

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

MONOGRAFIA



**“VALIDACION DEL METODO CURCUMINA
PARA LA DETERMINACION DE BORO”**

Prácticas Profesionales

**POSTULANTE: JAIME ANTONIO REYES ORTIZ TUMIRI
DOCENTE GUIA: Ph. Dra MARIA EUGENIA GARCIA**

AGRADECIMIENTOS

Deseo dar mis agradecimientos a:

- ❖ DIOS por brindarme salud, fortaleza y esperanza
- ❖ A mi madre y tía y mi novia por darme su apoyo, comprensión y cariño
- ❖ Al IGEMA "Instituto de Investigaciones Geológicas y del Medio Ambiente" , Unidad Físico-Química/ Laboratorio Químico, por haberme proporcionado el material , equipó y el adiestramiento necesario para realizar el presente trabajo.
- ❖ Al Lic. Cristian Herbas por que, con su guía y su despendimiento de sus conocimientos y oportunos consejos permitieron desarrollar el presente trabajo.
- ❖ Al Lic. J. Cesar Calderon I. porque sin escatimar su tiempo me transmitió su experiencia y su amistad.
- ❖ A la Dra. María Eugenia García , por haberme prestado su colaboración en la elaboración del presente documento, con sus conocimientos.

Por todas estas personas e instituciones permitieron llegar a culminar el presente documento

RESUMEN

En este documento se presenta evidencias químico estadísticas del proceso de validación con el método de Curcumina, según el Estandar Method 580 B de análisis, para la determinación de Boro método utilizado y adaptado por el Lic. Cristian Herbas en el laboratorio y control de calidad del IGEMA “Instituto de Geología y Medio Ambiente”

Los parámetros que fueron evaluado son Selectividad, Linealidad, Precisión (repetibilidad, reproducibilidad) Exactitud, limite de detección, limite de cuantificación, robustez y otros parámetros.

Para lo cual se diseño un experimento que se inicia en preparar soluciones madre a partir de un standart de referencia con certificado de la National Institute for Standards, y de Salmuera sintetica standart de control certificada por una asociación de laboratorios y solución madre de ácido bórico; de cada una de los patrones preparados, se obtuvieron muestras con diferentes concentraciones, previa preparación de soluciones para la curva de calibración.

Todas las muestras fueron sometidas con indicador de curcumina (extracción en laboratorio) y desecadas por el lapso aproximado de dos horas para luego ser sometidas a un Espectrofotometro Lambda 850 Uv- visible .

En el tratamiento estadístico se empleo fundamentalmente la norma ISO 8402 e ISO 17025 con el empleo de regresión lineal, formulas, empleo de ANOVAS y otras formulas.

Determinándose por los resultados obtenidos que el método de la Curcumina empleado en el IGEMA es seguro y confiable.

También se determino que el tamaño de las capsulas empleadas en el método no influye en los resultados.

I N D I C E

1. INTRODUCCION	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Validación del método	3
2.1.1. Que es la validación de un método Analítico	3
2.1.1.1 METODO CUANTITATIVO	5
2.1.1.2 METODO CUALITATIVO	5
2.1.2. Cómo validar los métodos analíticos	6
2.1.2.1. Validación de métodos normalizados	6
2.1.2.2. Grado de validación	7
2.1.3. Importancia de las mediciones analíticas	7
2.1.4. El Deber Del Profesional Del Químico Analítico	8
2.1.5. Parámetros de validación de un método	9
2.1.5.1. Repetibilidad	9
2.1.5.2. Reproducibilidad	9
2.1.5.3. Elaboración De La Carta Control Analizando Una Muestra De Referencia	9
2.1.5.4. Participar en intercomparaciones	10
2.1.5.5. Intervalos de trabajo	11
2.1.5.6. Ámbito Lineal	11
2.1.5.7. Recuperación	12
2.1.5.8. Límites de Detección	13
2.1.5.9. Límite de Cuantificación	14
2.1.5.10. Robustez	15
2.1.5.11. Exactitud	16
2.1.5.12. Precisión	17
2.1.6. Incertidumbre De Los Resultados	18
2.1.6.1. Incertidumbre De Las Mediciones	18
2.1.6.2. Procedimiento General Para El Cálculo De La Incertidumbre	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GENERAL	20
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
4. METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	20
4.1. DESARROLLO DEL PROCESO DE VALIDACION	26
4.3.1. PLAN DE VALIDACION	26
4.3.1.1. RECURSOS	26
4.3.1.2. DISEÑO	26
4.3.2.2 Mediciones y cálculos	27
4.3.3. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD	27
4.3.4. EVALUACION DE LA PRECISION	28
4.3.4.1 Procedimiento para el cálculo de la linealidad	30

4.3.4.1 Procedimiento para el cálculo de reproducibilidad interna (Sw)	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
6. CONCLUSIONES	42
7. RECOMENDACIONES	43
8. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	43
ANEXOS	44

I N D I C E D E G R A F I C A S Y T A B L A S

Grafica N° 1 Validación del Método de determinación de Boro con Curcumina	25
Tabla N°1 Plan de validación de la determinación de Boro	26
Tabla N°2 Experimento de diseño	27
Tabla N° 3 De concentraciones leídas de acuerdo a diseño de pruebas experimentales	34
Tabla N° 4 Repetibilidad y reproducibilidad de las mediciones leídas	35
Tabla N° 5 Rectas de calibrado, coeficientes de regresión y porcentaje de linealidades	35
Tabla N° 6 Límite de cuantificación y de detección del blanco de control	36
Tabla N° 7 Límite de cuantificación y de detección	36
Tabla N° 8 Límite de cuantificación y de detección del SPYKE	36
Tabla N° 9 Concentración leída de las muestras (0,5ug/l) considerando el tiempo de desecado Comparacion de lotes 2 y 5	37
Tabla N° 9.1 ANOVA de la variación del tiempo de desecamiento	37
Tabla N° 10 Concentración leída de los Startd de control (0,25ul/L) de acuerdo a días	38
Tabla N° 10.1 ANOVA	38
Tabla N° 11 Concentración leída de los Startd de control (0,75ul/L) de acuerdo a días	39
Tabla N° 11.1 ANOVA de los lotes 2 y 5	39
Tabla N° 12 Concentración leída de los Startd de control (0,5ul/L) de acuerdo a días	39
Tabla N° 12.1 ANOVA de los lotes 2 y 5	39
Tabla N° 13 Evaluación de las concentraciones leídas respecto al tamaño de las capsúlas lotes 1 y 5 con (0,5ul/L)	40
Tabla N° 13.1 ANOVA	40
Tabla N° 14 Ecuaciones utilizadas	41

Tabla N° 15 Resultados de Repetibilidad y Reproducibilidad de acuerdo a diferentes autores	41
Tabla N° 16 Resultado final	42

A N E X O S

Análisis de Boro 11 de noviembre y grafica de regresión

Análisis de Boro 12 de noviembre y grafica de regresión

Análisis de Boro 15 de noviembre y grafica de regresión

Análisis de Boro 16 de noviembre y grafica de regresión

Análisis de Boro 17 de noviembre y grafica de regresión

Análisis de Boro 18 de noviembre y grafica de regresión

Análisis de Boro 22 de noviembre y grafica de regresión

Análisis de Boro 24 de noviembre y grafica de regresión

Tabla de concentraciones de acuerdo a diseño de pruebas experimentales

Tabla N° 1 Datos de Repetibilidad del proceso de validación Curcumina

Tabla N° 2 Datos de Reproducibilidad del proceso de validación Curcumina

VALIDACION DEL METODO CURCUMINA PARA LA DETERMINACION DEL BORO

1. INTRODUCCION

En la actualidad, en todo el mundo se realizan millones de determinaciones analíticas, donde se obtienen datos acerca de diferentes matrices y materiales: alimentos, textiles, materiales de construcción, etc. Los valores obtenidos son muy importantes para el comercio y también se relacionan con la vida y salud de la humanidad.

Básicamente, estamos hablando de determinaciones costosas, no sólo por ellas en sí, sino por las decisiones que se toman a partir de sus resultados. Así, es bien sabido que un pequeño error en el contenido de una sustancia en un dado producto puede traer cuantiosas pérdidas si el error es por defecto, o grandes reclamos si el mismo es por exceso. Y en lo relacionado a la protección de la salud y el medio ambiente, los errores pueden ser tan graves como para comprometer la vida de las personas.

Es por eso que, en todo el mundo, hay una creciente inquietud acerca de la forma de realizar las determinaciones analíticas, lo que implica cada vez mayores esfuerzos a fin no sólo de llevarlas a cabo correctamente, sino de que se pueda demostrar que los resultados obtenidos son confiables demostrar que sus métodos de análisis son los adecuados para cada situación concreta.

Para que un método se considere adecuado para brindar información útil acerca de cualquier problema analítico, deben determinarse las características de ese procedimiento, y debe además estimarse la incertidumbre del resultado brindado.

Actualmente, es cada vez más importante que los resultados de una medición analítica se expresen con su respectiva incertidumbre, como lo establece la norma ISO 17025. Indica cuánto puede alejarse un resultado del valor considerado como “valor verdadero”.

Los autores remarcan que, para garantizar condiciones adecuadas de calidad, “el primer cuidado del analista químico es cerciorarse de que sus resultados se encuentran bajo control estadístico”. Esto implica conocer y manejar adecuadamente los conceptos básicos de la estadística descriptiva. A lo largo de los diferentes ejemplos desarrollados en este libro, los mismos se irán definiendo y utilizando en forma práctica.

El Boro en la Naturaleza

El Boro es esencial para el crecimiento de las plantas, pero un exceso de éste en el agua de riego afecta su desarrollo, aunque algunas plantas presentan problemas en su crecimiento cuando las concentraciones son muy bajas, por lo general menores a 1 mg/L. El agua potable contiene concentraciones muy bajas de boro que se consideran inocuas para el ser humano. Sin embargo, cuando se ingieren cantidades altas de Boro por un tiempo prolongado, el sistema nervioso central puede verse afectado, ocasionando un síndrome que en medicina se denomina borismo. El boro se encuentra en forma natural en el agua pero se puede encontrar en concentraciones mayores debido a desechos de productos de limpieza e industriales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Que es la validación de un método Analítico

La validación es la formación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, que cumplen los requisitos particulares para un uso específico (*según Instituto de Normalización y Calidad (Bolivia), Requisitos Generales para la competencia Técnica de los Laboratorios de ensayo y de calibración NB-ISO – 17025:2005, La Paz, Bolivia*)

Validación es la confirmación mediante examen y aporte de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico previsto (ISO 8402, ISO 17025).

La validación del método es necesaria ya que permite conocer los parámetros del desempeño y proporciona un alto grado de confianza y seguridad en los resultados que se obtienen.

La validación es el proceso para establecer las características de funcionamiento y limitaciones del método y la identificación de influencias que pueden cambiar estas características; cuando se desarrolla sin un problema particular previsto. Está implícito en el proceso que el estudio para determinar los parámetros de desempeño se realiza usando equipos dentro de las especificaciones, trabajando correctamente y que se encuentre adecuadamente calibrado.

Al momento de validar un método analítico se requiere actuar mediante procedimientos correctos entre los que se incluyen; una buena organización funcional; personal adecuadamente adiestrado en la aplicación del método; instalaciones adecuadas y suficientes; equipos, reactivos y material de laboratorio apropiado y en perfectas condiciones para su uso;

métodos escritos, actualizados y aprobados. De esta forma se puede garantizar la calidad de los resultados obtenidos en el laboratorio.

Una vez desarrollado un método analítico, al igual que toda técnica analítica deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados producidos por el método son confiables.

En general, para validar existen 3 tipos de validación:

- **Validación Prospectiva:** es aquella validación realizada a métodos analíticos nuevos.
- **Validación Retrospectiva:** Para métodos analíticos antiguos, pero que se usan en forma rutinaria y que no han sido validados.
- **Revalidación:** repetición parcial o total de una validación debido a cambios efectuados, que puedan afectar a la capacidad del método validado.

De la misma forma el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo bajo estudio a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas de las observaciones hechas mientras proceda el estudio. *(Según Guerrero Postigo Hugo, Política sobre la Trazabilidad de los resultados de medición, La Paz, Bolivia, Instituto Boliviano de Metrología Dirección Técnica de Acreditación)*

La validación se puede realizar mediante estudios intralaboratorio o interlaboratorios:

- **Estudios Intralaboratorio:** este tipo de validación lo realiza un laboratorio individualmente, utilizando materiales de referencia, comparación con otro método, utilizando muestras blanco o muestras positivas fortificadas, etc.
- **Estudios interlaboratorios:** conjunto de mediciones a un nivel o varios niveles de concentración del analito problema, ejecutadas independientemente, por varios laboratorios, sobre muestras de un material dado.

