. Clasificación jerárquica de las propiedades analíticas (Valcarcel, 1999).

Se suelen clasificar en tres grupos, destacando las propiedades supremas como aquellas que tienen una mayor importancia en la calidad de los resultados. Los otros dos grupos jerárquicos engloban una serie de propiedades que atributos del proceso analítico (Compañó y Ríos, 2002).

Propiedades supremas:

- Exactitud: es la diferencia entre una medida y el valor verdadero, y se expresa en forma de error.
- Representatividad: es la coherencia entre el resultado y las necesidades del cliente.

Propiedades básicas:

- Precisión: mide la concordancia que se tiene, de resultados, sobre una misma muestra durante un periodo de repeticiones.
- Sensibilidad: capacidad de un método para diferenciar dos analitos de similar concentración o determinar pequeñas concentraciones de un analito en la muestra.
- Selectividad: capacidad de que un método sea específico para el analito problema, para su identificación o cuantificación.
- Robustez: capacidad de resistencia al cambio de la respuesta de un método cuando se la cambian las condiciones experimentales.

Propiedades complementarias

- Rapidez y coste: mayor productividad posible, es decir, número de muestras procesadas por unidad de tiempo y valor económico por cada análisis.
- Factores personales: profesionales cualificados y trabajo en condiciones de seguridad y comodidad.

2.2.3. Propiedades Supremas

La elección de propiedades adecuadas, es clave en la validación del método, porque resulta prácticamente imposible conseguir valores de calidad para cada propiedad, con lo cual se ha de lograr un equilibrio entre los parámetros o priorizar según los requisitos analíticos (Maroto y cols., 2007). Las propiedades supremas, exactitud y representatividad, son las que resultan más imprescindibles para alcanzar calidad de resultados. Así, por ejemplo, un resultado que tenga una gran valor de exactitud, pero que no cumple con la representatividad del problema, no será un resultado de calidad (Valcárcel, 1999).

La representatividad es un parámetro que se refiere a un muestreo correcto y se consigue encontrando una concordancia entre los resultados y la muestra, el objeto, el problema analítico y otros factores socioeconómicos.

La exactitud como concepto teórico, viene caracterizado por el error sistemático. Los errores en los procedimientos analíticos incluyen dos componentes, uno aleatorio y otro sistemático. Los errores sistemáticos son originados por fallos en el diseño o de los equipos empleados, y seguirá siendo el mismo aunque se repita el experimento. El error sistemático puede ser estimado y debe ser corregido (Harris, 2006).

Los otros errores, los aleatorios, están relacionados principalmente con una propiedad de calidad básica, la precisión. Estos tipos de errores surgen durante el proceso de medición y son errores impredecibles e incorregibles. Como son impredecibles y no se pueden estimar, se introduce el concepto de la incertidumbre. La incertidumbre de medida es otro parámetro muy usado en la química analítica, que establece un intervalo de valores dentro del cual se estima que se encuentra el valor real de la medición (Gella, 2012).

2.3. Trazabilidad

En un contexto de globalización de mercados como es el actual, conseguir resultados trazables, resultados que puedan ser comparables con los de otros laboratorios y que sean considerados exactos, resulta fundamental.

La trazabilidad se define según el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM, 2012) como “propiedad del resultado de una medición (o el valor de un estándar) que consiste en que se pueda establecer el resultado previsible de su comparación directa con los patrones apropiados, generalmente nacionales o internacionales, mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones reales, todas con incertidumbres conocidas”.

Atendiendo a su definición, se puede considerar que el concepto de trazabilidad consta de seis *elementos principales* (Benítez, 2004):

- *Cadena ininterrumpida de comparaciones*: se inicia en los patrones nacionales o internacionales y termina con el valor del resultado de una medición. Se trata de una cadena documentada de calibraciones hasta una referencia, mediante unos procesos de medición, que permiten relacionar los resultados de medida, en general a las unidades del Sistema Internacional, con su incertidumbre de medida conocida (Rivera, 2015).

- *Incertidumbre de medición*: en cada etapa o eslabón de la cadena, está presente la incertidumbre de medida, que debe ser calculada, para poder después estimar la incertidumbre para la cadena completa.
- *Documentación*: cada paso debe realizarse según procedimientos documentados y estos serán posteriormente registrados.
- *Competencia*: los laboratorios encargados de las comparaciones, deben acreditar su competencia técnica para ello.
- *Referencia al Sistema Internacional de unidades (SI)*: la cadena de comparaciones debe tener como único punto de origen patrones de máxima calidad metrológica, utilizados para la realización de las unidades del SI.
- *Recalibraciones*: se deben calibrar los patrones usados con frecuencia, para asegurar que se mantengan la trazabilidad de las mediciones realizadas. Los patrones también tienen su incertidumbre asociada, y con esta etapa se intenta que no se degrade en un tiempo determinado.

Es muy importante destacar que la trazabilidad de un resultado requiere que se trabaje con estándares de calidad. Debido a la amplia gama de mediciones químicas que existen, para asegurar la calidad de los resultados, resulta necesario aplicar algún método primario de medición química como método de lograr un vínculo con las unidades del SI.

2.4. Estándares analíticos. Materiales de referencia

Los estándares o patrones analíticos son la base para realizar medidas de cualquier parámetro, ya sea físico, químico o biológico. Este concepto de estándar hace referencia a una sustancia, químicamente pura, empleada como referencia para calibrar equipos de medida y contrastar la trazabilidad de las medidas.

Existen diferentes clasificaciones de los estándares analíticos, así en la Figura 2, se muestra una división de los estándares en tres grupos, ordenados en orden creciente de izquierda a derecha según la incertidumbre del valor de referencia, y en orden decreciente en el mismo sentido según estos valores estén más próximos al valor considerado como verdadero. Todos los grupos están relacionados entre sí a través de la trazabilidad.

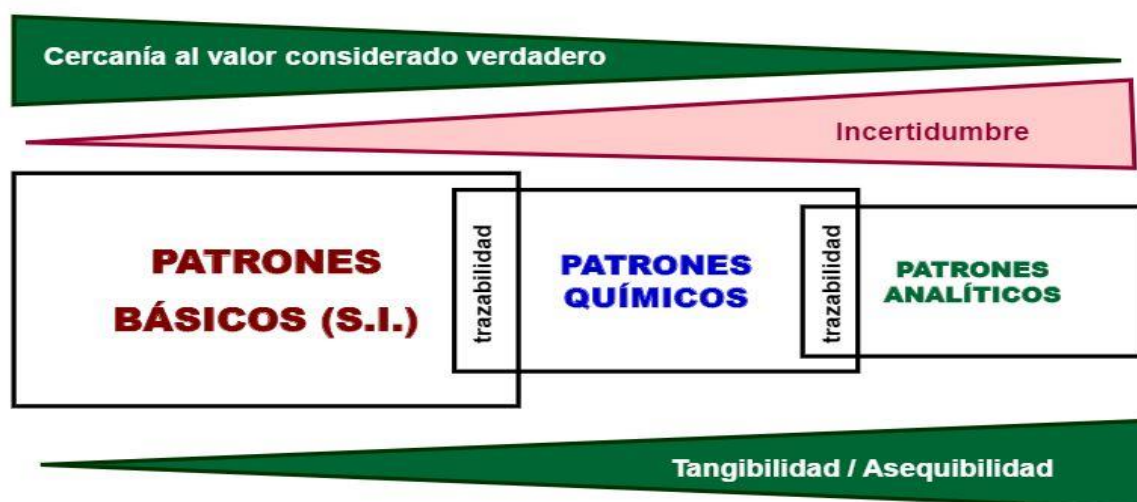


Figura 2. Distintos tipos de patrones según su jerarquía.

