

## Capítulo V

---

### **Aseguramiento de resultados aplicables a metodologías de control de calidad de bioplaguicidas**

---

Adriana Marcela Santos  
Lisette Torres Torres  
Liz Alejandra Uribe  
Erika Paola Grijalba

Debido a los cambios que ha traído consigo la agricultura verde, en la actualidad las empresas productoras de bioinsumos están en proceso de expansión, ya que buscan implementar estrategias para mejorar la producción agrícola. Dichos procesos incluyen la expansión a nuevas tierras, el incremento de la producción por hectárea gracias a la utilización de insumos adecuados, el aumento del rendimiento del cultivo y el control de plagas y enfermedades con productos biológicos (Altieri et al., 2012). Por esta razón, uno de los objetivos principales de la adopción y el uso de bioinsumos es asegurar sus resultados en condiciones de campo.

El control de calidad de un bioproducto es una parte esencial durante el proceso de producción comercial y es vital para la satisfacción del cliente (Ravensberg, 2011). En los capítulos anteriores se presentó la diversidad de metodologías que existen y pueden

desarrollarse, sin embargo, su implementación requiere un sistema de gestión de calidad y de aseguramiento de resultados.

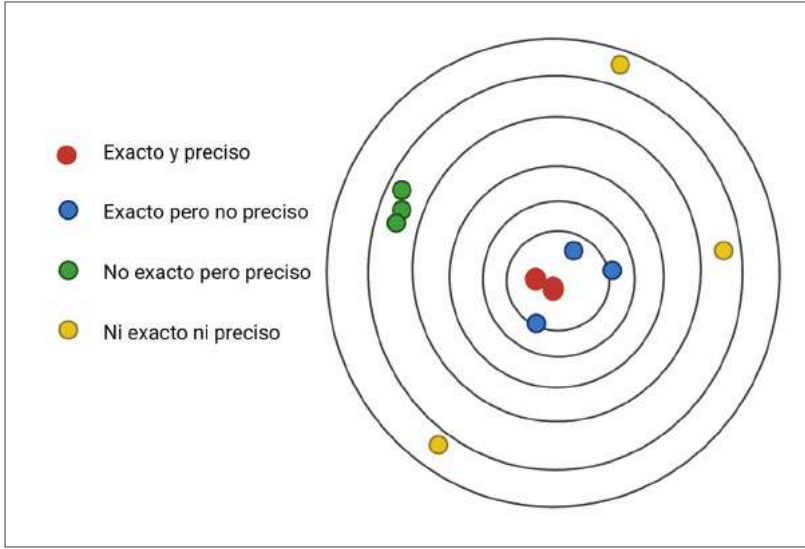
La regulación en algunos países se enfoca en que los laboratorios de control de calidad implementen un sistema de gestión de calidad con base en las directrices internacionales como las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) o la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”. Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, el control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) son todos los mecanismos, acciones y herramientas que se realizan con el fin de detectar la presencia de errores en los procedimientos utilizados para cualquier producto o servicio que se preste. Debido a la fuerte competencia en la industria, la calidad se ha convertido en el diferenciador de casi todos los bienes y servicios. Además, la gestión de la calidad es fundamental para construir una organización productiva que conduzca a productos que satisfagan o superen las necesidades del consumidor. Lo anterior también forma la base para un negocio productivo, pues reduce el desperdicio y fomenta los altos niveles de productividad (Hrvat et al., 2020).

Con el fin de implementar un sistema de aseguramiento de calidad, se debe garantizar un sistema de medición confiable. En general, las mediciones y los ensayos, especialmente de actividad biológica, requieren de un material de referencia que sea reproducible y confiable. Además, estos resultados están sujetos a la incertidumbre propia del ensayo (Paisan & Moret, 2010). Teniendo en cuenta que existen muchas fuentes de error en una metodología, es indispensable reducir aquellos que estén relacionados con las variables a medir y, de esta manera, aumentar la confianza de los resultados (Manterola et al., 2018).

En el desarrollo de las metodologías, la precisión depende de la persona que realiza la medición (el analista), el equipo o instrumento mediante el cual se realiza la medición y el objeto de estudio o la muestra a evaluar (Manterola et al., 2018). Con el fin de disminuir y evitar errores y sesgos en el proceso de medición, el analista debe tener en cuenta la variabilidad de los componentes que hacen parte del sistema de medición. Esta variabilidad se debe establecer al momento de planificar el proceso de estandarización y ejecución de la metodología. Asimismo, es fundamental establecer la confiabilidad del analista (Paisan & Moret, 2010).

Con respecto al equipo o instrumento, se debe garantizar que genere los mismos resultados en diferentes tiempos, muestras y escenarios si se aplica bajo las mismas

condiciones ambientales (Manterola et al., 2018). Sin embargo, el concepto de precisión se combina con el concepto de la exactitud. Su combinación puede generar diferentes clasificaciones de mediciones, las cuales se encuentran descritas en la figura 5.1.



**Figura 5.1.** Posibles escenarios de precisión y exactitud de resultados.

Fuente: Elaboración propia

Para mejorar la precisión y la exactitud, se han diseñado diversas estrategias cuya finalidad es disminuir las fuentes potenciales de error. Entre las más utilizadas se encuentran los procesos de estandarización y validación de métodos; el entrenamiento de los analistas; el mantenimiento y la calibración de los equipos; los procesos de supervisión y verificación y la implementación de controles como materiales de referencia y repeticiones.

## **Estandarización de métodos**

Los procesos de estandarización involucran actividades de adopción de una metodología a las “condiciones reales” con el objetivo de establecer que la metodología cumpla con las condiciones iniciales en las cuales se desarrolló (Riera et al., 2008). Ya que no existen parámetros oficiales establecidos por organismos internacionales para hacerle seguimiento a las metodologías de control de calidad de bioinsumos, el proceso que se debe implementar es este. Las ventajas de la estandarización incluyen la optimización de recursos, el establecimiento de criterios de aceptación y el estable-

cimiento de límites de cuantificación, lo que se traduce en la estabilidad del sistema de medición y en la calidad del resultado.

Las metodologías de control de calidad en el proceso y el producto terminado se realizan con base en un resultado conocido o típico, además, el sistema de medición (analista, equipo y muestra) debe ser estable durante un tiempo determinado. Esta estabilidad debe garantizar que la utilización de la misma metodología, los mismos analistas y los mismos equipos en el mismo intervalo de tiempo genere medidas en los rangos establecidos inicialmente (González & Falcón, 2015). Cuando una metodología no alcanza los controles de calidad y los resultados en los rangos de medición, es necesario que las causas que generan estas desviaciones sean estudiadas y determinadas. La estabilidad del sistema de medición es determinada a través de indicadores de repetibilidad y reproducibilidad, mediante los cuales se puede determinar a qué se debe la variación presentada en el proceso de medición utilizado (Paisan & Moret, 2010).

Según González & Falcón (2015), la repetitividad y reproducibilidad (r&R) son términos estandarizados adoptados por la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés) y están relacionados con la precisión y estabilidad en el tiempo de las mediciones realizadas con un conjunto de instrumentos que cuantifican la misma magnitud (González & Falcón, 2015).

La repetibilidad ( $r$ ) puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión característica de los resultados. Según el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), esta se define como “la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición” (VIM, 2012) (tabla 5.1), donde:

1. Estas condiciones son llamadas condiciones de repetibilidad.
2. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento de medición, el mismo observador u operador, el mismo instrumento de medición utilizado bajo las mismas condiciones, el mismo lugar, mediciones repetidas del mismo objeto u otro similar en un período corto de tiempo.

**Tabla 5.1.** Condiciones de evaluación de estudios de repetibilidad y reproducibilidad

Análisis	Condiciones de evaluación
Repetibilidad (r)	Mismo analista Mismo instrumento de medición Mismas condiciones Mismo lugar Repetición de la medición en un periodo de tiempo corto
Reproducibilidad (R)	Entre analistas Entre lugares o condiciones Instrumento de medición Evaluación del principio de método Tiempo de evaluación variable

Fuente: Elaboración propia con base en Betancourt & García (2018)

Por otra parte, la reproducibilidad (R) se define como “la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo condiciones de medición que cambian” (VIM, 2012) (tabla 5.1), donde:

1. Se debe especificar la condición que cambia.
2. Las condiciones que cambian pueden incluir: principio de medición, método de medición, observador u operador, instrumento de medición, patrón de referencia, lugar, condiciones de uso, mediciones repetidas del mismo objeto u otro similar en un periodo amplio de tiempo.

La reproducibilidad también puede ser expresada cuantitativamente teniendo en cuenta la dispersión característica de los resultados.

En la década de 1960, se desarrollaron diferentes metodologías para determinar y evaluar la repetitividad y reproducibilidad en sistemas de medición de la industria manufacturera (González & Falcón, 2015). En la actualidad, no solamente se aplica en la estandarización de procesos, sino también en procesos de ajuste y estandarización de metodologías en condiciones de laboratorio.

Estos estudios de repetibilidad y reproducibilidad (r&R) son la combinación de los estudios de repetibilidad (r) y los estudios de reproducibilidad (R), cuyo fundamento es la evaluación de las dispersiones de los resultados a través de la estadística, ya sea mediante la determinación de máximos y mínimos, varianzas o desviaciones

estándar (Paisan & Moret, 2010). El estudio tradicional de r&R emplea un diseño combinado de dos factores como, por ejemplo, muestras y analistas. De acuerdo con el procedimiento recomendado por ISO, se deben elegir y numerar las repeticiones que representen el rango real o esperado de variación del proceso de manera que los números no sean visibles para los analistas. Por lo general, en el estudio se supone que participan entre dos o tres analistas; en el primer ciclo (bloque) el analista A mide todas las muestras en un orden aleatorio y, posteriormente, el analista B. Los ciclos se repiten entre dos o tres veces y se aleatorizan las mediciones. Por lo general, no se espera que los efectos de bloqueo sean significativos. El objetivo del estudio no es expresar la diferencia entre las muestras y los analistas, sino medir la variación entre diferentes unidades y diferentes operadores en general (Jarosova, 2020).

Según Betancourt & García (2018), los pasos para la realización de estudio de r&R son los siguientes:

1. La calibración de instrumentos involucrados en la medición (sistemas de apoyo)
2. La selección de una muestra que cubra un rango de variación
3. El establecimiento de la metodología (paso a paso)
4. La selección de 2 o 3 analistas que realicen mínimo 10 análisis
5. Los cálculos correspondientes mediante el método seleccionado de análisis
6. La generación del informe de estandarización y el protocolo ajustado de la técnica (documentación)

Según Paisan & Moret (2010), los métodos estadísticos más utilizados para determinar el r&R son:

- Métodos de los rangos
- Método de ANOVA (análisis de varianza)
- Métodos de los promedios y rangos

## Método de los rangos

Este método permite una aproximación rápida al establecimiento de la variabilidad de las mediciones, ya que ofrece un dato global de la variabilidad total del sistema y no descompone de forma individual los valores de repetibilidad y reproducibilidad (Jarosova, 2020). Debido a esta particularidad, el método en cuestión permite establecer y verificar que el porcentaje de r&R no haya variado en el tiempo y que se encuentra dentro de lo establecido inicialmente. En general, dos analistas evalúan 5 muestras; posteriormente, se calcula el promedio de los cinco rangos y se calcula variación total (VT) teniendo en cuenta un porcentaje de confianza del 99,73 %.

La aplicación de este método tiene la desventaja de no diferenciar la variabilidad de los componentes del sistema de medición, por lo que establecer mejoras en el proceso se dificulta. Sin embargo, tiene como ventaja la aplicación directa de los analistas y los pocos recursos que se requieren para su procesamiento (Jarosova, 2020).

## Método de ANOVA

Este método se diferencia del método de promedio y rangos por la forma en la cual se procesan los datos, ya que mediante un análisis estadístico se requiere establecer la varianza (ANOVA). En este tipo de método la varianza se puede establecer en cuatro componentes: analistas; muestras; interacción entre muestra y analistas y el error de repetibilidad (Botero-Arbeláez et al., 2007). Este método tiene la ventaja de estimar el error experimental y las varianzas de forma más exacta. Además, permite manejar un ensayo experimental con un alto número de repeticiones y establecer de forma individual los efectos de cada componente (Botero-Arbeláez et al., 2007).

