



GUIA

VALIDACIÓN DE MÉTODOS NIRS APLICABLES PARA LA EVALUACIÓN PROXIMAL DE ALIMENTOS PARA ANIMALES, CEREALES Y PRODUCTOS DE CEREALES MOLIDOS.

La presente guía para la validación de métodos analíticos mediante la aplicación de tecnología NIRS, está dirigida a los establecimientos dedicados a la fabricación de materias primas y alimento para uso en animales, comercializados en el país, así como los laboratorios de control de calidad internos.



Versión 1.0
Abril 2026



2026
año de
Margarita
Maza



LEGALES

En el ejercicio de las facultades del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), en materia de regulación, control y fomento sanitarios, se emite el presente documento que tiene carácter orientativo, en el cual se describen las recomendaciones y sugerencias actuales del SENASICA respecto a la orientación sobre la validación de metodologías basadas en la Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS).

En caso de que se requiera citar la presente Guía, se realizará de la siguiente manera:

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), CENAPA. (2026). Guía de validación de metodologías basadas en la Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS). México.





INTRODUCCIÓN

En un mundo cada vez más consciente de la importancia de la alimentación para la salud y el bienestar animal, asegurar la calidad y seguridad de los alimentos es una cuestión fundamental, y un desafío cada vez más complejo para esta industria, debido en gran parte a la globalización del mercado. La creciente demanda por parte de los consumidores de que los productores de alimento para consumo animal, proporcionen una mayor información relacionada con la seguridad y calidad alimentaria que asegure su autenticidad, la ausencia de fraudes y el cumplimiento de la legislación y normativas de calidad, confirma el interés existente por el desarrollo de métodos analíticos rápidos y de aplicación general para dicho control.

Los análisis de alimentos para animales, cereales y productos de cereales molidos se realizan de manera rutinaria para garantizar su calidad e inocuidad. Para lograr que cumplan con los estándares establecidos por las regulaciones gubernamentales, además de examinar el producto final se evalúan la materia prima y se monitorean los cambios durante el proceso de producción.

Dentro de los parámetros de calidad solicitados está el determinar la composición química del alimento cuyos constituyentes principales son los carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales y agua, también conocidos como nutrientes. La información resultante se puede utilizar para distintos propósitos como determinar si se alteraron las propiedades físicas y químicas del producto, así como el establecer el valor nutricional, dato que les interesa a muchos consumidores al momento de elegir un alimento sobre otro por motivos de salud, y que se reporta por medio de la etiqueta nutrimental.

Sin embargo, actualmente la autenticación de los productos alimenticios se limita a conclusiones basadas en análisis de fracciones específicas de los alimentos mediante el uso de métodos analíticos primarios. A estos métodos empleados para cuantificar a los nutrientes se le conoce como análisis proximales. Por ello, es necesario modificar los esquemas convencionales de los métodos analíticos actuales que proporcionan datos univariable, identificando y cuantificando compuestos/analitos o familias de ellos de forma individual, fundamentados en la aplicación de un enfoque multivariable no dirigido, empleando la metodología de huellas instrumentales. Dado que hasta el alimento más sencillo es una compleja matriz multicomposicional, el enfoque para investigar su composición o estructura química no debería ser otro que el multivariable.

La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés: Near Infrared Spectroscopy) es una técnica secundaria que permite evaluar distintos componentes de una muestra con niveles de exactitud y precisión comparables con los métodos de referencia primarios. Al prescindir de la separación física de los analitos o de una dilución, no requiere el uso de solventes ni reactivos tóxicos para el análisis, teniendo un beneficio con la reducción de tiempos y costos. Además, el material a investigar no es destruido, lo que permite realizar el estudio en la línea de producción. Esto ha permitido que sea utilizada como técnica analítica en la industria farmacéutica, petroquímica, alimenticia, agrícola, medio ambiental, médica, textil, cosmética y estudio de químicos como polímeros.





1. TABLA DE CONTENIDO

Legales	2
Introducción	3
1. Tabla de contenido	4
2. Objetivo	7
3. Alcance	7
4. Referencias normativas	7
5. Términos y definiciones	8
6. Procedimiento	13
6.1. Colección de una población diversa de muestras	14
6.1.1 Estimación del número de muestras	15
6.1.2 Factores que afectan el número de muestras	15
6.1.3 Selección de muestras	16
6.1.4 Criterios de Inclusión en la Matriz	16
6.1.5 Estrategia de Selección de Muestras	16
6.1.6 Estrategia de selección de muestras de alimentos para animales, cereales y productos de cereales molidos	17
6.2.0 Preparación de la muestra y técnicas de muestreo	18
6.3.0 Almacenamiento de las muestras	19
6.4.0 Homogeneidad y Tamaño de Partícula	19
7. Calificación del instrumento NIRS	20
7.1.0 Parámetros de Desempeño Óptico (OQ)	20
7.2.0 Parámetros de Estabilidad y Ambiente (OQ)	21
7.3.0 Retos de la Muestra y el Accesorio (PQ)	21
7.4.0 Integridad de Datos y Software	21





7.5.0 Calibración de equipos NIRS	22
7.5.1 Consideraciones Críticas para la Compra	22
7.6.0 Procedimiento para la creación del modelo	23
7.6.1 Obtención de Espectros (Lecturas en equipo NIR.....	23
7.6.2 Pre-procesamiento de Datos (Limpieza)	24
7.6.3 Desarrollo de la Calibración (Quimiometría)	24
7.6.4 Evaluación estadística	24
7.7.0 Validación del método analítico	25
7.7.1 Metodología de validación	25
7.8.0 Descripción de la creación del modelo de cuantificación	26
7.9.0 Criterios de aceptación	28
8.0.0 Protocolo de validación del modelo analítico usando tecnología NIRS	29
8.1.0 Objetivo	29
8.2.0 Alcance	29
8.3.0 Equipos e instrumentos	30
8.4.0 Reactivos, Materiales y Materiales de Referencia Certificados.....	30
8.5.0 Selección de matrices y muestras	31
8.6.0 Condiciones generales de equipos	34
8.7.0 Perfil, competencia y habilidades del personal que realiza la validación	35
8.8.0 Condiciones ambientales	35
9.0.0 Parámetros de funcionamiento y metodología de validación	35
9.1.0 Linealidad	35
9.2.0 Precisión (Repetibilidad del sistema, Repetibilidad y Reproducibilidad)	36





9.2.1 Repetibilidad instrumental -----	36
9.2.2 Repetibilidad -----	37
9.2.3 Reproducibilidad -----	37
9.3.0 Incertidumbre de la medición -----	37
9.4.0 Sesgo o bias -----	39
10.0 Mantenimiento o actualización del modelo -----	40
11.0 Documentación -----	41
12.0 Bibliografía -----	43
13.0 Histórico del documento -----	45
 ANEXO 1. Proceso para la validación del modelo en técnicas NIRS -----	47
ANEXO 2. Guía para la estimación de la linealidad en técnicas NIRS -----	48
ANEXO 3. Guía para la estimación de la repetibilidad del sistema en técnicas NIRS -----	50
ANEXO 4. Guía para la estimación de la repetibilidad y reproducibilidad del sistema en técnicas NIRS -----	52
ANEXO 5. Guía para la estimación de la solidez (robustez) en técnicas NIRS -----	55
ANEXO 6. Guía para la estimación de la incertidumbre en técnicas NIRS -----	57
ANEXO 7: Guía para la estimación del sesgo o bias en técnicas NIRS -----	59
 Diagrama 1: Proceso de selección del set de calibración, validación y de referencia -----	61
Diagrama 2: Matriz de análisis -----	63
Diagrama 3: Matriz de resultados -----	66
Diagrama 4: Resumen de parámetros estadísticos obtenidos en la validación del modelo -----	70





2. OBJETIVO

Este documento proporciona directrices para la determinación, mediante espectroscopia de infrarrojo cercano NIRS, los constituyentes como humedad, grasa, proteína y fibra cruda y parámetros como la digestibilidad en animales, piensos, cereales y productos de cereales molidos.

3. ALCANCE

La presente guía de validación tiene como alcance y aplicabilidad a los laboratorios autorizados en el control de calidad interna, particularmente en el sector agroalimentario y veterinario, y que están regulados y enlistados por el SENASICA para realizar análisis de productos de uso o consumo animal.

4. REFERENCIAS NORMATIVAS

ISO 12099:2017: Animal feeding stuffs, cereals and milled cereal products — Guidelines for the application of near infrared spectrometry.

AOCS AM1a-09: Desarrollo de modelos predictivos y de gestión de instrumentos de espectroscopia de infrarrojo cercano.

ISO-IEC-17025: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

NMX-CH-13528-IMNC-2007: Métodos estadísticos para su uso en ensayos de aptitud por comparaciones interlaboratorios.

REGLAMENTO DE LA LEY FEDERAL DE SANIDAD ANIMAL: DOF 21-05-2012





5. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

5.1 Agua: Componente esencial de muchos alimentos y su contenido varía según el tipo de comestible que se trate. Las frutas contienen entre un 80 y 95% de agua, las carnes de 50 a 82%, leche de 84 a 86% y el pan de 30 a 35% por mencionar algunos (Cheung, 2015), incluso los que aparentan estar deshidratados presentan entre un 10 a 12% de ella (Badui, 2006).

En el espectro de infrarrojo cercano se observan las bandas de absorción del agua en la región de 1450 (1er sobretono) y 1940 nm (banda de combinación) por las vibraciones OH. Sin embargo, pueden presentarse cambios en su ubicación y en la anchura de la banda debido a la formación o rompimiento de puentes de hidrógeno. Factores como la temperatura y las interacciones químicas con otras moléculas de la muestra a analizar favorecen dichas alteraciones (Burns, 2008).

5.2 Análisis exploratorio de datos: Se aplican antes de desarrollar el modelo de regresión para determinar posibles relaciones entre las muestras y detectar aquellas que no pertenezcan al grupo (Manley, 2014). Generalmente, los resultados se muestran en gráficos y la búsqueda de patrones se hace de manera visual. La técnica más utilizada es el Análisis del Componente Principal, mejor conocida como PCA por sus siglas en inglés. El PCA es una técnica básica en el análisis multivariante debido a que en la construcción de los modelos de regresión se utilizan las variables latentes o los componentes principales calculados con este método. Tal es el caso de la Regresión del Componente Principal (PCR, por sus siglas en inglés), resolución de curva multivariante (MCR, por sus siglas en inglés) y la regresión parcial de mínimos cuadrados, mejor conocida como PLS. Incluso, para determinar si el modelo es sencillo de interpretar, éste debe contener la menor cantidad de PCs posibles (Miller y Miller, 2010).

5.3 Análisis del componente principal (PCA): Identifica las longitudes de onda que presentan mayor variación en un set de datos al considerar que éstas son quienes aportan información y que no contribuyen al ruido. Proyecta los resultados en una menor cantidad de variables conocidas como variables latentes o como componentes principales (PC, por sus siglas en inglés). El primer PC interpreta la mayor cantidad de información, el segundo exhibe lo que no se tomó en cuenta en el anterior y en cada subsecuente PC aumenta la porción de ruido.

5.4 Carbohidratos: También conocidos como hidratos de carbono, son las biomoléculas más abundantes de la naturaleza. La mayoría de ellos presentan la fórmula general $(CH_2O)_n$ y dependiendo de la ubicación del grupo funcional carbonilo, pueden ser polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas por sus siglas en inglés). En los espectros NIR los carbohidratos presentan una banda de absorción en la longitud de onda de los 2100 nm por las vibraciones de los enlaces O-H/C-O y C=O-O. Sin embargo, para su estudio también se utilizan otras regiones dependiendo del tipo de molécula que se requiera analizar. Por ejemplo, la celulosa presenta bandas en los 1490, 1780, 1820, 2335, 2347, 2352 y los 2488 nm (Burns, 2008).

5.5 Centrado a la media: Consiste en restar el valor promedio de un conjunto de datos a cada variable (Unscrambler). Esto permite que el modelo de regresión sea más sencillo de interpretar al remover la necesidad de que tenga un intercepto, y, por tanto, las concentraciones estimadas de los analitos sean más precisos (Burns, 2008).





5.6 Contenido constituyente: Fracción de masa de sustancias determinada utilizando el producto químico apropiado, estandarizado o método validado.

Nota: La fracción de masa a menudo se expresa como porcentaje. EJEMPLO: Humedad, grasa, proteína, fibra cruda, fibra detergente neutra y fibra detergente ácida.

5.7 Corrección de línea base: Se utiliza para corregir el desplazamiento de la línea base del espectro. Puede ser a través de una compensación (offset) que consiste en restar el valor mínimo de todas las variables o en aplicar una transformación que convierte la línea base inclinada en una horizontal al elegir dos variables entre las cuales se definirá la nueva base (CAMO Software AS, 2016).

5.8 Corrección de la dispersión de la luz: El método de corrección de dispersión multiplicativa (MSC por sus siglas en inglés) calcula un coeficiente que permite remover los efectos aditivos y multiplicativos de la dispersión de la luz. Para esto, utiliza el espectro promedio de un conjunto de datos como referencia para futuras correcciones de espectros obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales y asume que dichos efectos no están relacionados con las características químicas de las muestras.

5.9 Corrección ortogonal de la señal: El método de corrección ortogonal de la señal (OSC por sus siglas en inglés) fue diseñado originalmente para corregir datos obtenidos por espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano. Remueve las variaciones de los datos espectrales que no estén relacionados a la propiedad de interés, lo que permite mejorar el desempeño de los modelos de calibración (Burns, 2008).

5.10 Derivadas: La aplicación de esta técnica corrige la línea base y permite resolver el problema del traslape de las bandas en los espectros NIR al obtener información que aparenta estar oculta. Sin embargo, puede incrementar el ruido y remover datos que podrían ser útiles (Li Vigni, Durante y Cocchi, 2013). Las derivadas pueden ser de primer, segundo, tercer y cuarto orden, siendo las primeras dos las más populares.

5.11 Detrending: Es un pretratamiento que consiste en remover las tendencias no lineales del espectro (Li Vigni, 2013). Corrige el desplazamiento de la línea base, así como su curvatura. Usualmente, se aplica junto con el preprocesamiento Variación Normal Estándar (SNV por sus siglas en inglés).

5.12 Error Estándar de Predicción (SEP): Es una medida de la precisión con la que un modelo de calibración NIRS predice el valor de un parámetro (como proteína, humedad o grasa) en un conjunto de muestras que no fueron utilizadas durante la fase de creación o entrenamiento del modelo (el set de validación externa).

5.13 Instrumento NIR: Aparato que, cuando se utiliza en las condiciones definidas en este documento, predice los componentes, contenido y parámetros tecnológicos en piensos, cereales y cereales molidos a través de relaciones con absorciones en el rango del infrarrojo cercano.