Estándares básicos:

Se corresponden con las unidades del Sistema Internacional de Unidades (SI), como por ejemplo: Kilogramo (masa), Mol (cantidad de sustancia), Metro (longitud), Kelvin (temperatura), etc.

Estándares químicos:

Son considerados como el vínculo entre los básicos y los estándares químico-analíticos. Por ejemplo son el número de Avogadro, Isotopo 12 del carbono, pesos atómicos, etc. (Valcárcel, 1999).

Estándares químico analíticos:

Existen dos categorías principales de estándares químico analítico: primarios y secundarios. Los *estándares primarios* son sustancias homogéneas y estables que permiten relacionarse directamente con los estándares químicos a través de la trazabilidad. Tienen una pureza y composición bien definida. Sirven para asegurar directamente la trazabilidad con los patrones químicos.

Los *estándares secundarios* no tienen una composición definida, tienen una pureza y estabilidad limitadas. Deben apoyarse en los estándares primarios para lograr la trazabilidad.

Dentro de los patrones químicos analíticos primarios se encuentran *los materiales de referencia* y *los materiales de referencia certificados*.

Los materiales de referencia son aquellos que tienen propiedades bien establecidas, y por ello pueden ser utilizados para la calibración de instrumental de laboratorio, la verificación y validación de métodos de medida y para la asignación de valores a materiales.

Los materiales de referencia certificados son aquellos en los cuales las propiedades que le otorgan la calidad, están certificadas por un procedimiento validado, y que tienen una trazabilidad e incertidumbre establecidas (Leiva-Guzmán, 2006). Dependiendo del uso que se requiera y los objetivos de la medición, se podrá usar un material u otro.

3. OBJETIVOS

Resaltar la importancia del proceso de calibración, tanto instrumental como metodológica, en el laboratorio analítico y su relación con la obtención de resultados de calidad. Como objetivos concretos:

- Exponer algunos conceptos (calidad, validación, trazabilidad, materiales de referencia) comunes a todo procedimiento analítico, relacionándolos con la etapa de calibración que resultan indispensables para poder comprenderla y llevarla a cabo.
- Introducir el término calibración y esquematizar las principales diferencias entre los dos tipos existentes: instrumental y metodológica.
- Definir la calibración instrumental e ilustrarla con algunos ejemplos de los procedimientos de calibración de equipos de uso común en los laboratorios analíticos.
- Describir los distintos tipos de calibración metodológica, su concepto, el procedimiento, así como las ventajas e inconvenientes; ilustrándolas con ejemplos de interés farmacéutico.

4. METODOLOGÍA

La presente revisión bibliográfica se inicia con la definición y el desarrollo de los conceptos claves en cualquier procedimiento analítico. Para ello, se ha consultado los libros Valcarcel y Rios (1992), Valcarcel (1999), Compañó y Rios (2002), Maroto y cols. (2007); además de los artículos de divulgación de técnicas de laboratorio de Riu y cols.

Para encontrar la documentación sobre la calibración instrumental y la calibración de los principales equipos utilizados en el laboratorio se ha consultado la normativa para los laboratorios de calibración (ISO 17025/2005) y organismos oficiales en temática de calibración y metrología como el Centro Español de Metrología, Inter American Accredition Cooperation, Instituto Nacional de Salud y el Instituto Nacional de Tecnología Industrial.

Por último, se han consultado libros especializados en metodologías de calibración analítica como Miller y Miller (2002), Skoog y cols. (2005), Coello y MasPOCH (2007) y Harris (2006).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Calibración. Concepto y tipos

Según el Vocabulario Internacional de Metrología, VIM (2012) por calibración se entiende “el conjunto de operaciones que establecen, en condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esa magnitud realizados por patrones”.

Esta definición de calibración es la comúnmente aceptada, pero existe otra según la cual la calibración también se puede considerar como la caracterización de la respuesta de un instrumento en función de las propiedades de un analito. Establece la relación entre una magnitud y la concentración de la sustancia medida (Valcárcel, 1999). Se puede hablar por lo tanto de dos tipos de calibración.

En el Tabla 1, se esquematizan las principales diferencias que existen entre los dos tipos de calibración que existen.

Tabla 1. Principales diferencias entre calibración analítica e instrumental.

CALIBRACIÓN INSTRUMENTAL	CALIBRACIÓN ANALÍTICA
<i>Comprobación del funcionamiento correcto del instrumento o equipo</i>	<i>Caracterización de la respuesta instrumental en función de las propiedades del analito</i>
<i>Su objetivo es corregir la respuesta instrumental de un equipo</i>	<i>Su objetivo es establecer la relación entre la señal y una propiedad del analito</i>
<i>Misma magnitud medida que la del patrón</i>	<i>La magnitud medida es distinta que la magnitud conocida del patrón</i>
<i>El patrón no contiene el analito</i>	<i>El patrón contiene el analito</i>

Cuando se habla de *calibración instrumental* o directa, lo más característico es que existe una coincidencia entre la magnitud del patrón y la magnitud medida por el instrumento. En el caso en el que se utilicen equipos de medida que proporcionen valores absolutos del parámetro que se mida, esta será la única calibración necesaria (Compañó y Ríos, 2002).

En la *calibración analítica* o indirecta, la respuesta del instrumento o sistema de medida se expresa en magnitud distinta a la del patrón o patrones de calibración. Será necesaria en algunos procedimientos junto a la calibración instrumental.

5.2. Calibración instrumental

Existen diversas formas de obtener la relación entre el equipo sujeto a calibración y el patrón (ISO 17025/2005):

- *Calibración por comparación directa:* se compara directamente los valores proporcionados por el equipo bajo calibración, con los valores proporcionados por un patrón.

- *Calibración por transferencia:* en este caso se procede a la comparación de los valores proporcionados por el equipo, con los valores proporcionados por un patrón, a través de un patrón de transferencia, incluso en diferente tiempo y lugar.
- *Calibración por sustitución:* en este caso, se usa un instrumento auxiliar, con el que se mide primero el patrón y luego el instrumento de medida.
- *Calibración por equilibrio:* en este método también se utiliza un equipo auxiliar, pero es un detector de punto cero, permitiéndonos comprobar la igualdad entre el valor del patrón y el del equipo.

La metodología más utilizada es la calibración por comparación directa. El objetivo de esta es demostrar la coincidencia entre la magnitud en el patrón y la magnitud medida por el instrumento, por lo tanto se deben usar patrones alta calidad metrológica.

Cuando se calibra, pueden aparecer discrepancias entre el valor medido por el instrumento o equipo y el valor real de la magnitud patrón. Estas diferencias son debidas a desviaciones sistemáticas y variabilidad intrínseca del proceso. Las desviaciones sistemáticas se evalúan mediante la corrección o sesgo. La variabilidad se estima mediante la incertidumbre (Hernández, 2013).

La corrección es un valor agregado algebraicamente al resultado no corregido de una medición, para compensar un error sistemático. Para cada punto calibrado, la corrección es la diferencia entre la media de las lecturas del patrón y la media de las lecturas del equipo. La incertidumbre de medida es un parámetro que se utiliza para indicar el intervalo de valores que podrían atribuirse al mensurando. Este parámetro normalmente suele ser la desviación estándar (Ventura y Lluque, 2008).

Es importante destacar que en cualquier calibración instrumental se debe mantener la estabilidad ambiental durante el proceso de calibración. De tal manera que mientras mayor sea la estabilidad del ambiente, mayor será la confiabilidad de los resultados. Las condiciones ambientales principales (humedad, temperatura y presión atmosférica) deberán apuntarse al inicio y al final de la calibración (CEM, 2004).