**Tabla 5.2.** Tabla de ANOVA para un sistema de medición con dos factores

Fuente variación	Suma cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
Analista	SSA	$a - 1$	$MSA = \frac{SSA}{a - 1}$
Muestra	SSB	$b - 1$	$MSB = \frac{SSB}{b - 1}$
Interacción	SSAB	$(a - 1)(b - 1)$	$MSAB = \frac{SSAB}{(a - 1)(b - 1)}$
Error	SSE	$ab(n - 1)$	$MSE = \frac{SSE}{ab(n - 1)}$
Total	SST	$N - 1$	

Fuente: Elaboración propia con base en Botero-Arbeláez et al. (2007)

Donde:

$a$  es el número de analistas

$b$  es el número de muestras

$n$  es el número de medidas por cada muestra por cada analista

$N$  es el número total de datos

## Método de promedios y rangos

El método del promedio y el rango permite realizar de forma separada el análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad de un sistema de medición. Este método consiste en que varios analistas realicen la misma medición sobre varias muestras (González & Falcón, 2015). Con los resultados obtenidos se pueden determinar la repetibilidad, la reproducibilidad y la interacción ente el analista y las muestras.

En general, los estudios de r&R se pueden clasificar como “cortos” y “largos”. Los estudios cortos corresponden al caso en que dos analistas realizan la medición de cinco muestras. Los estudios largos corresponden al caso en que participan tres analistas y realizan tres veces la medición en 10 muestras diferentes. La selección de la cantidad de analistas y muestras depende del criterio del implementador, sin embargo, en la medida en que se aumente el número de repeticiones, de muestras y de analistas, se obtendrán mejores datos. Con los datos obtenidos se pueden estimar los porcentajes de repetibilidad, reproducibilidad y la relación entre estos. Para dicho fin se deben seguir las ecuaciones descritas a continuación:

El porcentaje de repetibilidad ( $r$ ) se puede calcular de la siguiente manera:

$$\text{Repetibilidad}(\%) = \frac{K_1 * R}{T} * 100$$

Donde:

$K_1$  = Constante que depende del número de mediciones realizadas por cada operador y proporciona un intervalo de confianza del 99 % para estas características (tabla 5.1).

$R$  = Rango promedio de todos los rangos.

$T$  = Tolerancia de la característica medida (dada por el parámetro de aceptación).

**Ecuación 5.1.** Cálculo para determinar el porcentaje de repetibilidad (Paisan & Moret, 2010).

El rango promedio de todos los rangos ( $R$ ) se calcula según la ecuación 5.2.

$$R = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m r_i$$

$m$  = Número de operadores.

$r_i$  = Rango promedio de cada operador, el cual a su vez está dado por:

$$r_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r$$

Donde  $r$  es el rango de medición corresponde a la diferencia entre el promedio mayor y el promedio menor de los operadores por medio de la ecuación:

$$\text{Reproducibilidad}(\%): \frac{\sqrt{(K_1 * xD)^2 - \frac{(K_2 * R)^2}{nr}}}{T} * 100$$

**Ecuación 5.2.** Cálculo para determinar el rango promedio de todos los rangos (Paisan & Moret, 2010).

El porcentaje de reproducibilidad se calcula mediante la ecuación 5.3.

Donde:

$K_2$  = Constante que depende del número de operadores y proporcional un intervalo de confianza del 99% para estas características (tabla 5.1).

$xD$  = Diferencia entre el promedio mayor y promedio menor de los operadores.

$R$  = Rango promedio de todos los rangos.

$n$  = Número de ensayos por operador.

$r$  = número de partes medidas.

$T$  = Tolerancia de la característica medida (dada por el parámetro de aceptación).

$$\text{Reproducibilidad (\%)} = \frac{\sqrt{(K_1 * xD)^2 - \frac{(K_2 * R)^2}{nr}}}{T} * 100$$

**Ecuación 5.3.** Cálculo para determinar el porcentaje de reproducibilidad (Paisan & Moret, 2010).

**Tabla 5.3.** Valores de las constantes  $K_1$  y  $K_2$

<b>Número de ensayos</b>	2	3	4	5
$K_1$	4,56	3,05	2,50	2,21
<b>Número de operadores</b>	2	3	4	5
$K_2$	3,65	2,70	2,30	2,08

Nota: Si el valor de  $K_2$  dentro de la raíz es un número negativo, el valor de la reproducibilidad se considera 0.

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje de la relación entre la repetibilidad y la reproducibilidad se calcula según la ecuación 5.4.

$$r \& R(\%) = \sqrt{(\% \text{Repetibilidad})^2 + (\% \text{Reproducibilidad})^2}$$

**Ecuación 5.4.** Cálculo para determinar el porcentaje de la relación entre la repetibilidad y reproducibilidad ( $r\&R\%$ ) (Paisan & Moret, 2010).

Para garantizar la exactitud de los resultados se requiere que las mediciones sean realizadas bajo las mismas condiciones, es decir, utilizando el mismo instrumento o equipo y ejecutado por el mismo analista. Lo anterior, para que no se altere la estabilidad del sistema de medición (González & Falcón, 2015).

## Interpretación de resultados: pruebas r&R

Según Gutiérrez & De la Vara (2004), en todos los estudios de  $r\&R$  se espera siempre tener un porcentaje de repetibilidad y reproducibilidad lo más cercano posible a 0, ya que esto indica que existe menor variación entre los datos obtenidos. Sin embargo, se

han establecido los siguientes criterios (Llamosa et al., 2007; Paisan & Moret, 2010; Arango et al., 2013):

- Si  $r\&R$  (%) < 10 %, la metodología se aprueba.
- Si  $10\% \leq r\&R$  (%) < 30 %, puede ser aceptable según su uso y aplicación.
- Si  $r\&R$  (%) > 30 % la metodología no se acepta y requiere mejoras en cuanto al analista, equipo, método, condiciones ambientales, entre otros.

En cuanto a la repetibilidad y la reproducibilidad analizadas de forma independiente (Mosquera & López, 2007):

- a. Si la repetibilidad es mayor en comparación con la reproducibilidad, se puede deber a las siguientes situaciones:
  - El sistema de medición (instrumento o equipo) requiere mantenimiento.
  - Se debe revisar y establecer si las condiciones ambientales son las adecuadas según el método.
  - Existe mucha variación entre los analistas, las muestras y el equipo utilizado.
- b. Si la reproducibilidad es mayor comparada con la repetibilidad, las causas posibles son:
  - El analista necesita entrenamiento en el uso de la metodología.
  - Pueden existir errores de apreciación en la lectura.
  - Las condiciones de reproducibilidad no se han mantenido, por lo tanto, se han modificado.

## **Criterios de calidad de resultados**

Un componente esencial durante la evaluación de un parámetro de control de calidad es el establecimiento de criterios que aseguren la confiabilidad y calidad de los resultados. Estos están relacionados con la definición de parámetros de aceptación, coeficientes de variación, entre otros. A continuación, se encuentra un análisis de este tipo de criterios.

## Coefficiente de variación

Según Górdon-Mendoza & Camargo (2015), el coeficiente de variación de Pearson se considera fundamental como indicador de la calidad de experimentos. En general, se utiliza el coeficiente de variación (cv) para aceptar o rechazar la validez de los experimentos (Bowman & Rawlings, 1995).

Por definición, el coeficiente de variación es “la desviación estándar expresada como porcentaje de la media aritmética” (Wayne, 2006). Lo anterior permite establecer este coeficiente como adimensional y reflejar diferentes características de la población (Vásquez & Caballero, 2011).

En general, los datos experimentales proveen información tanto de la variación controlada (efecto de un tratamiento específico) como de la no controlada. Esta última se expresa como un error experimental, el cual puede ser cuantificado como un estimado llamado coeficiente de variación (cv). Estadísticamente el cv indica qué tan grande es la desviación estándar en relación con la media. Este se calcula de la siguiente forma (Patel et al., 2001) (ecuación 5.5).

$$CV = \frac{S}{X} * 100$$

**Ecuación 5.5.** Determinación del coeficiente de variación (Patel et al., 2001).

El rango aceptable del cv se debe determinar con base en reportes teóricos pero principalmente con la evaluación de un número determinado de ensayos, con los cuales se puede definir a su vez un valor crítico. Lo anterior debido a que los cv varían considerablemente de acuerdo con el tipo de experimento (Patel et al., 2001).

Gómez & Gómez (1984) y Patel et al. (2001) son más específicos al indicar que los cv varían considerablemente de acuerdo con el tipo de experimento. En el caso particular de las técnicas microbiológicas y fisicoquímicas, se ha definido que un valor inferior al 10 % es aceptable. En el caso de los ensayos biológicos, el coeficiente de variación aceptado debe ser inferior al 30 % entre réplicas de un mismo tratamiento (Gómez & Gómez, 1984; Patel et al., 2001). Una gran cantidad de investigadores (Gómez & Gómez, 1984; Patel et al., 2001) indican que, si el valor del cv supera el 30 %, los datos deben ser descartados por su baja precisión (Gordon-Mendoza & Camargo 2015; Schmidt et al., 2017).

Sin embargo, Schmildt et al. (2017) sugieren que los rangos de clasificación de los valores de *cv* dependen de la variabilidad de las técnicas y los experimentos, del número de repeticiones por tratamiento y de la forma de recolección de los datos. Por lo tanto, los criterios de aceptación dependerán directamente del diseño experimental y de la precisión de este. En algunos casos es necesario establecer dicho rango de aceptación.

## Parámetros de aceptación para la metodología

Los parámetros de aceptación son un conjunto de requisitos que se deben cumplir durante la realización de un ensayo y determinan que este sea válido y confiable. Estos hacen referencia a los aspectos que se enuncian a continuación.

**Evaluación de testigo absoluto:** para ciertas metodologías, por ejemplo las actividades biológicas, se debe evaluar un testigo absoluto (sin aplicación). En general, la variable respuesta en este tratamiento debe estar entre el 5 % y el 10 % y nunca superior al 20 %, de lo contrario el ensayo se debe repetir (Lacey, 2012).

**Material de referencia o cepa de referencia:** el material o cepa de referencia corresponde a los agentes de control biológico que se han caracterizado o de los cuales se cuenta con el conocimiento de su respuesta en las diferentes evaluaciones. La cepa de referencia se debe evaluar en metodologías microbiológicas y biológicas y es un tratamiento adicional en el análisis de calidad de una muestra de bioplaguicida.

**Condiciones físicas y ambientales:** los ensayos se deben realizar bajo las condiciones físicas y ambientales (temperatura, humedad o fotoperiodo) previamente establecidas. En caso de evidenciarse alguna modificación en estas condiciones, así como una eventualidad que ponga en riesgo los tratamientos o algunas de sus réplicas, se debe repetir el ensayo.

## Criterios estadísticos

Los criterios estadísticos que se deben tener en cuenta en la estandarización de una metodología o en el control de calidad de un bioplaguicida, incluyen la definición de tratamientos, número de réplicas, unidad experimental, diseño experimental, variables de respuesta y análisis estadístico:

## Tratamientos

Los tratamientos son las condiciones experimentales que se desean comparar en un ensayo (Johnson & Besselsen, 2002). En cada prueba se debe incluir un control positivo (a una concentración cercana al agente biológico a evaluar) y un control negativo (para conocer el porcentaje del efecto máximo) (Cuevas et al., 2012). En caso de ser necesario, se debe incluir además un control del vehículo empleado, por ejemplo, los excipientes de formulación.

Por ejemplo, si se desea evaluar la actividad de un bioplaguicida sobre una población determinada de insectos es necesario evaluar mínimo dos tratamientos, uno correspondiente a un testigo absoluto (insectos sin ninguna aplicación del agente de control) y el otro a la aplicación del agente de control. Algunas veces, es necesario evaluar un tratamiento adicional cuando se quiere determinar el efecto de otras condiciones en ausencia del principio activo sobre la población tratada. Tal es el caso de los excipientes de formulación, el diluyente del agente de control con el cual se ajusta la concentración requerida o, incluso, el mismo método de aplicación (testigo tratado). Al final del ensayo se determina la variable respuesta definida y mediante la comparación entre los tratamientos, se determina el efecto de las condiciones experimentales evaluadas.