Si el laboratorio acreditado o en proceso planea incluir en su alcance de acreditación un método normalizado, debe verificar su capacidad para aplicarlo correctamente. Cualquier cambio en el método (actualización, nueva edición, nueva tecnología) obliga al laboratorio a repetir el proceso de verificación y esta información debe estar disponible para los equipos de evaluación de la DTA durante las evaluaciones de supervisión o re acreditación.

Si un laboratorio acreditado o en proceso planea incluir en su alcance de acreditación un método que no es normalizado, debe validarlo. Durante los procesos se debe tomar en cuenta el uso previsto de los resultados por parte de los usuarios.

Los procesos de verificación o de validación deben estar concluidos antes que el laboratorio presente la solicitud de acreditación, ampliación de alcance o re acreditación, según se aplique en cada caso. Solo se acreditará los métodos de ensayo cuya verificación o validación se encuentre terminada.

La dirección técnica del laboratorio debe documentar las posibles desviaciones en la aplicación de un método normalizado y demostrar que estas diferencias no alteran la ejecución del ensayo, los resultados obtenidos o su aplicación. En caso que de no ser demostrado por el laboratorio, no se considera normalizado.

La dirección técnica del laboratorio debe asegurar que toda la información pertinente a los procesos de verificación o validación de métodos de ensayo o los registros generados como resultado de estos, para los equipos de evaluación de la DTA durante las evaluaciones de supervisión o re acreditación.

2.2. ASPECTOS IMPORTANTES EN LA VALIDACION

La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión, puede incluir procedimientos para el muestreo, manejo y transporte de muestras.

El laboratorio deberá validar:

- ✓ Métodos no estandarizados
- ✓ Métodos diseñados o desarrollados internamente
- ✓ Métodos estandarizados usados fuera del alcance propuesto
- ✓ Ampliaciones o modificaciones de métodos estandarizados (cuando se realizan algunos cambios en los métodos no estandarizados ya validados, se debe documentar la influencia de tales cambios, si es necesario, se debe efectuar una nueva validación)

La validación incluye:

- ✓ La especificación de los requisitos
- ✓ La determinación de las características de los métodos
- ✓ Una verificación de que se pueden cumplir los requisitos al usar el método
- ✓ Una declaración de su validez

La técnica para determinar el funcionamiento de un método puede ser una de las siguientes o su combinación:

- ✓ Calibración con el uso de normas o materiales de referencia
- ✓ Comparación de resultados obtenidos por otro(s) método(s)
- ✓ Evaluación sistemática de los factores que influyen en los resultados
- ✓ Evaluación de la incertidumbre de los resultados basados en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y la experiencia práctica.

El laboratorio deberá registrar:

- ✓ Los resultados obtenidos
- ✓ El procedimiento usado para la validación
- ✓ Una declaración acerca de que el método se ajusta al uso propuesto

Para las necesidades de los clientes deben ser relevantes el intervalo y la exactitud de los valores que se pueden obtener de los métodos validados, como son:

- ✓ La incertidumbre de los resultados
- ✓ Límite de detección
- ✓ Selectividad del método
- ✓ Linealidad
- ✓ Límite de repetibilidad y reproducibilidad
- ✓ Robustez contra influencias externas
- ✓ Sensibilidad cruzada contra interferencias de la matriz de la muestra

Conforme avance el desarrollo del método, se deben llevar a cabo revisiones regulares para verificar que se siguen cumpliendo las necesidades del cliente. Cualquier cambio en los requisitos que necesiten modificaciones en el plan de desarrollo debe ser aprobado y autorizado.

2.2.1 METODO CUANTITATIVO

A. Validación de métodos

Las características a determinar en un método de ensayo cuantitativo durante el proceso de validación son las siguientes:

- ✚ Repetibilidad
- ✚ Reproducibilidad interna o precisión intermedia
- ✚ Reproducibilidad
- ✚ Rango lineal
- ✚ Límite de detección (cuando sea aplicable)
- ✚ Límite de cuantificación (cuando sea aplicable)
- ✚ Especificada (cuando sea aplicable)
- ✚ Sesgo
- ✚ Robustez (cuando sea aplicable)
- ✚ Incertidumbre

2.1.2 METODO CUALITATIVO

A. Validación de métodos

Las características a determinar en un método de ensayo cualitativo durante el proceso de validación son las siguientes:

- ✚ Especificidad
- ✚ Límite de detección (sensibilidad)
- ✚ Falsos positivos
- ✚ Falsos negativos
- ✚ Exactitud relativa (si fuera necesario).

3. CÓMO VALIDAR LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Para el cumplimiento de los requisitos de validación de los métodos analíticos del laboratorio, se plantea a continuación por qué validar los métodos normalizados y se dan las pautas básicas para llevar a cabo la validación.

3.1 Validación de métodos normalizados

Si bien la norma ISO/IEC 17025 no requiere la validación de los métodos normalizados aplicados en un laboratorio específico, se establece que se deberán obtener datos sobre el rendimiento de su propio uso, es decir que resulta apropiado contar con algún grado de validación.

Con frecuencia se asume que los métodos normalizados se pueden aplicar directamente y que se alcanzarán los niveles de rendimiento publicados por quien sea que lo utilice. Se debe al menos practicar con el método a través de un proceso de capacitación para alcanzar una competencia aceptable.

Para métodos normalizados debe verificarse si la información existente sobre su validación es adecuada para el propósito requerido y si el laboratorio es capaz de alcanzar el nivel de rendimiento que se reporta como posible. Ante los cambios de analista es más relevante controlar el rendimiento, respecto a lo que se requiere y no según la información publicada en el método, se debe verificar dicha información.

De acuerdo con lo anterior, un método debe validarse cuando:

- ✚ Verificar que los parámetros de rendimiento son adecuados para usarlos en un problema analítico específico
- ✚ Se incorporen mejoras en el método
- ✚ Se amplíe el alcance del método para nuevas matrices
- ✚ Que el control de calidad indique que el método está cambiando con el tiempo
- ✚ Que el método se use en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o instrumentos

3.2. Grado de validación

Un laboratorio debe establecer el grado de validación requerido de acuerdo con las necesidades del cliente, con las políticas de calidad, con la naturaleza de los cambios realizados a un método previamente validado, o con las metas de calidad que se haya trazado como parte de los procesos de mejoramiento continuo del sistema de calidad.

El laboratorio debe decidir qué parámetros de rendimiento del método debe caracterizar, teniendo en cuenta las limitaciones de tiempo y costos, además de los requerimientos del cliente, la experiencia con el método y si será de aplicación rutinaria o no. *Por ejemplo*, si un método se aplica solo en casos esporádicos, puede ser mejor subcontratar ese análisis antes que incurrir en los gastos que la validación representa.

No necesariamente todos los parámetros de validación que se describen más adelante son aplicables para todos los métodos. *Por ejemplo*, para validar métodos normalizados en las condiciones de un laboratorio en particular que no lo aplicará para matrices complejas o poco comunes, pueden no ser de interés los aspectos de selectividad y especificidad, por cuanto quienes han desarrollado y/o homologado el método ya han hecho (en la mayoría de los casos) un trabajo exhaustivo acerca de las interferencias y la manera de eliminarlas.

Por otra parte, según el principio físico o químico de la medición algunas variables no son susceptibles de ser obtenidas porque no aplican o porque no es viable contar con un patrón de comparación confiable (*según ASOCIACION ESPAÑOLA DE FARMACEUTICOS DE LA INDUSTRIA, 1990, "Validación de Métodos Analíticos", Edición HEWLETT PACKARD, España*).

3.3. Importancia de las mediciones analíticas

Millones de mediciones analíticas se realizan diariamente en miles de laboratorios alrededor del mundo. Hay innumerables razones para realizar estas mediciones, *Por ejemplo*:

- ❖ Como una forma de evaluar bienes para propósitos de comercio.
- ❖ Apoyo a la salud.
- ❖ Verificar la calidad del agua para consumo humano, etc.

Virtualmente cada aspecto de la sociedad está apoyado de algún modo por las mediciones analíticas. El costo de realizar estas mediciones es elevado y costos adicionales surgen de las decisiones hechas en base a los resultados.

Por ejemplo, si las pruebas muestran que un alimento no es adecuado para el consumo pueden resultar demandas por compensación; pruebas que confirmen la presencia de drogas prohibidas podrían ocasionar multas, encarcelamiento, etc. Claramente es imposible determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar. (según Garfield Frederick M. 1993, "Principios de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos", Edición Española, A.O.A.C. INTERNATIONAL, E.E.U.U).

3.4. El Deber del profesional químico analítico

Si el resultado obtenido no es confiable entonces tiene poco valor. Cuando un cliente encarga un trabajo analítico a un laboratorio tiene un conocimiento experto que el cliente no tiene por sí mismo. El "cliente" espera confirmar en los resultados reportados y por lo general solo cuestiona cuando surge una disputa. Así el laboratorio y su personal tienen una clara responsabilidad para justificar la confianza del cliente proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema, en otras palabras, resultados demostrables que son "adecuados para su propósito". La validación del método permite a los químicos demostrar que el método es adecuado para su propósito.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para cualquier decisión basada en él, pueda tomarse con confianza. Asimismo, el desempeño del método debe ser validado y la incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método. (Según *Métodos de Análisis, Instituto de Nutrición de CENTRO América y Panamá, Laboratorios de Química y Bioquímica, 1992*)

4. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

A continuación se hace una breve descripción de los parámetros que permiten evaluar el rendimiento de un método y se hace una indicación de qué analizar para evaluar cada parámetro.

4.1. Selectividad/Especificidad

Aún cuando los términos se han empleado indistintamente, la selectividad suele ser el término más apropiado para definir el grado en que un procedimiento puede determinar con exactitud un analito en presencia de dos o tres componentes en una matriz dada. La selectividad se evalúa de forma práctica estudiando las interferencias de mayor potencialidad a partir del conocimiento de la composición promedio de la matriz de las muestras a analizar, las referencias al respecto y la propia experiencia del analista.

La selectividad de un método se investiga usualmente estudiando su habilidad de medir el analito de interés en una muestra a la que se han añadido posibles interferentes deliberadamente. Cuando no es posible definir claramente qué interferentes están presentes, la selectividad del método puede ser investigada comparando los resultados del método que se evalúa con los obtenidos por otro método o técnica independiente.

4.2. Repetibilidad

Precisión en condiciones de repetibilidad, condiciones bajo las cuales se obtienen resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, por el mismo operador usando el mismo equipo en intervalos de tiempos cortos. (*Según ANALYTICAL Chemistry in Europe. Guía para la validación de métodos y Tópicos Relacionadas-Guía EURACHEM. Traducción México*). (Ver tablas)

4.3. Reproducibilidad

La precisión en condiciones de reproducibilidad, bajo las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, en un material idéntico, en diferentes laboratorios por diferentes operadores usando diferentes equipos.

Una afirmación válida de reproducibilidad requiere de la especificación de las condiciones modificadas, puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión del resultado. (*Según ANALYTICAL Chemistry in Europe. Guía para la validación de métodos y Tópicos Relacionadas-Guía EURACHEM. Traducción México*).

Su determinación es posible, solamente cuando los laboratorios cercanos utilizan el método de ensayo y es posible una comparación interlaboratorios o cuando se realiza un ensayo de intercomparación.

De la misma forma que en la repetibilidad se calcula a través de la desviación estándar pero de los resultados de la comparación.

4.4. Elaboración de la Carta Control analizando una Muestra de Referencia

La elaboración de una carta control es el método de elección para el control interno de rutina. Las cartas control no son adecuadas para métodos que se utilicen menos de tres veces al mes. Para ellos se analiza una muestra de control (muestra de retención de una muestra real o un material de referencia certificada o no) junto con las muestras de análisis y el resultado se anota en la carta control. Las variantes más importantes son:

- ❖ Carta control de un solo valor.
- ❖ Carta control del blanco.
- ❖ Carta para recuperación.

El procedimiento es en principio el mismo para todos los casos. La diferencia se encuentra en el factor que se controla (contenida del analito, blanco o bien el porcentaje de recuperación).