Tras la calibración del instrumental de laboratorio, se obtienen unos resultados que se interpretan por el personal técnico del laboratorio para obtener la información acerca del estado de los equipos analíticos. Los resultados y la información generada a partir de estos suelen ser:

Resultados (Riu y cols., 2001):

- Estimación de los errores del instrumento de medida, del sistema de medida o de la medida materializada.
- Determinación de otras propiedades metrológicas: incertidumbre o diferentes valores de precisión.
- El resultado debe ser recogido en un documento denominado certificado de calibración.

Información: se obtiene información sobre la capacidad de medida del equipo, y se garantiza la comparabilidad mediante (Riu y cols., 2001):

- Valor de relación entre el valor del equipo y el proporcionado por el patrón, concepto que en química analítica se conoce como corrección. Es un valor que se utiliza para obtener valores reales de la medición.
- Incertidumbre: el valor numérico de la corrección o la función de la respuesta obtenida, tendrá una incertidumbre asociada debida al método y a los patrones utilizados. Se puede calcular con la información generada en la calibración, aunque que la incertidumbre no solo proviene de ahí, sino también del uso que se dé a diario al instrumento de medida.
- Trazabilidad: la operación de calibración tiene como objetivo demostrar que los resultados sean comparables con el resto de laboratorios y el certificado de calibración garantiza la trazabilidad de los resultados a patrones apropiados.
- Evaluación de los resultados de la calibración. El equipo encargado de hacerlo analiza los resultados y decide que se debe hacer con el equipo.

Con el fin de desarrollar con más profundidad la calibración instrumental en un laboratorio de química analítica, se van a detallar los procedimientos de calibración del instrumental de mayor uso diario en cualquier laboratorio.

5.2.1. Calibración de una balanza analítica

Cualquier instrumento de pesada se va a calibrar por comparación directa (Figura 3). Cabe apuntar que la calibración queda invalidada si se cambiase de ubicación de la balanza, salvo que se haya demostrado que el instrumento no es sensible a estos cambios (CEM, 2004).

Patrones: pesas normalmente de acero inoxidable pulido, latón o aluminio. Según la Organización Internacional de Metrología Legal, las pesas son de siete tipos diferentes:

- Clase E: E1 y E2, exactitud grande. Usado por laboratorios de calibración.

- Clase F: F1 y F2, gran exactitud, patrones de referencia por los organismos de metrología.
- Clase M: M1, M2 y M3, pesas con menor exactitud, pero mayor tolerancia. Usadas como patrones de trabajo. (OILML R 111-1, 2004).



Figura 3. Calibración de una balanza analítica usando pesas certificadas.

Procedimiento de calibración: generalmente, un proceso de calibración de una balanza analítica, o de otro instrumento de pesaje, consta de cinco etapas que se esquematizan en la Figura 4.



Figura 4. Etapas del procedimiento de calibración de una balanza analítica.

1. Repetibilidad de las lecturas: es una medida de como la balanza será capaz de medir de forma repetitiva una masa, en la que se determina el valor de la desviación estándar. Se

realiza una serie de lecturas repetidas. El valor de desviación estándar obtenido nunca deberá ser mayor que tres veces la resolución de la balanza. El procedimiento es simple, primero se ajusta a cero la balanza, se coloca la pesa patrón un número de veces acorde a lo dicho anteriormente (CEM, 2004).

2. Efecto del descentramiento de carga: esta prueba determina las posibles variaciones para un mismo valor de masa producidas al poner la carga en distintos puntos de la balanza. Se deben colocar las cargas dentro de los límites establecidos por el fabricante colocando siempre en primera posición la pesa en el centro del platillo, ya que el valor obtenido, es el resultado de la diferencia del valor en medio del platillo, con respecto a las otras posiciones (Kremer y Putrele, 2016).
3. Prueba de desvío de ajuste: en esta prueba se calcula el desvío, como la diferencia entre la lectura del valor del pesaje y el valor de la pesa.
4. Prueba de linealidad: se verifica, en todo el intervalo de pesada que la indicación de instrumento sea acorde con la carga aplicada dentro de los límites especificados por el fabricante.
5. Movilidad: consiste en depositar sin choque, una carga en la balanza o se retira suavemente del instrumento en equilibrio. Se debe producir una variación en la indicación de la balanza, si no es así, se aumentara la sobrecarga hasta que se produzca la variación del valor (INTI, 2012).

5.2.2. Calibración de material volumétrico.

En la calibración de material volumétrico (Figura 5), se realiza una calibración directa pero por el método de reproducción de la definición de la magnitud. Se calibra el material volumétrico mediante pesada y se calculan los valores de la magnitud deseada a partir de la densidad (Riu y cols., 2002).

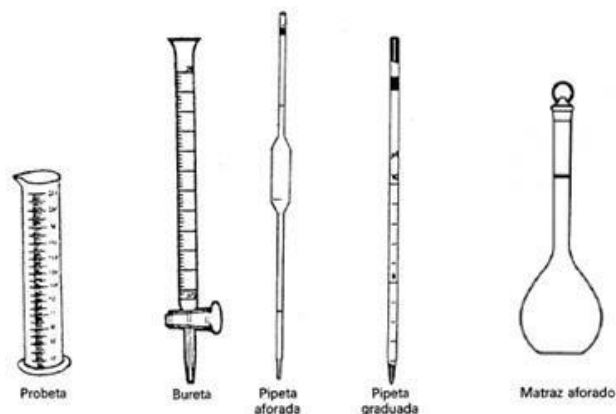


Figura 5. Material volumétrico de uso frecuente en los laboratorios.

Patrones: no se utilizan patrones trazables al sistema internacional de unidades, pero el instrumental que mide la pesada debe estar calibrado.

Procedimiento de calibración: se selecciona un volumen máximo, mínimo e intermedio del instrumento a calibrar, y se realizan las siguientes operaciones para cada uno de los volúmenes: Se coloca el recipiente para la pesada y se apunta el valor, que se tendrá en cuenta para el cálculo de la incertidumbre y se ajusta a cero. Para finalizar el proceso, se añade el agua destilada al material volumétrico y se anota la pesada.

Con los valores obtenidos se podrá calcular, mediante operaciones matemáticas, el volumen de cada una de las calibraciones, utilizando parámetros como la densidad del agua, empuje del aire, temperatura y coeficiente de dilatación del vidrio. La relación que existe entre el volumen calculado y el volumen nominal, que es el correspondiente al material volumétrico, es el dato para calcular la corrección y la incertidumbre de los resultados.

5.2.3. Calibración de un pH-metro

Se lleva a cabo una calibración por comparación directa.

Patrones: se utilizan disoluciones reguladoras de referencia con distintos valores de pH, 4, 7 y 10 generalmente (Figura 6).



Figura 6. Disoluciones de referencia para calibración pH-metro.

Procedimiento de calibración (CEM, 2007):

1. Lectura inicial: se procede a la lectura, de forma ordenada, de todo el campo de medida del pH-metro, utilizando disoluciones reguladoras que abarquen dicho intervalo. Se inicia con el patrón de menor pH.

2. Ajuste: si la lectura de la disolución reguladora no coincide con la certificada, se procede a su ajuste manual o automático según el pH-metro utilizado.
3. Lectura tras ajuste: se vuelven a leer sucesivamente todas las disoluciones y se comprueba que el ajuste ha sido correcto.