5.14 Quimiometría: La quimiometría consiste en la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos para obtener información relevante de muestras a partir de sus datos químicos (Burns, 2008). La interpretación de los espectros NIR podría ser una tarea difícil debido a la naturaleza de las bandas, éstas tienden a ser débiles y anchas, además de que se superponen unas sobre otras y tienden a desplazarse por la influencia de los puentes de hidrógeno (Jha, 2010). Asimismo, dicho espectro es un conjunto de datos multivariante porque cada longitud de onda que lo conforma aporta una medición (Wang, 2007). Por ejemplo, un espectro que abarque el rango de los 1000 a 2500 nm puede proporcionar 1501 variables. La aplicación de los métodos de análisis multivariante permite relacionar una propiedad en particular con el espectro NIR al extraer la información útil e ignorar el ruido. De esta manera, acciones como clasificar las muestras alimenticias según su origen geográfico o determinar su contenido de proteínas, son posibles al desarrollar modelos de clasificación o de regresión respectivamente (Zou, 2015).

5.15 Lípidos: Biomoléculas cuya característica principal es la insolubilidad en el agua. Su función en los sistemas biológicos depende de su estructura química. Los derivados de ácidos grasos almacenan energía de muchos organismos en forma de grasas o aceites; los fosfolípidos y esteroides son componentes estructurales de la membrana celular. Otros compuestos lipídicos participan como cofactores enzimáticos, pigmentos, hormonas y mensajeros intracelulares, por mencionar algunos (Nelson, 2005). En los espectros NIR las longitudes de onda relacionadas con los lípidos son varias y dependen del tipo de muestra a analizar y de la molécula objeto de estudio. Se les asocia las vibraciones de enlaces manifestados en los 1410, 2070, 2140, 2310 y 2380 nm (Burns, 2008).

5.16 Modelo para análisis cuantitativos (regresión y predicción): La espectroscopía NIR es una técnica analítica secundaria que, para poder medir una propiedad química de una muestra, requiere establecer una relación entre el espectro y el valor de dicha propiedad. A este último se le conoce como valor de referencia y debe ser determinado previamente por un método analítico independiente (Manley, 2014). De esta manera, se puede predecir en un alimento su contenido de proteínas, agua, lípidos, carbohidratos y otros constituyentes, utilizando modelos de regresión multivariantes.

Los métodos comúnmente empleados son la regresión de componentes principales (PCR, por sus siglas en inglés), la de mínimos cuadrados parciales (PLS, por sus siglas en inglés) y la regresión múltiple lineal (MLR, por sus siglas en inglés). Los tres métodos tienen en común que utilizan técnicas de mínimos cuadrados para construir modelos lineales relacionando la matriz de los datos espectrales (X) con la matriz de la propiedad a analizar (Y), estimando así el coeficiente de regresión (Zou, 2015).

Para PCR y PLS, el desarrollo de los modelos de calibración se basa en el principio de que sólo unos cuantos componentes lineales del conjunto de datos pueden emplearse en la ecuación de regresión. En PCR se denominan componentes principales (PCs) y en PLS factores (Manley, 2014). La habilidad de predicción de ambas técnicas es similar, incluso cuando para el cálculo de la ecuación de regresión con PLS se utilicen menos factores (Zou, 2015).





MLR se emplea cuando el espectro contiene pocas variables. Comienza con la longitud de onda que presente mayor correlación lineal y posteriormente, elige las siguientes que aumente el coeficiente de determinación (R^2) y reduzca el error de predicción. El proceso se detiene cuando al agregar otra longitud de onda el valor de R^2 disminuye y el error aumenta (Zou, 2015).

5.17 Método primario o método normalizado: Un método normalizado (o estandarizado) es un procedimiento de análisis validado, documentado y reconocido internacionalmente o por organismos oficiales (como ISO, ASTM, AOAC), que garantiza la fiabilidad, trazabilidad y reproducibilidad de los resultados entre diferentes laboratorios. Estos métodos aseguran alta exactitud y precisión.

Existen métodos oficiales internacionales basados en el uso de NIRS para cuantificar nutrientes en alimentos, en su mayoría productos agrícolas (ver tabla 1); Sin embargo, México carece de normas sobre este campo.

Método	Tipo de Método	Analito	Matriz
AOAC 967.19	Cuantitativo	Agua	Vegetales deshidratados
AOAC 997.06	Cuantitativo	Proteína cruda	Granos/trigo
AOAC 991.01	Cuantitativo	Humedad	Forraje
AOAC 989.03	Cuantitativo	Fibra y proteína cruda	Forraje
AOAC 2007.04	Cuantitativo	Grasa, humedad y proteína	Carnes (res, puerco y pollo)

Tabla 1 Fuente: AOAC

5.18 NIRS: La tecnología de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS por sus siglas en inglés- Near Infrared Spectroscopy) aparece con fuerza en el escenario como una herramienta de análisis novedosa, eficaz y fundamentalmente rápida, para determinar los principales parámetros que caracterizan a una biomasa. Las propiedades que ofrece esta tecnología encajan perfectamente en grandes instalaciones energéticas, puesto que reducirían de forma muy significativa los costes asociados al control de calidad de la evaluación proximal de alimentos para animales, cereales y productos de cereales molidos.

Esta técnica analítica de espectroscopía molecular es capaz de detectar en su rango espectral de infrarrojo cercano (entre las longitudes de onda de 13,000–4,000 cm^{-1}), las vibraciones de los enlaces covalentes de átomos ligeros en las uniones C-H, O-H y N-H fundamentalmente, así como las interacciones moleculares entre diferentes sustancias. Dado que el alimento para animales se compone principalmente de carbono, oxígeno e hidrógeno, entre otros, puede concebirse el desarrollo de un procedimiento analítico para el análisis proximal basado en la espectroscopía, puesto que la propia estructura del alimento para animales, favorece la detección del contenido porcentual.





Los usos más importantes de la radiación en el infrarrojo cercano son los relacionados con la determinación cuantitativa de especies, como agua, proteínas, hidrocarburos de bajo peso molecular y grasas en productos agrícolas, alimentos, petróleo y de la industria química. Se utilizan tanto las medidas de reflexión difusa como las de transmisión, aunque la reflectancia difusa es la más utilizada.

Las bandas de los espectros en el infrarrojo cercano son casi siempre anchas y están traslapadas. Rara vez hay bandas espectrales limpias que faciliten la simple correlación con la concentración del analito, por lo que se requiere aplicar técnicas de calibración de varias variables. Por lo general se usan los mínimos cuadrados parciales, regresión lineal múltiple regresión de los componentes principales y redes neurales artificiales.

Los fabricantes de instrumentos para el infrarrojo cercano proporcionan programas de computación para crear modelos de calibración.

5.19 Número de constituyentes: Cantidad de parámetros químicos o físicos distintos que estás intentando cuantificar o identificar simultáneamente en una muestra. A diferencia de los métodos analíticos tradicionales (como la cromatografía), donde a menudo se busca una sola sustancia a la vez, la tecnología NIRS destaca por su capacidad multicomponente.

Ejemplo: La propiedad analítica (proteína, almidón, cenizas, etc.).

5.20 Parámetro: Propiedad o funcionalidad de los piensos para animales, los cereales y los productos de cereales molidos que pueden ser determinado utilizando el método apropiado, estandarizado o validado.

Nota: es posible desarrollar y validar métodos NIR para otros parámetros y tipos de muestras además de los enumerados anteriormente, siempre y cuando se respete el procedimiento de este documento. Las unidades de medida de los parámetros determinados siguen las unidades utilizadas en los métodos de referencia.

Ejemplo: Digestibilidad

5.21 Pretratamientos matemáticos: Los pretratamientos o pre procesamientos matemáticos preparan los datos espectrales para el desarrollo de modelos cualitativos y cuantitativos. Remueven señales indeseables como el ruido y los desplazamientos de la línea base, corrigen los efectos de la dispersión de la luz y los datos son linealizados (Wang, 2007).

Existe una gran variedad de estas técnicas que puede resultar complicado elegir de entre todas la más apropiada. Su selección dependerá del tipo de muestra a analizar y la propiedad a evaluar. Por tanto, para la presente investigación se aplicaron los pretratamientos espectrales más populares y otros representativos, la mayoría disponibles en el software del espectrofotómetro.





5.22 Principio de medición: Los datos espectrales en la región del infrarrojo cercano se recopilan y transforman en constituyentes o concentraciones de parámetros mediante modelos de calibración desarrollados sobre muestras representativas de los productos en cuestión.

5.23 Proteína: Son las macromoléculas más abundantes y diversas presentes en todos los seres vivos, además de tener un papel central en muchos procesos biológicos. Se encuentran principalmente en la leche, huevos, carnes, cereales, legumbres y semillas oleaginosas. Debido a la estructura compleja de las proteínas se presentan diversas bandas de absorción en los espectros NIR. Entre las longitudes de onda más importantes para su medición directa se encuentra la región de los 2050 a 2060 nm en donde se manifiesta un estiramiento del grupo carbonil de la amida primaria; la región entre los 2168 a 2180 nm, 1640 a 1680 nm por los grupos aromáticos y finalmente, de los 1500 a 1530 nm (Burns, 2008).

5.24 Set de calibración: Grupo de muestras que utilizas para "enseñarle" al equipo la relación matemática entre la luz que absorbe un producto y su composición química real.

5.25 Set de validación externa: Conjunto de muestras completamente independiente del grupo utilizado para construir el modelo de calibración.

5.26 Set de referencia: Conjunto de muestras analizadas con un método primario (ejemplo: química húmeda), por un laboratorio autorizados en el alcance de la prueba.

6. PROCEDIMIENTO

El presente capítulo contiene la descripción del proceso seguido para desarrollar modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) que permitieron clasificar a las muestras según una categoría, como tipo de matriz, concentración o formulación.

Comienza con la descripción de la selección y preparación de las muestras a analizar, seguido de las especificaciones técnicas para la obtención de los espectros FT-NIR, continuando con una guía para la interpretación visual de los espectros recabados, así como una exploración de datos con el análisis del componente principal (PCA).

Posteriormente, se detallan los parámetros empleados para el cómputo de los modelos, tanto para la clasificación como para la cuantificación, estableciendo los indicadores que determinarán si el modelo es eficiente y el procedimiento a seguir si hay indicios de que no lo sea, finalizando con unos diagramas de flujo que resumen la metodología empleada.

El **Anexo 1** es una guía sugerida para abordar la validación de métodos NIRS aplicables para la evaluación proximal de alimentos para animales, cereales y productos de cereales molidos.

6.1 Colección de una población diversa de muestras





La validación de un método por Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS) es un proceso fascinante pero exigente. A diferencia de los métodos químicos tradicionales, el NIRS no "mide" el analito directamente, sino que aprende a reconocer patrones químicos a través de modelos matemáticos.

Para que tu validación sea exitosa, las muestras deben cumplir con cuatro pilares fundamentales:

- A) Representatividad Genética y Geográfica:** Las muestras deben cubrir toda la variabilidad que el método encontrará en el futuro. Si solo usas muestras de un único proveedor o de una sola estación del año, el modelo fallará cuando cambien las condiciones. En el diagrama 1 se muestra las variables a considerar.

Variabilidad: Incluye diferentes orígenes, estados de madurez, variedades o lotes de producción. Cada espectro debe estar perfectamente vinculado a su dato de laboratorio.

Distribución: Asegúrate de tener muestras que representen tanto los valores promedio como los valores extremos (mínimos y máximos) y debe cubrir todo el rango esperado (ej. de 5% a 25% de proteína).

- B) Preparación de la Muestra (Consistencia):** El NIRS es extremadamente sensible a la física de la muestra. La forma en que presentas la muestra al equipo debe ser reproducible.

Granulometría: Si la muestra es sólida, el tamaño de partícula debe ser uniforme (molienda constante), homogéneo sin grumos o bolsas de aire.

Humedad: El agua tiene una señal muy fuerte en el infrarrojo. Debes controlar si las muestras se miden tal cual o secas.

Temperatura: Las variaciones de temperatura pueden desplazar las bandas de absorción. Lo ideal es medir a temperatura ambiente controlada.

- C) El "Gold Standard" (Referencia):** La calidad de tu validación NIRS nunca será mejor que la calidad de tu método de referencia (química húmeda, HPLC, etc.).

Precisión: Cada muestra del set de validación debe haber sido analizada por el método oficial con la mayor exactitud posible.

Sincronización: El análisis químico debe hacerse lo más cerca posible en el tiempo a la lectura del espectro para evitar degradación.

- D) Cantidad de Muestras:** Aunque no hay un número mágico, para una validación externa robusta se recomienda un número de muestras suficientes para lograr el propósito previsto.





Para dar una cifra más precisa y técnica, es necesario que consideremos la complejidad de la matriz. No es lo mismo validar un método para medir humedad en harina de trigo (una matriz muy estable) que para medir principios activos en un proceso de fermentación o parámetros en suelos.

Se puede tomar como referencia los estándares internacionales (como la ISO 12012 o la ASTM E1655). A continuación, se sugiere cómo deberías estructurar tu lote de muestras:

6.1.1 Estimación del número de muestras

Para una validación que sea aceptada en una auditoría de calidad o ante un ente regulador, podrías seguir este esquema:

A) Set de Calibración (Construcción del modelo):

Matrices simples: 50 - 80 muestras.

Matrices complejas (productos naturales, mezclas variables): 100 - 200 muestras.

B) Set de Validación Externa (muestras que el modelo "nunca haya visto"):

Se recomienda que sea un 20% a 25% del tamaño del set de calibración.

Como mínimo absoluto, 21 muestras independientes que cubran todo el rango de concentración.

Para mayor referencia consulte el diagrama 2.

6.1.2 Factores que afectan el número de muestras

A) Número de constituyentes: Si quieres medir Proteína, Grasa y Fibra al mismo tiempo, necesitarás más muestras para asegurar que el modelo pueda distinguir las señales de cada una sin interferencias.

B) Rango de medición: Si tu rango es muy amplio (por ejemplo, de 0% a 80%), necesitas más puntos para que la regresión sea lineal y estable.

C) Precisión requerida: Si buscas una validación para control de calidad crítico (farmacéutico), el número de muestras suele aumentar para reducir el error de predicción o Standard Error of Prediction (SEP).

¿Cómo deben ser seleccionadas?:

- No elijas muestras al azar.
- Utiliza un criterio de variabilidad química
- Selecciona muestras que estén distribuidas uniformemente.
- Evita tener "huecos" en tu base de datos (por ejemplo, tener muchas muestras con 10% de grasa y ninguna con 15%).
- Si tienes muestras que son "outliers" (valores muy extraños), identifícalas antes de incluirlas, ya que pueden arruinar la precisión del modelo.

6.1.3 Selección de muestras





En la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS), la selección de muestras es quizás el paso más crítico. No se trata solo de elegir muestras al azar, sino de cubrir todo el espacio de variabilidad química y física que el modelo encontrará en el futuro.

Para esto, se suele construir una matriz de selección que asegura que el modelo de calibración sea robusto. A continuación, se explica cómo se estructura y qué criterios se utilizan habitualmente:

6.1.4 Criterios de inclusión en la matriz

Para que tu validación sea aceptada por normativas (como la ISO 12099), la matriz debe cumplir con:

Distribución Uniforme: No concentrar todas las muestras en el valor medio.

Independencia: Las muestras de validación no deben haber sido usadas en la calibración.

Error de Referencia: Los datos químicos (vía húmeda) deben ser de alta precisión, ya que el NIRS nunca será mejor que el método de referencia utilizado para entrenarlo.