Una gráfica de control es una comparación gráfica de los datos de desempeño de proceso con los "límites de control estadístico" calculados, dibujados como rectas limitantes sobre la gráfica. Los datos de desempeño de proceso por lo general consisten en grupos de mediciones que vienen de la secuencia normal de producción y preservan el orden de los datos. Las gráficas de control constituyen un mecanismo para detectar situaciones donde las causas asignables pueden estar afectando de manera adversa la calidad de un producto. Cuando una gráfica indica una situación fuera de control, se puede iniciar una investigación para identificar causas y tomar medidas correctivas.

4.4.1. Participar en Intercomparaciones

Deben tomarse en cuenta los siguientes, puntos:

- ❖ Las intercomparaciones dan información valiosa solamente cuando las muestras se manejen de la misma manera que las muestras de un análisis normal.

- ❖ Las intercomparaciones se realizan en intervalos de tiempos largos. De ahí que no sean suficientes para el aseguramiento de calidad rutinario, sino que funcionan como complemento de las cartas de control, *Por ejemplo*.
 - ✓ Entre más distintas sean las matrices de las muestras de interpretación y las de análisis, menos información dan las intercomparaciones para el análisis rutinario.
- ❖ La interpretación de los resultados de intercomparación debe realizarse con el mayor cuidado, especialmente en el caso de resultados aberrantes o desviaciones, para obtener las mayores posibilidades de mejora.
- ❖ Si no se organizan intercomparaciones oficiales o prevenientes de proveedores reconocidos, se pueden realizar en un lugar comparaciones con otros laboratorios. Para la realización y el tratamiento estadístico de las intercomparaciones debe aceptarse la norma ISO: 5725-1.

4.5. Intervalos de Trabajo

El ámbito de trabajo de un método analítico es el intervalo entre los niveles más bajos y más altos de concentraciones que ha sido demostrado que puede ser determinados con la precisión y la exactitud requeridos para una determinada matriz.

- ❖ Se preparan un blanco y seis concentraciones diferentes del analito a determinar o seis muestras fortificadas a varias concentraciones.

Preferiblemente las soluciones se deben preparar independientemente y no a partir de disoluciones sucesivas del material de referencia.

- ❖ Se presenta la señal obtenida en función de la concentración y se determina el ámbito lineal y los extremos superiores e inferiores del intervalo de trabajo.
- ❖ Se repiten los pasos a y b dentro del ámbito lineal y se efectúa un estudio estadístico de los resultados obtenidos.
- ❖ Es preferible trabajar dentro del ámbito lineal.
- ❖ Para la curva de la calibración, es conveniente utilizar polinomio de ajuste de grado 2 como máximo.

4.6. **Ámbito lineal**

Es la parte de la función de calibración en la que la señal obtenida para el analito responde “linealmente” a la concentración. Se verifica mediante la obtención de coeficientes de correcciones mayores o iguales a 0,995.

4.6.1. **Linealidad**

La linealidad de un método analítico se refiere a la capacidad de un método de obtener resultados linealmente proporcionales entre la concentración de analito y su respuesta. Este parámetro se considera como un criterio inicial de validación, y es necesario verificarlo si se va a trabajar con un sólo estándar en las determinaciones de rutina. Al trabajar con estándares múltiples se puede aceptar métodos no lineales,.

Junto con establecer la linealidad del método se puede estimar el rango de linealidad del método, es decir, el intervalo de concentraciones para el cual el método ha demostrado responder en forma lineal y dentro del cual se puede estimar la cantidad de analito por interpolación.

Para determinar la linealidad se prepara una serie de, al menos, cinco diluciones de un estándar, las cuales deben estar de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra. Se efectúa el análisis siguiendo exactamente el procedimiento descrito.

En procedimientos cromatográficos se recomienda efectuar las inyecciones por triplicado, a no ser que se use un patrón interno.. Para Absorción atómica a lo menos el promedio de 3 lecturas por concentración

4.7. **Recuperación**

El porcentaje de recuperación es el coeficiente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra; en el caso ideal, se obtiene un cien por ciento.

En mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analito en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores.

Para calcular la recuperación se determina la función de recuperación para lo cual se agregan a la muestra antes del tratamiento cantidades sucesivas del analito y se determinan contra una calibración base. Las cantidades encontradas se grafican contra las agregadas.

En caso ideal los valores caen en la bisectriz de la incertidumbre de los resultados. En caso de recuperación es del 100% y es suficiente una calibración base, analito en un disolvente.

Si los valores se salen de este marco, se deben hacerse una calibración a partir de una matriz y analito en un disolvente para eliminar en efecto d la matriz.

Variando el tiempo de adición del analito (*Por ejemplo*, antes y después de un paso de concentración) puede determinarse la recuperación para pasos aislados de un procedimiento.

En caso de que la matriz introduzca muchas variaciones debe utilizarse en un lugar de calibración con la matriz de la muestra el método del agregado patrón (o de las adiciones estándar), el cual consiste en agregar concentraciones sucesivas de analito a la muestra.

Al graficar el aumento de la señal contra la cantidad adicionada se obtiene una función de calibración, a partir de la cual puede obtenerse la cantidad del analito presente en la muestra original.

Este método conduce a un aumento claro en la concentraron del analito. Para mantener el error lo más pequeño posible, las cantidades añadidas deben ser tales que no sobrepasen el intervalo de trabajo.

La recuperación se calcula de la siguiente forma:

$$RR = \frac{\text{Valor Obtenido}}{\text{Valor Re ferencia}} \times 100$$

También se debe evaluar la capacidad de un método de determinar todo el analito presente en las muestras, (algunos solo determinan algunas especies del analito). La mejor manera de determinar la eficacia de extracción del método es adicionar diferentes concentraciones del analito a las muestras y procesarlas por el método completo. Aunque es la manera más común de cuantificar la recuperación, el analito adicionado puede no enlazarse tan fuertemente a la matriz como el presente de manera natural y dar como resultado la impresión de una elevada eficacia de extracción. La alternativa es efectuar el proceso con MR en la matriz deseada, si existen; si estos MR han sido generados mediante caracterización de muestras naturales el estudio de recuperación representará con mayor precisión la extracción de muestras reales.

4.8. Límites de Detección

“El menor contenido que puede ser medido con una certeza estadística razonable” (*ANALITYCAL Chemistry in Europe. Guía para la validaron de métodos y Tópicos Relacionadas-Guía EURACHEM. Traducción México*).

Es necesario solamente cuando deben tomarse decisiones cuantitativas, es decir, si el analito está presente o no. Los procedimientos de determinación posible son:

- ✚ 3 veces la dispersión, expresada como desviación estándar, a partir de mediciones repetidas del blanco (valido solamente para procedimientos con blanco), o de soluciones del analito en agua pura.
- ✚ 2,5 a 5 veces la relación señal / ruido del instrumento de medida a utilizar.

En algunos casos es suficiente brindar una indicación del nivel en el que la detección se torna menos confiable (promedio de lectura de blancos del método más tres veces su desviación estándar), pero resulta conveniente aplicar una metodología más exacta; en cualquier caso se recomienda informar el mecanismo seleccionado (IUPAC, 1978; IUPAC, 1983; Analytical Methods Committee, 1987)

4.9. Límite de Cuantificación

“La menor concentración de un analito que puede ser determinada con una precisión aceptable (repetibilidad) y exactitud bajo las condiciones establecidas de la prueba” (*ANALYTICAL Chemistry in Europe. Guía para la validaron de métodos y Tópicos Relacionadas-Guía EURACHEM. Traducción México*).

Se emplea cuando se realizan determinaciones de analito a nivel de trazas.

En esencia se encuentran en la literatura dos formas para determinarla:

- ✚ De manera análoga al límite de detección, en el cual el límite de cuantificación es como mínimo tres veces el límite de detección, según cada caso.
- ✚ Por determinar de una incertidumbre de los resultados máximo permisible (dada como dispersión relativa del 30%, *Por ejemplo*) por medio de la determinación de la concentración más pequeña que se puede medir con este valor máximo. Este límite de cuantificación, es por tanto, dependiendo de las exigencias de la incertidumbre.

El LC es la mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud. Varias convenciones lo definen como la concentración de analito correspondiente al valor del blanco más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media de blancos.

Ninguno de los dos límites representan niveles en los que la cuantificación es imposible; es simplemente una región en que la magnitud de las incertidumbres asociadas es de valor

semejante al resultado real. El límite de cuantificación no se debe determinar por extrapolación por debajo del menor estándar analizado.

Intervalo de trabajo e intervalo lineal

Se debe determinar el intervalo de concentraciones de analito dentro del cual se puede aplicar el método; esto se refiere a las concentraciones efectivamente medidas y no a las muestras originales. En el extremo inferior del intervalo de concentraciones el factor limitante es el valor del límite de detección; en el extremo superior el alcance depende de la respuesta del instrumento o de condiciones analíticas establecidas como óptimas.

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un rango de respuesta lineal (intervalo lineal); los cálculos de regresión por si solos pueden ser insuficientes para establecer la linealidad; se debe complementar con una inspección visual de la línea y los residuos. En general los controles de linealidad requieren efectuarse con al menos 10 concentraciones o valores diferentes.

La evaluación del intervalo de trabajo y del intervalo lineal permiten definir qué grado de calibración se requerirá al usar el método; en el intervalo lineal puede ser suficiente un punto de calibración para establecer la pendiente de la línea de calibración. En el resto del intervalo de trabajo será necesaria la calibración en múltiples puntos, preferiblemente más de seis. La respuesta del instrumento a la concentración no tiene que ser perfectamente lineal para que el método sea eficaz, pero la curva debe ser repetible cotidianamente. El intervalo de trabajo y el intervalo lineal pueden ser diferentes para matrices diferentes según el efecto de las interferencias que aporte la matriz.

4.9.1. Sensibilidad

Es la propiedad del método que demuestra la variación de respuesta en función de la concentración del analito. Puede ser expresada por la pendiente de la recta de regresión de calibración.

4.10. Robustez

Estudio en el laboratorio para estudiar el comportamiento de un proceso analítico cuando se efectúan pequeños cambios en el ambiente y/o en las condiciones de operación similares a aquellas que pudieran surgir en las diferentes ambientes de prueba. La prueba de robustez

permite obtener información de los efectos de cambios menores de una forma rápida y sistemática.

El objetivo de la prueba de robustez es de optimizar el método analítico y describir que bajo las condiciones establecidas (incluidas sus tolerancias) se pueden obtener resultados suficientemente exactos con una alta seguridad, de manera que el procedimiento funcione confiablemente si se utiliza en otros laboratorios o después de intervalos largos de tiempo.

Un método es más robusto entre menos dependan los resultados del ensayo de una modificación en las condiciones de este.

Al desarrollar un método analítico debe determinarse la modificación de los resultados por el cambio en las condiciones del ensayo.

Modificaciones pequeñas a estas condiciones afectar muy poco o nada el resultado del análisis.

Para determinar la robustez de un procedimiento analítico puede modificarse algunas condiciones del análisis y seguir las afecciones a los resultados o a los parámetros estadísticos.

Un aspecto importante de la robustez es la estabilidad de todas las muestras estándares y reactivos, tanto en el almacenamiento como durante las condiciones de ensayo. En este caso pueden ser parámetros a probar:

- ❖ Sensibilidad a la temperatura.
- ❖ Sensibilidad a la luz.
- ❖ Hidrólisis *Por ejemplo* por la humedad del aire.
- ❖ Facilidad de oxidación.
- ❖ Descomposición química.
- ❖ Efectos catalíticos, *Por ejemplo* por las paredes del contenedor.
- ❖ Adsorción, *Por ejemplo* durante la filtración de disoluciones por trazas.
- ❖ Precipitación, *Por ejemplo* al dejar mucho tiempo una disolución.

4.11. Exactitud

Proximidad de concordancia entre el resultado y un valor verdadero del mensurando.

Para evaluación de este parámetro se realiza el análisis de un material de referencia certificada preferentemente con una matriz semejante a la de la muestra. Solo en el caso de no existir un material adecuado se puede realizar un ensayo de recuperación.

Cuando sea posible se realizan un mínimo de diez repeticiones del ensayo tres días consecutivas.