5.2.4. Calibración de un espectrofotómetro UV-Visible.

Un espectrofotómetro mide la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra en función de las longitudes de onda específicas. La energía absorbida o absorbancia (A) y la longitud de onda (λ) son los parámetros que intervienen y los que hay que considerar a la hora de calibrar el equipo cuyos componentes se esquematizan en la Figura 7.

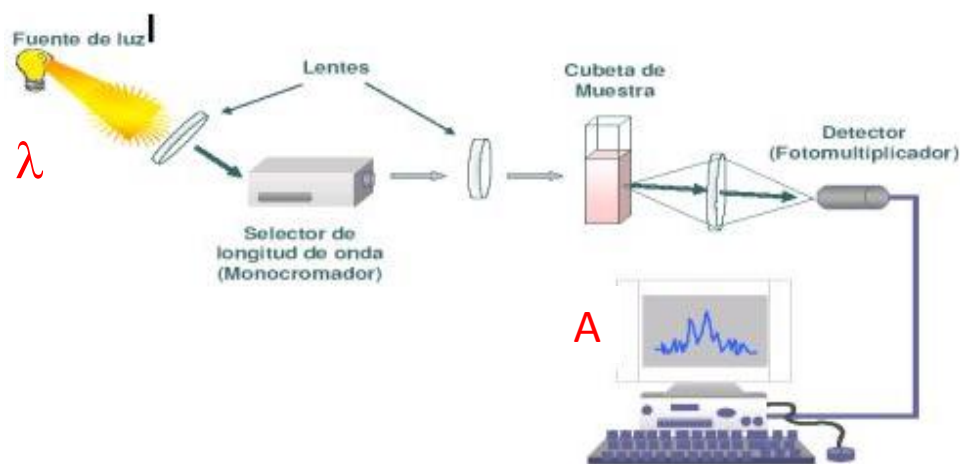


Figura 7. Esquema de los componentes básicos de un espectrofotómetro.

Para asegurar la trazabilidad de las mediciones realizadas con un espectrofotómetro se calibra el instrumento mediante una serie de pruebas. Cada prueba usa un patrón distinto.

Patrones: disoluciones de: óxido de holmio en ácido perclórico, sulfato de cobre en ácido sulfúrico, dicromato potásico en ácido sulfúrico y nitrito de sodio.

Procedimiento de calibración: se realizan las siguientes pruebas para determinar (Azcarate y cols., 2016; Martínez y de los Ángeles, 2009):

1. Exactitud de la longitud de onda: este parámetro se verifica midiendo el estándar de óxido de holmio (III) en ácido perclórico, con sus picos bien definidos, comparándolo con la longitud de onda de dichos picos obtenidos al medir con el espectrofotómetro

2. Exactitud fotométrica: se obtiene comparando la absorbancia de las disoluciones de referencia (sulfato de cobre en ácido sulfúrico, dicromato potásico en ácido sulfúrico) con la obtenida en el instrumento, a las mismas longitudes de onda. Es recomendable comparar a distintas longitudes de onda
3. Luz difusa o parasita: es la radiación electromagnética de longitud de onda distinta a la seleccionada que se detecta. Esta luz difusa causa disminución de la absorbancia y reduce el rango lineal del instrumento. Se utiliza una disolución de nitrito de sodio medida a tres longitudes de onda.
4. Linealidad fotométrica: el análisis de la linealidad fotométrica sirve para establecer el rango de absorbancia en el que el espectrofotómetro tiene respuesta lineal. Como patrones se utilizan disoluciones de dicromato potásico a distintas concentraciones, utilizando una disolución de ácido sulfúrico para el ajuste del equipo.

5.3. Calibración metodológica.

La calibración metodológica o analítica, es una operación necesaria para algunos métodos de análisis en los cuales no basta con una calibración instrumental. Los métodos utilizados en un laboratorio analítico se pueden clasificar en dos grandes grupos:

Métodos clásicos: son los métodos más antiguos utilizados para medir la cantidad de sustancia en una muestra. La gravimetría y volumetría son ejemplos de ellos. Se caracterizan por ser métodos de alta precisión, mayor que la de los análisis instrumentales. Son considerados métodos absolutos porque es posible encontrar una relación directa entre la medida analítica y la concentración analítica sin necesitar de estándares o patrones que contengan el analito en cuestión, tan solo utilizan reacciones químicas y coeficientes estequiométricos para calcular la concentración final de analito (Valcárcel y Ríos, 1992).

Métodos instrumentales: son métodos que utilizan técnicas más modernas, como son las técnicas ópticas, térmicas, radioquímicas, másicas, etc. Suelen tener gran sensibilidad y gran capacidad de analizar, de forma rápida, muchas muestras. Además, al usar instrumentos y técnicas más avanzadas, los resultados de los análisis están computarizados y automatizados.

Aun así, los métodos instrumentales presentan una desventaja frente a los clásicos, son menos precisos y esto es debido al error de calibración. Las técnicas instrumentales son técnicas relativas, la señal obtenida de la medición de la muestra a analizar se compara con otras

medidas para determinar la concentración analítica. Los patrones utilizados ya contienen un error de medida, y este error se arrastra y se añade al resto de errores, tanto aleatorios como sistemáticos, que aparecen en el proceso de calibración, incrementando el posible error de la determinación de la concentración (Valcárcel, 1999).

A diferencia de lo que ocurre con los métodos clásicos, los métodos instrumentales requieren el uso de estándares químico-analíticos adecuados que contengan el analito a estudiar. Y la forma más común de determinar la concentración de una muestra usando estándares pasa por la elaboración de gráficas de calibrado con la correspondiente recta de calibración.

El procedimiento para elaborar las gráficas de calibrado es el siguiente: se toman una serie de patrones de calibración de los que se conoce la concentración del analito. Estos patrones se miden en el instrumento analítico, y se representa gráficamente la concentración de cada uno de los patrones frente a las respuestas de medición. Una vez elaborada la gráfica de calibrado, se puede obtener mediante interpolación (menos en algún caso que se hace por extrapolación) la concentración de la muestra a determinar midiendo ésta con el instrumental analítico en las mismas condiciones en las que se hizo la medida de los patrones (Miller y Miller, 2002). Para ello, es necesario encontrar la forma de obtener una curva de calibración lo más recta posible, ajustándose a una serie de puntos experimentales, donde cada punto se encuentra definido por una variable X (variable independiente, concentración del analito) y una variable Y (variable dependiente, respuesta instrumental) (Riu y Boqué, 2003).

Los puntos de calibración tienen un error aleatorio causado por la respuesta instrumental, en el valor de Y . Hay que buscar la mejor recta que pase por los puntos de calibración y calcular la ordenada en el origen y la pendiente de la misma. El método usado para conseguir una recta que pase por los puntos de calibración, se conoce como regresión lineal simple o método de los mínimos cuadrados (Coello y Maspocho, 2007).

Además de las propiedades analíticas desarrolladas en la introducción, existen una serie de parámetros o propiedades que se determinan a partir de la curva de calibración, que también van a ser importantes para valorar la calidad de un método (Figura 8). Son los siguientes (PAHO, 2008):

- *Linealidad* se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro del intervalo de trabajo. A partir de la curva de calibración, se puede obtener la ecuación de la recta de la que se obtiene un coeficiente de correlación r^2 . Para una buena garantía de linealidad, será conveniente medir en cinco niveles de concentración, que abarquen el intervalo de trabajo, y

repetir este proceso tres veces. Se considera que un valor de r^2 representa un buen ajuste lineal, cuanto más próximo a 1 se encuentre.