Nota importante: Una matriz de selección pobre resultará en un modelo que parece perfecto en el papel pero que falla estrepitosamente cuando llega una muestra ligeramente distinta en la vida real.

6.1.5 Estrategia de Selección de Muestras

Para crear una matriz de validación robusta, te sugiero seguir este flujo de trabajo:

Muestreo por variabilidad (Espacio PCA): antes de elegir muestras, lo ideal es realizar un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre los espectros de toda tu población disponible.

Selección en la periferia: Elige muestras que se ubiquen en los extremos del gráfico de puntuaciones (scores). Esto asegura que el modelo sepa "leer" casos límite.

Selección central: Elige muestras representativas del promedio para dar estabilidad.

Definición de rangos y estratos: supongamos que vas a validar proteína en harina de trigo. Tu matriz debe asegurar representación en cada nivel. La tabla 2 muestra un ejemplo de definición de rangos y estratos.





Estrato	Rango de Referencia	Cantidad de Muestras (Ejemplo)
Bajo	8.0% - 10.5%	15 muestras
Medio	10.6% - 13.5%	21 muestras
Alto	13.6% - 16.0%	21 muestras

Tabla 2.

Inclusión de Variables de "Ruido": para que el método sea validado como robusto, la matriz debe incluir variaciones que ocurrirán en la rutina diaria del laboratorio:

- **Temperatura:** Muestras medidas a 15°C, 25°C y 35°C.
- **Humedad:** Variaciones naturales de la muestra.
- **Operadores:** Si el equipo requiere carga manual, incluye mediciones hechas por distintas personas.

6.1.6 Estrategia de selección de muestras de alimentos para animales, cereales y productos de cereales molidos

Para alimento animal, la matriz de selección es particularmente compleja debido a la heterogeneidad de los ingredientes (forrajes, cereales, harinas de origen animal, etc.). Aquí la variabilidad no solo es química, sino también estructural.

Para diseñar tu matriz de validación, considerar estas cuatro consideraciones importantes:

Clasificación por matriz de producto: No mezcles todos los tipos de alimento en una sola matriz si quieres alta precisión. Debes categorizar tu matriz de selección según el destino o la forma física:

- A) **Alimento balanceado (terminado):** Pellets (requieren molienda para NIRS), harinas o extrusados.
- B) **Materias primas:** Maíz, soja, salvados.
- C) **Forrajes/ensilados:** Tienen una variabilidad de humedad altísima que debe estar representada en la matriz.





Variables críticas en la matriz: En nutrición animal, los analitos suelen estar correlacionados. La matriz de selección debe cubrir los siguientes rangos de manera equilibrada. La tabla 3 muestra un ejemplo de variables críticas en la matriz.

Muestra	Tipo de alimento	Proteína (%)	Humedad (%)	Fibra (%)	grasa (%)	Observación
Alimento balanceado	Alimento para pollo	27.5	15.9	3.0	1.8	Formula 1
Alimento balanceado	Engordadora de cerdo	15.2	13.8	5.8	6.8	Fórmula 2
Alimento balanceado	Alimento concentrado	17.8	11.8	14.2	3.8	Fórmula 3
Materia prima	Harina de carne	60.5	1.1	2.4	0.8	Proveedor 1
Materia prima	Semilla de algodón	0.3	2.2	1.2	0.5	Proveedor 2
Forraje	Forraje de maíz	0.9	3.5	9.8	2.1	Proveedor 3

Tabla 3.

6.2.0 Preparación de la muestra y técnicas de muestreo

En el mundo de la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS), el muestreo no es solo un paso previo; es la base de la precisión. Si el muestreo falla, el modelo NIRS (y su validación) fallará.

Para validar un método NIRS, la técnica de muestreo es independiente pero representativo de la variabilidad real del producto.

A continuación, se presentan algunas técnicas y estrategias más utilizadas:

- **Muestreo incremental:** En lugar de una sola toma grande, se recolectan pequeñas porciones de diferentes puntos del lote para formar una muestra compuesta.
- **Reducción por cuarteo:** Para asegurar que la sub-muestra que llega al sensor sea idéntica al lote original.
- **Análisis multibanda o replicación:** Escanear la misma muestra varias veces (reempacando el portamuestras) para promediar el error de carga.





Nota: El procedimiento de selección de muestra y de las técnicas de muestreo deberán estar descritas en los procedimientos internos de cada laboratorio.

6.3.0 Almacenamiento de las muestras

La validación de un método de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) es un proceso delicado porque el equipo no solo mide la composición química, sino también el estado físico de la muestra. Cualquier cambio en el almacenamiento puede alterar la firma espectral y arruinar tu modelo de predicción.

A continuación, se presentan algunas alternativas de cómo debes manejar y almacenar las muestras para asegurar resultados robustos:

Mantener la integridad física y química: El principio fundamental es que la muestra debe estar en el mismo estado físico en el que será analizada habitualmente.

A) Evitar la pérdida de humedad: El agua tiene una señal fuertísima en NIRS. Si la muestra se seca durante el almacenamiento, el espectro cambiará drásticamente. Usa envases herméticos (frascos de vidrio con tapa de rosca o bolsas de alta densidad trilaminadas).

B) Control de temperatura: Si las muestras son biológicas o degradables, almacénalas en refrigeración ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) o congelación ($-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, deben volver a temperatura ambiente antes de ser escaneadas.

Estabilización Térmica (Regla de Oro): Nunca midas una muestra que acabas de sacar del refrigerador si el modelo de calibración se hizo a temperatura ambiente.

C) Variaciones de temperatura: Desplazan las bandas de absorción (especialmente las de los puentes de hidrógeno).

D) Recomendación: Deja que las muestras se equilibren en el laboratorio de análisis por al menos 2-4 horas antes de la lectura.

6.4.0 Homogeneidad y tamaño de partícula: Si el método requiere molienda (NIRS de reflectancia), el almacenamiento debe evitar que las partículas se estratifiquen por tamaño debido a la vibración. Si la muestra se ha "asentado", agítala suavemente antes de colocarla en la celda de lectura para asegurar que la superficie expuesta sea representativa. La tabla 4 muestra un resumen de condiciones según el tipo de muestra.





Tipo de muestra	Envase recomendado	Condiciones de almacenamiento	Observaciones críticas
Sólidos/Granos	Bolsas herméticas	Lugar fresco y seco	Evitar condensación al abrir el envase.
Polvos	Frascos de vidrio oscuro	Temperatura ambiente controlada	Sensibles a la higroscopia (absorción de humedad).
Líquidos	Viales de vidrio sellados	Refrigeración ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)	Cuidado con la formación de burbujas al agitar.
Pastos/Forrajes	Bolsas de vacío	Congelación ($-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)	La molienda debe ser uniforme tras el secado.
Tabla 4.			

7.0 CALIFICACIÓN DEL INSTRUMENTO NIRS

La calificación de un equipo de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS), es un proceso crítico en industrias reguladas (como la farmacéutica o alimentaria) para asegurar que los datos analíticos sean confiables.

A diferencia de un espectrofotómetro UV-Vis simple, el NIRS requiere retos específicos debido a su dependencia de modelos quimiométricos y su sensibilidad ambiental.

Los parámetros clave que se deben "retar" o verificar durante las etapas de Calificación de la Operación (OQ) y Calificación del Desempeño (PQ).

7.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ÓPTICO (OQ)

Estos retos aseguran que el hardware funciona según las especificaciones del fabricante.

- **Exactitud de la longitud de onda:** Se utilizan estándares de referencia (como el Óxido de Holmio o materiales poliméricos certificados) para verificar que los picos aparezcan donde deben.
- **Repetibilidad de la longitud de onda:** Capacidad del equipo para encontrar el mismo pico en múltiples escaneos sucesivos.
- **Nivel de ruido fotométrico:** Se mide la relación señal-ruido. Un ruido alto puede enmascarar señales de analitos en bajas concentraciones.





- **Linealidad fotométrica:** Retar al equipo con estándares de diferentes niveles de reflectancia o absorbancia para asegurar una respuesta proporcional.

7.2 PARÁMETROS DE ESTABILIDAD Y AMBIENTE

El NIRS es muy sensible a factores externos que deben ser controlados o retados. Entre los factores externos a retar se encuentran:

- **Estabilidad Térmica:** Verificar que las variaciones de temperatura en el laboratorio no desplacen las lecturas (importante para láseres y detectores).
- **Luz Ambiental (Stray Light):** Asegurar que el compartimento de la muestra esté sellado y que la luz externa no interfiera con el detector.
- **Humedad:** Dado que el agua tiene una señal fuertísima en el infrarrojo cercano, se debe retar la purga del equipo o la hermeticidad si el ambiente es húmedo.

7.3 RETOS DE LA MUESTRA Y EL ACCESORIO (PQ)

En la Calificación del Desempeño, se reta cómo el equipo interactúa con el producto real:

- **Presentación de muestra:** Evaluar si el giro de la muestra o el re-empaquetado afecta la repetibilidad.
- **Tamaño de partícula:** El NIRS es sensible a la morfología física; se debe retar el modelo con variaciones normales del proceso.
- **Robustez del modelo:** Introducir muestras con pequeñas variaciones de humedad o temperatura para ver si la predicción sigue siendo exacta.

7.4 INTEGRIDAD DE DATOS y SOFTWARE:

En la Calificación del Desempeño, se reta cómo los siguientes puntos:

- **Seguridad de acceso:** Retar los niveles de usuario y contraseñas.
- **Audit Trail:** Verificar que cada cambio o medición quede registrado de forma inalterable (cumplimiento de 21 CFR Parte 11).





- **Algoritmos de transferencia:** Si se usan modelos creados en otro equipo, se debe retar la capacidad de transferencia entre instrumentos.

Nota: La USP <1119> y la EP 2.2.40 son las guías de referencia principales que dictan estos estándares de calibración para equipos NIR. Se requieren materiales con trazabilidad metrológica (NIST o equivalentes).

7.5 CALIBRACIÓN DE EQUIPOS NIRS

A continuación, se indican los estándares más utilizados y qué es exactamente lo que retan:

1. Estándares para la escala de longitud de onda: El objetivo es asegurar que el "eje X" de tu espectro sea exacto.

- **Óxido de Holmio (Ho_2O_3):** Es el estándar de oro para el rango NIR. Proporciona picos muy finos y definidos en posiciones específicas.
- **Óxido de Disprosio (Dy_2O_3):** Se usa a menudo en combinación con el Holmio para cubrir más puntos de referencia en el espectro.
- **Materiales poliméricos (NIST SRM 2036):** Son discos de materiales sintéticos (como mezclas de tierras raras en una matriz de polímero) que son más estables físicamente que los polvos.

2. Estándares para la escala fotométrica (Reflectancia/Absorbancia): Se reta la linealidad y el ruido, es decir, el "eje Y".

- **Estándares de reflectancia de espectralón (Spectralon):** Son juegos de "pastillas" con diferentes niveles de gris/blanco (por ejemplo: 99%, 50%, 25%, 12% y 2% de reflectancia).

El reto: El equipo debe ser capaz de distinguir proporcionalmente la diferencia entre el blanco absoluto y el negro, manteniendo una línea base estable.

- **Carbonato de Litio:** A veces se usa para verificar la sensibilidad en regiones específicas de absorción débil.

7.5.1 CONSIDERACIONES CRÍTICAS PARA LA COMPRA

Al adquirir estos kits de calibración, debes verificar tres cosas:





- **Certificado de trazabilidad:** Debe mencionar explícitamente que es trazable al NIST (National Institute of Standards and Technology) o al NRC (National Research Council).
- **Recertificación:** Estos estándares no son eternos. La mayoría requiere ser enviada al fabricante cada 1 o 2 años para verificar que la reflectancia no ha cambiado por degradación o suciedad.
- **Presentación Física:** Asegúrate de que el estándar sea compatible con tu accesorio. Si usas una esfera de integración, necesitas discos; si usas una sonda de inmersión, necesitas estándares líquidos o sólidos diseñados para contacto directo.

Utilizando el instrumento NIRS utilizado de rutina en el laboratorio, el cual debe estar equipado con el accesorio de reflectancia (NIRA) y detector INGAAS, así como el software de adquisición de datos se especifican las condiciones de obtención de los espectros NIR de las muestras seleccionadas para la validación.

Los parámetros fueron los siguientes: supresión de bandas de CO₂/H₂O, velocidad de escaneo de 1 cm/s, fondo (background) como corrección de fase y apodización fuerte. Las unidades de la abscisa se establecieron en número de onda y las de ordenadas en log (1/R). La resolución fue de 4 cm⁻¹ y las acumulaciones en 32 escaneos en el rango de 10,000 a 4,000 cm⁻¹ para dar un total de 6001 puntos de datos.

7.6.0 PROCEDIMIENTO PARA LA CREACIÓN DEL MODELO

IMPORTANTE: Para la creación del modelo consulte la norma ISO 12099:2017- ALIMENTOS PARA ANIMALES, CEREALES Y PRODUCTOS DE CEREALES MOLIDOS — GUÍA PARA LA APLICACIÓN DE INFRARROJO CERCANO ESPECTROMETRÍA.

7.6.1 Obtención de espectros (Lecturas en equipo NIRS)

Se escanean las muestras para obtener su "huella digital" óptica. Generalmente, se mide la Absorbancia (A), que se relaciona con la Reflectancia (R) mediante la fórmula:

$$A = \log\left(\frac{1}{R}\right)$$

Crear un modelo de Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS) es, en esencia, un proceso de traducción: le enseñamos a la computadora a convertir "picos y valles" de luz en valores químicos o físicos concretos.

Aquí tienes la hoja de ruta técnica para construir un modelo robusto:



2026
año de
Margarita
Maza



7.6.2 Pre-procesamiento de datos (Limpieza)

Los espectros crudos suelen tener "ruido" o desplazamientos debidos a la textura de la muestra. Se aplican filtros matemáticos para resaltar la información química:

- **Derivativas (Savitzky-Golay):** Eliminan desplazamientos de línea base y separan picos superpuestos.
- **SNV (Standard Normal Variate):** Corrige variaciones por el tamaño de partícula o la dispersión de luz.
- **MSC (Multiplicative Scatter Correction):** Similar al SNV, ajusta los espectros a un espectro ideal promedio.

7.6.3 DESARROLLO DE LA CALIBRACIÓN (QUIMIOMETRÍA)

Se busca la correlación entre los espectros y los datos químicos. El método más utilizado es el **PLS (Partial Least Squares)** o Mínimos Cuadrados Parciales.

- **Calibración:** El software crea una ecuación matemática que vincula las longitudes de onda con la concentración del parámetro de interés.
- **Selección de factores:** Debes elegir el número óptimo de "Latent Variables" para evitar el **overfitting** (cuando el modelo memoriza el ruido en lugar de aprender la química).

7.6.4 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

Para saber si tu modelo es bueno, fíjate en estos indicadores:

- **R² (Coeficiente de determinación):** Qué tan cerca están los puntos de la línea de regresión (ideal cercano a 1).
- **RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction):** El error promedio esperado en unidades reales (ej. +/- 0.5% de proteína).
- **RPD:** Relación entre la desviación estándar y el error; un RPD > 3 suele considerarse bueno para control de calidad.