## Número de réplicas

Las réplicas son las unidades experimentales que reciben el mismo tratamiento (Gómez, 1997), por lo cual también hacen referencia a la cantidad de observaciones (mediciones) repetidas e independientes que se hacen a las condiciones experimentales que se evalúan (Milliken & Johnson, 1992). Las réplicas permiten estimar el error experimental y determinar una respuesta precisa al efecto que se está evaluando. Entre mayor sea el número de réplicas, mayor es la precisión en la estimación de las medias de los tratamientos; esto se debe a que se disminuye la varianza de las medias de los tratamientos (Gómez, 1997; Gutiérrez & De la Vara, 2004). Para todos los ensayos, tanto microbiológicos como biológicos, se recomienda la evaluación de mínimo tres réplicas por cada tratamiento (Cuevas et al., 2012).

## Unidad experimental

Barros & Tavares (1995) definen la unidad experimental como la unidad básica que provee la información en la cual se basa la experimentación. Es necesario tener en

cuenta la importancia de la unidad experimental, ya que es la fuente de resultado del ensayo y, por lo tanto, su comportamiento está fuertemente relacionado con todos los factores que son fuente de error de las metodologías (Vargas & Navarro, 2019).

Al momento de evaluar varios tratamientos, las unidades experimentales deben ser homogéneas, de esta forma se garantiza que la diferencia en los resultados es generada por el efecto de los tratamientos y no por factores externos, a los cuales se les conoce como “ruido” (Vargas & Navarro, 2019). Sin embargo, especialmente para ensayos con microorganismos e insectos, establecer un conjunto de unidades experimentales homogéneas es casi imposible debido a las características propias de la unidad experimental. Esta situación se puede corregir mediante tratamientos testigo o control, a los cuales no se les aplica ningún tratamiento. Por ende, sus resultados permiten establecer el comportamiento “real” de la unidad experimental (Vargas et al., 2020).

Por ejemplo, el número de unidades experimentales en un bioensayo de control de calidad de agentes entomopatógenos depende de su definición y establecimiento, como se mencionó en el capítulo 4. Cuando la unidad experimental incluye un solo insecto, se recomienda que el número de unidades experimentales sea de 10 a 15 por réplica. Por otra parte, existen ensayos en los cuales varios insectos están confinados en una misma unidad experimental, en este caso el número de insectos debe estar entre 10 y 15 por unidad, la cual, a su vez, corresponde a una réplica.

En general se ha comprobado que, al aumentar el tamaño de las unidades experimentales, el coeficiente de variación disminuye con respecto al error experimental (Gómez, 1997). Sin embargo, es importante estimar de manera óptima la cantidad de las unidades experimentales, no solo para reducir el error experimental, sino también con base en aspectos económicos y prácticos, incluidos el espacio y la mano de obra (Vargas & Navarro, 2019).

## Diseño experimental

El diseño experimental es la forma en que se organizan las unidades experimentales con el fin de uniformizar, en lo posible, los tratamientos a evaluar (Milliken & Johnson, 1992). Cuando todas las unidades experimentales son homogéneas, solo existe un grupo o bloque de observaciones y las unidades experimentales pueden ser asignadas a los tratamientos de manera aleatoria, se denomina Diseño Completamente al Azar (DCA) (Milliken & Johnson, 1992; Gómez, 1997). El DCA

tiene varias ventajas sobresalientes y es el más usado en ensayos de control de calidad de bioplaguicidas. Dichas ventajas se relacionan con su flexibilidad, la cual permite usar cualquier número de tratamientos y réplicas durante la experimentación. Los tratamientos pueden tener diferente número de réplicas, sin embargo, se obtienen comparaciones más precisas cuando se evalúa un mismo número. En este tipo de bioensayos, es necesario contemplar la posibilidad de que exista pérdida de unidades experimentales, sobre todo cuando se manipulan larvas en estado temprano de desarrollo. Asimismo, este diseño tiene la ventaja de proporcionar el mayor número de grados de libertad para el error.

**Tabla 5.4.** Ejemplo de la asignación aleatoria de réplicas en un Diseño Experimental Completamente al Azar

Tratamientos	Números
A	15,4,9,11
B	3,1,10,12
C	8,6,13,16
D	14,2,5,7

Fuente: Elaboración propia

En el DCA, la distribución de los tratamientos en las unidades experimentales se puede realizar mediante tablas de números aleatorios o con otro método que permita sortear los tratamientos de forma aleatoria (Martínez & Martínez, 1997). Tal es el caso del uso de tarjetas o fichas numéricas que se extraen al azar de una caja o bolsa. Por ejemplo, para la distribución de cuatro tratamientos a las unidades experimentales en un DCA, cada uno con cuatro réplicas, se realiza un sorteo con 16 fichas enumeradas que se extraen al azar sin reemplazo (Gómez, 1997). En la tabla 5.4 se presenta un ejemplo de cómo pueden quedar asignados.

Otro diseño menos usado en el control de calidad de bioplaguicidas, especialmente para ensayos biológicos bajo condiciones de laboratorio o de invernadero pero que resulta recomendable cuando las unidades experimentales pueden agruparse de acuerdo con una fuente de variación, es el uso de bloques (Gómez, 1997).

Los bloques deben contener el mismo número de unidades experimentales y los tratamientos se deben distribuir al azar dentro de cada bloque. Si el bloqueo es correcto, la variabilidad entre las unidades de diferentes bloques debe ser mayor al promedio de la variabilidad entre las unidades de un mismo bloque (Gómez, 1997). Así se eliminan las diferencias del error experimental entre bloques, con lo cual

aumenta la precisión del experimento. La estructura más sencilla en bloques es el diseño de bloques completamente aleatorizados (BCA), en el cual los tratamientos se distribuyen aleatoriamente en las unidades experimentales dentro de cada bloque, con una aleatorización diferente en cada uno de ellos. Para esto se recomienda usar una tabla de números aleatorios (Martínez & Martínez, 1997). Por ejemplo, en un ensayo con seis tratamientos y tres réplicas, la distribución de los tratamientos en tres bloques puede darse como se muestra en la figura 5.2.

Bloque 1						Bloque 2					
F	B	E	C	A	D	C	A	F	D	E	B
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bloque 3											
E	C	F	B	D	A						
13	14	15	16	17	18						

**Figura 5.2.** Ejemplo de la distribución de seis tratamientos en tres bloques organizados completamente al azar.

Fuente: Elaboración propia

Dentro de las ventajas del diseño BCA están:

- El agrupamiento de las unidades experimentales en bloques homogéneos para controlar una fuente importante de variación (la de bloques), con lo que se obtiene una reducción del error experimental.
- Es posible aumentar el número de réplicas dentro de cada bloque para aquellos tratamientos que requieren más cuidado y atención.
- Si se pierden unidades experimentales, es posible estimar sus valores teniendo en cuenta las restantes.

A pesar de sus ventajas, el diseño BCA no es apropiado para un número elevado de tratamientos (no mayor de 24) debido a que se aumenta el tamaño del bloque, lo cual implica un aumento en la variabilidad dentro de cada bloque y, por lo tanto, un aumento en el error experimental. Por otra parte, si los bloques se arreglan sin una

justificación clara con base en una importante fuente de variación, puede haber una pérdida en la eficiencia al disminuirse los grados de libertad del error (Gómez, 1997).

## Variable respuesta

La variable respuesta (variable de interés) es el factor a través del cual se conoce el efecto o los resultados de cada prueba experimental (Gutiérrez & De La Vara, 2004). Es decir, los datos que se recogen en un experimento son las medidas de dicha variable, la cual se debe definir con antelación dependiendo de los objetivos, así como sus unidades.

Para el caso de metodologías microbiológicas se utilizan las expuestas en el capítulo 1. Estas son definidas como parámetros establecidos de acuerdo con el microorganismo. En general, todos los datos o resultados de las unidades experimentales se denominan parte de la variable respuesta. Para ensayos microbiológicos, la variable respuesta puede ser expresada en términos de viabilidad o recuento. En la mayoría de las pruebas de actividad biológica, la respuesta se puede medir como mortalidad, parasitismo, crecimiento, o ciertos efectos subletales (Cuevas et al., 2012).

## Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos relacionados con el control de calidad rutinario de un agente de control incluye la determinación de la desviación estándar (S) y del coeficiente de variación (CV) entre las réplicas de un mismo tratamiento. Posteriormente, se determina su validez dependiendo de los parámetros de aceptación establecidos para cada técnica.

Por otra parte, los datos resultantes de un proceso de estandarización incluyen un análisis más riguroso. Como primera medida se debe calcular el coeficiente de variación para cada uno de los analistas involucrados, el cual deber ser inferior al 10 % para que la metodología se considere repetible. Asimismo, se debe realizar una prueba de T pareada para determinar si hay diferencias significativas en los datos obtenidos. De esta manera, se contempla una hipótesis nula ( $H_0$ ) que establece que no hay diferencias entre los datos obtenidos por los analistas y una hipótesis alternativa ( $H_1$ ) que establece que sí las hay.

Con el fin de determinar si existe diferencia significativa entre los analistas se deben realizar pruebas estadísticas en las que se compare el valor  $p$  con el nivel de significancia. Un nivel de significancia de 0.05 permite establecer las siguientes relaciones:

- **Si el valor  $p \leq \alpha$ :** La diferencia entre las medias es estadísticamente significativa (Rechazar  $H_0$ ).
- **Si el valor  $p > \alpha$ :** La diferencia entre las medias no es estadísticamente significativa (No se puede rechazar  $H_0$ ).

De esta forma la prueba de T pareada ayuda a determinar si la metodología evaluada es reproducible.

Una vez se determine de manera preliminar que la metodología es repetible y reproducible, se debe llevar a cabo su confirmación mediante los métodos mencionados anteriormente, previa transformación de los datos según la variable respuesta. Por ejemplo, variables de respuesta expresadas en porcentaje o variables de respuesta expresadas como exponentes se transforman en arcosenos o logaritmos en base 10. De esta manera, los datos que siguen una distribución binomial, al ser transformados, se normalizan y sus varianzas se estabilizan. Se alargan los extremos de la distribución y se angosta la parte central y se pueden realizar los análisis estadísticos respectivos (Gómez, 1997; Segnini, 2004).

## Casos de estudio

Los siguientes casos de estudio corresponden a ensayos de estandarización realizados por AGROSAVIA, en el Centro de Investigación Tibaitatá.

### Caso de estudio I

En el presente caso de estudio se estandarizaron los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y de actividad biológica para las metodologías de control de calidad de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiospsis* cepa Th003 (Ascomycota: Hypocreaceae) formulado como un granulado dispersable (wg).

Los parámetros de estandarización seleccionados fueron el de repetibilidad, reproducibilidad y el porcentaje de relación entre estos dos (r&R); asimismo, se utilizó el método de promedios y rangos (Llamosa et al., 2007; Paisan et al., 2010). Para ello se

contó con dos analistas, quienes evaluaron la metodología tres veces con la misma muestra bajo las mismas condiciones, con los mismos instrumentos, en el mismo laboratorio y durante el mismo día.

Como criterios de aceptación, se tuvo en cuenta que el coeficiente de variación de los datos obtenidos por cada analista (repetibilidad,  $r$ ) fueran inferiores al 10 %; que la prueba T pareada no presentara diferencias significativas en los datos obtenidos entre los dos analistas (reproducibilidad,  $R$ ) y la relación entre  $r$  &  $R$  (%) obtenida al aplicar el método de promedios y rangos fuera:  $r$  &  $R$  (%) < 10 % (se aprueba) o  $10 \% \leq r$  &  $R$  (%) < 30 % (puede ser aceptable según su uso y aplicación).