- *Límite de detección* se define como la cantidad mínima de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo unas condiciones establecidas. Existen diferentes procedimientos para determinar este límite, uno de ellos es usando la curva de calibración mediante la relación entre tres veces la desviación estándar de la respuesta lineal S_b , y la sensibilidad que en la ecuación de la recta corresponde a la pendiente b . Se calcula midiendo una señal de un blanco más tres veces su desviación estándar.

$$LD = \frac{3 \times S_b}{b}$$

- *Límite de cuantificación* es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo unas condiciones establecidas para dicho método, con una exactitud y precisión adecuada. El método de determinarlo es casi idéntico al del límite de detección, se distingue en que este requiere una relación de diez veces la desviación estándar frente a la pendiente. Se calcula midiendo una señal de un blanco más diez veces su desviación estándar.

$$LC = \frac{10 \times S_b}{b}$$

- *Rango o intervalo lineal* se define como el intervalo de concentración en que el analito puede ser determinado mediante la curva de calibración. Esta comprendido entre el límite de cuantificación y el punto en el que la curva deja de ser lineal.

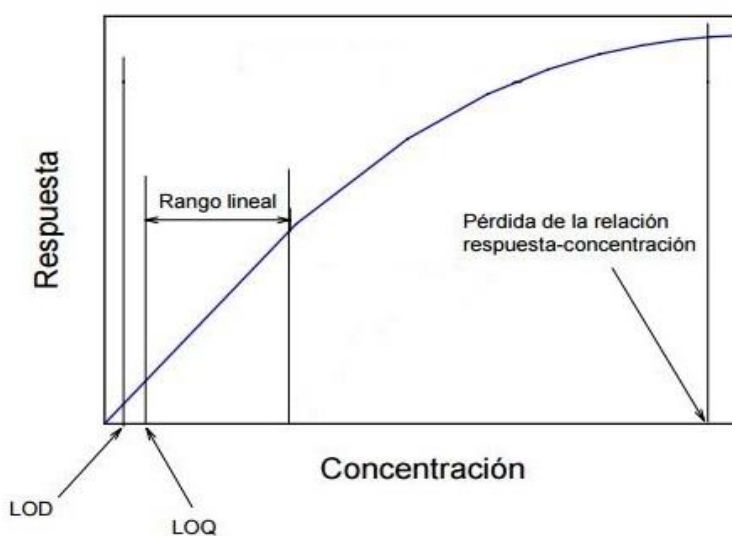


Figura 8. Parámetros relacionados con la calibración metodológica

5.3.1. Método simple, directo o del estándar externo

Un estándar o patrón externo, es aquel que se prepara fuera de la muestra problema. Se aplica este método cuando se desea determinar la concentración de un analito en la que, ni los componentes de la matriz de la muestra ni los reactivos usados en el procedimiento interfieren en el análisis. También se puede usar en el caso en que las interferencias se conozcan y se mantengan siempre constantes en las medidas, con lo cual se podrán corregir estas posteriormente (Sánchez, 2016).

Procedimiento: se preparan una serie de estándares externos de concentración conocida. La cantidad óptima de estándares debe ser como mínimo de tres a cinco, aunque en análisis rutinarios se podrá confiar en calibraciones con dos patrones. Se mide las señales y se representan frente a la concentración de los patrones obteniendo una línea recta. Previa a las medidas de los estándares, se utiliza un blanco, que es una muestra idéntica a la problema pero sin el analito. El blanco corrige la respuesta analítica original (Figura 9) (Skogg y cols., 2005).

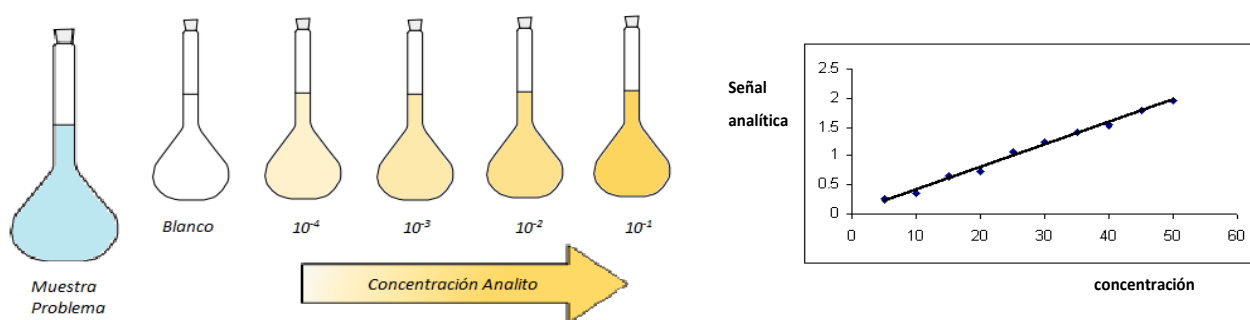


Figura 9. Esquema del procedimiento de una calibración directa.

Ventajas: método simple y rápido. Usando un número necesario de patrones se puede analizar múltiples muestras.

Inconvenientes: este método se basa en la suposición de que la respuesta instrumental del analito en la muestra será la misma que la respuesta del analito en la muestra patrón. Aunque se corrige con blanco, hay muchos factores que pueden hacer que esta suposición no se cumpla. Los más comunes son: los efectos de la matriz, la contaminación de muestras durante la preparación y la incorrecta elaboración de blancos o patrones.

Aplicación: la calibración por el método de estándar externo se ha aplicado en la determinación de norisoprenoides en frutas y verduras. Así, en el estudio llevado a cabo por

Stinco y cols. (2014) se desarrolla y valida un método cromatográfico que permite determinar nueve carotenoides, cuatro tocoferoles y cuatro clorofilas. Las curvas de calibrado presentan una buena linealidad en un amplio rango de concentración (Figura 10).

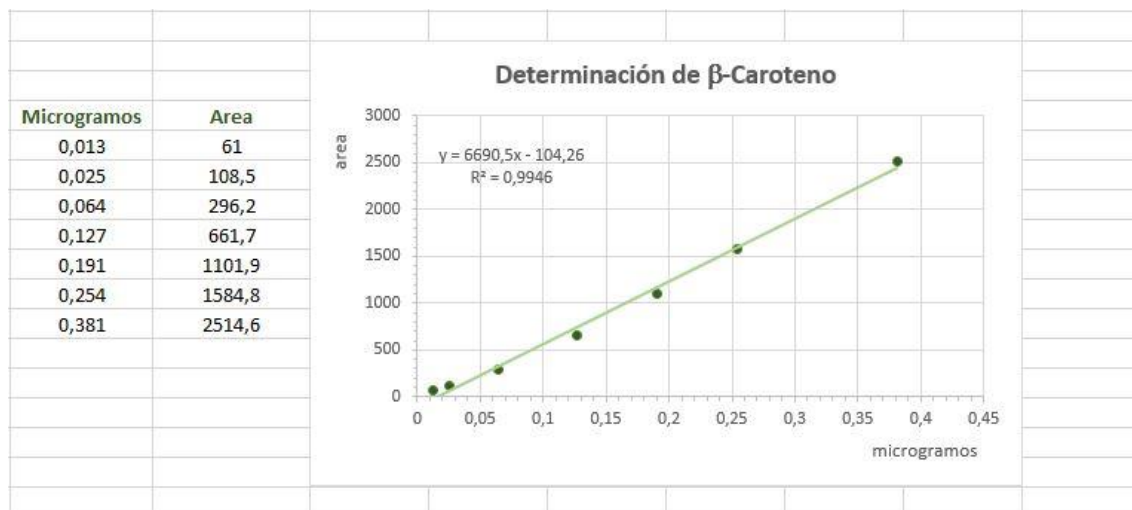


Figura 10. Gráfica de determinación de isoprenoides por calibración simple.