El módulo de la diferencia da como resultado el sesgo del método. También la exactitud, que es la cercanía de un resultado al valor verdadero, lo que se evalúa en la validación por comparación con los valores de referencia de un material caracterizado (material de referencia, MR), o con valores tomados de otro método caracterizado. Los valores de referencia deberían ser trazables a las normas internacionales; los materiales de referencia certificados (MRC) generalmente se aceptan como trazables. Es ideal que el MR sea de matriz natural lo más similar posible a las muestras de interés. En caso contrario los MR pueden ser:

- Preparados por adiciones de MRC puro u otros de pureza y estabilidad adecuadas a muestras típicas, o
- Muestras típicas bien caracterizadas, controladas para verificar su estabilidad y pasadas por un proceso interno de control de calidad.

Usualmente la aplicación de un método involucra un sesgo combinado: el sesgo del método que surge de errores sistemáticos inherentes a él (sin importar el laboratorio que aplica el método) y el sesgo del laboratorio que surge de errores sistemáticos característicos del laboratorio. El sesgo obtenido en una validación debe compararse con el sesgo reportado para el método y el obtenido por varios laboratorios que utilicen el mismo método (ISO, Guía 32; ISO, Guía 33; ISO, Guía 43-1).

Exactitud (Veracidad + Precisión)

La exactitud (de acuerdo a la definición de ISO 3534-1) expresa la proximidad de un resultado al valor verdadero. La validación busca cuantificar la exactitud de los resultados teniendo en cuenta tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios que puedan afectarlos. La exactitud tiene en cuenta dos componentes:

“veracidad y precisión”. Existe además otra expresión de la exactitud que es “la incertidumbre de las mediciones”.

Es más simple no utilizar el término exactitud, ya que puede confundirse con otras definiciones, es mejor en su lugar hablar de sus componentes: veracidad y precisión, asociados al error total, el máximo sesgo que puede tener un dato.

$$\text{Exactitud} = \text{Incertidumbre} = \text{Veracidad} + \text{Precisión}$$

4.12. Precisión

La precisión es la medida de cuán cerca o dispersos están los resultados unos de otros, y se expresa normalmente como la desviación estándar o desviación estándar relativa, ya que se acepta la varianza como el mejor indicador de la dispersión: a menor varianza, mayor precisión.

Las dos medidas más comunes de la precisión, que generalmente se define en términos de la desviación estándar o el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) son la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad, que es la precisión más pequeña esperada, da una idea de la variabilidad que se espera cuando un método es aplicado por un solo analista en un equipo durante un periodo corto (análisis por duplicado). En el otro extremo, la reproducibilidad, que representa la variabilidad que se obtiene cuando una muestra es analizada por varios laboratorios tiene un valor más amplio. La precisión intermedia y más útil en casos específicos se obtiene cuando se evalúa la reproducibilidad entre analistas en un mismo laboratorio.

La repetibilidad y la reproducibilidad generalmente dependen de la concentración del analito y por lo tanto se deben determinar para diferentes concentraciones, estableciendo, cuando sea relevante, la relación entre la concentración y el coeficiente de variación.

A partir de las desviaciones estándar de repetibilidad (S_r) y reproducibilidad (S_w) se pueden calcular los límites de repetibilidad, r , y de reproducibilidad, R , que permiten al analista saber si la diferencia entre análisis duplicados es significativa, en las respectivas condiciones.

Para estimar la precisión se pueden considerarse distintas opciones:

- Utilizar replicados de una misma muestra; se recomienda un número de alrededor de 20 para calcular la desviación estándar.
- Cuando se usa en el tiempo una muestra de control, se recomienda obtener como mínimo 30 datos para determinar su promedio y la desviación estándar.
- A través de un diseño experimental realizado a tal efecto, como se desarrollará más adelante en un ejemplo específico para el cálculo de incertidumbre. Tanto la repetibilidad como la reproducibilidad suelen depender de la concentración del analito y cuando esto ocurre, esta dependencia debe ser determinada si es significativa. La desviación estándar relativa es más útil en estos casos ya que en su cálculo está incluida la concentración.

4.13. Veracidad (Sesgo)

La veracidad del método expresado como sesgo relativo %, $s\% = (Vv - Vo) \cdot 100 / Vv$; donde Vv es el valor verdadero y Vo el valor obtenido. La veracidad del método es una expresión de cuán cerca está la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) del valor verdadero. La veracidad se expresa normalmente en términos del sesgo. El cálculo del sesgo puede hacerse de diferentes maneras:

- Utilizando materiales de referencia certificados
- Validando por comparación con otro método ya validado
- Participando en estudios colaborativos

En el caso de no disponer de las alternativas anteriores, se recomienda usar para comparación las muestras utilizadas n pruebas de desempeño, de las cuales se disponga de los resultados del ejercicio interlaboratorio.

En la práctica para establecer la veracidad se efectúa la comparación de la media de los resultados del método con valores conocidos, o sea ésta se establece contra un valor de referencia. Hay dos formas para hacerlo: comparando con Materiales de Referencia Certificados (MRC) o con los resultados obtenidos por un método estándar. Los Materiales de Referencia Certificados y los valores de referencia obtenidos por métodos estándar deben ser absolutos (trazables al SI).

Un Material de Referencia Certificado es una matriz natural certificada lo más similar posible a las muestras de interés.

Como la disponibilidad de tales materiales es limitada se pueden obtener Materiales de Referencia para la validación:

- Adicionando a un material típico materiales de referencia certificados puros u otros materiales de pureza y estabilidad adecuadas.
- Reteniendo materiales caracterizados y chequeados “in-house” para garantizar su estabilidad durante el Control de Calidad.

Para fines regulatorios deben ser utilizados Materiales de Referencia Certificados reconocidos internacionalmente, mientras que para trabajos de menor alcance o no críticos suele ser suficiente el uso de estándares preparados en el Laboratorio o por adición.

Para verificar contra un método alternativo, se comparan los resultados de ambos métodos en las mismas muestras. Las muestras deben ser preferentemente MRC, estándares “in-house”, o muestras típicas. Es mejor el empleo de los MRC por su probada estabilidad y homogeneidad y pueden mostrar la presencia de sesgo respecto al SI, pero estos son caros y a veces no se encuentran con las características exactas de las muestras.

4.14. Incertidumbre de los Resultados

La Incertidumbre es “un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente podrían ser atribuidos al mensurando”.

Es necesario aclarar que la incertidumbre es un sólo parámetro (usualmente la desviación estándar o el intervalo de confianza) que expresa el rango de valores posibles en base al resultado de las mediciones. La estimación de la incertidumbre toma en cuenta todos los efectos que actúan sobre el resultado; las incertidumbres asociadas con cada efecto deben ser combinadas de acuerdo a procedimientos bien establecidos, como se verá más adelante.

Es un parámetro de identificación central e inalienable para preparar una acreditación NB-ISO-IEC 17025. Incluye los errores sistemáticos y aleatorios. Para su determinación y especificación existen varias posibilidades:

- Indicación acerca de la repetibilidad.

- Resultados de las cartas de control.
- Evaluación por miembros del personal experimentado, competentes por lo tanto autorizados.

4.15. Incertidumbre de las Mediciones

“Parámetros, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos al mensurado”.

La medición de la incertidumbre es un parámetro simple (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) expresando el intervalo de posibles valores sobre la base de la medición del resultado. La estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen el resultado, las incertidumbres asociados cada efecto son combinados de acuerdo a procedimientos bien establecidos.

La estimación de la incertidumbre en la química analítica debe considerar:

- La precisión total del método en un periodo largo de tiempo.
- El sesgo y su incertidumbre incluyendo la incertidumbre estadística asociada en las mediciones del sesgo y la incertidumbre del material de referencia o del método.
- Incertidumbre de calibración. Cuantas más calibraciones de equipo existan más pequeñas serán las incertidumbres, comparadas precisión total y la incertidumbre en el sesgo, por lo que solo se necesitaran verificarse.
- Cualquier efecto significativo que opere junto con lo anterior *Por ejemplo* la temperatura o los intervalos de tiempos permitidos por el método puede no ser ampliamente practicado en un ejercicio de validación y su efecto puede necesitar agregarse.

Dichos efectos pueden ser cuantificados por estudios de robustez o estudios relacionados que establecen la medida de un efecto determinado sobre un resultado.

4.15.1. Procedimiento General para el Cálculo de la Incertidumbre

1. Expresar la magnitud de salida que se está midiendo o la característica que está ensayando y en función de las magnitudes de entrada X_i .
2. Aplicar la ley de propagación de las incertidumbres a la expresión anterior para así relacionar la incertidumbre típicas o típicas combinadas de esta magnitud de entrada X_i .
3. Estimar cada contribución a la incertidumbre $U(X_i)$.

4. Aplicando la expresión obtenida en el paso dos, estimar $U(y)$ a partir de los valores de los valores calculados para cada una de las contribuciones que influyen en ella.
5. Calcular el número de grados de libertad efectivos.
6. Calcular la incertidumbre expandida U múltiple cuando $u(y)$ por el factor de cobertura k determinando: $U = k u(y)$.
7. Considerar el efecto de las correcciones no realizadas, si las hubiera, mediante $U = k u(y) + C_{\max}$.

5. COMPARACIÓN DE UNA MEDIA EXPERIMENTAL CON UN VALOR CONOCIDO

Al hacer un contraste de significación se prueba la veracidad de una hipótesis denominada hipótesis nula, denotada por H_0 . Adoptamos como hipótesis nula aquella mediante la cual un método analítico no está sujeto a errores sistemáticos. El término nulo se emplea para indicar que no hay otra diferencia entre el valor observado y el conocido que la atribuible a la variación aleatoria. Suponiendo que esta hipótesis nula es verdadera, la teoría estadística se puede emplear para calcular la probabilidad de que la diferencia observada (o una superior a ella) entre la media muestral, y el verdadero valor se deba solamente a errores aleatorios. Cuanto más pequeña sea la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar, menos probable será que la hipótesis nula sea verdadera. Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir, 0.05 ó 5%).

En este caso se dice que la diferencia es significativa al nivel 0.05 (ó 5 %). Utilizando este nivel de significación se rechaza, en promedio, la hipótesis nula, aunque sea de hecho verdadera, 1 de cada 20 veces. Es importante tener en cuenta que si se acepta la hipótesis nula no significa que se haya probado que sea verdadera, sólo que no se ha demostrado que sea falsa.

Para decidir si la diferencia entre \bar{x} y μ es significativa, es decir para contratar H_0 : la media de la población = μ , se calcula el estadístico t :

$$t = (\bar{x} - \mu) \sqrt{n/s}$$

Donde \bar{x} =media muestral, s = desviación estándar muestral y n = tamaño muestral

Si $|t|$ (es decir, el valor calculado de t sin tener en cuenta el signo) es mayor que un cierto valor crítico entonces se rechaza la hipótesis nula. El valor crítico de t para un nivel de significación

concreto se encuentra en la Tabla A.2. Por ejemplo, para un tamaño muestral de 10 (es decir, 9 grados de libertad) y un nivel de significación de 0.01 el valor crítico es $t_9 = 3.25$, donde, como en el Capítulo 2, el subíndice se utiliza para indicar el número de grados de libertad.

5.1. Datos anómalos

Es muy frecuente encontrarse con la situación en que uno (o posiblemente más) de los resultados que se obtienen de un conjunto de medidas difiera del resto de forma inexplicable. Por esta razón estas medidas se denominan resultados anómalos «<outliers»¹. En algunos casos, un resultado anómalo puede atribuirse a un error humano. Por ejemplo, si se obtienen los siguientes resultados en una valoración: 13.12, 13.15, 13.13, 14.14, 13.12 ml entonces es casi seguro que el cuarto valor corresponda a un error en la escritura y que debería leerse 14.14. Sin embargo, incluso cuando los datos que son obviamente erróneos hayan sido eliminados o corregidos, todavía quedan datos que pudieran ser anómalos. ¿Deberíamos conservarlos, o deberíamos buscar algún procedimiento para comprobar estadísticamente si deben ser rechazados o no? Obviamente, los valores finales de la media y la desviación estándar dependerán de si los datos anómalos han sido rechazados o no.

Puesto que la discusión sobre la precisión y la exactitud de un método dependen de estos valores finales, tiene que quedar claro siempre si los datos anómalos han sido rechazados y, si es así, por qué

5.1.1. Contraste de Grubbs

Que compara la desviación entre el valor sospechoso y la media muestral, con la desviación estándar de la muestra. Este contraste lo recomienda la ISO.