A continuación, se describe el proceso de estandarización para cada metodología:

### Estandarización de la metodología para la determinación de la germinación del principio activo

La metodología estandarizada se describe a continuación:

1. Se pesó  $1 \text{ g} \pm 0,01\text{g}$  del agente microbial a base de *Trichoderma koningiopsis*, aislamiento Th003.
2. Se preparó la suspensión inicial y se adicionó la muestra anterior a un vaso de precipitado plástico de 250 ml de capacidad, con 99 ml de polisorbato 80 al 0,1 %.
3. La suspensión anterior se homogenizó (dilución  $10^{-2}$ ) con la licuadora de inmersión por 20 segundos.
4. Por medio de una micropipeta, se traspasaron 0,1 ml de la dilución  $10^{-2}$  a un tubo Eppendorf con 0,9 ml de polisorbato 80 al 0,1 %. Se evitó el contacto entre la micropipeta y el diluyente. De esta manera se obtuvo la dilución  $10^{-3}$ .
5. Las diluciones ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) se homogenizaron en un agitador vórtex por 10 segundos.
6. Se sembraron 0,1 ml de las tres últimas diluciones en cajas de Petri (agar agua suplementado con benomil al 0,0003 %). Cada dilución se sembró por triplicado y se utilizó un rastrillo para distribuir el contenido sobre el medio de cultivo.
7. Las cajas se incubaron a una temperatura de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y se ubicaron dentro de la incubadora de manera invertida.

8. Transcurrido el tiempo de incubación, se cortó un trozo de medio de cultivo inoculado de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> con un bisturí estéril y se colocó sobre una lámina portaobjetos. Posteriormente, se adicionó una gota de azul de lactofenol sobre el trozo de medio de cultivo y se cubrió con una laminilla.
9. Se cuantificaron los conidios germinados y no germinados mediante microscopio óptico (40×). Se contaron mínimo 100 conidios (germinados y no germinados) por cada réplica.
10. El porcentaje de germinación se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$Germinacion (\%) = \frac{Conidios\ germinados}{Conidios\ totales} * 100$$

Los resultados correspondientes a la determinación del porcentaje de germinación del principio activo para cada uno de los analistas están relacionados en la tabla 5.5.

**Tabla 5.5.** Resultados de la determinación del porcentaje de germinación del agente microbioal a base de *T. koningiopsis* obtenidos por cada analista

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
Analista 1	1	72,17	71,07	75,21	72,82	x	74,66
	2	74,77	74,31	74,79	74,62	SD	1,85
	3	78,00	77,57	74,00	76,52	CV (%)	2,48
Analista 2	1	74,51	70,19	71,15	71,95	x	74,20
	2	75,25	75,73	74,58	75,19	SD	1,95
	3	80,58	72,55	73,27	75,47	CV (%)	2,63

Fuente: Elaboración propia

Para el analista 1 se obtuvieron porcentajes de germinación del 71,07 % al 78,00 % con una media del 74,66 % ± 1,85 % y un coeficiente de variación del 2,48 %. Para el analista 2 se obtuvieron porcentajes de germinación del 70,19 % al 80,58 % con una media de 74,20 % ± 1,95 % y un coeficiente de variación del 2,63 %. Estos resultados establecen que la variabilidad de las evaluaciones para cada analista fue pequeña, lo cual se refleja en el valor de coeficiente de variación obtenido (2,48 % y 2,63 %, respectivamente). Los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 10 %, lo cual corrobora la repetibilidad de las evaluaciones siguiendo la metodología establecida.

Al realizar la prueba T pareada se obtuvo un valor de p del 0,5635 el cual, al ser mayor a 0,05, permitió la aceptación de la hipótesis nula, lo que indica que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos por los dos analistas (tabla 5.6).

**Tabla 5.6.** Resultados de la prueba T pareada

<b>Media</b>	<b>0,52</b>
<b>Error Estándar</b>	0,8631
<b>Media <math>H_0</math></b>	0,52
<b>Lower 95 % CI</b>	-1,470
<b>Upper 95 % CI</b>	2,510
<b>T</b>	0,60
<b>DF</b>	8
<b>Valor p</b>	0,5635

Fuente: Elaboración propia

$H_0$ : Hipótesis nula: No hay diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos por los dos analistas

$H_1$ : Hipótesis alterna: Hay diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos por los dos analistas

Luego de transformar los porcentajes de germinación mediante la función de arco-seno, se determinó la reproducibilidad, la repetibilidad y el porcentaje de r&R (%) mediante la metodología de promedios y rangos (tabla 5.7 y 5.8).

**Tabla 5.7.** Porcentajes de germinación del agente microbiano a base de *T. koningiopsis* transformados mediante la función arcoseno

<b>Analista</b>	<b>Evaluación</b>	<b>R 1</b>	<b>R 2</b>	<b>R 3</b>
<b>Analista 1</b>	1	0,85	0,84	0,87
	2	0,86	0,86	0,86
	3	0,88	0,88	0,86
<b>Analista 2</b>	1	0,86	0,84	0,84
	2	0,87	0,87	0,86
	3	0,90	0,85	0,86

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 5.8.** Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la determinación del porcentaje de germinación del agente microbiano a base de *T. koningiopsis*

	Analista 1	Analista 2
<b>Rango por medición</b>	0,03	0,03
	0,04	0,03
	0,01	0,02
Repetibilidad (%)	9,44	
Reproducibilidad (%)	1,04	
r&R (%)	9,50	

Fuente: Elaboración propia

La metodología para determinar la germinación de los conidios del agente microbiano a base de *T. koningiopsis* presentó una repetibilidad del 9,44 %, una reproducibilidad del 1,04 % y un porcentaje de relación entre estos dos parámetros (r&R %) del 9,50 % ( $\leq 10$  %). Lo anterior sugiere que la metodología analítica es repetible y reproducible en el tiempo y se aprueba para su uso y aplicación.

## Estandarización de la metodología para la determinación de pH

La metodología estandarizada fue la siguiente:

1. Se pesó 1 g de la muestra y se dispuso en 50 ml de agua destilada estéril contenida en un vaso de precipitado. Se agitó hasta disolver completamente y se verificó que la temperatura de la suspensión fuera de 20 °C.
2. Se verificó la calibración del potenciómetro mediante una de las soluciones amortiguadoras de pH 4 y pH 7.
3. Se realizó la lectura del pH de la muestra tres veces y por triplicado por cada uno de los analistas.

Los resultados obtenidos se encuentran registrados en la tabla 5.9.

**Tabla 5.9.** Resultados de la determinación del pH del agente microbiano a base de *T. koningiopsis*, obtenidos por cada analista

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
						x	SD
Analista 1	1	6,12	6,12	6,14	6,13	x	6,12
	2	6,12	6,12	6,10	6,11	SD	0,01
	3	6,11	6,12	6,12	6,12	CV (%)	0,11
Analista 2	1	6,14	6,14	6,15	6,14	x	6,12
	2	6,09	6,11	6,12	6,11	SD	0,02
	3	6,12	6,12	6,13	6,12	CV (%)	0,30

Fuente: Elaboración propia

Para el analista 1 se obtuvieron valores de pH entre 6,10 y 6,14 con una media de  $6,12 \pm 0,01$  y un coeficiente de variación del 0,11 %. Para el analista 2 se obtuvieron valores de pH entre 6,09 y 6,15 con una media de  $6,12 \pm 0,02$  y un coeficiente de variación del 0,30 %. Estos resultados establecen que la variabilidad de las evaluaciones para cada analista fue pequeña, lo cual se refleja en el valor de coeficiente de variación obtenido (0,11 % y 0,30 %, respectivamente). Estos coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 10 %, lo cual corrobora la repetibilidad de las evaluaciones siguiendo la metodología establecida.

Los resultados obtenidos al realizar la prueba T pareada determinaron un valor de p del 0,3466 el cual, al ser mayor a 0,05, permitió la aceptación de la hipótesis nula, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre valores de pH obtenidos por los dos analistas (tabla 5.10).

**Tabla 5.10.** Resultados de la prueba T

Media	$-5,56 \times 10^{-3}$
Error Estándar	$5,56 \times 10^{-3}$
Media H0	$-5,56 \times 10^{-3}$
Lower 95 % CI	-0,0184
Upper 95 % CI	$7,26 \times 10^{-3}$
T	-1,00
DF	8
Valor p	0,3466

Fuente: Elaboración propia

$H_0$ : Hipótesis nula: No hay diferencias significativas entre los valores de pH obtenidos por los dos analistas

$H_1$ : Hipótesis alterna: Hay diferencias significativas entre los valores de pH obtenidos por los dos analistas

Posteriormente se determinó la reproducibilidad, la repetibilidad y el r&R (%) mediante la metodología de promedios y rangos (tabla 5.11).

**Tabla 5.11.** Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la determinación de pH del agente microbiano a base de *T. koningiopsis*

	Analista 1	Analista 2
<b>Rango por medición</b>	0,01	0,05
	0,00	0,03
	0,04	6,13
Repetibilidad (%)	1,33	
Reproducibilidad (%)	0,31	
r&R (%)	1,37	

Fuente: Elaboración propia

La metodología para determinar el pH del agente microbiano a base de *T. koningiopsis* presentó una repetibilidad del 1,33 %, una reproducibilidad del 0,31 % y un porcentaje de relación entre estos dos parámetros (r&R %) del 1,37 % ( $\leq 10$  %). Lo anterior sugiere que la metodología analítica es repetible y reproducible en el tiempo y se aprueba para su uso y aplicación.

### Estandarización de la actividad biológica del bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis*

Para la actividad biológica se evaluó la eficacia en de *Trichoderma koningiopsis* contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Ascomycota: Sclerotiniaceae) en condiciones *in vitro*. Para la estandarización de la metodología se definieron los siguientes criterios:

#### Criterios biológicos

- Patógeno: esclerocios de *S. sclerotiorum*.

- Agente de control: bioplaguicida a base del aislamiento Th003 de *T. koningiopsis* y como control positivo se evaluó la cepa de referencia Th003 (microorganismo sin formular y cultivado en PDA durante 10 días).

### Criterios de evaluación

- Condiciones físicas y ambientales: bioensayo montado en condiciones de laboratorio con una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Sistema de aplicación: aspersión del agente de control sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*.
- Montaje de la unidad experimental: una caja de Petri con suelo y cinco esclerocios de *S. sclerotiorum*.
- Signos del parasitismo: se evidencia un crecimiento micelial de color blanco y una esporulación de color verde del hongo antagonista sobre los esclerocios del patógeno.

### Criterios para el aseguramiento de los resultados

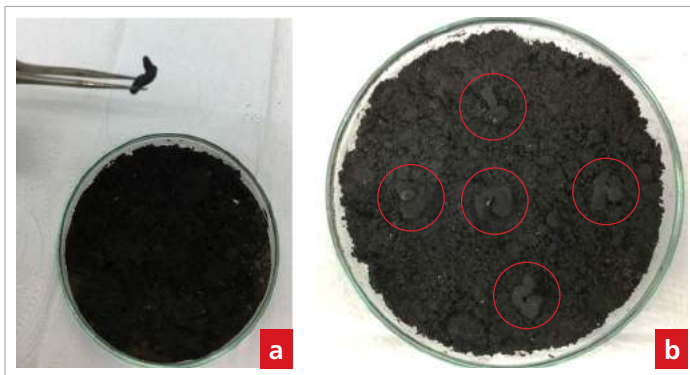
- Parámetros de aceptación: el testigo absoluto no debe presentar parasitismo por el agente biocontrolador ni contaminación. El coeficiente de variación entre las réplicas de un mismo tratamiento debe ser menor al 30 %. La cepa de referencia (aislamiento Th003 de *T. koningiopsis*) debe alcanzar un parasitismo superior al 80 %. El bioensayo se debe realizar bajo las condiciones de temperatura establecidas anteriormente.

### Criterios estadísticos

- Tratamientos: la aplicación del agente de control (bioplaguicida y cepa de referencia) y un testigo absoluto. Cada analista evaluó la metodología establecida tres veces (tres repeticiones).
- Número de réplicas: se evaluaron tres réplicas por tratamiento.
- Unidades experimentales: una caja de Petri con suelo y cinco esclerocios de *S. sclerotiorum*, asperjados y no asperjados con el agente de control.
- Diseño experimental: diseño experimental completamente al azar (DCA).
- Variable respuesta: Porcentaje de parasitismo (ver el capítulo 3).