7.7 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Un modelo no es válido hasta que demuestra que puede predecir muestras que "no conoce".

Validar un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos establecidos que determinan, a su vez, los criterios de calidad del método a utilizar. Los **criterios de calidad** pueden ser de tipo estadístico (exactitud y precisión en primera instancia y selectividad, sensibilidad, límites de método y robustez en segundo lugar) o de tipo económico/operativo (comprensión del método, manejo de la instrumentación, rapidez del análisis, coste y mantenimiento).

Los principios comunes de la validación en análisis multivariable son:

- **Validación interna (Validación cruzada):** El sistema usa subgrupos de las mismas muestras de calibración que se deja de lado en la construcción del modelo, es decir, el modelo, se desarrolla con las muestras restantes. Las muestras que no se introdujeron en la construcción son usadas en la comprobación de la calidad del modelo.

Este proceso se repite n veces de manera iterativa hasta que todas las muestras son usadas para la construcción y validación del modelo.
- **Validación externa:** Se usan muestras totalmente nuevas y se comparan los resultados NIRS contra los resultados realizados por un laboratorio autorizado en el alcance en las pruebas y matrices a validar.
- **Análisis de referencia (El "Gold Standard"):** Para que el modelo aprenda, necesitas la verdad. Debes analizar las mismas muestras mediante métodos químicos tradicionales (química húmeda, HPLC, Kjeldahl, etc.).

Nota crítica: El modelo NIRS nunca será más preciso que el método de referencia que uses para calibrarlo.

7.7.1 METODOLOGÍA DE VALIDACIÓN

Descripción de la creación del modelo de identificación

1. **Registrar los espectros NIR:** Usar un conjunto de muestras de identidad conocida.
2. **Elección de los espectros:** Para cada componente o sustancia del producto farmacéutico, los espectros escogidos que conformen el conjunto de calibración deben representar toda la variabilidad química y física del sistema.
3. **Construcción de la biblioteca:** Se deben escoger los parámetros de construcción de la biblioteca, tales como el pre-tratamiento espectral (SNV, derivadas...), el rango de longitudes de onda y el umbral. Luego debe escogerse un método de reconocimiento de pautas (coeficiente de correlación, análisis de Clusters, PCA, etc.)





El siguiente paso es una validación interna de la biblioteca, con tal de comprobar que no hay espectros mal identificados o que llevan a errores de identificación o ambigüedades. Basándose en los resultados de la validación interna, se pueden modificar los parámetros usados en la construcción de la misma a fin de obtener la que discrimine todas las sustancias con el grado de especificidad deseado.

4. **Construcción de subbibliotecas:** Cada subbiblioteca debe incluir todas aquellas sustancias que sean similares debido a la semejanza de sus espectros. Los pasos necesarios para construir una subbiblioteca son los mismos que los descritos para construir una biblioteca y llevar a término los cálculos, variando los parámetros, a fin de que todos los componentes puedan ser inequívocamente identificados.
5. **Validación externa:** El conjunto de toda la biblioteca (la principal y las subbibliotecas) debe ser externamente validada con muestras no incluidas en el conjunto de calibración que proporcionen resultados de identificación sin ambigüedades.

7.8.0. DESCRIPCIÓN DE LA CREACIÓN DEL MODELO DE CUANTIFICACIÓN

Diseño de un conjunto de calibración:

Construir un conjunto de calibración adecuado requiere:

- a) Disponer de muestras con un rango suficientemente amplio de concentraciones con el fin de asegurar la capacidad predictiva del proceso
- b) Contemplar toda la variabilidad del proceso, la química y la física.

Para ello, en el laboratorio se preparan, por pesada, el número de muestras seleccionadas considerando lo indicado en el punto 6.1 y 6.2 de esta guía.

Registro de los espectros y aplicación del modelo quimiométrico de calibración:

Registra el espectro NIR de todas las muestras que conforman el conjunto de calibración. Los espectros deben registrarse con el mismo equipo que va a utilizarse en la predicción, después se procesan matemáticamente para evitar desplazamientos de la línea base o cambios en la pendiente y poder aumentar la relación señal/ruido. El procedimiento para seleccionar las muestras que forman los conjuntos de calibración y de validación se efectúa de modo que ambos subconjuntos contengan la variabilidad espectral y el rango de concentraciones antes indicado. Para seleccionar las muestras adecuadamente se realiza un análisis en componentes principales (PCA) de todo el conjunto de muestras. Los gráficos de scores muestran esa selección en función de la variabilidad.

Luego se aplica el algoritmo de regresión multivariable PLS y el rango espectral usado para la construcción de ese modelo PLS se selecciona basándose en las posiciones de las bandas de absorción del espectro de API puro, de esta manera se pueden excluir aquellas bandas del espectro NIR que son demasiado débiles o que únicamente





proporcionan ruido espectral. Se deben detectar y descartar out-liers y verificar que el modelo mejora su capacidad predictiva. Aunque no debe descartarse tomar muestras en situaciones “no conformes” (es decir fuera de control estadístico) porque eso puede alimentar el modelo con una variabilidad importante para ampliar el rango de calibrado.

Validación del modelo:

La validación del modelo es el estudio cuantitativo de los resultados de aplicar el modelo construido con los datos de calibración a nuevas muestras. La validación llevada a término no ha sido una cross-validation sino mediante un conjunto de prueba. Una vez definidos los conjuntos de calibración y de prueba, el rango o rangos de longitudes de onda, el pretratamiento matemático y cálculo PLS con un máximo número de componentes, el software quimiométrico proporciona los parámetros de calibración y validación a la vez, pudiendo decidir entonces la dimensionalidad del modelo y la detección de out-liers mediante gráficos RMSEP vs Núm. de PCs, R^2 vs Núm. de PCs, diferencia vs verdadero, predicción verdadera, score1 vs score 2, etc.

Dimensionalidad del modelo:

La dimensionalidad del modelo viene determinada por el número de factores o componentes principales PLS. Un valor muy pequeño resultará en un modelo sin información suficiente para predecir adecuadamente los valores (under-fitting). Un valor demasiado alto hará que el modelo tenga demasiada información particular de algunas muestras (ruido o detalles menores) y, por tanto, la predicción de muestras desconocidas será defectuosa (over-fitting).

El número óptimo de factores que se debe escoger es aquel que proporcione un menor RMSE (Root mean Square Error of Prediction):

Otros parámetros de predicción a tener en cuenta son:

Bias (sesgo): desviación promedio sistemática entre los datos verdaderos y los predichos. Se calcula promediando las desviaciones particulares de las muestras dentro del conjunto de datos y se pretende que sea lo más parecida a cero.

Residual Prediction Deviation (RPD): es el cociente entre la desviación estándar de los valores de referencia (SD) y SEPbias es el error promedio corregido con el bias de la predicción de la validación. Se busca un valor de RPD mayor de 5.

R^2 (coeficiente de correlación): proporciona el porcentaje de varianza presente en los valores de los componentes, después son reproducidos en la predicción. También es denominado varianza explicada. Cuanto más alto sea el coeficiente, mejor será la correlación entre los datos de concentración y los datos espectrales.





7.9.0 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Para validar un método de Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS) en alimentos para ganado, los criterios de aceptación no son leyes universales "fijas", sino que dependen de la variabilidad del parámetro analizado (por ejemplo, es más fácil predecir proteína que fibra).

Sin embargo, la industria y la academia suelen seguir las directrices de la **AOAC** y autores de referencia como **Williams y Norris**. Aquí tienes los valores estándar aceptados:

1. Sesgo (Bias)

El sesgo indica la exactitud sistemática (la diferencia entre el promedio de los valores NIRS y los valores de referencia).

Criterio de aceptación: No debe ser significativamente diferente de cero mediante una prueba *t* de Student.

Valor recomendado: Generalmente se busca que el sesgo sea menor al 10-20% del error estándar de la predicción (SEP). Si el sesgo es alto, el modelo necesita un ajuste de pendiente e intercepto.

Significancia del Sesgo: Usaremos una prueba *t* de Student para ver si ese bias es un error sistemático que debas corregir o si es despreciable. La fórmula que aplicaremos es:

Si $t > 1.96$ (para un 95% de confianza), el sesgo es significativo y requiere ajuste.

2. Coeficiente de correlación (r) o Coeficiente de determinación (R²)

Mide la fuerza de la relación lineal entre los valores de laboratorio y los del NIRS. La tabla 5 muestra criterios de aceptación del coeficiente de correlación (r) o coeficiente de determinación (R²).

Valor de R ²	Interpretación en alimentos para ganado
0.50 – 0.64	Discriminación pobre; solo para separar muestras en grupos (alto/bajo).
0.66 – 0.81	Calibración aceptable para tamizaje (screening).
0.82 – 0.90	Buena calibración para control de calidad e ingredientes.
0.91 – 0.98	Calibración excelente; apta para la mayoría de las aplicaciones.
> 0.99	Excelente, casi idéntico al método de referencia.
Tabla 5.	

3. RPD (Relación del Desvío de la Predicción)

Es el cociente entre la desviación estándar (SD) de las muestras de referencia y el error estándar de la predicción (SEP). Es el indicador más usado en nutrición animal. La tabla 6 muestra valores de RPD (Relación del Desvío de la Predicción).





Valor RPD= SEPSD	Interpretación en alimentos para Ganado
RPD < 2.0	No confiable.
RPD 2.0 – 2.4	Aceptable para tamizaje (screening) muy básico.
RPD 2.5 – 3.0	Bueno (Recomendado para análisis de rutina en forrajes y granos).
RPD 3.1 – 4.0	Muy bueno para control de calidad.
RPD > 4.1	Excelente; equivalente al método químico de referencia.
Tabla 6.	

8.0 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MODELO ANALÍTICO USANDO TECNOLOGÍA NIRS

En la validación de métodos por Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS) para alimentos balanceados y forrajes, los criterios no son tan rígidos como en la farmacopea química, ya que dependen de la variabilidad biológica de la muestra y del error del método de referencia (química húmeda).

A continuación, te presento una metodología, parámetros y criterios de aceptación comúnmente aceptados en la industria de nutrición animal, basados en guías internacionales como la ISO 12099:2017, la AOAC y las recomendaciones de Williams (2001).

8.1 OBJETIVO

Verificar el desempeño del método analítico basado en tecnología NIRS aplicables para la evaluación proximal de alimentos para animales, cereales y productos de cereales molidos.

8.2 ALCANCE

El protocolo debe tener como alcance la comprobación, mediante evidencia objetiva, que el método analítico para la determinación de los diferentes rangos de concentración, matrices, productos o materias primas analizadas es preciso, repetible, robusto y lineal bajo las condiciones y recursos de su laboratorio.

8.3 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

El equipo NIRS, así como los instrumentos críticos (balanzas, pipetas, etc.) utilizados la validación del método analítico deben estar, cuando aplique, calificados, calibrados o verificados antes del uso y bajo un programa de mantenimiento preventivo y correctivo vigente.





8.4 REACTIVOS, MATERIALES Y MATERIALES DE REFERENCIA CERTIFICADOS

Todo los reactivos y material usado en la validación, incluyendo las muestras, deben registrarse y tener la información disponible, así como cumplir con la trazabilidad metrológica. Materiales de Referencia Certificados pueden ser usados para retar la precisión de los métodos NIRS. A continuación, en la tabla 7 se muestra un listado de algunos materiales disponibles comercialmente.

Proveedor	Código	Descripción del material	Componentes certificados (Proximal)
NIST	SRM 3233	Alimento Fortificado para Perros	Proteína, grasa, cenizas, carbohidratos, humedad.
NIST	SRM 1549a	Leche en Polvo (Cereales de leche)	Proteína, grasa total, sólidos totales.
NIST	SRM 1547	Hojas de Durazno (usado para forrajes)	Nitrógeno (Proteína), cenizas y minerales.
NIST	SRM 1849b	Preparado Alimenticio Infantil	Proteína, grasa, cenizas, humedad.
BCR	BCR-115	Alimento para Animales (Soft Feed)	Principalmente para contaminantes, pero con valores de referencia proximal.
ERM	ERM-BB184	Carne de Bovino (Liofilizada)	Validación de proteína y grasa en piensos de origen animal.
ERM	ERM-BB186	Harina de Cerdo (Pig Kidney)	Análisis de nitrógeno y minerales.
BRC	BCR-187	Leche en Polvo Desnatada	Proteína y lactosa (energía).
BRC	BCR-115	Alimento para Animales (Soft Feed)	Principalmente para contaminantes, pero con valores de referencia proximal.
ERM	ERM-BB184	Carne de Bovino (Liofilizada)	Validación de proteína y grasa en piensos de origen animal.
ERM	ERM-BB186	Harina de Cerdo (Pig Kidney)	Análisis de nitrógeno y minerales.

Tabla 7.

Catálogo de LGC Standards y FAPAS (Reino Unido)

LGC es uno de los distribuidores más grandes y gestiona el programa FAPAS, que ofrece materiales de control de calidad para ensayos de aptitud que luego pueden adquirirse como materiales de referencia.

- **Pienso para rumiantes (Cattle Feed):** Disponibles para proteína cruda, fibra cruda, cenizas, grasa (extracto etéreo) y humedad.
- **Pienso para aves (Poultry Feed):** Matrices específicas para balanceados de engorde.





- **Harina de pescado:** Crítico para verificar niveles de nitrógeno y grasa en dietas acuícolas o suplementos

Materiales de origen vegetal (forrajes y granos)

Para el análisis de pastos, ensilados y granos, se suelen usar estos MRC específicos:

- **Harina de soya (NIST o LGC):** Para validar niveles altos de proteína y aminoácidos.
- **Harina de maíz:** Utilizada para el control de almidón y carbohidratos no estructurales.
- **Salvado de trigo:** Ideal para calibrar métodos de Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Ácido (FDA).

¿Cómo elegir el adecuado?

Al buscar estos materiales comercialmente (por ejemplo, en el buscador de Sigma-Aldrich o LGC Standards), te recomiendo filtrar por:

- **Similitud de matriz:** Si analizas ensilado, busca materiales vegetales; si analizas balanceado pelletizado, busca "Mixed Feed".
- **Rango analítico:** Asegúrate de que el valor certificado de proteína o fibra sea cercano al que esperas encontrar en tus muestras reales.
- **Trazabilidad:** Verifica que el certificado mencione la trazabilidad al SI (Sistema Internacional de Unidades)

8.5 SELECCIÓN DE MATRICES Y MUESTRAS

La selección de las matrices para realizar la validación de método analítico usando el equipo NIRS para la determinación de análisis proximales se basa considerando las características físicas, químicas y de composición proximal de las matrices más representativas analizadas en su laboratorio. En la validación, las muestras deben cumplir con lo establecido en las secciones 6.1 y 6.2.

La selección de matrices y muestras puede realizarse de la siguiente manera:

1.- A partir de datos históricos:

Se debe realizar un estudio estadístico de valores porcentuales históricos para el análisis NIRS analizados en su laboratorio en las matrices, productos o materias primas utilizando el equipo NIRS, con la finalidad de seleccionar e identificar las matrices más representativas para establecer el proceso de validación, discriminando las que, por su incidencia, no es factible su inclusión la validación.