Para usar el contraste de Grubbs² para un valor anormal, esto es para probar H_0 todas las medidas proceden de la misma población, se calcula el estadístico G: donde s se calcula incluyendo el valor sospechoso.

$$G = |\text{valor sospechoso} - \bar{x}|/s$$

El contraste supone que la población es normal.

Los valores críticos de G para $P = 0.05$ se encuentran en la Tabla A.6. Si el valor de G calculado supera al valor crítico, se rechaza la hipótesis de que el dato sospechoso no es anómalo.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental es el plan usado en la experimentación. Este comprende la asignación de tratamientos a las unidades experimentales y una cabal comprensión del análisis estadístico a realizarse una vez que se disponga de los datos experimentales.

Algunos autores consideran que Diseños Experimentales es un arte y una ciencia. El diseño de experimentos es por tanto la secuencia de pasos previstos para recolectar los datos que permitan un análisis objetivo que conduzca a conclusiones válidas con respecto al problema planteado.

6.1. Relación Entre Estadística Y Diseño Experimental

La estadística ingresa en el diseño experimental porque, aun en los experimentos mejor planeados uno no puede controlar todos los factores, además uno desea hacer inferencias sobre la base de los datos de la muestra observada. Para ser de utilidad práctica, estas inferencias inciertas deben estar acompañadas de márgenes de probabilidad que expresan el grado de confianza que tiene el investigador en tales inferencias. Para ello los experimentos deben ser diseñados de acuerdo con los principios de la ciencia estadística.

6.2. Error Experimental

El error experimental es una medida de la variación debida a causas que no se pueden precisar y que existe entre dos o más unidades experimentales sometidas al mismo tratamiento.

El error experimental, no es sinónimo de equivocación sino que incluye todos los tipos de variación extraña o inexplicable.

Se puede concluir que el error experimental es la variabilidad entre unidades experimentales dentro de un tratamiento, por ejemplo: en un experimento la variabilidad entre veinte unidades experimentales es la variabilidad total, pero solamente la variabilidad entre cinco unidades experimentales sometidas a un mismo tratamiento constituye el error experimental (con este valor se compara la variabilidad entre tratamientos).

El aplicar los tratamientos específicos a las unidades experimentales, en los resultados se manifiestan variaciones, las cuales se clasifican en dos grandes grupos: Variaciones pertinentes y variaciones no pertinentes.

6.3. Análisis de La Varianza

El análisis de la varianza (abreviado con frecuencia como ANOVA) es una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. Para los ejemplos concretos anteriores, se puede utilizar para separar la variación debida al error aleatorio de cualquier otra variación que venga provocada al cambiar el factor de control. De este modo se puede contrastar si una alteración del factor de control conduce a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

A fin de separar las diversas causas de variación, se sigue los métodos siguientes:

- Separar los grados de libertad (G.L.) para cada factor o causa de variación.
- Calcular la suma de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones con respecto a la media, para causa de variación.
- Calcular las varianzas o cuadrados medios para cada factor de variación
- Probar hipótesis por medio de la prueba de “F” o relación de varianzas.
- Comparar las medias de los tratamientos (discriminación de variables). Cuando hay únicamente dos tratamientos, si la “F” resulta significativa, las conclusiones son equivalentes a indicar que los tratamientos tienen efectos distintos o que las diferencias entre las medias de los tratamientos son significativas si $P < 5\%$ o altamente significativas si $P < 1\%$. Cuando los tratamientos numerosos, se sigue diferentes métodos para discriminar variables y clasificar los tratamientos.

6.4. Diseño Completamente al Azar (D.C.A.)

Este diseño es también llamado “Diseño Completamente Randomizado”.

- El numero de restricciones en la aleatorizacion = 0 (cero)
- El modelo matemático (Modelo lineal Aditivo) es:

Donde:

$$Y_{ij} = M + T_i + E_i$$

Y_{ij} = representa cada observación

M = media de población

T_i = efecto del i -ésimo tratamiento

E_{ij} = desviación al azar de la i -ésima replicación del i -ésimo tratamiento (error experimental)

$I = 1, 2, 3, \dots, a$; donde a = número de tratamientos

$J = 1, 2, 3, \dots, r$; donde r = número de repeticiones por tratamiento puede existir: $r = a$ ó $r < a$

El modelo matemático describe una observación cualquiera, identifica el diseño, identifica las variables, identifica los grados de libertad a través del error experimental frente a las variables.

Descripción

El diseño completamente al azar tiene las características de que los tratamientos se asignan completamente al azar en las unidades experimentales o viceversa, es un diseño simple que no impone restricciones de ninguna clase, pero debe cuidarse de aplicar si no se dispone de unidades experimentales homogéneas, caso contrario usar otro diseño.

El medio que rodea al experimenta debe actuar en forma uniforme sobre todas las unidades experimentales, además de realizar un manejo uniforme.

Las unidades experimentales deben ser fácilmente identificables, además cada unidad debe tener la misma opción de recibir cualquier tratamiento en la aleatorización.

El D.C.A. asume lo siguiente:

El modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = M + T_i + E_{ij}$$

- Asume una distribución normal (una sola condición de tratamiento)
- Suma de cuadrados de repeticiones = 0 (cero)
- Que la varianza de los tratamientos deberá ser homogénea en repeticiones
- Considera variables independientes pero relacionadas, se asume que el efecto entre tratamiento difiere uno del otro.

6.4.1. Reproducibilidad del ANOVA

La precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mensurando, con diferentes operadores, diferentes equipos de medida, en diferentes laboratorios, mediante un diseño experimental y evaluado mediante comparación de medias .

6.4.2. Reproducibilidad interna del ANOVA

Precisión que reúne las condiciones de reproducibilidad excepto que todas las medidas se realizan en el equipo laboratorio o en el mismo laboratorio³

6.4.3. Estudio de precisión del ANOVA

- Formas de expresar la precisión
- La medida de la expresa se determina en términos de imprecisión representada por diferentes parámetros estadísticos calculados a partir de los resultados de las mediciones. Así, una menor precisión se refleja por un mayor valor de dichas parámetros. Cuando se dispone de un conjunto de n datos experimentales ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$), de media m, obtenidos por repetición de un determinado proceso de medida o análisis, los diferentes parámetros que pueden utilizarse son: rango, desviación estándar (DE), varianza (VAR), desviación estándar relativa (DER %) o coeficiente de variación (CV %), repetibilidad, reproducibilidad (R), etc.

Rango

Es la diferencia entre el mayor y el menor valor de conjunto, según:

$$\text{Rango} = x_{\text{mayor}} - x_{\text{menor}}$$

Desviación estándar o desviación típica

La Desviación estándar o desviación típica (DE), se representan habitualmente por las letras s y viene dada por la expresión:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}{n-1}}$$

Varianza

La varianza (VAR) es el cuadrado de la DE por lo que se representa habitualmente por S^2 , y viene dada por la expresión:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}{n-1}$$

Al numerador de esta expresión se le denomina genéricamente término de suma de cuadrados (SC) y el denominador representa los grados de libertad (g.l). Por tanto, de forma genérica, se puede expresar siempre que:

$$\text{VAR} = \frac{\text{SC}}{\text{g.l.}}$$

Donde el término SC se puede calcular de forma más sencilla a partir de la expresión:

$$SC = \sum_{i=1}^n (x_i - m)^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right)^2$$

La desviación estándar relativa o coeficiente de variación

Es un parámetro adimensional que se utiliza para normalizar el valor de una DE a la media. Se expresa habitualmente en forma de porcentaje.

$$\text{DER} (\%) = \text{CV} (\%) = \frac{s}{m} \times 100$$

Donde m indica el valor de la media dada por:

$$m = \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right)$$

6.4.4. Límite de la Repetibilidad y reproducibilidad

La precisión asociada a la repetibilidad de un método de medida o de análisis se puede expresar por un parámetro r , dado por la expresión:

$$r = 2.83 \times s_r$$

Donde s_r es la desviación estándar de un conjunto de medidas realizadas en condiciones de repetibilidad. De la misma forma la precisión asociada a la reproducibilidad de un método de medida o de análisis se puede expresar por un parámetro R , dado por la expresión:

$$R = 2.83 \times s_R$$

Donde s_R es la desviación estándar de un conjunto de medidas realizadas en condiciones de reproducibilidad.

El coeficiente numérico utilizado (2.83) representa el valor del término debido a $2 \times \sqrt{2}$ a que ambos parámetros (r y R) indican el valor por debajo del cual puede esperarse la diferencia absoluta entre dos resultados del ensayo obtenidos con el mismo método y con idénticos materiales, bajo condiciones de repetibilidad o de reproducibilidad, según el caso, con una probabilidad del 95%, los valores de las desviaciones estándar (s_r y s_R) se calculan a partir de replicas del proceso de medida o de análisis en las condiciones correspondientes a cada caso.

Obviamente siempre se ha de cumplir que:

$$s_r \leq s_R \quad (o \quad r < R)$$

Estudio intralaboratorio para el cálculo de la precisión

El protocolo experimental y la metodología de cálculo de la precisión para cada método de análisis a aplicar se basan en el descrito en la norma ISO 5725-2:1994, adaptados ambos aun escenario intralaboratorio. Este protocolo es de aplicación a todos los métodos de medida y análisis que utiliza el laboratorio y se describe a continuación.

Estadística del Diseño experimental

Para ello sobre una muestra representativa se realizaran diferentes replicados (al menos 2) por distintos analistas (al menos 3) o por un analista en sesiones diferentes (al menos 3). El número de replicados y analistas puede elegirse de forma que se satisfaga la condición de que el número total de datos experimentales obtenidos sea al menos igual a 15 a fin de asegurar suficientes grados de libertad para que la estimación de las correspondientes desviaciones estándar se pueda considerar suficientemente fiable. No es absolutamente necesario que el número de replicados sea siempre el mismo, aunque es conveniente para mantener la homogeneidad del diseño experimental. Con los datos experimentales obtenidos se construirá una tabla de la forma.

Tabla datos experimentales

Análisis	Replicados				Numero de replicados
	1	2	3	J	
1	X_{1j}	X_{11}	X_{13}	X_{1j}	N_1
2	X_{2j}	X_{22}	X_{23}	X_{2j}	N_2
3	X_{3j}	X_{32}	X_{33}	X_{3j}	N_3
l	X_{ij}	X_{i2}	X_{i3}	X_{ij}	N_4
a	X_{nj}	X_{n2}	X_{n3}	X_{nj}	N_5

Tratamiento de datos

Desde un punto de vista estadístico el modelo a desarrollar se basa en un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía.

Esta técnica está basada en la siguiente ecuación:

$$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - M)^2 = \sum_{i=1}^n (m_i - M)^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{n_i} x_i^2 (x_{ij} - m_i)^2$$

Donde m_i es la medida del analista i y M es la media global dada por :

$$m_i = \frac{\sum_{j=1, \dots, n_i} x_{ij}}{n_i}$$

$$M = \frac{\sum_{j=1, \dots}^n m_{ij}}{a} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1, \dots}^n x_{ij}}{N}$$

Donde N representa el número total de datos experimentales.

La anterior ecuación se suele representar de forma abreviada utilizando la nomenclatura SC (suma de cuadrados), según:

$$SCT = SCA + SCR$$

Por mayor facilidad, estos términos se pueden calcular también a partir de las expresiones:

$$SCT = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n x_{ij} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1, \dots}^n x_{ij} \right)^2}{N}$$

$$SCR = \sum_{i=1}^a \left(\sum_{j=1}^n x_{ij}^2 - \frac{\left(\sum_{j=1, \dots}^n x_{ij} \right)^2}{n_i} \right) = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (x_{ij} - m_i)^2$$

El término SCA se obtiene por diferencia de estos dos, si dicho valor fuera negativo se asigna el valor cero.

La varianza dentro (S_r^2) y la varianza entre analistas (S_A^2) se calculan a partir de las expresiones.

$$S_r^2 = \frac{SCR}{N - a}$$

$$S_A^2 = \frac{(a-1) - \left(\frac{SCA}{a-1, \dots} - S_r^2 \right)}{\frac{N^r}{\sum_{i=1}^a n_i^2}}$$

$$N^r = N - \frac{j=1, \dots}{N}$$

Donde N indica el número de datos totales corregidos.