La metodología estandarizada fue la siguiente:

Cinco esclerocios desinfectados de *S. sclerotiorum* se dispusieron sobre 35 g  $\pm$  0,1 g de suelo contenidos en una cada de Petri (figura 5.3). Posteriormente, se asperjaron 550  $\mu$ l de una suspensión del agente control biológico ajustado a la concentración de  $1 \times 10^7$  conidios.ml<sup>-1</sup> sobre cada uno de ellos (unidad experimental o réplica). Cada réplica (tres por tratamiento) se incubó a 25 °C  $\pm$  1 °C durante siete días en completa oscuridad. Adicionalmente, se evaluó un testigo absoluto (esclerocios no asperjados con el agente de control).



Fotos: Lisette Torres Torres

**Figura 5.3.** Ubicación de los esclerocios de *S. sclerotiorum* sobre el suelo. a. Esclerocio de *S. sclerotiorum*; b. Ubicación equidistante de los esclerocios sobre el suelo estéril.

Transcurrido dicho tiempo, se observó cada uno de los tratamientos y se cosecharon los esclerocios de cada uno de ellos. Luego de su desinfección con alcohol al 70 % e hipoclorito de sodio al 2 % y de enjuagues con agua estéril, estos se sembraron en Agar agua con cloranfenicol y se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura por siete días más. Finalmente se determinó el porcentaje de parasitismo en cada uno de los tratamientos.

Los resultados obtenidos para cada uno de los analistas se encuentran en la tabla 5.12.

**Tabla 5.12.** Porcentaje de parasitismo del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*, obtenidos por cada analista

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
Analista 1	1	100,00	100,00	100,00	100,00	x	100,00
	2	100,00	100,00	100,00	100,00	SD	0,00
	3	100,00	100,00	100,00	100,00	CV (%)	0,00

(Continúa)

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
						x	SD
Analista 2	1	100,00	100,00	100,00	100,00	x	100,00
	2	100,00	100,00	100,00	100,00	SD	0,00
	3	100,00	100,00	100,00	100,00	CV (%)	0,00

Fuente: Elaboración propia

Tanto para el analista 1 como para el analista 2 se obtuvieron porcentajes de parasitismo del 100 % en todas sus evaluaciones, por lo que en ambos casos el coeficiente de variación (cv) fue de 0 %. Lo anterior corrobora la repetibilidad la metodología establecida. Luego de transformar los porcentajes de parasitismo mediante la función de arcoseno, se determinó la reproducibilidad, repetibilidad y el r&R (%) mediante la metodología de promedios y rangos (tabla 5.13 y 5.14).

**Tabla 5.13.** Porcentaje de parasitismo del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum* transformados mediante la función arcoseno

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3
Analista 1	1	1,00	1,00	1,00
	2	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00
Analista 2	1	1,00	1,00	1,00
	2	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00

Fuente: Elaboración propia

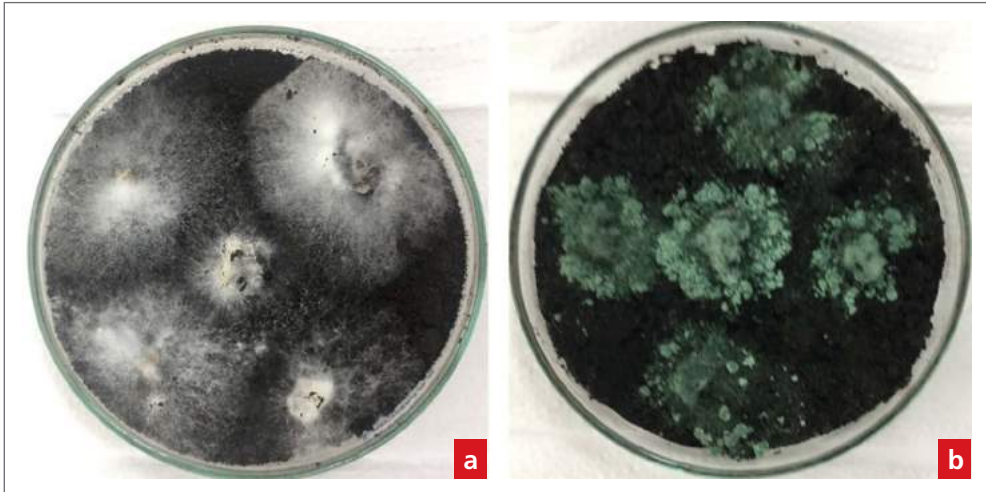
**Tabla 5.14.** Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la evaluación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*

Rango por medición	Analista 1	Analista 2
	0,00	0,00
	0,00	0,00
	0,00	0,00
Repetibilidad (%)	0,00	
Reproducibilidad (%)	0,00	
r&R (%)	0,00	

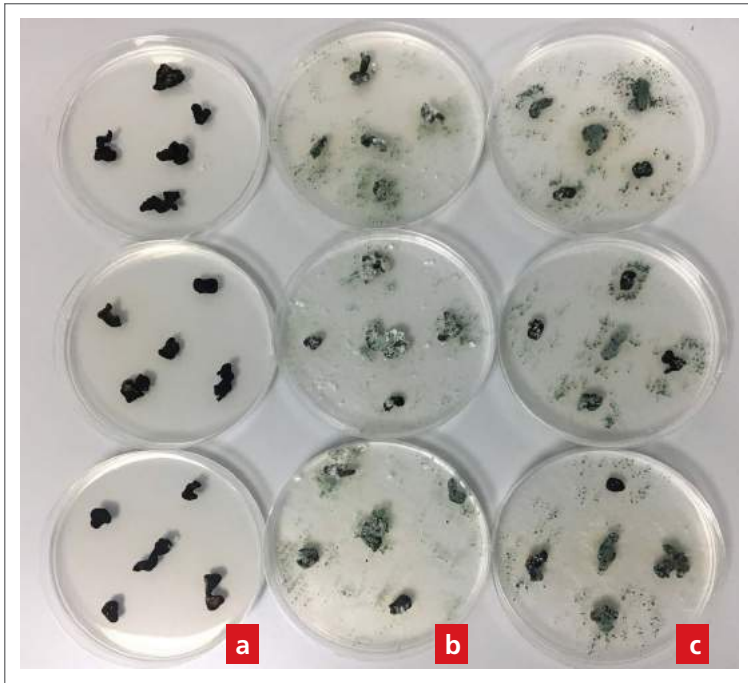
Fuente: Elaboración propia

La metodología para evaluar la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum* presentó una repetibilidad del 0 %, una reproducibilidad del 0 % y un porcentaje de relación entre estos dos parámetros (r&R %) del 0 % ( $10 \% \leq r\&R$ ). Lo anterior sugiere que la metodología analítica es repetible y reproducible en el tiempo y se aprueba para su uso y aplicación.

Por otra parte, los esclerocios tratados con la cepa de referencia (Th003) presentaron un parasitismo del 100 % y estos, junto con los tratados con el bioplaguicida, presentaron un crecimiento micelial lanoso con una esporulación típicamente de color verde en comparación con testigo absoluto (figura 5.4). Esta misma observación se hizo con los esclerocios mantenidos en agar agua, lo cual corrobora el parasitismo del agente biocontrolador (figura 5.5).



**Figura 5.4.** Evaluación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*. a. Esclerocios de *S. sclerotiorum* germinados (testigo absoluto) sobre suelo; b. Esclerocios de *S. sclerotiorum* parasitados por el agente de control biológico a base de *T. koningiopsis*.



Fotos: Lissette Torres Torres

**Figura 5.5.** Confirmación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*. a. Esclerocios de *S. sclerotiorum* (testigo absoluto) crecidos en agar agua; b. Esclerocios de *S. sclerotiorum* parasitados por la cepa de referencia (Th003) de *T. koningiopsis*; c. Esclerocios de *S. sclerotiorum* parasitados por el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*.

## Caso de estudio II

El presente caso tuvo como objetivo estandarizar la metodología relacionada con la determinación de la eficacia de *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae) sobre larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Para esto, a partir de una misma muestra homogénea (el mismo cultivo del agente de control e insectos de la misma edad), bajo las mismas condiciones, los mismos instrumentos, en el mismo laboratorio y durante el mismo día, dos analistas evaluaron la metodología establecida cinco veces cada uno (repetición). Adicionalmente, se tuvieron en cuenta tres réplicas por repetición para cada uno de los tratamientos evaluados, los cuales correspondieron a un testigo absoluto y al aislamiento del hongo entomopatógeno en cuestión. Luego de la evaluación, se calcularon los estimadores estadísticos para cada grupo de bioensayos realizados independientemente para cada analista (repetibilidad) y entre ellos (reproducibilidad). Finalmente, se aplicó el método de promedios y rangos (Llamosa et al., 2007; Paisan et al., 2010).

Para la estandarización de la metodología se definieron los siguientes criterios:

### Criterios biológicos

- Insecto plaga: Larvas de *D. saccharalis* de seis días de edad provenientes de la Unidad de Crías del Laboratorio de Entomología de AGROSAVIA en el Centro de Investigación Tibaitatá.
- Agente de control: Hongo entomopatógeno *M. anisopliae* (aislamiento Mt004), cultivado en agar papa dextrosa agar (PDA) durante ocho a diez días.

### Criterios de evaluación

- Condiciones físicas y ambientales: bioensayo montado en condiciones de laboratorio con una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de  $36\% \pm 5\%$ .
- Sistema de aplicación: inmersión durante 20 segundos en una suspensión del agente de control ajustado a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios. $\text{ml}^{-1}$ .
- Montaje de la unidad experimental: un recipiente plástico de 0,5 oz con un grano de maíz tierno y una larva viva del insecto.
- Síntomas y signos de la infección: se evidencian por un crecimiento micelial de color blanco y una esporulación de color verde del hongo entomopatógeno sobre el cuerpo del insecto.

### Criterios para el aseguramiento de los resultados

- Parámetros de aceptación: la mortalidad en el testigo absoluto debe ser menor al 20 %. El coeficiente de variación entre las réplicas de un mismo tratamiento debe ser menor al 30 %. El material de referencia (aislamiento Mt004 de *M. anisopliae*) debe alcanzar un porcentaje de eficacia superior al 80 %. El bioensayo se debe realizar bajo las condiciones de temperatura y humedad establecidas anteriormente.
- Repetibilidad y reproducibilidad: el coeficiente de variación de los datos obtenidos por cada analista (repetibilidad, r) debe ser inferior al 10 %. La prueba T pareada no debe arrojar diferencias significativas en los datos obtenidos entre los datos obtenidos por los dos analistas (reproducibilidad, R). La relación entre r&R (%) obtenida al aplicar el método de promedios y rangos debe ser  $r\&R (\%) < 10\%$  (se aprueba) o  $10\% \leq r\&R (\%) < 30\%$  (puede ser aceptable según su uso y aplicación).

## Criterios estadísticos

- Tratamientos: la aplicación del aislamiento Mt004 y un testigo absoluto. Cada analista evalúa la metodología establecida cinco veces (cinco repeticiones).
- Número de réplicas: se evalúan tres réplicas por tratamiento.
- Unidades experimentales: un recipiente plástico de 0,5 oz con un grano de maíz tierno y una larva viva del insecto.
- Diseño experimental: diseño experimental completamente al azar (DCA).
- Variable respuesta: porcentaje de eficacia (Zar, 1999).

La metodología de estandarización fue la siguiente:

La evaluación del agente de control a base de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis* se realizó mediante la técnica de inmersión durante 20 segundos. Para ello, 15 larvas de seis días de edad fueron sumergidas en una suspensión del hongo con una concentración final de  $1 \times 10^7$  conidios. $\text{ml}^{-1}$  (figura 5.6).



Fotos: Lissette Torres Torres

**Figura 5.6.** Determinación de la eficacia de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis*. a. Inmersión de las larvas de *D. saccharalis* en la suspensión del agente biocontrolador; b. Montaje de las larvas de *D. saccharalis* luego de su inmersión en la suspensión del agente biocontrolador.

Posteriormente, cada larva se ubicó de manera individual en recipientes plásticos de 0,5 oz con un grano de maíz (*Zea mays*) como sustrato de alimentación, lo cual constituyó una réplica (figura 5.7). Igualmente, se evaluó un testigo absoluto con sus tres réplicas. Finalmente, se registró la mortalidad hasta el noveno día posterior a la inmersión, se calculó la eficacia (%) y se comprobó el crecimiento y la esporulación del hongo entomopatógeno sobre el cuerpo del insecto mediante observaciones en el estereoscopio y el montaje del microcultivo.