Derivado de este estudio de selección de matrices para la validación del método de NIRS en donde se compararán los resultados obtenidos del método analítico NIRS con un método Gold Standard o método estándar (por ejemplo, métodos OAC), del cual, se determinará un valor convencionalmente verdadero a partir de la tipificación de los lotes elaborados con las matrices seleccionadas.

En la tabla 8 nos indica la prueba correspondiente que se utilizara de cada matriz o material. Por ejemplo, del análisis de la harina de bovino, solo se tomarán los datos de proteína y ceniza; del análisis de la harina de sangre, se utilizarán los datos de las 4 pruebas; y de esta forma subsecuentemente. Estos datos serán utilizados para la elaboración de la validación. Asimismo, nos muestra dos valores de mediana para cada prueba, que corresponden a valores altos y bajos, los cuales fueron determinados en el análisis estadístico.

Los valores altos y bajos de cada prueba corresponden a dos matrices diferentes, es decir, los valores altos y bajos para proteína se determinaran a partir de la matriz de bovino (bajos) y de la matriz de sangre (altos), por lo que ya no se determinaran valores bajos y altos de proteína en otras matrices; para el caso de grasa tendremos lo mismo, dos valores, altos y bajos, que se determinaran a partir de la harina de sangre y alimento para ave, así que ya no se determinarán valores de grasa en otras matrices. Lo anterior aplica también para ceniza y humedad, todo ello, con fines de validación.

El arreglo anterior de matrices también nos permite determinar el valor convencionalmente verdadero de un lote homogéneo, para cada matriz seleccionada, de esta forma, nos permite disminuir costos de análisis para la determinación de cada valor a través de un laboratorio externo de referencia.

El valor convencionalmente verdadero de cada matriz se determinará por un método Golden estandarizado, realizado por un laboratorio externo con competencia analítica en las pruebas mencionadas. Cada uno de estos valores se utilizarán en la presente validación para determinar el sesgo de cada prueba y sus intervalos de confianza. Un ejemplo de la selección de los niveles de los valores proximales se muestra en la tabla 8.





Nota: Las matrices incluidas entre los intervalos del valor más bajo y el valor más alto quedaran justificadas con los resultados satisfactorios de la verificación.

Materiales	Proteína %	Grasa %	Cenizas %	Humedad %
Harina de bovino	Rango (38.988 - 59.272)	-----	Rango (21.206 - 45.550)	-----
Harina de sangre	Rango (65.280 - 106.211)	Rango (0.030 - 11.580)	Rango (1.000 - 14.780)	Rango (0.430 - 20.300)
Alimento para aves	-----	Rango (1.030 - 10.580)	-----	-----
Alimento para porcino	-----	-----	-----	Rango (1.328 - 6.476)

Tabla 8

2.- A partir de las muestras del set de pruebas utilizadas para la validación del modelo:

Para la determinación del análisis proximal en las matrices, productos o materias primas, las muestras deberán ser analizadas por un laboratorio autorizado en el método Gold Standard o método estándar de referencia normalizado (por ejemplo, métodos OAC), con el objetivo de establecer el valor de referencia convencionalmente verdadero.

A partir de los valores por duplicado reportados por el laboratorio autorizado se debe aplicar estadística descriptiva. Un ejemplo de cómo los resultados deben de registrarse se muestran en la tabla 9.

Matriz	Identificación	Estadística descriptiva					
		n	Media	Mediana	DST	CV	Incertidumbre
Harina de bovino							
Harina de sangre							
Alimento para aves							
Alimento para porcino							

Tabla 9





El valor convencionalmente verdadero para el establecimiento de un valor de referencia se estableció a partir de los resultados de la homogeneidad, una vez descartada la presencia de datos atípicos. Un ejemplo de cómo deben registrarse los valores convencionalmente verdaderos establecidos para la verificación del método AOAC se muestra en la tabla 10. Considere la norma NMX-CH-13528-IMNC-2007 para el análisis estadístico para la estimación de la homogeneidad y el valor asignado.

Matriz	Identificación	Estadística descriptiva		
		Valores atípicos	Homogeneidad	Valor de referencia
Harina de bovino				
Harina de sangre				
Alimento para aves				
Alimento para porcino				

Tabla 10.
Nota: Los lotes utilizados de cada matriz se deben documentar para fines de trazabilidad

8.6 CONDICIONES GENERALES DE EQUIPOS

Las condiciones generales de los equipos y/o instrumentos críticos que aplican para la validación debe contar con la información mínima de la tabla 11.

Equipo	Identificación	Condiciones de uso	Periodo da calibración o verificación	
			Fecha de calibración o verificación	Vigencia
Equipo NIRS				
Balanzas Analíticas				
Termohigrómetro				
Termómetro				
Horno de secado				
Mufla				

Tabla 11.





Nota 1: Los certificados de calibración correspondientes se deben anexar al protocolo de validación

Nota 2: Si las calibraciones son realizadas con patrones de referencia con incertidumbres declaradas se deben anexar al protocolo de validación.

8.7 PERFIL, COMPETENCIA Y HABILIDADES DEL PERSONAL QUE REALIZA LA VALIDACIÓN

Los analistas participantes deben quedar definidos en el protocolo y presentar evidencia de su capacitación o competencia técnica en el método analítico.

8.8 CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones de temperatura y humedad requeridas para los análisis deben quedar indicadas en el protocolo y registradas durante todo el proceso de validación. Los formatos de registro deben quedar incluidos en la documentación de la validación para su rastreabilidad.

9.0 PARÁMETROS DE FUNCIONAMIENTO Y METODOLOGÍA DE VALIDACIÓN

Los siguientes parámetros de validación sugeridos están basados considerando el fundamento de medición de los métodos NIRS y constituyen una guía enunciativa, mas no limitativa, para la obtención de evidencia objetiva para demostrar que el método NIRS es preciso, exacto, repetible y robusto.

9.1 LINEALIDAD

Determinar la linealidad en un método de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) es fundamental porque, aunque el equipo "lee" luz, lo que tú necesitas es una **medición cuantitativa precisa** de un analito (como proteína, grasa o humedad). El reto en NIRS, a diferencia del UV-Vis, el NIRS trabaja con reflectancia difusa y señales complejas (sobretonos). La linealidad demuestra que el tratamiento matemático (quimiometría) es capaz de transformar esas señales ópticas en datos de concentración proporcionales y reales.

En NIRS, la "matriz" (la estructura física de la muestra) influye mucho. Una buena linealidad indica que el método ha logrado separar la información química de las interferencias físicas (como el tamaño de partícula o la densidad).

Si intentas medir una muestra que está por encima o por debajo del rango lineal validado, el error de predicción (SEP) se dispara.





Importancia: Asegura que el modelo sea útil tanto para muestras con valores bajos como altos sin sesgos sistemáticos.

El anexo 2 muestra una propuesta para validar la linealidad del método NIRS.

9.2 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD DEL SISTEMA, REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD)

Realizar la validación de la **repetibilidad** en un método de Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS) es fundamental para asegurar que el equipo y el método son consistentes a corto plazo. Básicamente, buscamos saber si el sistema nos da el mismo resultado cuando nada debería haber cambiado.

La experimentación para la obtención de los datos a través de la evaluación de la repetibilidad.

9.2.1 Repetibilidad instrumental

En una validación de Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS), retar la repetibilidad del sistema no es solo un trámite burocrático; es la única forma de asegurar que el "ruido" de tu equipo no esté disfrazando los datos reales de la muestra.

Las razones fundamentales por las que este paso es importante es el siguiente:

- 1. Aislamiento del error instrumental:** La repetibilidad del sistema mide la capacidad del espectrómetro para obtener el mismo espectro al medir la misma muestra, en las mismas condiciones, en un periodo corto de tiempo.

Si el equipo varía por sí solo (debido a inestabilidad de la lámpara, detectores térmicamente inestables o ruido electrónico), la predicción química será errónea. Se requiere saber cuál es la desviación estándar instrumental mínima antes de confiar en los resultados cuantitativos.

- 2. Validación de la preparación de la muestra:** La técnica NIRS es extremadamente sensible a la superficie y la textura de la muestra. Al retar la repetibilidad (especialmente la que implica "re-empacar" la celda de lectura), evalúas si el método de carga de la muestra es consistente. Si al sacar y volver a meter la muestra el espectro cambia significativamente, tu error de predicción (SEP) se disparará, no por culpa del modelo, sino por una mala técnica de muestreo.

En términos estadísticos, retamos la repetibilidad del sistema para calcular el Coeficiente de Variación (CV). Si el CV de las lecturas repetidas supera los umbrales críticos, cualquier análisis posterior de proteína, humedad o grasa será, en el mejor de los casos, una estimación educada, y en el peor, un dato peligroso para el control de calidad.





El anexo 3 muestra una propuesta para validar la repetibilidad del sistema instrumental del método NIRS.

9.2.2 Repetibilidad

Realizar la validación de la **repetibilidad** en un método de Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS) es fundamental para asegurar que el equipo y el método son consistentes a corto plazo. Básicamente, buscamos saber si el sistema nos da el mismo resultado cuando nada debería haber cambiado.

La experimentación para la obtención de los datos a través de la evaluación de la repetibilidad se debe realizar bajo las mismas condiciones de trabajo, por el mismo analista y en tres ocasiones diferentes de valores porcentuales.

El anexo 4 muestra una propuesta para validar la repetibilidad del método NIRS.

9.2.3 Reproducibilidad

La experimentación para la obtención de los datos a través de la evaluación de la reproducibilidad se debe realizar bajo diferentes condiciones de trabajo, por diferentes analistas y en tres ocasiones diferentes.

El anexo 5 muestra una propuesta para validar la reproducibilidad del método NIRS.

9.3. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

Evaluar la incertidumbre en un método de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) es un paso crítico, ya que pasamos de una medición física (absorbancia) a una predicción química mediante modelos quimiométricos.

A diferencia de los métodos químicos tradicionales, en NIRS la incertidumbre no proviene solo del equipo, sino fundamentalmente del error de predicción y de la incertidumbre del método de referencia.

A continuación, se detalla cómo se estructura esta evaluación siguiendo el enfoque "Top-Down" (enfoque global) de las guías internacionales (como ISO o ICH):

En NIRS, lo más práctico es usar el enfoque global basado en los estadísticos de validación externa. La incertidumbre de medida (u) se suele estimar a partir del SEP (Error Estándar de la Predicción).

Componentes principales:

1.Exactitud del modelo (SEP): Es la desviación estándar de las diferencias entre los valores predichos por el NIRS y los valores del método de referencia. Para calcular el valor del SEP se utiliza la siguiente fórmula:



$$SEP = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\hat{y} - y - bias)^2}}{n - 1}$$

Donde:

Valor de referencia (y)

Valores predichos por el NIRS ($\hat{y}$)

n número de muestras en el conjunto de validación

$bias$ es el sesgo del método

2. Incertidumbre del método de referencia (u_{ref}): Para estimar la incertidumbre asociada a los resultados de las muestras analizadas por el laboratorio de referencia utilizar la siguiente fórmula:

$$u_{ref} = \sqrt{\frac{s}{n}}$$

Donde:

u_{ref} Es la Incertidumbre estándar del método de referencia

s Es la desviación estándar de los resultados obtenidos por el laboratorio de referencia de las réplicas de los tres niveles porcentuales.

n Es el número de muestras analizadas por el laboratorio de referencia.

Nota: El modelo NIRS nunca será más exacto que el método usado para calibrarlo (química húmeda).

3. Repetibilidad instrumental (u_{rep}): Para estimar la incertidumbre asociada a los resultados de las muestras analizadas por el método NIRS se toman los resultados de la prueba de repetibilidad utilizar la siguiente fórmula:

$$u_{rep} = \sqrt{\frac{s}{n}}$$

Donde:

u_{rep} Es la Incertidumbre estándar de la prueba de repetibilidad

s Es la desviación estándar de los resultados obtenidos por el método NIRS de las réplicas de los tres niveles porcentuales y los diferentes días.

n Es el número total de muestras analizadas en la prueba de repetibilidad (niveles * días).

Cálculo de la incertidumbre combinada:

Para obtener una estimación robusta, se utiliza la ley de propagación de errores. La incertidumbre estándar combinada (u_c) se puede expresar simplificada como:





$$v_c = \sqrt{SEP_{corr}^2 + v_{ref}^2 + v_{rep}^2}$$

Donde:

v_c : Incertidumbre estándar combinada

SEP_{corr}^2 : Es el error estándar de predicción corregido por el sesgo (bias).

v_{ref}^2 : Es la incertidumbre estándar del laboratorio de referencia.

v_{rep}^2 : Es la incertidumbre estándar de la repetibilidad

Incertidumbre expandida (U):

Siguiendo la ISO/IEC Guide 98-3 (GUM), que es la base de las normas ISO, la incertidumbre final que reportarás en tus certificados de análisis será:

$$U = k \cdot v_c$$

Nota: para reportar un intervalo de confianza (usualmente al 95%), aplicamos un factor de cobertura ($k=2$)

El anexo 6 muestra una propuesta para estimar la incertidumbre del método NIRS.

9.4. SESGO O BIAS

En el análisis por Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS), la evaluación del sesgo (o bias) es un paso fundamental de la validación externa. El sesgo representa la diferencia sistemática entre los valores predichos por el modelo NIRS y los valores reales obtenidos por el método de referencia (química húmeda).

Aquí te detallo cómo se calcula, se interpreta y se corrige:

Definición matemática

El sesgo es el promedio de las diferencias entre los valores de referencia (y) y los valores predichos ($\hat{y}$) para un conjunto de validación independiente de n muestras.

$$Bias = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y} - y)}{n}$$

Sesgo Positivo: El modelo tiende a sobreestimar el valor real.

Sesgo Negativo: El modelo tiende a subestimar el valor real.

Ideal: El valor debe ser lo más cercano a cero.

Procedimiento de evaluación

Para evaluar si un sesgo es significativo, se debe realizar una prueba t de Student para determinar si el sesgo es estadísticamente diferente de cero. Si el valor $p < 0.05$, el sesgo es significativo y el modelo necesita un ajuste.

Si detectas un sesgo elevado, suele deberse a factores externos al modelo original:

• **Cambio en la instrumentación:** Desgaste de la lámpara o cambio de detector.



2026
año de
Margarita
Maza



- **Diferencias en la preparación de muestra:** Cambios en la molienda, temperatura o humedad ambiental.
- **Deriva del método de referencia:** Errores sistemáticos en el laboratorio químico que no estaban presentes durante el desarrollo del modelo.

El anexo 7 muestra una propuesta para validar el sesgo del método NIRS.

10.0 MANTENIMIENTO O ACTUALIZACIÓN DEL MODELO

Mantener la vigencia y exactitud de un modelo de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) es un proceso dinámico conocido como **mantenimiento o actualización del modelo**. Una vez validado, el modelo no es estático, ya que factores como la variabilidad natural de las muestras, cambios en el instrumental o derivas ambientales pueden degradar su capacidad predictiva.