A partir de la ecuación de la recta de calibrado se calculan las concentraciones de las muestras problemas por interpolación en la misma.

5.3.2. Método del patrón interno

Método utilizado para compensar errores debidos a fluctuaciones debidas a la técnica analítica. Los patrones internos, además, se consideran muy útiles, cuando la concentración de la muestra o la respuesta instrumental varía cada vez que se utiliza, por razones desconocidas y difíciles de controlar. También es un método de utilidad cuando se producen pérdidas del analito durante el proceso.

Se utiliza como estándar interno, una sustancia diferente al analito pero que tengan propiedades físico-químicas similares, provocando que se vean afectadas de forma similar durante el análisis. Añadiendo un patrón de propiedades parecidas al analito, la relación de concentración perdida de ambas se mantiene constante (Sánchez, 2016).

Procedimiento: se empieza por la adición de la sustancia pura a la muestra y a los patrones en concentración fija (Figura 11). Primero se determina la respuesta del equipo a las disoluciones

estándares (A) por separado y después con el patrón interno (PI). Se calcula el cociente de la respuesta de ambas, y este valor es el que se representa frente a la concentración del analito. Por tanto, se representa gráficamente el cociente entre la señal del analito y la del patrón interno en función de la concentración del analito de las disoluciones de los estándares. Si se varía algún parámetro que afecte a las respuestas medidas, dichas respuestas deberán afectar igual al analito y al patrón interno.

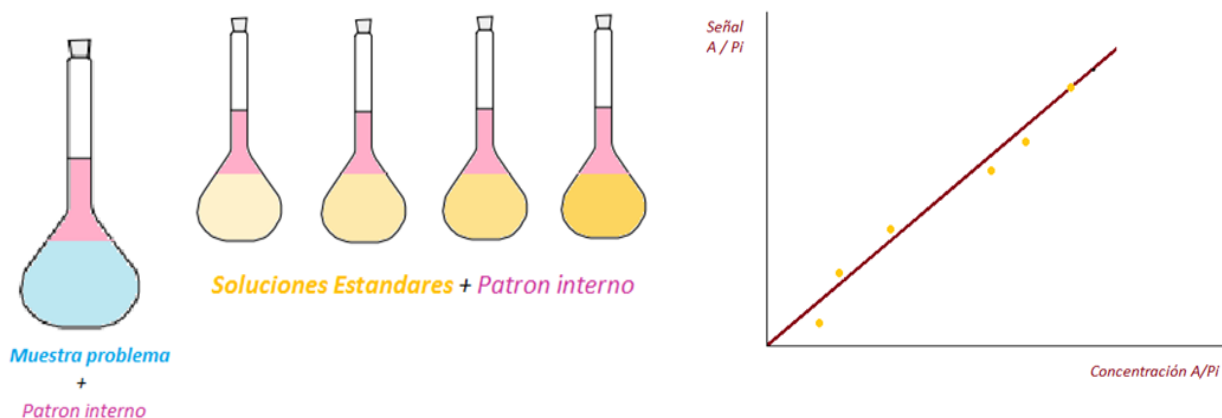


Figura 11. Esquema del procedimiento de calibración con patrón interno.

Ventajas: al compensar el efecto de los errores no controlados, se obtienen resultados muy exactos y precisos.

Inconvenientes: se trata de un procedimiento más laborioso que cualquier otro método de calibración convencional. Además de la dificultad de encontrar una sustancia adecuada para que sea utilizada como patrón interno.

Aplicación: para mostrar la utilización de una calibración por la técnica del patrón interno se ha tomado el ejemplo del estudio de Díaz (2014) sobre los compuestos responsables de los defectos sensoriales de aceites de oliva vírgenes, principalmente el hexanal. Se utiliza para el análisis cuantitativo la cromatografía de gases. Cualquier cromatografía presenta muchos parámetros difíciles de controlar a la hora de realizar un análisis, entre ellos variaciones en el gas transportador, cambios en el volumen de inyección, etc., por lo que el método adecuado para solventar esos problemas es la calibración con un patrón interno, en el caso del estudio fue el acetato de isobutilo (Figura 12).

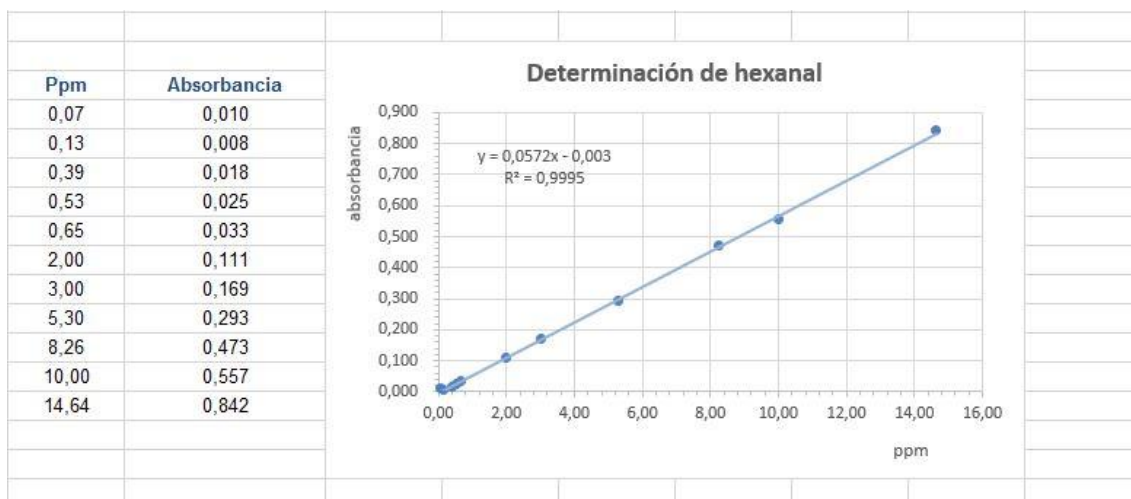


Figura 12. Gráfica de determinación del hexanal por el método del patrón interno.

Tomando la ecuación de la recta de calibrado se van a calcular las concentraciones de las muestras problemas por interpolación de la misma.

5.3.3. Método de la adición estándar o adición patrón

En algunas ocasiones, al medir una sustancia, hay otros componentes en la muestra o disolución a analizar, y estos interfieren en los resultados de medición, es lo que se conoce como efecto matriz. Cuando esto ocurre, hay dos soluciones posibles. Una primera solución, es lo que se conoce como aproximación a una matriz comparable, consiste en tomar una muestra similar a la muestra problema, pero sin el analito a determinar, y añadir esta sustancia para formar disoluciones patrón que poder comparar con la muestra problema. Aunque no es siempre posible obtener esta aproximación.

La segunda solución es utilizar el método de las adición patrón o adición estándar (Miller y Miller, 2002). El método consiste en añadir cantidades de concentración conocida de analito a la muestra a determinar. Y con el aumento de la señal de respuesta, se puede determinar la concentración de analito que había antes de la adición.

Procedimiento: se toman volúmenes iguales de la muestra a analizar, y a todas, menos a una de ellas, se le adiciona concentraciones conocidas y crecientes del analito, y por ultimo todas ellas se diluyen al mismo volumen. De esta forma se tienen disoluciones con una misma concentración de analito problema, a las que se añaden concentraciones distintas de patrón,

que es la misma especie que el analito. Después de medir la señal de cada una de las disoluciones se representan estas respuestas en función de la concentración de analito patrón añadido obteniéndose una línea recta que no pasa por el origen de coordenadas tal como se muestra en la Figura 13.