Fotos: Lissette Torres Torres

**Figura 5.7.** Montaje de la unidad experimental para determinar la actividad biocontroladora de *M. anisopliae* sobre *D. saccharalis*.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad biocontroladora (mortalidad) del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis* bajo condiciones de laboratorio están relacionados, para cada uno de los analistas, en la tabla 5.15.

**Tabla 5.15.** Mortalidad expresada como eficacia (%) del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. sacchralis*, obtenidos por cada analista

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
						x	SD
Analista 1	1	86,7	93,3	100,0	93,33	x	95,56
	2	93,3	100,0	100,0	97,78	SD	2,22
	3	93,3	93,3	100,0	95,56	CV (%)	2,33
Analista 2	1	93,33	86,67	86,67	88,89	x	91,85
	2	86,67	100,00	86,67	91,11	SD	3,39
	3	86,67	100,00	100,00	95,56	CV (%)	3,70

Fuente: Elaboración propia

Para el analista 1 se obtuvieron porcentajes de eficacia del 86,7 % al 100 % con una media del 95,56 %  $\pm$  2,22 % y un coeficiente de variación del 2,33 %. Para el analista 2, se obtuvieron porcentajes de eficacia del 86,67 % al 100 % con una media de 91,85 %  $\pm$  3,39 % y un coeficiente de variación del 3,70 %. Estos resultados establecieron que la variabilidad de las evaluaciones para cada analista fue pequeña, lo cual se refleja en el valor del coeficiente de variación obtenido (2,33 % y 3,70 %, respectivamente). Los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 10 %, lo cual corrobora la repetibilidad de las evaluaciones siguiendo la metodología establecida.

Los resultados obtenidos al realizar la Prueba T pareada determinaron un valor de p del 0,1796 el cual, al ser mayor a 0,05, permitió la aceptación de la hipótesis nula. Lo anterior indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de eficacia obtenidos entre los dos analistas y corroboró la reproducibilidad de la metodología (tabla 5.8).

**Tabla 5.16.** Resultados de la prueba T pareada

Media	36,911
Error Estándar	25,096
Media $H_0$	36,911
Lower 95 % CI -4,7434	-20,961
Upper 95 % CI 2,1914	94,783
T	1,47
DF	8
Valor p	0,1796

Fuente: Elaboración propia

Hipótesis nula ( $H_0$ ): no hay diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de eficacia obtenidos por los dos analistas.

Hipótesis alterna ( $H_1$ ): hay diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de eficacia obtenidos por los dos analistas.

Luego de transformar los porcentajes de eficacia mediante la función de arcoseno se confirmó la reproducibilidad y repetibilidad de la metodología por medio de la aplicación del método de promedios y rangos (tabla 5.16 y 5.17).

**Tabla 5.17.** Mortalidad (porcentaje de eficacia) del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis*, transformados mediante la función arcoseno

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3
Analista 1	1	0,93	0,97	1,00
	2	0,97	1,00	1,00
	3	0,97	0,97	1,00
Analista 2	1	0,97	0,93	0,93
	2	0,93	1,00	0,93
	3	0,93	1,00	1,00

Fuente: Elaboración propia

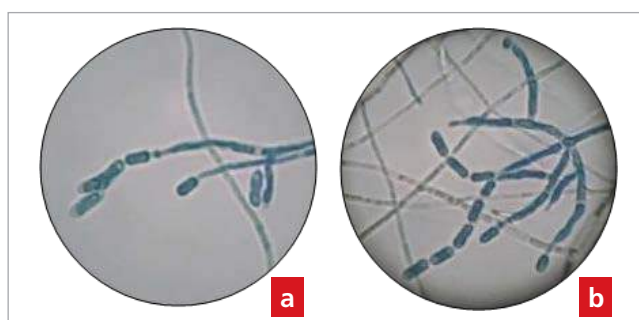
**Tabla 5.18.** Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y de r&R (%) para la evaluación de la actividad biológica (mortalidad) del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae*

	Analista 1	Analista 2
<b>Rango por medición</b>	0,04	0,09
	0,07	0,1
	0,07	0,09
Repetibilidad (%)	13,84	
Reproducibilidad (%)	7,44	
r&R (%)	15,71	

Fuente: Elaboración propia

La metodología para evaluar la actividad biocontroladora del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis* presentó una repetibilidad del 13,84 %, una reproducibilidad del 7,44 % y un porcentaje de relación entre estos dos parámetros (r&R %) del 15,71 % ( $10 \% \leq r\&R (\%) < 30 \%$ ). Lo anterior sugirió que la metodología analítica es repetible y reproducible en el tiempo y se acepta para su uso y aplicación.

Por otra parte, se corroboró el crecimiento y esporulación del hongo entomopatógeno sobre el cuerpo de los insectos y se confirmó su identidad mediante el montaje de microcultivos. El entomopatógeno se caracterizó por presentar micelio blanco, hifas septadas, ramificadas y hialinas, así como conidios alargados que forman cadenas originadas en fiálides de color verde (figura 5.8). Estas características concordaron con las reportadas por Barnett & Hunter (1998) para *M. anisopliae*.



Fotos: Lissette Torres Torres

**Figura 5.8.** Características microscópicas del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae*. a. Conidios aseptados, cilíndricos u ovoides; b. Conidios en cadena, compactados en columnas.

## Validación de metodologías analíticas

El principal objetivo de un laboratorio de análisis es reportar resultados altamente confiables, por lo tanto, se debe controlar y asegurar la calidad de estos (Valencia, 2010a). En este sentido, se deben desarrollar procedimientos internos que permitan asegurar la calidad de los resultados que se obtienen y emiten, en síntesis, es fundamental validar las metodologías analíticas que se utilizan. Como se ha mencionado en los capítulos anteriores, se recomienda usar materiales de referencia o certificados. En este sentido, para evitar recurrir a varios métodos para el cumplimiento de un mismo objetivo, se debe tener en cuenta que los organismos de normalización ya tienen desarrollados y validados métodos de referencia armonizados (Leclercq et al., 2019).

El siguiente apartado contiene información sobre los parámetros que se deben considerar cuando se vaya a validar una metodología que va a ser empleada para control de calidad. Sin embargo, es importante recordar que para que un proceso de validación sea exitoso, es imperativo que el laboratorio involucrado en el análisis esté equipado adecuadamente para cumplir con los requisitos de bioseguridad y trazabilidad (Singh & Anannd, 2020). Asimismo, es fundamental tener en cuenta que el método analítico a validar debe estar normalizado antes de iniciar el proceso de validación (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals [ICH, Q2A], 1995).

La validación garantiza que los requisitos para la realización de un ensayo se cumplen, que las posibilidades de error en los resultados disminuyen y que las técnicas son compatibles en las condiciones en que se está trabajando. El proceso de validación permite evaluar si un método analítico es aceptable para su propósito previsto (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020). En suma, la validación es la manera de demostrar que, por medio de evidencia documentada, el procedimiento analítico en cuestión producirá de manera persistente y permanente resultados confiables.

Básicamente, existen dos tipos de validación según el objetivo que se quiere alcanzar: validación primaria y validación secundaria. La validación primaria es un proceso exploratorio que se emplea para establecer los límites operativos y las características de un método nuevo o que ha sido modificado (Sartory, 2005). Por otro lado, la validación secundaria o verificación se emplea cuando se van a usar metodologías desarrolladas y validadas por terceros, como las metodologías de los ensayos físico-químicos. En este caso se deben tener en cuenta los parámetros evaluados por quienes desarrollaron la metodología (Sartory, 2005).

Existen diferentes guías sobre métodos de validación que han sido publicadas para brindar orientación al respecto (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020). Aunque algunas están dirigidas a otras áreas, pueden ser útiles en la validación de metodologías que se utilizan de manera similar en los ensayos de control de calidad de bioplaguicidas (tabla 5.19).

**Tabla 5.19.** Guías para la validación de metodologías analíticas

Nombre de la organización	Sigla	Área o disciplina	Año
Collaborative International Pesticides Analytical Council	Cipac	Agrochemical formulations	2003
The United States Pharmacopeia	USP	Pharmaceutical	2016
Association of Analytical Communities	AOAC	Foods	2002
The International Council for Harmonization of Technical Requeriments for Pharmaceuticals	ICH	Pharmaceutical	2005
The Organization of Economic Co-operation & Development	OECD	Biocides	2014

Fuente: Raposo &amp; Ibelli-Bianco (2020)

## Etapas en el desarrollo de la validación de una metodología analítica y criterios de aceptación

No existe una guía oficial que enumere los pasos a seguir; esto dependerá del método en sí mismo (Velandia, 2008). Sin embargo, a continuación se sugieren los pasos generales que se deben seguir para la validación de una técnica (tabla 5.20).

**Tabla 5.20.** Pasos para tener en cuenta para la validación de técnicas de análisis

Proceso de validación					
Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
Metodologías que se pueden validar:	<b>Identificar:</b> parámetros y variables				
Cualitativos Semicuantitativos Cuantitativos	<b>Diseñar:</b> experimentos estadísticamente (DEE) <b>Ejecutar:</b> ensayos de laboratorio <b>Medir:</b> observaciones	Obtención de datos	Análisis estadístico	Comparación con requisitos	Método validado

Fuente: Elaboración propia

Según Velandia (2008), “la validación de un procedimiento analítico establece mediante estudios de laboratorio que las características de desempeño del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas” (p 42). Son precisamente esas características o criterios los que evidencian que el método analítico permitirá obtener resultados confiables en el tiempo. De acuerdo con el tipo de ensayo a realizar, algunos de los parámetros a tener en cuenta para su validación se presentan en la tabla 5.21 (Valencia, 2010b).

**Tabla 5.21.** Parámetros de validación a tener en cuenta de acuerdo con el tipo de ensayo de control de calidad

Tipo de ensayo	Parámetros a tener en cuenta en la validación						
	Precisión	Linealidad	Repetibilidad	Reproducibilidad	Exactitud	Especificidad	Robustez
Microbiológico			X	X		X	X
Fisicoquímico	X	X	X	X	X		X
Biológico		X	X	X			X

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se aplicarán diferentes parámetros en el proceso de validación de una metodología de recuento en placa para microorganismos. Es necesario tener en cuenta que la validación aplica para metodologías establecidas por entes internacionales como los establecidos en la tabla 5.19.

## Parámetros de validación

**1. Precisión:** hace referencia a la distancia o alejamiento de los datos obtenidos de una medida media o central (dispersión). Los datos de precisión proporcionan evidencia sobre la aceptabilidad del protocolo (Jacobs et al., 2019). El objetivo es conocer la variabilidad debida a “errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo que no pueden ser siempre controlados (analista, equipo, instrumental, reactivos, tiempo, entre otros)” (Velandia, 2008, p. 30). Este parámetro suele expresarse en la forma de “imprecisión” como desviación estándar absoluta ( $s$  o  $SD$ ), desviación estándar relativa ( $RSD$ ), coeficiente de variación ( $CV$ ) o varianza ( $s^2$ ) (Buick et al., 1990).

**2. Linealidad:** de acuerdo con Velandia (2008), corresponde a “la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro del rango establecido”. La linealidad es una relación entre la concentración y la medida de valoración que se puede modelar mediante una línea recta que describe con precisión la relación de la concentración versus la respuesta (USP, 2007). Este tipo de modelo lineal es ideal, dado que facilita el trazado, la interpolación y la interpretación de los datos (AEFI, 2001). Sin embargo, no siempre es así (USP, 2007), entonces el uso de modelos cuadráticos o modelos de regresión superior pueden ser necesarios para evitar “puntos altamente influyentes” y desviaciones en bajos niveles de concentración (Rasopo & Ibelli-Bianco, 2020).

*Ejemplo 5.1. Linealidad entre dos métodos utilizada para cuantificar la concentración de un microorganismo (resultado expresado como Log<sub>10</sub> ufc/ml)*

Método de referencia Log <sub>10</sub> UFC/ml	Método para validar Log <sub>10</sub> UFC/ml
4,50	4,32
4,60	4,62
4,58	4,70
5,42	5,30
5,87	6,00
4,40	4,32
4,65	4,62
4,68	4,70
5,32	5,30
5,97	6,00
4,44	4,32
4,67	4,62
4,68	4,70
5,22	5,30
6,02	6,00

Fuente: Elaboración propia

Empleando los datos del ejemplo 5.1. se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el error típico ( $S_{xy}$ ):

- $r$  = El coeficiente de correlación mide el grado de linealidad. En este caso corresponde a 0,99.