Para asegurar que el modelo siga siendo robusto, se deben seguir estos pasos fundamentales:

1. Monitoreo Continuo (Control estadístico)

No se puede mejorar lo que no se mide. Es vital implementar un sistema de alerta temprana:

- **Análisis de Outliers (Valores atípicos):** El software debe identificar muestras que se alejan del espacio espectral del modelo original (distancia de Mahalanobis o valores H). Si una muestra es un "outlier", la predicción no es confiable.
- **Gráficos de control:** Se deben registrar las diferencias entre los valores predichos por NIRS y los valores reales obtenidos por el método de referencia (química húmeda) a lo largo del tiempo.

2. Validación externa periódica

Incluso si el modelo parece funcionar bien, es necesario seleccionar un subconjunto de muestras (por ejemplo, el **5%** o **10%** de la rutina) para ser analizadas por el método de referencia.

- Se comparan los resultados mediante el **SEP** (*Standard Error of Prediction*) y el **Bias** (sesgo).
- Si el sesgo aumenta de forma constante, es señal de que el modelo necesita un ajuste.





3. Expansión de la matriz de calibración

La causa más común de falla es la aparición de variabilidad que no estaba presente en la calibración inicial (nuevas variedades de cultivo, diferentes orígenes geográficos o cambios estacionales).

- **Incorporación de nuevas muestras:** Las muestras identificadas como outliers o aquellas con errores de predicción altos deben analizarse por el método de referencia e **incorporarse al set de calibración original**.
- **Recalibración:** Se vuelve a entrenar el modelo (usando PLS u otros algoritmos) incluyendo estos nuevos datos para que el modelo "aprenda" la nueva variabilidad.

4. Transferencia de calibraciones (Estandarización)

Si cambias de equipo o incluso si cambias componentes críticos (como la lámpara del espectrómetro), el modelo puede fallar.

- Se utilizan algoritmos de estandarización (como *Piecewise Direct Standardization* o el uso de muestras "check") para ajustar el modelo al nuevo estado óptimo del hardware sin tener que empezar de cero.

5. Documentación y control de versiones

Es fundamental tratar el modelo NIRS como un activo de software:

- Llevar un registro de qué muestras se añadieron y por qué.
- Mantener versiones anteriores del modelo por si la nueva actualización introduce errores imprevistos.

Nota clave: El éxito a largo plazo del NIRS no depende de la complejidad del algoritmo inicial, sino de la disciplina en la **toma de muestras de referencia** para alimentar el modelo de forma constante.

11.0 DOCUMENTACIÓN

La documentación en la validación de métodos analíticos NIRS no es solo un trámite administrativo; es la **evidencia objetiva** de que un método es adecuado para su uso previsto y que los resultados generados son confiables. Sin una documentación robusta, el método no existe legal ni técnicamente ante organismos reguladores (como la COFEPRIS, SENASICA, FDA o EMA).





1. ¿Qué se debe documentar?

Un protocolo de validación debe ser una "hoja de ruta" que no deje lugar a dudas. Los elementos críticos incluyen:

- **Objetivo y Alcance:** Qué se va a medir, en qué matriz y bajo qué condiciones
- **Términos y definiciones:** Los aplicables en la validación
- **Descripción general del estudio:** Indicar los materiales, equipos e instrumentos, sustancias de referencia, reactivos y preparación de soluciones (si aplica) que se requieren en la validación
- **Procedimiento de validación:** En esta sección se definen la metodología y los pasos requeridos para realizar las pruebas y los retos, incluyendo las matrices y el número de muestras por cada parámetro
- **Parámetros de desempeño:** Los parámetros de validación a retar y los criterios de aceptación
- **Listado de anexos:** Toda la información a documentar.

2.- La documentación se divide generalmente en tres fases fundamentales:

A. El Protocolo de validación (El "Antes"):

Es el plan maestro. Debe estar aprobado y firmado antes de iniciar cualquier experimento en el laboratorio. Incluye la metodología estadística que se usará para evaluar los datos.

B. El Reporte de validación (El "Después"):

Es el resumen de lo ocurrido. Aquí se comparan los resultados obtenidos contra los criterios de aceptación establecidos en el protocolo.

- **Tabulación de datos:** Presentar los datos crudos de forma clara.
- **Análisis estadístico:** Cálculos de desviación estándar, error relativo y pruebas de hipótesis.
- **Conclusión:** Una declaración explícita de si el método se considera validado o no.

C. Los datos crudos (El soporte):

Son el corazón de la integridad de datos. Incluyen:

- Cromatogramas originales.
- Pesadas de balanza firmadas.
- Bitácoras de uso de equipos.
- Certificados de estándares de referencia.





3. Principios de documentación (ALCOA+)

Para que la información sea válida a nivel internacional, debe seguir los principios **ALCOA+**:

- **Atribuible:** Quién hizo la medición.
- **Legible:** Que se pueda leer y entender a largo plazo.
- **Contemporánea:** Documentada en el momento que ocurre.
- **Original:** No copias de hojas sueltas.
- **Exacta:** Sin errores de transcripción.

4. El Ciclo de vida del método

Recuerda que la documentación no termina con el reporte. Si el método sufre cambios (un nuevo equipo, cambio en la columna cromatográfica, etc.), se debe realizar una **re-validación** o transferencia de método, la cual también debe quedar documentada en el historial del método.

5. Hojas de cálculo o software comerciales

Si para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la validación se diseñan hojas de cálculo en Excel, estas deben estar validadas antes de su uso.

En el caso que utilices Software comerciales no se requiere de una validación solamente debes retar la concordancia de los cálculos.

12.0 BIBLIOGRAFÍA

- Eduardo H.L; Todos podemos validar-un enfoque amigable al mundo de las validaciones analíticas;
- D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman; Principios de análisis instrumental; Editorial Cenease Learning: Santa Fe, 2008.
- Williams, P. (2001). Implementation of Near-Infrared Technology. En: Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. (Establece las tablas originales de RPD).
- Fearn, T. (2002). Assessing predictions of NIR calibrations. NIR News. (Referencia clave para entender el sesgo y SEP).
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the NIR System.





-ISO 12099:2017: Animal feed, cereals and milled cereal products — Guidelines for the application of near infrared spectrometry. Es la norma base para la validación de parámetros de desempeño como exactitud, precisión y robustez en matrices agrícolas.

-AOAC International. Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Annex F. (Aunque es para suplementos, sus criterios de validación química se extrapolan a NIRS).

-USP <1119>: Near-Infrared Spectroscopy. La Farmacopea de los Estados Unidos detalla los requisitos de validación para la industria farmacéutica, incluyendo la calificación del instrumento y la validación del modelo.

-EMA (European Medicines Agency): Guideline on the use of Near Infrared Spectroscopy by the pharmaceutical industry. Una guía exhaustiva sobre el desarrollo, calibración y validación de métodos NIRS en entornos regulados.

-Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (2007). Handbook of Near-Infrared Analysis. CRC Press. Considerado la "biblia" del NIRS; dedica capítulos enteros a la transferencia de calibraciones y protocolos de validación.

-Pasquini, C. (2018). Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. Analytica Chimica Acta. Una revisión técnica excelente que aborda los criterios modernos de validación.

-Vandeginste, B. G., Massart, D. L., et al. (1998). Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Elsevier. Fundamental para entender la validación estadística de modelos multivariantes (como PLS o PCR).

-Esbensen, K. H., & Geladi, P. (2010). Principles of Proper Validation: use and abuse of re-sampling for validation. Journal of Chemometrics. Un artículo crítico sobre por qué la validación externa es superior a la validación cruzada.

-Fearn, T. (2001). Standard error of prediction or standard error of validation?. NIR News. Explica la terminología y las métricas de error esenciales.

-Zeaiter, M., Roger, J. M., & Bellon-Maurel, V. (2005). Robustness of models of near infrared spectroscopy. Trends in Analytical Chemistry. Se enfoca en cómo validar la estabilidad del método ante cambios en el entorno o la muestra.

-Statistical 2.5, programa estadístico de validación.





13.0 HISTÓRICO DEL DOCUMENTO

Elaborado	Aprobado	Autorizado
Q.I. Eduardo Hernández Lara Jefe de Metrología y Ensayos de Aptitud Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica. Email: eduardo.hernandezl@senasica.gob.mx Tel. 55 5905 1000 Ext 53104	Biol. Maria del Rosario Quezada Delgado Directora del Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica. Email: rosario.quezada@senasica.gob.mx Tel. 55 5905 1000 Ext 53135	Q.F.B. María Elena González Ruíz Directora de Regulación de Establecimientos, Productos y Órganos de Coadyuvancia. Email: elena.gonzalez@senasica.gob.mx Tel. 55 5905 1000 Ext 53222
Revisión: 1 Junio2026		
*** FIN DEL DOCUMENTO ***		



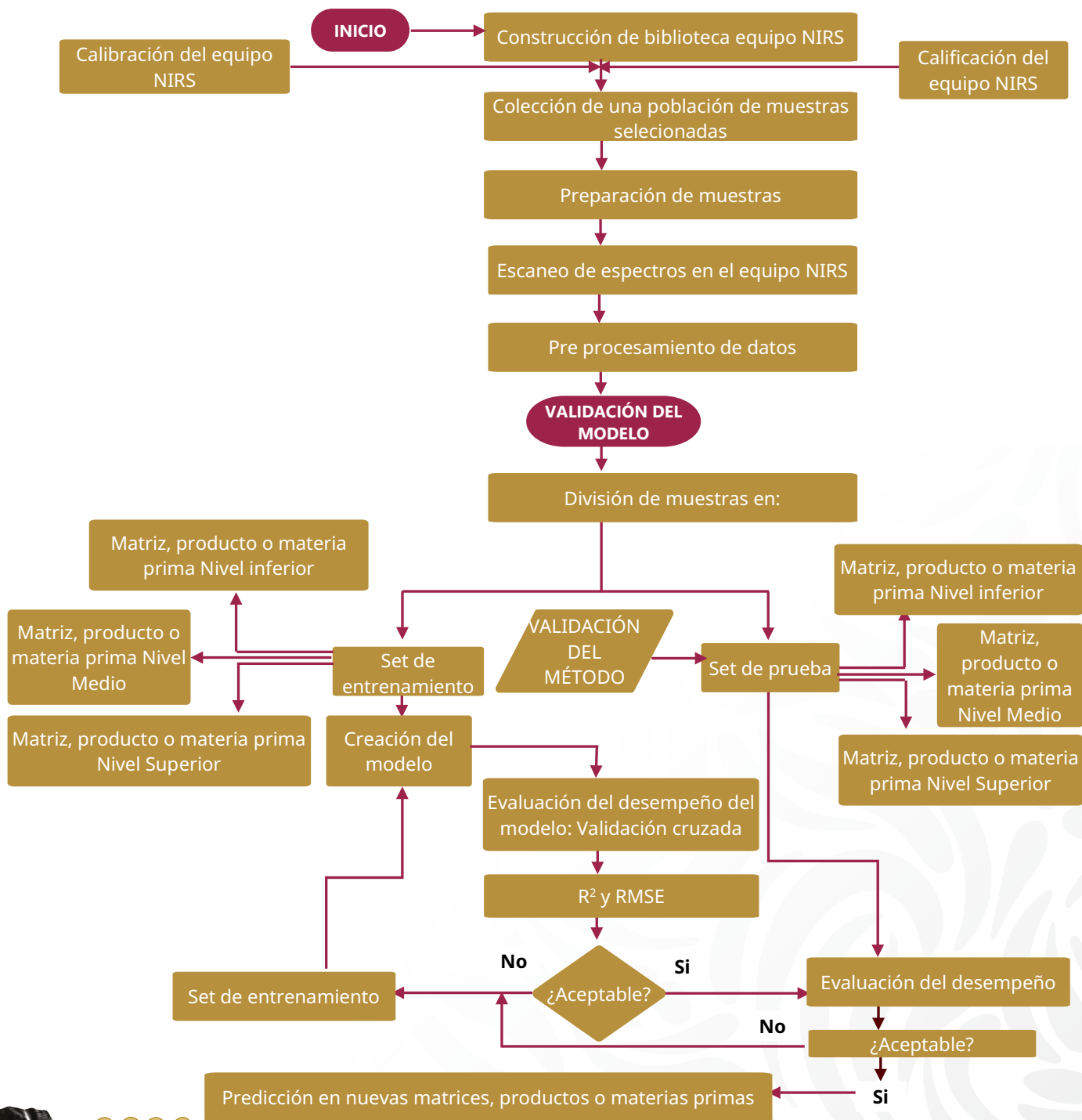


ANEXOS





ANEXO 1: PROCESO PARA LA VALIDACIÓN DEL MODELO EN TÉCNICAS NIRS





ANEXO 2. GUÍA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA LINEALIDAD EN TÉCNICAS NIRS

Parámetro	¿Que se evalúa?	Estrategia	Origen de las muestras	Estadístico
Linealidad	Se evalúa la capacidad del método para obtener resultados proporcionales a los niveles porcentuales para cada prueba (Proteína, grasa, ceniza, humedad).	Analizar, al menos 3 niveles porcentuales (bajo, medio y alto)	Set de pruebas y Set de referencia	Análisis de regresión. <i>SEP</i> y <i>SEL</i>

EJEMPLO ILUSTRATIVO

Número de muestras	Nivel	Matriz seleccionada	Identificación	Rango de valor porcentual
7	Bajo	Alimento para aves	Lote 1	7.23 % de Proteína
7	Medio	Alimento para cerdo	Lote 2	Entre 15.2 % de Proteína
7	Alto	Harina de carne	Lote 3	Entre 45 % de Proteína

Nota 1: Se recomienda que sea un 20% a 25% del tamaño del set de calibración.

Como mínimo absoluto, 21 muestras independientes que cubran todo el rango de concentración.

Ejemplo: 7 muestras del nivel bajo, 7 muestras para el nivel medio y 7 para el nivel alto.

Nota 2: Si utiliza un mayor número de niveles, distribuir equitativamente el número de muestras seleccionadas.

Nota 3: Las matrices incluidas entre los intervalos del valor más bajo y el valor más alto quedaran justificadas con los resultados satisfactorios de la verificación.

SET DE MUESTRAS UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Nivel Bajo							Nivel Medio							Nivel Alto						
SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7
SR1	SR2	SR3	SR4	SR5	SR6	SR7	SR1	SR2	SR3	SR4	SR5	SR6	SR7	SR1	SR2	SR3	SR4	SR5	SR6	SR7
Analista 1							Analista 1							Analista 1						
Día 1							Día 2							Día 3						

SP=Set de pruebas **SR**=Set de referencia

INTERPRETACIÓN

- 1.- Graficar los resultados de las muestras del set de pruebas obtenidos por el equipo NIRS contra los resultados del set de referencia analizadas con el método de referencia.
- 2.- Agregar línea de tendencia, ecuación del gráfico y el valor de R^2 .
- 3.- Comparar el valor de R^2 y el valor de la pendiente obtenida con el valor de referencia.
- 4.- Calcular el Error Estándar de la Predicción (*SEP*) y el Error Estándar del Laboratorio de Referencia (*SEL*)

Criterio de aceptación: El valor de R^2 obtenido no debe ser menor que el valor de referencia y el *SEP* debe ser menor que 1.4 veces el error estándar de laboratorio del método de referencia (*SEL*).





Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

VALORES DE REFERENCIA		
Valor	Correlación	Interpretación
$R^2 > 0.98$	Excelente	Los resultados del método NIRS correlacionan perfectamente con los resultados de referencia
$R^2 > 0.95 < 0.98$	Aceptable	Existe una correlación adecuada entre los resultados del método NIRS con los resultados de referencia
$R^2 > 0.90 < 0.95$	Suficiente	Se requiere mejorar el modelo. Realizar los ajustes necesarios y volver a realizar la prueba de linealidad
$R^2 > 0.66 < 0.90$	No aceptable	El método analítico no correlaciona con los resultados de referencia. El método solo puede aplicarse como Screening
Pendiente (m)	Debe estar lo más cerca posible a 1.0 (rango aceptable de 0.9 a 1.0).	El modelo correlaciona adecuadamente
$SEP < (1.4 * SEL)$	Aceptable	Existe una correlación adecuada entre los resultados del método NIRS con los resultados de referencia



2026
año de
Margarita Maza



ANEXO 3. GUÍA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA EN TÉCNICAS NIRS

Parámetro	¿Que se evalúa?	Estrategia	Origen de las muestras	Estadístico
Repetibilidad del sistema	Evalúa la variabilidad de 10 lecturas sucesivas de una muestra, básicamente buscamos saber si el sistema NIRS es repetible.	Analizar, al menos 2 niveles porcentuales (bajo y alto) por un analista.	Set de muestras de validación.	S_r , r , ANOVA,

EJEMPLO ILUSTRATIVO

n	Nivel	Matriz seleccionada	Identificación	Rango de valor porcentual
7	Bajo	Alimento para aves	Lote 1	1.23 % de Grasa
7	Alto	Harina de carne	Lote 3	Entre 5.5 % de Grasa

Nota 1: El tamaño de muestras se recomienda que sea un 20% a 25% del tamaño del set de calibración. Como mínimo absoluto, 21 muestras independientes que cubran todo el rango de los valores porcentuales. Ejemplo: 7 muestras del nivel bajo y 7 muestras para el nivel alto.

Nota 2: Realizar al menos 10 lecturas de una misma muestra de cada nivel de valor porcentual.

SET DE MUESTRAS UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Nivel Bajo										Nivel Alto									
SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV8	SV9	SV10	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV8	SV9	SV10
Analista 1 Día 1										Analista 1 Día 2									

SR=Set de validación

INTERPRETACIÓN

PARA LA PRUEBA DE REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

1.- Prueba de ANOVA: Tabule independientemente los resultados de las mediciones de las 10 muestras de cada nivel porcentual obtenidos por el equipo NIRS del set de muestras de validación. Realice una prueba de análisis de varianza de un factor a un 95% de intervalo de confianza y un valor de alfa de 0.05. Compare el valor de F crítico contra el valor de F calculada.

2.- Límite de repetibilidad: Tabular, por separado, los resultados de las mediciones de las 10 muestras de cada nivel porcentual obtenidos por el equipo NIRS del set de muestras de validación. Calcular las diferencias cuadráticas de las réplicas, la desviación estándar de las diferencias cuadráticas y el límite de repetibilidad.





Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

VALORES DE REFERENCIA		
Valor	Correlación	Interpretación
ANOVA de la repetibilidad	$F_{\text{crítico}}$ debe ser menor que $F_{\text{calculada}}$ El valor de la probabilidad p debe ser > 0.05	Existe una buena repetibilidad entre las mediciones repetidas de las muestras analizadas con el equipo NIRS.
Límite de la repetibilidad r	La diferencia cuadrática de las réplicas individuales no deben ser mayor que 2.8 veces el valor de la desviación estándar de las diferencias cuadráticas	Si es mayor, algo falló (homogeneidad de la muestra, limpieza de la ventana del NIRS o estabilidad de la lámpara). En 21 muestras no deben existir más de 2 datos que no cumplan este criterio.




ANEXO 4. GUÍA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA REPETIBILIDAD & REPRODUCIBILIDAD EN TÉCNICAS NIRS

Parámetro	¿Que se evalúa?	Estrategia	Origen de las muestras	Estadístico
Repetibilidad & Reproducibilidad	Evalúa la variabilidad de lecturas sobre una serie de muestra. Básicamente buscamos saber si el sistema nos da el mismo resultado cuando nada debería haber cambiado.	Analizar, al menos, 3 niveles porcentuales (bajo, medio y alto) por dos analistas diferentes en tres días diferentes.	Set de muestras de validación	S_r , r , CV%, ANOVA, Sesgo,

EJEMPLO ILUSTRATIVO

n	Nivel	Matriz seleccionada	Identificación	Rango de valor porcentual
7	Bajo	Alimento para aves	Lote 1	1.23 % de Grasa
7	Medio	Alimento para cerdo	Lote 2	Entre 3.5 % de Grasa
7	Alto	Harina de carne	Lote 3	Entre 5.5 % de Grasa

Nota 1: El tamaño de muestras se recomienda que sea un 20% a 25% del tamaño del set de calibración.

Como mínimo absoluto, 21 muestras independientes que cubran todo el rango de los valores porcentuales.

Ejemplo: 7 muestras del nivel bajo, 7 muestras para el nivel medio y 7 para el nivel alto.

Nota 2: Realizar, al menos, el análisis por duplicado de cada nivel de muestra en tres días diferentes y al menos dos analistas diferentes.

SET DE MUESTRAS UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Nivel Bajo							Nivel Medio							Nivel Alto						
SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7
SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7

REPETIBILIDAD

Analista 1 Día 1, 2 y 3	Analista 1 Día 1, 2 y 3	Analista 1 Día 1, 2 y 3
----------------------------	----------------------------	----------------------------

REPRODUCIBILIDAD

Analista 2 Día 1, 2 y 3	Analista 2 Día 1, 2 y 3	Analista 2 Día 1, 2 y 3
----------------------------	----------------------------	----------------------------

SV=Set de validación





INTERPRETACIÓN		
PARA LA PRUEBA DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD		
1.- Límite de repetibilidad: Tabular, por separado, los resultados de la repetibilidad y reproducibilidad de los duplicados obtenidos por el equipo NIRS, por cada nivel porcentual y por cada día de análisis. Calcular las diferencias cuadráticas de las réplicas, la desviación estándar de las diferencias cuadráticas y el límite de repetibilidad. 2.- Prueba de ANOVA de la repetibilidad y reproducibilidad: Tabule los promedios de los duplicados de los niveles porcentuales de las muestras obtenidos por el equipo NIRS del set de muestras de validación de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad. Realice una prueba de análisis de varianza de un factor a un 95% de intervalo de confianza y un valor de alfa de 0.05. Compare el valor de $F_{crítico}$ VS el valor de $F_{calculada}$. 3.- Sesgo relativo y Coeficiente de Variación relativo: Tabule los promedios de los duplicados de cada nivel porcentual de las muestras obtenidos por el equipo NIRS del set de muestras de referencia contra los valores obtenidos por el laboratorio de referencia. Calcule el sesgo relativo, el promedio, la Desviación Estándar y el Coeficiente de Variación Relativo cada nivel porcentual.		
VALORES DE REFERENCIA		
Valor	Correlación	Interpretación
ANOVA de la repetibilidad	$F_{crítico}$ debe ser menor que $F_{calculada}$ El valor de la probabilidad p debe ser > 0.05 .	Existe una buena repetibilidad entre las muestras analizadas con NIRS con respecto a las muestras analizadas con el método de referencia.
Límite de la repetibilidad r	La diferencia cuadrática de las réplicas individuales no deben ser mayor que 2.8 veces el valor de la desviación estándar de las diferencias cuadráticas de la repetibilidad o reproducibilidad.	Si es mayor, algo falló (homogeneidad de la muestra, limpieza de la ventana del NIRS o estabilidad de la lámpara). En 21 muestras no deben existir más de 2 datos que no cumplan este criterio.
CV < al 2%	Excelente	Típico de componentes mayoritarios (humedad, proteína en granos) y matrices muy homogéneas.
CV > 2% < 5%	Bueno	Aceptable para la mayoría de las aplicaciones industriales y de control de calidad.
CV > 5% < 10%	Regular/Útil	Puede usarse para tamizaje (screening) o cuando la variabilidad natural de la muestra es muy alta (ej. forrajes).
CV > 10%	Pobre	El modelo tiene baja capacidad predictiva; generalmente solo sirve para clasificación cualitativa (alto/bajo).





Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

Sesgo	El sesgo de la mediana del método NIRS debe estar incluido en el rango del límite de repetibilidad del método de referencia. El límite de repetibilidad del método de referencia debe ser mayor que el método NIRS.	Si es mayor, algo falló (homogeneidad de la muestra, limpieza de la ventana del NIRS o estabilidad de la lámpara). En 21 muestras no deben existir más de 2 datos que no cumplan este criterio.
--------------	---	--





ANEXO 5. GUÍA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA SOLIDEZ (ROBUSTEZ) EN TÉCNICAS NIRS

Parámetro	¿Que se evalúa?	Estrategia	Origen de las muestras	Estadístico
Solidez (robustez)	Mide la capacidad del método para no verse afectado por pequeñas variaciones en las condiciones ambientales o de la muestra.	Analizar, al menos 2 niveles porcentuales (bajo y alto). Debes enfocarte en los factores físicos que alteran la interacción de la luz con las partículas del alimento.	Set de muestras de validación	S_r r ANOVA

EJEMPLO ILUSTRATIVO

n	Nivel	Matriz seleccionada	Identificación de factores	Rango de valor porcentual
7	Bajo	Alimento para aves	Granulometría y molienda	1.23 % de Grasa
7	Alto	Harina de carne	Temperatura de la muestra Densidad de Carga (empaquetamiento)	Entre 5.5 % de Grasa

Nota 1: El tamaño de muestras se recomienda que sea un 20% a 25% del tamaño del set de calibración. Como mínimo absoluto, 21 muestras independientes que cubran todo el rango de los valores porcentuales. Ejemplo: 7 muestras del nivel bajo y 7 para el nivel alto.

SET DE MUESTRAS UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Granulometría						Temperatura						Densidad de carga					
SV1 TP1	SV2 TP1	SV3 TP2	SV4 TP2	SV5 TP3	SV6 TP3	SV1 T1	SV2 T1	SV3 T2	SV4 T2	SV5 T3	SV6 T4	SV1 DC1	SV2 DC1	SV3 DC2	SV4 DC2	SV5 DC3	SV6 DC3
Analista 1 Día 1						Analista 1 Día 2						Analista 1 Día 3					
Analiza muestras con diferentes tres tiempos de molienda o tres distintos tamices.						Mide la misma muestra a diferentes variaciones de temperatura y humedad en la sala donde se encuentra el equipo. Ejemplo a 15°C, 25°C y 30°C.						Rete la presión con la que se coloca el alimento en la copa de lectura afecta la reflexión.					

SV=Set de Validación T= Temperatura TP=Tamaño de Partícula DC=Densidad de Carga





DISEÑO FACTORIAL (EJEMPLO ILUSTRATIVO)			
NIVEL PORCENTUAL BAJO Y ALTO			
FACTOR	REFERENCIA	CONDICIÓN A	CONDICIÓN B
Tamaño de partícula	0.10 mm	0.05 mm	0.15 mm
Temperatura del cuarto donde se utiliza el equipo	20°C	15°C	25°C
Densidad de carga	La referenciada en procedimiento	Presión de carga de muestra baja	Presión de carga de muestra alta
PARA LA PRUEBA DE SOLIDEZ (ROBUSTEZ)			
1.- Límite de repetibilidad: Tabular, por separado, los resultados de la prueba de robustez obtenidos por el equipo NIRS, por cada nivel porcentual y por cada factor y los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad de cada nivel porcentual. Calcular las diferencias cuadráticas de las réplicas, la desviación estándar de las diferencias cuadráticas y el límite de repetibilidad. 2.- Prueba de ANOVA de la robustez: Tabule, por separado, los resultados de la prueba de robustez obtenidos por el equipo NIRS, por cada nivel porcentual y por cada factor contra los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad de cada nivel porcentual. Realice una prueba de análisis de varianza de un factor a un 95% de intervalo de confianza y un valor de alfa de 0.05. Compare el valor de $F_{crítico}$ VS el valor de $F_{calculada}$.			
VALORES DE REFERENCIA			
Valor	Correlación	Interpretación	
ANOVA de la robustez	$F_{crítico}$ debe ser menor que $F_{calculada}$ El valor de la probabilidad p debe ser > 0.05 .	Existe una buena solidez entre las muestras analizadas por el método NIRS en la prueba de repetibilidad con respecto a las muestras analizadas modificando cada uno de los factores de la prueba.	
Límite de la repetibilidad r	La diferencia cuadrática de las diferencias de las muestras analizadas modificando cada uno de los factores de la prueba de la robustez no deben ser mayor que 2.8 veces el valor de la desviación estándar de las diferencias cuadráticas de la repetibilidad.	Si es mayor, algo falló (homogeneidad de la muestra, limpieza de la ventana del NIRS o estabilidad de la lámpara). En 21 muestras no deben existir más de 2 datos que no cumplan este criterio.	




ANEXO 6. GUÍA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN TÉCNICAS NIRS

Parámetro	¿Que se evalúa?	Estrategia	Origen de las muestras	Estadístico
Incertidumbre	Mide el grado de duda o el nivel de desconocimiento que tenemos sobre el valor real de lo que estamos cuantificando. No es un error (que es la diferencia entre el valor medido y el real), sino un intervalo de confianza.	Tomar los datos experimentales de la repetibilidad, el sesgo o bias de la repetibilidad y la incertidumbre del método de referencia	Set de muestras de validación	v_{ref} SEP v_{rep} v_c $U = k \cdot v_c$

DISEÑO EXPERIMENTAL

n	Nivel	Matriz seleccionada	Identificación de factores	Rango de valor porcentual
NA	NA	NA	NA	NA

Nota 1: Los resultados se toman de los experimentos ya realizados

SET DE MUESTRAS UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Repetibilidad	Sesgo o bias de la repetibilidad	Repetibilidad de las muestras de referencia
Los tres niveles de valores porcentuales con sus tres réplicas (63) muestras del set de validación (SV).	Los tres niveles de valores porcentuales con sus tres réplicas (63 muestras) y las 23 muestras del set referencia (SR).	Los tres niveles de valores porcentuales (23) muestras de referencia (SR).

PARA LA PRUEBA DE INCERTIDUMBRE

1.-Integre y tabule los resultados de la prueba de repetibilidad obtenidos por el equipo NIRS, por cada nivel porcentual y por cada día y los resultados obtenidos por el laboratorio de referencia de cada nivel porcentual.

Calcular lo siguiente:

- El sesgo o bias de la repetibilidad
- El valor de SEP y el valor de SEP corregido
- La incertidumbre estándar de las muestras de referencia
- La incertidumbre de la repetibilidad

2.- Utilizando la ley de propagación de errores calcule la incertidumbre estándar combinada (u_c) y la incertidumbre expandida usando un factor de cobertura $K=2$





Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

VALORES DE REFERENCIA		
Valor	Correlación	Interpretación
Incertidumbre expandida	La incertidumbre expandida del método de referencia debe ser menor que la incertidumbre expandida obtenida en el método NIRS	Si la incertidumbre expandida del método NIRS es menor que la del método de referencia indica que algo falló (homogeneidad de la muestra, limpieza de la ventana del NIRS o estabilidad de la lámpara, construcción del modelo, etc.).