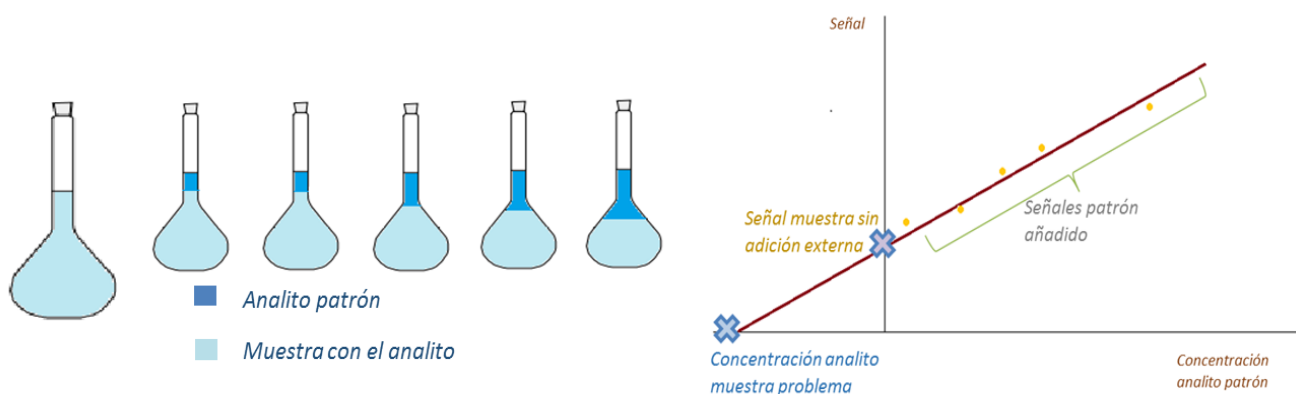


Figura 13. Esquema del procedimiento de calibración con adición patrón.

Una vez realizado, se determinan todas las señales para cada una de las disoluciones, y se representaran gráficamente. Se calcula la línea de regresión, pero este método tiene una diferencia con los anteriores, y es que la concentración de analito problema se haya mediante extrapolación al eje X. Este valor será la concentración del analito (Miller y Miller, 2002). En la gráfica se aprecia cómo se representan las respuestas instrumentales, y como la extrapolación de la recta lleva hasta el valor cero en el eje X. Los valores positivos del eje X, representa la concentración de patrón añadido después de haber sido mezclado con la muestra.

Para determinar si existen interferencias en la matriz se puede utilizar un método sencillo de comparación entre dos pendientes de dos rectas de calibrado (Palacios, 2015). Una se elabora por calibración externa añadiendo concentraciones crecientes de analito a un disolvente determinado, y la segunda por adición estándar, añadiendo analito en distintas concentraciones a la muestra. Si las rectas son paralelas, es decir, si las pendientes son idénticas, no existe dicho efecto matriz. En el caso en el que no sean paralelas, si hay efecto matriz.

Ventajas: se consigue que el efecto matriz sea contrarrestado.

Inconvenientes: es un proceso muy laborioso. Se necesita de un material diferente para cada adición de patrón, y se tiene que hacer una o diversas adiciones a cada muestra (Compañó y Rios, 2002).

Aplicación: se consultó el artículo de Saavedra y cols. (2007) en el cual se realiza un estudio de la concentración del plomo en el polen apícola, en concreto de la especie *Brassica napus*, con el objetivo de evaluar la contaminación ambiental de la zona de estudio, puesto que ha quedado demostrado que la contaminación ambiental con metales tóxicos va a quedar reflejado en la concentración de estos metales en el polen de las flores (el polen es un producto que presenta mucha variedad de oligoelementos de alta calidad nutricional, pero en bajas concentraciones). Se determinó la concentración mediante espectroscopia de absorción atómica, y para evitar interferencias con los múltiples elementos presentes en el polen, es necesaria la calibración por el método de la adición estándar (Figura 14).

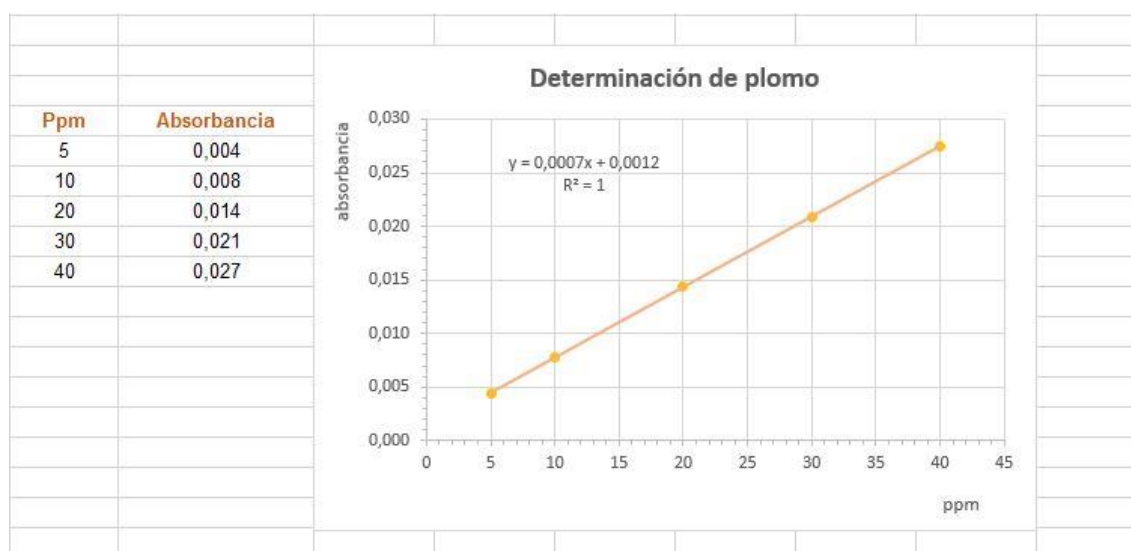


Figura 14. Gráfica de determinación de plomo por el método de la adición estándar

5. CONCLUSIONES

De la revisión bibliográfica realizada sobre la importancia de la calibración en los laboratorios de Química Analítica se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La finalidad de los laboratorios analíticos es producir información analítica que permita adoptar decisiones para resolver problemas planteados por la sociedad, la industria o un

cliente en particular. Para asegurar la calidad en los resultados analíticos es necesario verificar y calibrar la instrumentación, validar el método analítico y realizar controles de calidad.

- Con la validación de los métodos analíticos se pone de manifiesto el funcionamiento adecuado a la aplicación que se le quiere dar y se evalúa las propiedades analíticas, como son exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación, el intervalo de linealidad, sensibilidad, selectividad y la robustez, que constituyen la forma de expresar objetivamente la calidad analítica.

- Se han detallado los procedimientos de calibración instrumental, indicando la metodología y los patrones utilizados, de los principales equipos empleados en los laboratorios analíticos: balanza analítica, material volumétrico, pH-metros, y espectrofotómetros, destacando la importancia de los dos primeros como piezas clave para asegurar la calidad de las medidas y de los resultados.