- $S_{xy}$  = El error típico es de 0,09.

**3. Repetibilidad:** es la confiabilidad de los datos obtenidos en una prueba. Este análisis relaciona la variabilidad entre los resultados obtenidos de mediciones sucesivas con el método efectuado o una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos equipos y reactivos, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto) (AEFI, 2001). Como se mostró en la primera parte de este capítulo, la repetibilidad de un ensayo se estima con el coeficiente de variación (CV) (desviación estándar relativa) de una serie de medidas (AEFI, 2001). Sin embargo, para procesos de validaciones, el límite de repetibilidad  $r$  se define como la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales independientes (transformados con  $\log_{10}$ ) obtenidos utilizando el mismo método, el mismo aparato dentro del intervalo de tiempo más corto posible, con material de prueba idéntico, en el mismo laboratorio y realizados por el mismo operador. No se debe exceder el valor  $r$  en  $> 5\%$  de los casos. Si la diferencia entre la repetibilidad resultante dentro de un laboratorio excede  $r$ , los resultados pueden necesitar más investigaciones (ejemplo 5.2) (Jacobs et al., 2019).

*Ejemplo 5.2. Repetibilidad entre analistas en un proceso de validación*

Para la validación de un método, tres analistas evaluaron por quintuplicado un material de referencia (valor asignado de la cepa de referencia es: 5,36 log UFC/ml). Los resultados del recuento de UFC se transformaron a logaritmo en base 10 para normalizar la distribución y se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 5.22.

**Tabla 5.22.** Resultados normalizados obtenidos del recuento de colonias de tres analistas

Analistas	Resultado 1 Log10 (ufc/ml)	Resultado 2 Log10 (ufc /ml)	Resultado 3 Log10 (ufc /ml)	Resultado 4 Log10 (ufc /ml)	Resultado 5 Log10 (ufc /ml)	Promedio	Desviación $S_r$
Analista 1	5,70	5,71	5,69	5,64	5,72	5,69	0,03
Analista 2	5,68	5,67	5,66	5,61	5,64	5,65	0,03
Analista 3	5,75	5,78	5,80	5,81	5,77	5,78	0,02

Fuente: Elaboración propia

Teniendo en cuenta los datos del ejemplo 5.1, se quiere estimar:

- La desviación estándar (repetibilidad) expresada como Desvest o  $\sigma n^{-1}$ .
- La desviación estándar (reproducibilidad) entre analistas
- Sesgo expresado como Promedio laboratorio - valor asignado (cepa de referencia)

Para lograr lo anterior: en primer lugar, se calculó el promedio y la desviación estándar de los datos obtenidos con cada uno de los analistas; en segundo lugar, se estimó la repetibilidad de cada uno de los analistas ( $x < 5\%$ ) con la desviación estándar de sus replicados y, en tercer lugar, una vez estimada la desviación estándar de la repetibilidad de cada uno de los analistas, se calculó una estimación global de la desviación estándar de la repetibilidad. Para dicho fin, se obtuvieron los promedios de las estimaciones de la desviación estándar de la repetibilidad de los analistas empleando la ecuación 5.3:

$$S = \sqrt{\frac{(Sr1)^2 + (Sr2)^2 + (Sr3)^2}{3}}$$

**Ecuación 5.6.** Cálculo para determinar la repetibilidad.

El resultado S global ( $\log_{10}$  UFC/ml) es 0,03.

**4. Reproducibilidad:** a diferencia de la repetibilidad, la reproducibilidad analiza la capacidad de un método, ensayo o experimento de ser reproducido por otros bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios (AEFI, 2001). También se define como la medida de la dispersión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes (ejemplo 5.3, tabla 5.13) (Calpena et al., 1991). Con la desviación estándar de los datos obtenidos entre analistas se estima la reproducibilidad de la técnica. El límite de reproducibilidad (R) se define como la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba únicos (transformados en  $\log_{10}$ ) obtenidos utilizando el mismo método, con material de prueba idéntico, en diferentes laboratorios y con diferentes operadores que utilizan diferentes equipos. El valor R no debe superarse en  $> 5\%$  de los casos. Si la diferencia entre la reproducibilidad de los resultados entre laboratorios excede R, los resultados pueden necesitar investigaciones más profundas (Jacobs et al., 2019).

Ejemplo 5.3. Reproducibilidad entre analistas.

Tabla 5.23 Análisis de datos obtenido entre analistas

Analistas	Log <sub>10</sub> (UFC /ml)	Desviación (S / σ)
Analista 1	5,69	0,03
Analista 2	5,65	0,03
Analista 3	5,78	0,02
Desviación Sr (repetibilidad)		<b>0,03</b>
Desviación SR (reproducibilidad)	<b>0,07</b>	

Fuente: Elaboración propia

Con los datos obtenidos se calculó el sesgo:  $5,71 - 5,36 = 0,35$

**Conclusiones del ejercicio expuesto:** Con los resultados obtenidos se evalúa la aptitud del laboratorio para realizar el ensayo:  
 Sr (log UFC /ml): 0,03  
 SR (log UFC /ml): 0,07  
 Sesgo (log UFC /ml): 0,35

**5. Exactitud:** expresa la cercanía entre el valor que se acepta convencionalmente como verdadero (o un valor de referencia aceptado) y el valor encontrado experimentalmente. En síntesis, la exactitud permite evaluar qué tan cercano se encuentra el valor obtenido por un ensayo, método o equipo del valor medio (ICH, Q2A, 1995).

**6. Especificidad:** es la capacidad para evaluar inequívocamente el analito en la presencia de componentes que se espera estén presentes. En otras palabras, la especificidad hace referencia a la capacidad de un método, ensayo o equipo de obtener un resultado verdaderamente negativo o positivo. Este análisis es importante, dado que generalmente una muestra puede incluir impurezas, productos de degradación o componentes del vehículo, entre otros (ICH, Q2A, 1995). Sin embargo, la carencia de especificidad en un método puede ser compensada por otros procedimientos analíticos.

La especificidad tiene las siguientes implicaciones:

*Identificación:* para asegurar la identidad de un analito.

*Prueba de pureza:* para asegurar que todos los procedimientos analíticos permitan una declaración precisa del contenido de impurezas de un analito, por ejemplo, sustancias relacionadas con el ensayo, límite de metales pesados, residuos de solventes o productos de degradación. En este sentido, la prueba de pureza se lleva a cabo para proveer un resultado exacto que garantice una declaración precisa del contenido o potencia del analito en la muestra (ICH, Q2A, 1995).

**7. Robustez:** hace referencia a la capacidad de la metodología analítica, ensayo o equipo de medición para no afectarse por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método. El análisis de robustez tiene la propiedad de indicar la confiabilidad de un método, equipo o ensayo durante su uso normal (ICH, Q2A, 1995). En otras palabras, la robustez demuestra la capacidad del procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método susceptibles de producirse durante su utilización (AEFI, 2001).

## Caso de estudio para validar un método

Se analizó por quintuplicado una misma utilizando el método a validar y el método de referencia (Peñaranda, 2010) para el recuento en placa de microorganismos.

Tabla 5.24. Datos brutos de recuento UFC/ml

UFC/g		Log UFC/g	
Método a validar	Método de referencia	Método a validar	Método de referencia
2.000	2.100	3,30	3,32
1.800	2.200	3,26	3,34
1.900	2.300	3,28	3,36
1.800	2.100	3,26	3,32
2.100	2.200	3,32	3,34
<b>Promedio</b>		3,28	3,34
<b>S</b>		0,03	0,02
<b>F</b>		0,30	

Fuente: Elaboración propia

- Se evaluaron las diferencias en la precisión entre ambos métodos mediante una prueba de F. Para dicho fin, en Excel se colocó = prueba F (los datos del método a validar y los datos del método de referencia).  $F = 0,98$ .

Con los datos se obtuvo la siguiente información:

**Tabla 5.25.** Análisis de datos con prueba F

	Método a validar	Método de referencia
Media	3,28	3,34
Varianza	0,03	0,02
Datos	5	5
Grados de libertad	4	4
$\alpha$ 0,05		
F	3,107	F estadístico < valor crítico
P(F<f) una cola	0,14	
Valor crítico para F (una cola)	6,388 (*)	Valor límite

\* El valor crítico se obtiene de la tabla Fisher

Fuente: Elaboración propia

En conclusión, con un  $\alpha$  0,05 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la varianza de los dos métodos, por lo tanto, se aceptó el método a validar bajo las condiciones establecidas en el procesamiento de muestras.

## Referencias

- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria [AEFI]. (2001). *Validación de métodos analíticos* [Monografía]. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. AEFI.
- Altieri, M. A, Koohafkan, P., Giménez, E. H., & Division, W. (2012). Agricultura verde: Fundamentos agroecológicos para diseñar sistemas agrícolas biodiversos, resilientes y productivos. *Agroecología*, 7(1), 7-18. <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/170961>
- Arango, M., Gómez M., Rodrigo A., & Zapata, J. (2013). Medición y mejoramiento de la operación de despacho de carbón a través de modelos estadísticos r&R. *Boletín de Ciencias de la Tierra*, 33(1), 135-146.
- Barros, I., & Tavares, M. (1995). Estimativa do tamanho ótimo de parcelas experimentais através de cálculos algébricos. *Bragantia*, 54(1), 209-215. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051995000100024>

- Betancourt, L., & García, J. (2018). *Estandarización de técnicas para la caracterización química de los plastificantes usados en la producción de botas en PVC para la empresa Croydon Colombia*. Fundación Universidad de América.
- Botero-Arbeláez, M., Mendoza-Vargas, J., & Arbeláez-Salazar, O. (2007). Método Anova utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. *Science & Technology*, 13(37), 533-537, <https://doi:10.22517/23447214.4181>
- Bowman, D. T., & Rawlings, J. O. (1995). Establishing a rejection procedure for crop performance data. *Agronomy Journal*, 87(1), 147-151.
- Buick, A. R., Doig, M. V., Jeal, S. C., Land, G. S., & McDowall, R. D. (1990). Method validation in the bioanalytical laboratory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 8(12), 629-637. [https://doi:10.1016/0731-7085\(90\)80093-5](https://doi:10.1016/0731-7085(90)80093-5)
- Calpena, A. C., Escribano, E., & Fernández, E. (1991). Validación de los métodos analíticos. *Farmacología Clínica*, 7(9), 749-758.
- Cuevas, M. D. C., Pinette, G., López-Hidalgo, A. M., Cruz-Sanches, J. S., Nieto-Peña, M. De L. (2012). Requerimientos de control de calidad en bioensayos. En M. C. Cuevas, G. Espinosa, C. A. Ilizaliturri, A. Mendoza, M. Montejó (Eds.), *Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos* (pp. 127-135).
- Gómez, H. (1997). *Estadística experimental*. Universidad Nacional de Colombia.
- Gómez, K. A., & Gómez A. A. (1984). *Statistical procedures for agricultural research*. Wiley-Interscience Publication.
- González, G., & Falcón, C. (2015). Procedimiento para el análisis de repetibilidad y reproducibilidad en procesos de manufactura. *Revista Cubana de Ingeniería*, 6(3), 53-59.
- Górdon-Mendoza, R., & Camargo-Buitrago, I. (2015). Selección de estadísticos para la estimación de la precisión experimental en ensayos de maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 55-63.
- Gutiérrez, H., & De La Vara, R. (2004). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw Hill.
- Hrvat, F., Cifric, S., Aleta, A., Dzuho, A., Pokvic, L. G., & Badnjevic, A. (2020). *ISO/IEC 15189 Implementation in Microbiology Laboratory - General Concepts*. IEEE International Workshop on Metrology for Industry 4.0 & IoT, 2020, pp. 611-616, <https://doi:10.1109/MetroInd4.0IoT2020.9138169>

- International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals [ICH, Q2A]. (1995). *Validation of analytical procedures: Definitions and methodology*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)
- Jacobs, W., Jongenburger, I., De Boer, E., & Biesta, E. (2019). Validation by interlaboratory trials of EN ISO 10272-Microbiology of the food chain-Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.-Part 2: Colony-count technique. *International Journal of Food Microbiology*, 288(1), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.008>
- Jarosova, E. (2020). The use of D-optimal design in an expanded gauge R&R study. *Quality Engineering*, 33(1),1-9. <https://doi.org/10.1080/08982112.2020.1745233>
- Johnson, P. D., & Besselsen, D. G. (2002). Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR Journal*, 43(4), 223-232. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.202>
- Lacey, A. L. (2012). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Elsevier.
- Leclercq, A., Hardouin, G., & Lombard, B. (2019). European and International validation of 15 main reference methods in the microbiology of the food chain. *International Journal of Food Microbiology*. 288(1), 1-2. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.024>
- Llamosa, L. E., Meza, L., & Botero, M. (2007). Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica. *Scientia et Technica*, 1(35), 455-460. <https://doi.org/10.22517/23447214.5479>
- Manterola, C., Grande, L, Otzen, T., García, N., Salazar, P., & Quiroz, G. (2018). Reliability, precision or reproducibility of the measurements. Methods of assessment, utility and applications in clinical practice. *Revista chilena de infectología*, 35(6), 680-688, <https://doi.org/10.4067/S0716-10182018000600680>
- Martínez, R. & Martínez, N. (1997). *Diseño de experimentos. Análisis de datos estándar y no estándar*. Fondo Nacional Universitario. Universidad Nacional de Colombia.
- Milliken, G. & Johnson D. (1992). *Analysis oh Messy Data. Volumen 4. Basics of Experimental Desing*. Chapman & Hall/CRC. Press Company.