ANEXO 7. GUÍA PARA LA ESTIMACIÓN DEL SESGO O BIAS EN MÉTODOS NIRS

Parámetro	¿Que se evalúa?	Estrategia	Origen de las muestras	Estadístico
Sesgo o bias	Mide la capacidad del método para representar la diferencia sistemática entre los valores predichos por el modelo NIRS y los valores reales obtenidos por el método de referencia (química húmeda).	Tomar los datos experimentales de la repetibilidad y los datos del método de referencia	Set de muestras de validación y set de muestras de referencia	Prueba de t de Student de dos colas y un valor de α de 0.05

DISEÑO EXPERIMENTAL

n	Nivel	Matriz seleccionada	Identificación de factores	Rango de valor porcentual
NA	NA	NA	NA	NA

Nota 1: Los resultados se toman de los experimentos ya realizados

SET DE MUESTRAS UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Repetibilidad	Repetibilidad de las muestras de referencia
Por cada nivel de valores porcentuales con sus tres réplicas (21 muestras del set de validación)	Por cada nivel de valores porcentuales con sus tres réplicas (21 muestras del set de referencia)

PARA LA PRUEBA DEL SESGO O BIAS

- 1.- Integre y tabule los resultados de la prueba de repetibilidad obtenidos por el equipo NIRS, por cada nivel porcentual y por cada día y los resultados obtenidos por el laboratorio de referencia de cada nivel porcentual.
- 2.- Calcular la diferencia entre el valor obtenido por el método NIRS con respecto al valor obtenido por el método de referencia.
- 3.- Realizar la sumatoria de las diferencias individuales y calcular el sesgo o bias.
- 4.- Realice una prueba de t de Student de dos colas para medias de dos muestras emparejadas con un nivel de α de 0.05
- 5.- Compare el valor crítico de t (dos colas) con el valor de t
- 6.- Obtenga el valor de la probabilidad p

VALORES DE REFERENCIA

Valor	Correlación	Interpretación
Prueba de t de Student	El valor p debe ser < 0.05 El sesgo es estadísticamente diferente de cero	Si el valor $p < 0.05$, el sesgo es significativo y el modelo necesita un ajuste.





DIAGRAMAS





DIAGRAMA 1. PROCESO DE SELECCIÓN DEL SET DE CALIBRACIÓN, VALIDACIÓN Y DE REFERENCIA

1

SET DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN (PARA CONSTRUIR EL MODELO)

PRODUCTOS Y MATERIAS PRIMAS USADAS EN LA ELABORACIÓN DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES
Para muestras simples de 50 a 80 muestras y para muestras complejas de 100 a 200 muestras.



2

SET DE MUESTRAS DE VALIDACIÓN EXTERNA

SELECCIÓN DE MATRICES A RETAR EN LA VALIDACIÓN (MATRIZ DE NIVELES PROXIMALES BAJOS, MEDIOS Y ALTOS)
Preparar, para la validación, un lote HOMOGÉNEO con la cantidad suficiente de material de cada nivel.



NIVEL BAJO DE PROTEÍNA



NIVEL MEDIO DE PROTEÍNA



NIVEL ALTO DE PROTEÍNA

3

MOLIENDA Y CUARTEO DE LAS MATRICES SELECCIONADAS





4	SET DE MUESTRAS A USAR EN LA VALIDACIÓN (MUESTRAS QUE EL MODELO "NUNCA HAYA VISTO") Envasar las muestras homogéneas en botellas de plástico herméticamente selladas e identificadas con un número consecutivo y una clave de identificación.	
NIVEL BAJO PROTEÍNA 	M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7       	Muestras del set de referencia (7) Muestras para enviar al laboratorio autorizados en el método analítico proximal para el análisis por duplicado.
	M8 M9 M10 M11 M12 M13 M14       	Muestras del set de validación para la linealidad (7) Análisis con el método NIRS por duplicado por tres días diferentes y el mismo analista.
NIVE MEDIO PROTEÍNA 	M15 M16 M17 M18 M19 M20 M21       	Muestras del set de validación para la R & r (7) Análisis con el método NIRS por tres días diferentes y dos analistas diferentes.
	M22 M23  	Muestras del set de validación para la Repetibilidad del sistema NIRS (2) Análisis con el método NIRS de una muestra por 10 veces y los niveles porcentuales (nivel bajo y nivel alto).
NIVEL ALTO PROTEÍNA 	M24 M25  	Muestras del set de validación para la prueba de solidez o robustez (2) Análisis con el método NIRS modificando tres condiciones o factores de la prueba (nivel bajo y nivel alto).





DIAGRAMA 2. MATRIZ DE ANÁLISIS

Muestras del set de referencia						
Nivel bajo						
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
						
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
Nivel medio						
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
						
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
Nivel alto						
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
						
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2

Muestras del set de validación para la linealidad						
Analista 1						
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		Día 1
M8	M9	M8	M9	M8	M9	
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Día 2
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		
M10	M11	M10	M11	M10	M11	
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Día 3
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		
M12	M13	M12	M13	M12	M13	Día 3
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	





Nivel bajo M15 M16 M17 M18 M19 M20 Nivel medio M15 M16 M17 M18 M19 M20 Nivel alto M15 M16 M17 M18 M19 M20	Muestras del set de validación para la R & r Analista 1 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> <th rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 1</th> </tr> <tr> <td>M15</td><td>M16</td> <td>M15</td><td>M16</td> <td>M15</td><td>M16</td> </tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 2</td> </tr> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> </tr> <tr> <td>M17</td><td>M18</td> <td>M17</td><td>M18</td> <td>M17</td><td>M18</td> </tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 3</td> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> </tr> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> </tr> <tr> <td>M19</td><td>M20</td> <td>M19</td><td>M20</td> <td>M19</td><td>M20</td> <td rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 3</td> </tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> </tr> </table> Analista 2 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> <th rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 1</th> </tr> <tr> <td>M15</td><td>M16</td> <td>M15</td><td>M16</td> <td>M15</td><td>M16</td> </tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <th rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 2</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> </tr> <tr> <td>M17</td><td>M18</td> <td>M17</td><td>M18</td> <td>M17</td><td>M18</td> </tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <th rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 3</th> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> </tr> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> </tr> <tr> <td>M19</td><td>M20</td> <td>M19</td><td>M20</td> <td>M19</td><td>M20</td> <td rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 3 </td></tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> </tr> </table>	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		Día 1	M15	M16	M15	M16	M15	M16	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Día 2	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		M17	M18	M17	M18	M17	M18	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Día 3	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		M19	M20	M19	M20	M19	M20	Día 3	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		Día 1	M15	M16	M15	M16	M15	M16	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Día 2	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		M17	M18	M17	M18	M17	M18	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Día 3	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		M19	M20	M19	M20	M19	M20	Día 3	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		Día 1																																																																																																																																																			
M15	M16	M15	M16	M15	M16																																																																																																																																																				
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1																																																																																																																																																				
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Día 2																																																																																																																																																			
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto																																																																																																																																																					
M17	M18	M17	M18	M17	M18																																																																																																																																																				
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Día 3																																																																																																																																																			
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2																																																																																																																																																				
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto																																																																																																																																																					
M19	M20	M19	M20	M19	M20	Día 3																																																																																																																																																			
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1																																																																																																																																																				
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2																																																																																																																																																				
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		Día 1																																																																																																																																																			
M15	M16	M15	M16	M15	M16																																																																																																																																																				
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1																																																																																																																																																				
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Día 2																																																																																																																																																			
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto																																																																																																																																																					
M17	M18	M17	M18	M17	M18																																																																																																																																																				
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Día 3																																																																																																																																																			
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2																																																																																																																																																				
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto																																																																																																																																																					
M19	M20	M19	M20	M19	M20	Día 3																																																																																																																																																			
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1																																																																																																																																																				
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2																																																																																																																																																				
Nivel bajo M22 M23 Nivel alto M22 M23	Muestras del set de validación para la Repetibilidad del sistema NIRS Analista 1 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> <th rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 1</th> </tr> <tr> <td>M22</td><td>M23</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>M22</td><td>M23</td> </tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <th rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 2</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> </tr> <tr> <td>M22</td><td>M23</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>M22</td><td>M23</td> </tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <th rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 2</th> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> </tr> <tr> <th colspan="2">Nivel bajo</th> <th colspan="2">Nivel medio</th> <th colspan="2">Nivel alto</th> </tr> <tr> <td>M22</td><td>M23</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>M22</td><td>M23</td> <td rowspan="3" style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Día 2 </td></tr> <tr> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>Réplica 1</td><td>Réplica 1</td> </tr> <tr> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> <td>-----</td><td>-----</td> <td>Réplica 2</td><td>Réplica 2</td> </tr> </table>	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		Día 1	M22	M23	-----	-----	M22	M23	Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2	Día 2	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		M22	M23	-----	-----	M22	M23	Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1	Día 2	Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		M22	M23	-----	-----	M22	M23	Día 2	Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2																																																																												
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		Día 1																																																																																																																																																			
M22	M23	-----	-----	M22	M23																																																																																																																																																				
Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1																																																																																																																																																				
Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2	Día 2																																																																																																																																																			
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto																																																																																																																																																					
M22	M23	-----	-----	M22	M23																																																																																																																																																				
Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1	Día 2																																																																																																																																																			
Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2																																																																																																																																																				
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto																																																																																																																																																					
M22	M23	-----	-----	M22	M23	Día 2																																																																																																																																																			
Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1																																																																																																																																																				
Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2																																																																																																																																																				





Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

Nivel bajo M24 M25   Nivel alto M24 M25  	Muestras del set de validación para la prueba de solidez o robustez						
	Analista 1						
	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		Factor 1
	M24	M25	-----	-----	M24	M25	
	Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1	
	Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2	Factor 2
	Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto		
	M24	M25	-----	-----	M24	M25	
	Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1	Factor 3
	Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2	
Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto			
M24	M25	-----	-----	M24	M25	Factor 3	
Réplica 1	Réplica 1	-----	-----	Réplica 1	Réplica 1		
Réplica 2	Réplica 2	-----	-----	Réplica 2	Réplica 2		





DIAGRAMA 3. MATRIZ DE RESULTADOS

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD

SET DE MUESTRAS DE REFERENCIA				SET DE MUESTRAS DE VALIDACIÓN			
LABORATORIO AUTORIZADO				ANALISTA 1			
ID. MUESTRA	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO	ID. MUESTRA	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
M1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	M1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	M1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M2	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	M2	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	M2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M3	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	M3	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M3	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	M3	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M4	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	M4	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M4	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	M4	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M5	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	M5	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M5	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	M5	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M6	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	M6	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M6	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	M6	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M7	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	M7	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M7	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	M7	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
n				n			
promedio				promedio			
Mediana				Mediana			
DST				DST			
% CV				% CV			
Incertidumbre				Incertidumbre			





RESULTADO DE LA PRUEBA DE REPETIBILIDAD

ANALISTA 1									
ID. MUESTRA	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3		
	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
M1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M2	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M3	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M3	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M4	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M4	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M5	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M5	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M6	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M6	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M7	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M7	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
n									
promedio									
Mediana									
DST									
% CV									





Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE REPRODUCIBILIDAD

ANALISTA 2									
ID. MUESTRA	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3		
	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
M1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M1	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M2	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M3	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M3	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M4	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M4	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M5	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M5	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M6	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M6	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
M7	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
M7	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
n									
promedio									
Mediana									
DST									
% CV									





Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

Analista 1		
ID. MUESTRA	NIVEL BAJO	
M1	Réplica 1	Día 1
M1	Réplica 1	Día 1
M3	Réplica 1	Día 1
M4	Réplica 1	Día 1
M5	Réplica 1	Día 1
M6	Réplica 1	Día 1
M7	Réplica 1	Día 1
M8	Réplica 1	Día 1
M9	Réplica 1	Día 1
M10	Réplica 1	Día 1
n		
promedio		
Mediana		
DST		
% CV		

Analista 1		
ID. MUESTRA	NIVEL ALTO	
M1	Réplica 1	Día 2
M1	Réplica 1	Día 2
M3	Réplica 1	Día 2
M4	Réplica 1	Día 2
M5	Réplica 1	Día 2
M6	Réplica 1	Día 2
M7	Réplica 1	Día 2
M8	Réplica 1	Día 2
M9	Réplica 1	Día 2
M10	Réplica 1	Día 2
n		
promedio		
Mediana		
DST		
% CV		





Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SOLIDEZ (ROBUSTEZ)

Nivel	Muestra	Valores del factor			Factor 1
Bajo	M24	A inferior	B central	C superior	
	Analista 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
	Día 1				
Alto	Muestra	Valores del factor			
	M25	A inferior	B central	C superior	
	Analista 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
	Día 1				
Nivel	Muestra	Valores del factor			Factor 2
Bajo	M24	A inferior	B central	C superior	
	Analista 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
	Día 2				
Alto	Muestra	Valores del factor			
	M25	A inferior	B central	C superior	
	Analista 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
	Día 2				
Nivel	Muestra	Valores del factor			Factor 3
Bajo	M24	A inferior	B central	C superior	
	Analista 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
	Día 3				
Alto	Muestra	Valores del factor			
	M25	A inferior	B central	C superior	
	Analista 1	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
	Día 3				



2026
año de
Margarita Maza



Dirección General de salud animal

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica (CENAPA).

DIAGRAMA 4: RESUMEN DE PARÁMETROS Y DATOS ESTADÍSTICOS DE LOS MODELOS NIR CUANTITATIVOS OBTENIDOS EN LA VALIDACIÓN (EJEMPLO ILUSTRATIVO).
Producto: Engorda de cerdo

Parámetro	Determinación		
	Humedad	Proteína	Grasa
Muestras del set de calibración	80	75	55
Muestras del set de prueba	16	15	11
Algoritmo	PLS	PLS	PLS
Rango espectral (nm)	1000-2500	1000-2500	1000-2500
Número de variables	1501	1501	1501
Rango de Concentración (g/100 mL)	3.07-5.54	11.97-21.34	2.71-5.12
Escala	Centrado a la media	Centrado a la media	Centrado a la media
Pretratamientos espectrales	Segunda Derivada	SNV+2da. Derivada	1ra. Derivada
Factores	8	7	5
R ² Calibración	0.9943	0.9959	0.9876
RMSEC	0.0638	0.2232	0.1062
R ² Validación cruzada	0.9534	0.9640	0.971
RMSECV	0.1908	0.6870	0.1698
Objetos con alto valor residual	1	1	0
R ² Predicción	0.9465	0.9438	0.9638
RMSEP	0.1965	0.8530	0.1895

Nota: Este resumen deberá ser presentado al personal técnico del Senasica durante el proceso de auditoría.
Dudas o comentarios:

Q.I. Eduardo Hernández Lara

Jefe de Metrología y Ensayos de Aptitud

Centro Nacional de Referencia en Parasitología Animal y Tecnología Analítica.

Email: eduardo.hernandezl@senasica.gob.mx

Tel. 55 5905 1000 Ext 53104

***** FIN DE SECCIÓN *****

2026
 año de
Margarita
Maza