- Se han descrito las distintas técnicas de calibración metodológica, o analítica (estándar externo, patron interno, y adición estándar) indicando, en cada caso, sus principales características, procedimiento, ventajas, inconvenientes y aplicaciones, ilustrando estas últimas con ejemplos de interés farmacéutico.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Azcarate MP, Kloster NS, Ostinelli M, Carreira D. Guía para la verificación de espectrofotómetros UV-Visible utilizados en el análisis del suelo y agua. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina [en línea]. [Consultado en Junio 2016]. Disponible en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-guia_espectrofotmetros_uv.pdf
2. Benítez Chávez R. Simposio de metrología. Una vez más: Trazabilidad. 2004 [en línea]. [Consultado en Mayo 2016]. Disponible en: <https://www.cenam.mx/simposio2004/memorias/TA-017.pdf>
3. Centro Español de Metrología, CEM. Procedimiento de calibración para la calibración de balanzas mono plato. CEM; 2004. ME-005 [en línea]. [Consultado en Junio 2016]. Disponible en: http://www.cem.es/sites/default/files/procedimientome-005_calibracion_balanzas_monoplato.pdf

4. Centro Español de Metrología, CEM. Procedimiento para la calibración de pH-metros digitales. CEM; 2007. QU-003 [en línea]. [Consultado en Junio 2016]. Disponible en: http://www.cem.es/sites/default/files/qu-003_digital.pdf
5. Coello J, Maspoch S. Regresión lineal por mínimos cuadrados. Calibrado univariable. En: Blanco M, Cerda V. Temas avanzados de quimiometría. 1ªed. Islas Baleares: Universitat de les Illes Balears; 2007. 187-232.
6. Compañó Beltrán R, Ríos Castro A. Garantía de calidad en los laboratorios de química analítica. 1ªed. Madrid: Síntesis; 2002.
7. Díaz Fernández-Figueroa C. Estudio analítico de compuestos responsables de defectos sensoriales de aceites de oliva vírgenes. Trabajo de Fin de Master, Master en Especialización Profesional en Farmacia. Universidad de Sevilla. 2014.
8. Eurolab. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 1ª ed. España. 2016.
9. Gella J. Trazabilidad e incertidumbre de la Medición en el Laboratorio Clínico. Universidad Autónoma de Barcelona y Comisión de Metrología de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. España. 2012.
10. Harris DC. Análisis Químico cuantitativo. 3ª ed. Chine Lake, California: Michelson Laboratory; 2006.
11. Hernández Revilla, M. Validación de métodos de ensayo y estimación de la incertidumbre conforme a la norma ISO/IEC 17025. Aplicación al análisis de aguas residuales y continentales. Tesis doctoral. Valladolid: Universidad de Valladolid. Facultad de ciencias, Departamento química analítica, 2013. [en línea]. [Consulta Mayo 2016]. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/4284/1/TESIS457-140212.pdf>
12. Instituto Nacional de Tecnología Industrial, INTI. Calibración de balanzas. Ensayo de aptitud. INTI; 2012. PRM-09/2010 [en línea]. [Consultado Mayo 2016]. Disponible en: <https://www.inti.gov.ar/interlaboratorios/informes/2011/metrologia/2011-Balanzas.pdf>
13. Inter American Accreditation Cooperation, IAAC. Guía para formular alcances de acreditación de laboratorios. IAAC; 2010. G1: 04.
14. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International standar. Second edition. International Organization for Standarization. 2005
15. Kremer R, Putruele G. Desarrollo de un procedimiento y herramienta de calibración y verificación para balanzas electrónica aplicable a laboratorios que implementan la ISO 17025:2005. Gerencia del Sistema de la Calidad Institucional- Laboratorios, Dirección

- Nacional, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. [Consultado en Abril 2016].
16. Leiva-Guzmán MA. Materiales de Referencia y Comparaciones Interlaboratorio. Herramientas para el control de la calidad en laboratorios de ensayo. Chile: Centro Nacional del Medio Ambiente; 2006.
 17. Martínez Osorio FS, de los Ángeles Pérez Espinoza I. Calibración de un espectrofotómetro UV-Visible y evaluación de la incertidumbre. Tesis para optar al título de: Licenciado en Química. Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Facultad de Ciencias y Tecnología, Departamento de Química. 2009.
 18. Miller JC, Miller JN. Estadística para química analítica, 4ª ed. Madrid, España: Prentice Hall. 2002.
 19. Maroto A, Riu J, Boque R, Rius X F. Validación de métodos analíticos. Trazabilidad e incertidumbre. En: Blanco M, Cerda V. Temas avanzados de quimiometría. 1ªed. Islas Baleares: Universitat de les Illes Balears; 2007. 1-40.
 20. Organisation Internationale Métrologie Légale, OILM. Weights of classes E1, E2, F1, F2, M1, M1-2, M2, M2-3 and M3. Part 1: Metrological and technical requirements. OILM. 2004. [en línea] [Consultado en Mayo 2016]. Disponible en:
<http://www.oiml.org/publications/R/R111-1-e04.pdf>
 21. Organización Mundial De la Salud, OMS. Buenas prácticas para laboratorios nacionales de control farmacéutico. Ginebra: OMS; 2002. Serie de informes técnicos: 36 Anexo 3.
 22. Pan American Health Organization, PAHO. Validación de métodos analíticos. Buenas prácticas para laboratorios nacionales de control farmacéutico. PAHO. 2002. Anexo 3: Informe 36.
 23. Riu J, Boqué R, Maroto A, Riux F X, Laso J. Calibración de equipos de medida. Técnicas de Laboratorio. 2001; 260, 226-228.
 24. Riu J, Boqué R, Maroto A Rius FX. Trazabilidad en medidas físicas mediante calibración directa: calibración de material volumétrico. Técnicas de Laboratorio. 2002; 269, 112-114.
 25. Riu J, Boqué R. Calibración lineal. Técnicas de Laboratorio. 2003; 284, 676-680.
 26. Rius FX, Maroto A., Boqué R, Riu J. La validación de métodos analíticos. Técnicas de laboratorio. 2000; 252, 382-385.
 27. Rivera Romero B. Uso del concepto de trazabilidad metrológica por los laboratorios de calibración. Centro Español de Metrología y Entidad Nacional de Acreditación. 2015 [en línea]. [Consultado Abril 2016]. Disponible en:
http://www.enac.es/documents/7020/563119/Doc_ENAC_CEM_trazabilidad/4c53078c-e94a-42ee-a063-cdf4c13f7cb3

28. Saavedra AR, Di Bernardo ML, Rondón C, Gutiérrez L, Saavedra O, González I, Vit P. Determinación de plomo en polen apícola de *Brassica napus* L. del Páramo de Misintá, estado Mérida, Venezuela. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 2007; 38 (1): 6-10.
29. Sánchez Palacios MA. Métodos de Calibrado. Venezuela: Facultad de Ciencias, departamento de Química [en línea]. [Consultado en Mayo 2016]. Disponible en: http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/angelisa/Downloads/tecnicascalibracio_vr1.pdf
30. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentos de química analítica. 8ª ed. Madrid: Thompson; 2005.
31. Stinco CM, Benitez-González AM, Dolores H, Vicario IM, Meléndez-Martínez AJ. Development and validation of a rapid resolution liquid chromatography method for the screening of dietary plant isoprenoids: Carotenoids, tocopherols and chlorophylls. Journal of Chromatography A. 2014; 1370: 162-170.
32. Valcarcel M, Ríos A. La calidad en los laboratorios analíticos. 1º ed. España: Reverte; 1992.
33. Ventura Egusquiza G., Lluque Aquino A. Calculo de la Incertidumbre de la medición. Instituto nacional de Salud. 2008 [en línea]. [Consultado Junio 2016]. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/normatividad/proctec/PRT-CNSP-008%20Ed%2001%20C%C3%A1lculo%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_FINAL.pdf
34. Vocabulario Internacional de Metrología, VIM. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. Centro Español de Metrología, CEM. 3ª ed. 2012.