- Mosquera, C., & López, E. (2007). Comparación entre los métodos de evaluación de incertidumbre y estudios de repetibilidad y reproducibilidad para la evaluación de las mediciones. Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., Baez-Rogelio, A., Quintero-Hernández, V., Rivera-Urbalejo, A. P., & Pérez-Terrón, R. (2016). Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. En G. Chavira-Juárez (Ed.), *Instituciones de educación superior la labor investigadora e innovadora en México* (pp. 67-84).
- Paisan, Y., & Moret, J. (2010). La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. *Revista Tecnología Química* 30(2), 117-121.
- Parada, M. & Muñoz, C. (2015). *Bioinsumo de uso agrícola: potencialidades y desafíos*. <https://agriculturers.com/bioinsumos-de-uso-agricola-potencialidades-y-desafios/>
- Patel, J. K., Patel, N. M., & Shyani, R. L. (2001). Coefficient of variation in field experiments and yardstick thereof - An empirical study. *Current Science*, 81(9,10), 1163-1164.
- Peñaranda, S. (2010). *Memorias: Validación de los métodos microbiológicos. Análisis estadístico de los resultados*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validations: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends in analytical chemistry*, 129, 115913, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>
- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer y J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.
- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer, & J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.
- Riera, L., Lugo, S., Sosa, I., Entrena, A., Acevedo, M., Tabares, T., Llanes, H., Fernández, N., Joglar, I., Otaño, A., Zamora, Z., Negrín, N., González, A., Rodríguez, K., Muñoz, E., Crespo, E., Peña, M., & Chala, T. (2008). Quality Assurance Programs in the Production of Laboratory Animals. *Revista de Salud Animal*, 30(1), 12-16.
- Sartory, D. P. (2005). Review Validation, verification and comparison: Adopting new methods in water microbiology. *Water Sa*, 31(3), 393-396.

- Schmildt, E. R., Silva, W., Ambrosio, J., Schmildt, O., Nascimento, A. L., & Fernandes, A. A. (2017). Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de alface. *Revista agro@Mambiente on-line*, 11(4), 290, <http://doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i4.4412>
- Segnini, S. (2004). *Fundamentos de Bioestadística*. Universidad de los Andes.
- Singh, N., & Anand, A. (2020). *Analytical Methods J Microbiological*. Reference Module in Food Sciences.
- United States Pharmacopeial 30 edition. [USP 30]. (2007). Rockville: Mack printing.
- Vargas, J. C., & Navarro, J. R. (2019). Tamaño y forma de unidad experimental para ensayos de rendimiento de arroz (*Oryza sativa*), en Guanacaste, Costa Rica. *UNED Research Journal*, 11(3), 355-360, <https://doi.org/doi:10.22458/urj.v11i3.2653>
- Vargas, J. C., Vega, E. V., & Cerdas, R. (2020). Tamaño y forma de la unidad experimental en ensayos de rendimiento de Brachiaria híbrido CIAT 3608. *Pastos y Forrajes*, 43(2), 144-149.
- Vásquez, R., & Caballero, A. (2011). Inconsistencia del Coeficiente de Variación para expresar la variabilidad de un experimento en un modelo de Análisis de Varianza. *Cultivos tropicales*. 32(3). 59-62.
- Velandia, J. (2008). *Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica verterinaria*. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.
- Valencia, L. (2010a). *Estrategias para la validación de métodos de análisis microbiológicos*. Colombia: Curso validación de métodos microbiológicos, Programa de Educación Continua, Pontificia Universidad Javeriana (no publicado).
- Valencia, L. (2010b). *Validación de métodos de ensayos*. Colombia: Curso validación de métodos microbiológicos, Programa de Educación Continua, Pontificia Universidad Javeriana (no publicado).
- Vocabulario Internacional de Metrología (VIM). (2012). *Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*. Centro Español de Metrología.
- Wayne, D. (2006). *Bioestadística*. Limusa.
- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall.



---

## Glosario

---

**Bioplaguicida:** compuestos que incluyen sustancias naturales que controlan plagas (plaguicidas bioquímicos), microorganismos que controlan plagas (plaguicidas microbianos) y sustancias plaguicidas producidas por plantas que contienen material genético agregado, como protectores incorporados en las plantas (PIP) (United States Environmental Protection Agency [US EPA], 2019).

**Blastospora:** célula vegetativa (similar a una levadura) producida por diversos hongos entomopatógenos que es capaz de germinar e infectar insectos de forma más rápida que un conidio (Lacey, 2017).

**Concentración letal media:** concentración de un patógeno o agente que produce la muerte de la mitad de los individuos evaluados. El método experimental no es suficiente para determinar la dosis precisa a la que los individuos evaluados fueron expuestos. Su símbolo es  $CL_{50}$  (difiere de la dosis letal media) (Lacey, 2012).

**Conidio:** espora especializada de reproducción asexual que se forma en el extremo de una hifa a partir de un conidióforo. Permite la dispersión del hongo hacia nuevos hábitats (Rey et al., 2017).

**Conidióforo:** hifa especializada sobre la cual se forman conidios externamente (Cepero et al., 2012).

**Dosis letal media:** dosis con la cual se produce la mitad de la muerte de los individuos evaluados. Su símbolo es  $DL_{50}$  (Lacey, 2012).

**Epicarpo:** es la parte más externa que suele proteger al resto del fruto del exterior. El epicarpio forma la epidermis protectora del fruto que, a menudo, contiene glándulas con esencias y pigmentos. En muchas frutas se llama comúnmente piel (EcuRed, s. f.)

**Error experimental:** son aquellas variaciones o alteraciones en los resultados debidos a factores no controlados o no conocidos. Al error se le atribuye la diferencia que se presenta entre unidades experimentales tratadas idénticamente. Las principales fuentes de error están relacionadas con la variabilidad natural existente en el material sobre el cual se aplican los tratamientos; la falta de uniformidad con que se manejan las unidades experimentales; errores en la observación y en la medición y efectos combinados de factores extraños (Gómez, 1997).

**Excipiente:** grupo de auxiliares de formulación, inertes y que deben proteger y liberar al ingrediente activo (Díaz et al., 2018).

**Experimento/Bioensayo:** es un proceso por medio del cual se obtiene una observación o medición. Un bioensayo es un experimento aleatorio cuyos resultados no pueden predecirse y, por lo tanto, están sujetos al azar. Asimismo, los bioensayos incluyen tres etapas: planeación, ejecución y análisis e interpretación de resultados (Gómez, 1997). También corresponde a una prueba experimental de control de calidad realizada en un laboratorio o invernadero que permite verificar la actividad biológica de un insumo de uso agrícola (ICA, 2011).

**Flóculo:** signo de inestabilidad de una emulsión en el cual las gotas de la fase interna se unen y forman agregados debido a las fuerzas de atracción de Van der Waals (Aranberri et al., 2006).

**Ingrediente o principio activo:** componente de una formulación que ejerce la actividad biológica. Puede incluir un microorganismo, extracto vegetal, metabolito, entre otros. (Díaz et al., 2018).

**Insecto alterno:** insecto sobre el cual se evalúa la actividad biológica de un agente de control biológico el cual, en principio, está dirigido para el control de otro (insecto blanco). Surge como una alternativa cuando la consecución del insecto blanco es una limitación.

**Líquidos inmiscibles:** líquidos que no se mezclan (Brown et al., 1997).

**Microesclerocio:** agregados hifales compactos y pequeños, frecuentemente melanizados, con tolerancia a la desecación, productores de compuestos secundarios que pueden ser antibacteriales, antifúngicos o interrumpir la alimentación en insectos (Cooke, 1983 citado por Lacey, 2017).

**Surfactante:** contracción del término agente de la superficie activa, es una sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en un sistema tiene la propiedad de adsorberse sobre la superficie o interfase de este y alterar la energía libre presente en la superficie o interfase (Rosen & Kunjappu, 2012).

**Testigo absoluto:** corresponde a los individuos control en un bioensayo y, por lo tanto, no reciben ningún tratamiento, ninguna aplicación y se disponen en la unidad experimental correspondiente (Lacey, 2012).

**Testigo tratado:** corresponde a un tratamiento control. A los individuos de este tratamiento se les coloca el vehículo de aplicación sin el principio activo a evaluar. En este caso, la sustancia es generalmente inocua y se usa sola, administrada de la misma manera que el tratamiento (Johnson & Besselsen, 2002).

**Tiempo letal medio:** periodo de tiempo de exposición a un patógeno en el cual se produce la muerte en la mitad de los individuos sometidos a prueba (Lacey, 2012).

**Tratamiento:** los tratamientos son las condiciones experimentales que se desean comparar en un experimento (Johnson & Besselsen, 2002).

**Unidad experimental:** es la unidad o individuo al cual se le aplica un tratamiento (Gould, 2012).

## Referencias

- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., & Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3), 211-231.
- Brown, T. L., Lemay, H. E., Bursten, B. E., Murphy, C. J., Woodward, P. M., & Stoltzfus, M. W. (1997). *Chemistry: The central science*. Pearson.
- Cepero, M., Restrepo, S., Franco-Molano, A., Toquica, M., & Estupiñán, N. (2012). *Biología de hongos*. Uniandes.
- Díaz, A., Gómez, M., Grijalba, E., Santos, A., Cruz, F., León, D., Alarcón, E., & Cotes, A. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 628-692). AGROSAVIA.

- EcuRed. (s. f.). *Enfermedades del cultivo de la papaya*. [https://www.ecured.cu/Enfermedades\\_del\\_cultivo\\_de\\_la\\_papaya](https://www.ecured.cu/Enfermedades_del_cultivo_de_la_papaya).
- Gómez, H. (1997). *Estadística experimental*. Universidad Nacional de Colombia.
- Gould, A. L. (Ed.). (2015). *Statistical methods for evaluating safety in medical product development*. John Wiley & Sons.
- Instituto Colombiano Agropecuario [ICA]. (2011). Resolución 000698 de 2011 “Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones”. <https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx>
- Johnson, P. D., & Besselsen, D. G. (2002). Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR Journal*, 43(4), 223-232. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.202>
- Lacey, A. L. (2012). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Elsevier.
- Lacey, A. L. (2017). *Microbial control of insect and mite pests*. Elsevier.
- Rey, A., Garea, M., & Lago, J. C. (2017). *Glosario micológico y acepciones complementarias o afines*. Agrupación Micótica A. Zarrota.
- Rosen, M. J. & Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and interfacial phenomena*. Wiley Online Library.
- United States Pharmacopeial. 30 ed. [USP 30]. (2007). Rockville: Mack printing.