La varianza S_r^2 representa la varianza de repetibilidad del método, mientras que la varianza de reproducibilidad interna (S_r^2) se calcula como suma cuadrática de las dos anteriores.

$$S_r^2 = S_r^2 + S_A^2$$

Todos estos cálculos se pueden realizar fácilmente a partir de los términos incluidos en la siguiente tabla.

Tabla N° 1 Cálculos para el tratamiento de datos

Análisis	n_i	m_i	s_i	n_i^2	s_i^2	$\sum(x_{ij} - m_i)^2$	$\sum x_{ij}$	$\sum x_{ij}^2$
1	n_1	m_1	S_1	n_1^2	s_1^2	$\sum(x_{ij} - m_i)^2$	$\sum x_{ij}$	$\sum x_{ij}^2$
2	n_2	m_2	S_2	n_2^2	s_2^2	$\sum(x_{ij} - m_i)^2$	$\sum x_{ij}$	$\sum x_{ij}^2$
3	n_3	m_3	S_3	n_3^2	s_3^2	$\sum(x_{ij} - m_i)^2$	$\sum x_{ij}$	$\sum x_{ij}^2$
l	n_i	m_i	S_i	n_i^2	s_i^2	$\sum(x_{ij} - m_i)^2$	$\sum x_{ij}$	$\sum x_{ij}^2$
a	n_n	m_n	S_n	n_n^2	s_n^2	$\sum(x_{ij} - m_i)^2$	$\sum x_{ij}$	$\sum x_{ij}^2$
sumas	N	$\sum m_{ij}$	-	$\sum n_{ij}^2$	-	$\sum \sum (x_{ij} - m_i)^2$	$\sum \sum x_{ij}$	$\sum \sum x_{ij}^2$

Las desviaciones estándar de repetibilidad y reproductibilidad interna se calculan como raíz cuadrada las respectivas varianzas:

$$S_r = \sqrt{S_r^2}; \quad S_R = \sqrt{S_R^2}$$

Los correspondientes parámetros de repetibilidad y reproductibilidad interna vendrán dados por:

$$\bullet \quad r = 2.83 \times S_r; \quad R = 2.83 \times S_R$$

Que son las equivalentes al Cálculo del límite de repetibilidad (r) y reproductibilidad

6.4.5. Diferencia Mínima Significativa

La diferencia mínima significativa nos permite hacer comparaciones entre medias de tratamientos, utilizando la varianza del error experimental. La diferencia entre las medias de dos tratamientos es declarada significativa o altamente significativa cuando excede al DMS (Valor Crítico o Valor de tablas), para un nivel del 5% o 1%.

Se Determina la Diferencia Mínima Significativa. (Sólo si se concluye, al realizar el ANOVA, que existe diferencia entre las muestras).

$$DMS = t(\alpha, gl_e) \sqrt{2cme /}$$

Donde:

t : Valor de t student tabulado para el nivel de significación prefijado (alfa) y los grados de libertad del error en el ANOVA.

Cm_e: Cuadrado medio del error ANOVA.

Determinar los siguientes parámetros estadísticos:

- ✓ Cálculo del porcentaje de recuperación de cada concentración.
- ✓ Cálculo de la Desviación estándar ó (S)
- ✓ Cálculo de la Desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (C.V)
- ✓ También se calcula el “t” de Student

6.4.6. Determinación del grado de exactitud respecto al valor verdadero

Para confirmar que el valor medio no difiere significativamente del aceptado como referencia.

Fórmula para hallar el “t” experimental (t_{exp})

$$t_{exp} = \frac{[100 - R] n}{RSD}$$

Hallando el “t” de tabla (t)

Tabla = 2,306; Con las siguientes condiciones

n – 1 = grados de libertad y desviación estándar

Probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95 %

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

Validar el método de Curcumina en la cuantificación de Boro respecto a Standart de referencia "Perking Elmer" Standart control de "Salmuera Sintética" y soluciones de ácido bórico de acuerdo al protocolo de la Standart Método 580 B implementado por laboratorio químico IGEMA.

7.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Desarrollar un proceso de adiestramiento y de ensayos preliminares por ende de una adquisición de las metodologías de técnicas habituales de análisis empleadas en el laboratorio IGEMA; para análisis de Boro.
- ❖ Evaluar características de desempeño del método como ser precisión, especificidad. Selectividad Linealidad límite de detección límite de cuantificación y robustez.
- ❖ Determinar el diámetro adecuado de capsulas empleadas en el método que permita obtener mejor recuperación de Boro.

8. METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El método para determinar boro en aguas naturales y residuales se basa en la medición espectrofotométrica a partir de la formación de un compuesto rojo denominado rosocianina, producido por el boro de la muestra con la curcumina y el ácido clorhídrico. La reacción se lleva a cabo a 60°C y posteriormente se lleva a sequedad. El residuo se aconseja disolver con alcohol isopropílico sin embargo en el laboratorio IGEMA, en las pruebas se empleo alcohol etílico al 96 GL y se mide espectrofotométricamente a 540 nm. Con este método sólo se determina boro disuelto, El método de la curcumina se aplica para la determinación de boro en un intervalo de concentraciones entre 0,1 mg B/L y 1,0 mg B/L según el standat método 580 B.

Cantidad mínima detectable: 0.2 µg de B

8.1. Equipo Instrumental y reactivos

Equipo colorimétrico: se utilizo uno de los siguientes

- 1) Espectrofotómetro "Lambda 80", para utilización con transmitancia máxima próxima a 540 nm, con recorrido mínimo de luz de un 1 cm. Fotómetro de filtro, equipado con un filtro verde, con recorrido mínimo de luz de un 1 cm.
- a) 26 Capsulas de evaporación, con 100, 150 y 200 mL de capacidad, de porcelana con alto contenido de silicio
- b) Baño de agua ajustado a $60^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- c) Matraces aforados con tapón de vidrio de 25 mL de capacidad
- d) Micropipeta Ependorf de capacidad 0,05 ml a 1000 ml de capacidad

8.2. Preparación de soluciones Standart y de trabajo

- a) Reactivo de Curcumina: Se llego a obtener Curcumina a partir de la especie palillo o cúrcuma (*Curcuma longa*) que se obtiene del comercio habitual utilizado en gastronomía, se extrajo sometiendo 50 grs. de palillo "El cocinero" en 400 mL de alcohol etílico reposando por 24 horas y decantando y desechando el residuo y seguir con el desecado en baño maría a 50°C , hasta obtener una masa pastosa utilizada como reactivo en la cuantificación de Boro

Para la preparación del indicador Curcumina, se disolvió 120 mg. de Curcumina 30g ácido oxálico en 240 mL de alcohol etílico, 95% GL "Caiman". Añadiéndose 12,6 mL de ácido clorhídrico se llevo con alcohol etílico a 600 mL almacenando en lugar seco.

- a) Solución de Standart de referencia Perking Elmer avalado con certificado del National Institute for Standart and Technology Se diluyo 1 ml en 100 ml.
- b) Solución madre de Boro proveniente de ácido bórico: se disolvió 59,2 mg. de ácido bórico anhidro H_3BO_3 en agua destilada y diluir a 100 mL. Equivalente a 100 μg de Boro. Antes de la preparación se deseco el H_3BO_3 a 105°C , por dos horas

Solución patrón de Boro: se diluyo 10.00 mL de solución madre de Boro hasta 1000 mL, con agua destilada 1.00 mL equivalente a 1.00 μg de Boro.

8.3. Procedimiento

- a) Precauciones: controlándose estrechamente variables como los volúmenes y concentraciones de los reactivos, así como el tiempo y temperatura de secado. utilizando placas de evaporación idénticas de forma, tamaño y composición para asegurar un tiempo igual de evaporación ya que al aumentar el tiempo lo hace también la intensidad del color resultante.
- b) Preparación de la curva de calibrado: Llevándose con la pipeta 0 (blanco), 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 μg de Boro en las placas de evaporación de la misma forma, tipo y tamaño. Añadiendo agua destilada a cada estándar para completar el volumen total a 1.0 mL. (volumen referido a 1 ml) Añadiendo 4.0 mL de reactivo de Curcumina a cada una y girando suavemente para mezclar bien sus contenidos, poniendo las placas en flotación.
- c) Comparación visual: el método fotométrico puede adaptarse a la estimación visual de concentraciones bajas de Boro, desde 50 a 200 $\mu\text{g/L}$, del modo siguiente: diluyendo la solución patrón de Boro con agua destilada a una relación de 1:3; 1.00 mL es equivalente a 0.20 μg de Boro. Llévase con la pipeta 0m 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 μg de Boro a capsulas de evaporación, al mismo tiempo añadiendo un volumen apropiado de muestra (1.00 mL o porción diluida a 1.00 mL) a una placa de evaporación idéntica. El Boro total está comprendido entre 0.05 y 0.20 μg . añadiendo 4.0 mL de reactivo de Curcumina". comparando el color de las muestras con los estándares, dentro de la hora siguiente al secado de las muestras.

8.3.1 Desecamiento

En un baño de agua ajustado a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ y en reposo durante 120 minutos, que suelen bastar para completar el secado y eliminar el HCl. Manteniéndose constante el tiempo de secado para patrones y muestras. Tras enfriar las capsulas a temperatura ambiente, se añadió aproximadamente 10 mL de alcohol etílico 95% a cada placa agitándose suavemente con una varilla de polietileno para asegurar la completa disolución del producto coloreado de rojo. Lavándose el contenido de las placas en un matraz aforado de 25mL, usando alcohol etílico al 95% y mezclándose bien por inversión. Leyendo la absorbancia de patrones y muestras a la longitud de onda de 540 nm, después de ajustar el blanco de reactivo a abosorbancia cero. La

curva de calibrado es lineal desde 0 a 1.00 μg de Boro. Haciéndose lecturas fotométricas en el curso de la hora siguiente al secado de las muestras.

9. CALCULO DE MASA DE BORO

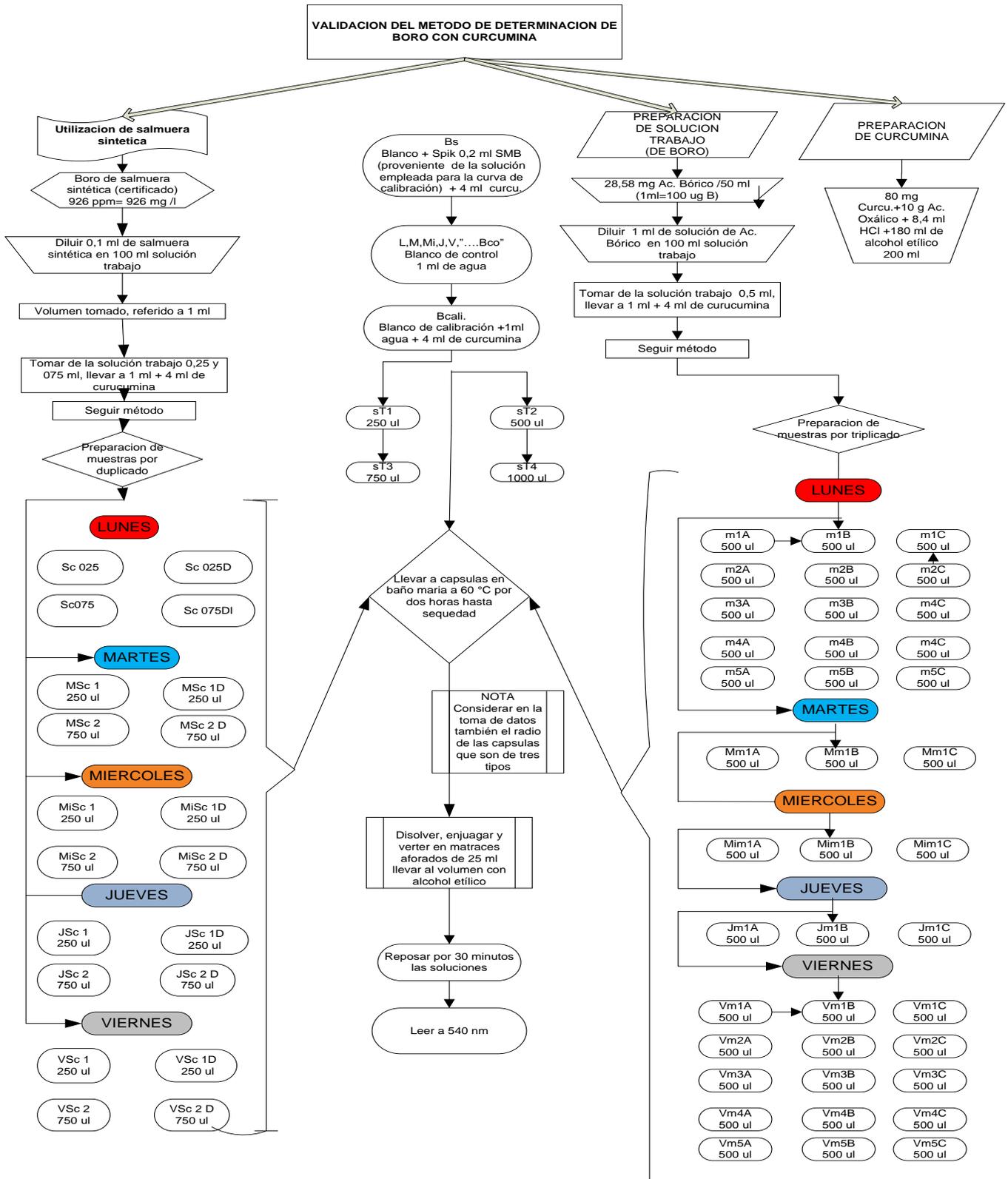
Utilizando la ecuación para calcular la concentración de Boro a partir de las lecturas de absorbancia:

$$\text{mgB/l} = \frac{A_2 \times C}{A_1 \times S}$$

Donde:

- ✓ A_1 = absorbancia del estándar
- ✓ A_2 = absorbancia de la muestra
- ✓ C = μg de Boro es el estándar tomado
- ✓ S = mL de muestra

Gráfica N° 1 Validación del Método de determinación de Boro con Curcumina



10. DESARROLLO DEL PROCESO DE VALIDACION

10.1. Plan de validación

Lo primero que se desarrollo para la validación es el plan de validación de acuerdo a las siguientes características de la tabla N°2

Tabla N° 2 Plan de validación de la determinación de Boro

10.2. Recursos

Elemento	Requisitos	Procedimiento de Referencia
Personal	Con educación, formación, experiencia y habilidades	Manual de cargos y perfiles
Equipos	Espectrofotómetro "Lambda 850"	Manual
Materiales	Matraces aforados, capsulas de porcelana, termostatos, termómetros	Manual de procedimiento técnico
Reactivos	Ac. Bórico, Curcumina y alcohol etílico 96 G.L	Manual de procedimiento técnico
Material de Referencia/Material de referencia certificado/Muestras naturales	Standart de referencia de Boro Perking Elmer, Standard de control de Salmuera sintética,	Manual de procedimiento técnico
Instalaciones	Control de acceso, separación áreas de ensayo, orden y limpieza	Manual de procedimiento técnico
Condiciones ambientales	Monitorear y controlar la temperatura y humedad de los ambientes de análisis químico: Temperatura ambiental 10 °C a 40 °C Humedad relativa ≤ 60% (Sala de Pesadas)	Manual de procedimiento técnico
Método de ensayo	Escrito de acuerdo al formato establecido	Manual de procedimiento técnico

Tabla N° 3 Preparación por peso de muestras

Preparación	Peso	A partir	Aprobado
Curva de calibración	0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 ppm	Solución estándar de referencia "Perkin Elmer"	Aprobado por la ISO
Estándar de control	0.25, 0,75 1 ppm	Salmuera sintética	Referencia entre laboratorios
Muestras	0.51 ppm	Acido bórico	Aprobado por el IGEMA
Spike	0.1 ppm	Solución estándar de referencia "Perkins Elmer"	aprobado por la ISO

10.3. Diseño del experimento para la validación

La validación se realizó con un Diseño Completamente al Azar con una fuente de variación como es el transcurso del tiempo (6 Días) y con soluciones de concentraciones conocidas de Boro, nivel alto, nivel medio y nivel bajo 0,23 ug/L, 0,51 ug/L y 0,70 ug/L respectivamente, recomendado por Eurachem. Las muestras de soluciones nivel bajo y alto, provienen de una Muestra de referencia de Salmuera sintética y la muestra de nivel medio proviene de la solución madre de Boro con la única certificación que la del pasante.

La curva de calibración se la efectuó en los seis días del periodo de las pruebas con concentraciones de 0,25 ug/L, 0,50ugL, 0,75 ug/L y 1ug/L preparadas a partir de la solución Standart Perking Elmer.

12. CALCULOS Y MEDICIONES

Tabla N° 4 Distribución de las muestras en los días (tratamientos)

Días	Nivel de las concentraciones	Concen. ug/L	Volumen uL	Código de las muestras	No repeticiones	Diámetro de capsulas		
						pequeña	mediana	grande
Lunes	Nivel Bajo	0,23	250	Sc023	2	pequeña		grande
	Nivel Medio	0,51	500	m0,51	2	pequeña		grande
	Nivel alto	0,7	750	Sc0,75	15	pequeña	mediana	grande
Martes	Nivel Bajo	0,23	250	Sc023	2	pequeña		grande
	Nivel Medio	0,51	500	m0,51	2	pequeña		grande
	Nivel alto	0,7	750	Sc0,75	6	pequeña	mediana	grande
Miércoles	Nivel Bajo	0,23	250	Sc023	2	pequeña		grande
	Nivel Medio	0,51	500	m0,51	2	pequeña		grande
	Nivel alto	0,7	750	Sc0,75	6	pequeña	mediana	grande
Jueves	Nivel Bajo	0,23	250	Sc023	2	pequeña		grande
	Nivel Medio	0,51	500	m0,51	2	pequeña		grande
	Nivel alto	0,7	750	Sc0,75	6	pequeña	mediana	grande
Viernes	Nivel Bajo	0,23	250	Sc024	2	pequeña		grande
	Nivel Medio	0,51	500	m0,52	2	pequeña		grande
	Nivel alto	0,7	750	Sc0,76	15	pequeña	mediana	grande
Lunes	Nivel Bajo	0,23	250	Sc023	2	pequeña		grande
	Nivel Medio	0,51	500	m0,51	2	pequeña		grande
	Nivel alto	0,7	750	Sc0,75	6	pequeña	mediana	grande

Tabla N° 5 Lectura de las Concentraciones Leídas en el Espectrómetro

Días	Muestras	tamaño de capsulas	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
			Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Lunes
Códigos			12-nov	15-nov	17-nov	18-nov	22-nov	24-nov
H2O	Blanco	pequeño	-0,01	0,002	0,011	0,01	0,0030	0,0000
Std 1	Standart 1	pequeño	0,26	0,246	0,244	0,24	0,2525	0,0623
Std2	Standart 2	pequeño	0,51	0,495	0,495	0,50	0,4697	0,1216
Std3	Standart 3	pequeño	0,75	0,746	0,741	0,75	0,7909	0,1838
Std4	Standart 4	pequeño	1,00	1,005	1,016	1,01	0,9838	0,2401
Bco	Blanco de control	pequeño	-0,03		-0,073			
Bco-1	Blanco de control	pequeño	0,010	0,040	0,016	0,0200	0,0199	0,0000
Bco-2	Blanco de control	pequeño	0,010	0,040	0,016	0,0148	0,0213	0,0000
Bco-3	Blanco de control	pequeño	0,010	0,041	0,016	0,0144	0,0195	0,0000
Bco-4	Blanco de control	pequeño	0,010	0,042	0,016	0,0144	0,0199	0,0000
Bco-5	Blanco de control	pequeño	0,020	0,040	0,012	0,0164	0,0199	0,1000
BS-1	Blanco con Spyke	pequeño	0,110	0,097	0,113	0,1912	0,1155	0,1038
BS-2	Blanco con Spyke	pequeño	0,110	0,099	0,112	0,1912	0,1106	0,1030
BS-3	Blanco con Spyke	pequeño	0,110	0,111	0,109	0,1948	0,1120	0,1030
BS-4	Blanco con Spyke	pequeño	0,110	0,114	0,112	0,1952	0,1116	0,1038
BS-5	Blanco con Spyke	pequeño	0,110	0,112	0,112	0,1936	0,1120	0,1030
Sc025-1	Standart de control 0,23 ug/L	pequeño	0,240	0,226	0,233	0,2332	0,2346	0,2442
Sc025-2	Standart de control 0,23 ug/L	pequeño	0,240	0,226	0,234	0,2336	0,2321	0,2449
Sc025-3	Standart de control duplicado0,23 ug/L	pequeño	0,240	0,224	0,234	0,2305	0,2325	0,2446
Sc025D-1	Standart de control duplicado0,23	grande	0,240	0,234	0,241	0,2443	0,2276	0,2484
Sc025D-2	Standart de control duplicado0,23	grande	0,230	0,236	0,239	0,2439	0,2237	0,2471
Sc025D-3	Standart de control duplicado0,23 ug/L	grande	0,230	0,236	0,236	0,2431	0,2241	0,2480
Sc0,75-1	Standart de control 0,70 ug/L	pequeño	0,680	0,673	0,717	0,7192	0,7073	0,7295
Sc0,75-2	Standart de control 0,70	pequeño	0,690	0,671	0,717	0,7176	0,7073	0,7299
Sc0,75-3	Standart de control 0,70 ug/L	pequeño	0,690	0,670	0,717	0,7160	0,7076	0,7295
Sc0,75D-1	Standart de control duplicado0,70ug/L	grande	0,680	0,671	0,740	0,7196	0,6957	0,7353
Sc0,75D-2	Standart de control duplicado0,70 ug/L	grande	0,680	0,670	0,740	0,7184	0,6953	0,7362
Sc0,75D-3	Standart de control duplicado0,70 ug/L	grande	0,680	0,673	0,739	0,7196	0,6953	0,7353

Días	Muestras	tamaño de capsulas	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
			Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Lunes
Códigos			12-nov	15-nov	17-nov	18-nov	22-nov	24-nov
M1A-3	Muestra de 0.51 ug/L	pequeño	0,520	0,501	0,504	0,5012	0,4806	0,5376
MAD	Muestra de 0.51 ug/L	pequeño	0,510		0,517	0,4956		0,5438
M2A	Muestra de 0.51 ug/L	pequeño		0,505			0,4852	
M3A	Muestra de 0.51 ug/L	pequeño		0,484			0,4918	
M4A	Muestra de 0.51 ug/L	pequeño		0,508			0,4890	
M5A	Muestra de 0.51 ug/L	pequeño		0,507			0,4887	
M1B	Muestra de 0.51 ug/L	mediano	0,530	0,506	0,501	0,5052	0,4996	0,5558
M1B-2	Muestra de 0.51 ug/L	Mediano	0,530	0,503	0,501	0,5059	0,4971	0,5571
M1B-3	Muestra de 0.51 ug/L	mediano	0,520	0,502	0,501	0,5055	0,4975	0,5563
MBD	Muestra de 0.51 ug/L	mediano	0,430		0,496	0,5055		0,5625
M2B	Muestra de 0.51 ug/L	mediano		0,493			0,5059	
M3B	Muestra de 0.51 ug/L	mediano		0,499			0,4824	
M4B	Muestra de 0.51 ug/L	mediano		0,500			0,4904	
M5B	Muestra de 0.51 ug/L	mediano		0,493			0,4975	
M1C	Muestra de 0.51 ug/L	grande	0,510	0,505	0,509	0,5194	0,4936	0,5512
M1C-2	Muestra de 0.51 ug/L	grande	0,510	0,505	0,508	0,5178	0,4911	0,5683
M1C-3	Muestra de 0.51 ug/L	grande	0,510	0,504	0,508	0,5163	0,4880	0,5679
MCD	Muestra de 0.51 ug/L	grande	0,570		0,520	0,5424		0,5741
MCD-2	Muestra de 0.51 ug/L	grande			0,521			
MCD-3	Muestra de 0.51 ug/L	grande			0,525			
M2C	Muestra de 0.51 ug/L	grande		0,547			0,5041	
M3C	Muestra de 0.51 ug/L	grande		0,509			0,5056	
M4C	Muestra de 0.51 ug/L	grande		0,509			0,4483	
M5C	Muestra de 0.51 ug/L	grande		0,514			0,4922	

✓ Cálculo del valor promedio

Ecuación a utilizar:

$$X (\text{promedio}) = (X_1 + X_2)/2$$

- ✓ Cálculo de la desviación estándar

Ecuación a utilizar:

$$S = \bar{\sigma} = [\sum ((X_i - X(\text{promedio}))^2 / n)]^{1/2}$$

Evaluar si los resultados pertenecen a la misma población estadística:

- ✓ Cálculo del coeficiente de variación(CV)

Ecuación a utilizar:

$$CV = (S_i / X(\text{promedio})) * 100$$

Tabla N° 6 Estadísticos de las pruebas experimentales

Caract.	Códigos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
		12-nov	15-nov	17-nov	18-nov	22-nov	24-nov
B. control	Media	0,012	0,041	0,0152	0,0160	0,0201	0,0000
	Desv. standar	0,004	0,001	0,002	0,002	0,001	0,000
	Vartianza	0,000020	0,000001	0,000003	0,000006	0,000000	0,000000
	C.V.	37,268	2,203	11,769	14,895	3,447	0,000
Spyke 0,1 ug/L	Media	0,110	0,107	0,112	0,193	0,112	0,103
	Desv. standar	0,000	0,008	0,002	0,002	0,002	0,000
	Vartianza	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	C.V.%	0,000	7,464	1,359	0,993	1,653	0,424
Standart de control 0,23 ug/L	Media	0,237	0,230	0,236	0,238	0,229	0,246
	Desv. standar	0,000	0,008	0,002	0,002	0,002	0,000
	Vartianza	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	C.V.%	0,000	3,454	0,642	0,806	0,811	0,178
Standart de control 0,70 ug/L	Media	0,683	0,671	0,728	0,718	0,701	0,733
	Desv. standar	0,005	0,001	0,012	0,001	0,007	0,003
	Vartianza	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	C.V.%	0,756	0,204	1,705	0,196	0,935	0,449
Standart de control 0,51 ug/L	Media	0,515	0,505	0,508	0,509	0,490	0,556
	Desv. standar	0,031	0,012	0,009	0,013	0,012	0,013
	Vartianza	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	C.V.%	6,112	2,319	1,750	2,534	2,528	2,427

12.1. ESTUDIO DE LA PRECISION

- Repetibilidad
- Reproducibilidad interna o precisión intermedia
- Reproducibilidad

Tabla N° 7 Prueba del método con 0,51 ug/l Contraste de Grubs para discriminar datos anómalos

	Día 1	Grubs	Día 2	Grubs	Día 3	Grubs	Día 4	Grubs	Día 5	Grubs	Día 6	Grubs
REPETICIONES	0,520	0,198	0,501	0,301	0,5037	-0,435	0,4999	-0,658	0,4805	-0,679	0,5381	-1,358
	0,510	-0,022	0,505	0,013	0,517	0,910	0,4956	-0,910	0,4852	-0,343	0,5438	-0,954
	0,527	0,351	0,484	1,526	0,501	-0,708	0,5055	-0,329	0,4918	0,129	0,556	-0,064
	0,430	-1,778	0,508	0,203	0,496	-1,214	0,5055	-0,329	0,4890	-0,072	0,563	0,368
	0,510	-0,022	0,507	0,131	0,5083	0,030	0,5178	0,392	0,4887	-0,093	0,569	0,834
	0,570	1,295	0,504	0,085	0,522	1,416	0,5424	1,835	0,4981	0,579	0,574	1,188
			0,493	0,878					0,5059	1,137		
			0,499	0,445					0,4824	-0,543		
			0,500	0,373					0,4904	0,029		
			0,493	0,878					0,4975	0,536		
			0,5047	0,035					0,4909	0,064		
			0,547	3,013					0,5041	1,008		
			0,509	0,275					0,5056	1,115		
			0,509	0,275					0,4483	-2,982		
		0,514	0,636					0,4922	0,157			
	Desv, Standart		Desv, Standart		Desv, Standart		Desv, Standart		Desv, Standart		Desv, Standart	
	0,0456		0,01388		0,0099		0,01705		0,014		0,014	
	Media		Media		Media		Media		Media		Media	
	0,511		0,50518		0,508		0,51112		0,4900		0,5573	
	t(tablas)		t(tablas)		t(tablas)		t(tablas)		t(tablas)		t(tablas)	
	1,774		2,85		1,774		1,774		2,85		1,774	

El día 2 es el único en el que se presenta un dato anómalo estadísticamente ya que el t crítico (tablas) es menor a la t calculada.

El contraste de Grubbs para un valor anómalo, se determina probando que la hipótesis nula H_0 : que supone que todas las medidas proceden de la misma población, y se calcula de la siguiente manera:

$$G = |\text{valor sospechoso} - \bar{x}|/s$$

Donde s se calcula incluyendo el valor sospechoso.

El contraste supone que la población es normal. Según AOAC(Association of Oficial American Chemists), EPA(Environmental Protection Agency), FDA(Food and Drug Administration), ICH (Internacional Conference on Harmonization), USP (united States Pharmacopoeia), EURACHEM(Eurepean Analytical Chemistry), La precisión se tiene que emplear al ANOVA como estadístico.

12.2. Relación entre la concentración y la respuesta del método

Los resultados de las mediciones que pertenecen a la misma población estadística, se utilizan para calcular una función que relacione la concentración de analito y la respuesta del método, así como la bondad del ajuste de la curva.

Se puede usar dos formas para evaluar la relación entre la concentración del analito y la respuesta del método:

Los estimadores de regresión para un nivel de significación (α) dado (en la mayoría de trabajos químicos $\alpha = 0,05$ (5%)) son:

- Pendiente (b_1)
- Intercepto (b_0)
- Coeficiente de correlación
- ANOVA y su significancia de las medias

Tabla N° 8 ANOVA Prueba del método a 0,23 ug/L de acuerdo a días

Tratamientos	Repeticiones		Nn rept.	media	<u>S</u>	<u>S₂</u>	<u>S_{xj}</u>	<u>S_{xj²}</u>
Día 1	0,24	0,233	2	0,2365	0,00495	2E-05	0,473	0,1119
Día 2	0,225	0,235	2	0,23	0,00707	5E-05	0,46	0,1059
Día 3	0,234	0,239	2	0,2365	0,00354	1E-05	0,473	0,1119
Día 4	0,2324	0,2437	2	0,23805	0,00799	6E-05	0,4761	0,1134
Día 5	0,2324	0,2251	2	0,22875	0,00516	3E-05	0,4575	0,1047
Día 6	0,2449	0,2478	2	0,24635	0,00205	4E-06	0,4927	0,1214
	1,4087	1,4236	12	1,41615	0,03076	0,0002	2,8323	0,6691
							T.C. =	0,66849
							SCT =	0,00058
							SCtrat =	0,00040
							SCerror = SC.T - SC.trat	0,00018
							media global	0,23603
							Coef.Variacion %	2,33151

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F0,05
Tratamientos	5	0,00040	8,02E-05	2,6469	4,39
Error Exp.	6	0,00018	3,03E-05		
Total	11	0,00058	5,3E-05		

El análisis de varianza nos muestra un valor de "F" calculado no significativo, es decir no existe diferencias tratamientos (días) El coeficiente de variación nos indica que hubo un manejo aceptable de las unidades experimentales Se debe realizar diferentes pruebas para saber cuáles de los tratamientos (días) determina las diferencias de medias

Tabla N° 9 Parámetros de precisión Reproducibilidad y Repetibilidad a una concentración de 0,23 ug/l

Suma de cuadrados		Desv. Standart		Parámetro X 2,83	
SC		S			
Sctrat = $s^2 R$	0,00040	5,77E-03	1,60E-02	Reproducibilidad	
Scerror = $s^2 r$	0,00018	3,87E-03	1,09E-02	Repetibilidad	
SCT	0,0006				

Tabla N° 10 Prueba del método a 0,70 ug/l de acuerdo a días

	Repetición		N° Rept.	media	S	S2	S(X - M)2	Sxj	Sxj2
Día 1	0,687	0,68	2	0,6835	0,004949747	0,0000245	0,0000245	1,367	0,934369
Día 2	0,671	0,6713	2	0,67115	0,000212132	4,5E-08	4,5E-08	1,3423	0,9008847
Día 3	0,717	0,7397	2	0,72835	0,016051324	0,000257645	0,00025765	1,4567	1,0612451
Día 4	0,7176	0,7192	2	0,7184	0,001131371	1,28E-06	1,28E-06	1,4368	1,0321984
Día 5	0,7074	0,6954	2	0,7014	0,008485281	7,2E-05	7,2E-05	1,4028	0,9839959
Día 6	0,7296	0,7356	2	0,7326	0,004242641	0,000018	0,000018	1,4652	1,0734235
	4,2296	4,2412	12	4,2354	0,035072496	0,00037347	6,728E-05	8,4708	5,9861166
								T.C. =	5,9795377
								SCT =	0,0065789
								SCtrat =	0,0062054
								SCerror = SC.T - SC.trat =	0,0003735
								media general =	0,7059
								Coef. Variación =	1,1176583
F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F0,05				
Tratamientos	5	0,0062054	0,00124109	19,938726	4,39				
Error Exp.	6	0,0003735	6,2245E-05						
Total	11	0,0065789							

El análisis de varianza nos muestra un valor de "F" altamente significativo, es decir existe alta diferencias entre los tratamientos (días), pero no indica entre cuales El coeficiente de variación nos indica que hubo un manejo aceptable de las unidades experimentales. Se debe realizar diferentes pruebas para saber cuáles de los tratamientos (días) determina las diferencias de medias

Comparación de promedios

Tabla N° 11 Comparación de promedios realizados es al 5% de nivel de significancia

$$\text{DMS} = t_{0,5} (2 * \text{CME}/\text{trat})^{0,5} = 0,0155313$$

		Día 6	Día 3	Día 4	Día 5	Día 1	Día 2
		0,733	0,728	0,718	0,701	0,684	0,671
Día 2	0,671	0,062	0,057	0,047	0,03	0,014	0,013
Día 1	0,684	0,049	0,044	0,034	0,017		
Día 5	0,701	0,032	0,027	0,016			
Día 4	0,718	0,015	0,01				
Día 3	0,728	0,005					
Día 6	0,733						

Día 3	Día 4	Día 6	Día 1	Día 2
0,728	0,718	0,733	0,684	0,671

Los días 3, 4, 5 y 6 unidos por la línea significan que estadísticamente son iguales, que su diferencia no es mayor a 0,016. Los días 1 y 2 son también similares estadísticamente entre si.

Tabla N° 12 ANOVA 0,70 ug/L considerando las comparaciones por la DMS

Días	Repeticiones		No Rept.	media	S	S2	Sxj	Sxj2
Día 3	0,717	0,7397	2	0,7284	0,0161	0,0003	1,4567	1,0612
Día 4	0,7176	0,7192	2	0,7184	0,0011	0,0000	1,4368	1,0322
Día 5	0,7074	0,6954	2	0,7014	0,0085	0,0001	1,4028	0,9840
Día 6	0,7296	0,7356	2	0,7326	0,0042	0,0000	1,4652	1,0734
	2,8716	2,8899	8	2,8808	0,0299	0,0003	5,7615	4,1509
							T.C.	
							=	4,1494
							SCT	
							=	0,0015
							SCtrat	
							=	0,0012
							SCerror = SC.T - SC.trat	
							=	0,0003
							media general	
							=	0,7202
							Coef.Variacion	
							=	1,4975

Tabla N° 13 Calculo de la significación del ANOVA 0,70 ug/L

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F0,05
Tratamientos	4	0,0012	0,0003	2,4799	9,12
Error Exp.	3	0,0003	0,0001		
Total	7	0,0015			

El análisis de varianza nos muestra un valor de "F" calculado no significativo, es decir no existe diferencias entre los tratamientos (días). El coeficiente de variación nos indica que hubo un manejo aceptable de las unidades experimentales

Tabla N° 14 Parámetros de precisión Reproducibilidad y Repetibilidad a 0,70 ug/L

Suma de cuadrados		Desv. Standart	Parámetro X 2,83 Reproducibilidad y Repetibilidad
SC		S	
Sctrat = $s^2 R$	0,0012	4,33E-03	1,23E-02
Scerror = $s^2 r$	0,0003	6,12E-03	1,73E-02
SCT	0,0015		

Tabla N° 15 ANOVA de la Prueba del método a 0,51 ug/L de acuerdo a días

$\Delta\alpha 1$	0,52	0,51	0,527	0,43	0,51	0,57									
$\Delta\alpha 2$	0,501	0,505	0,484	0,508	0,507	0,504	0,493	0,499	0,5	0,493	0,5047		0,509	0,509	0,514
$\Delta\alpha 3$	0,5037	0,517	0,501	0,496	0,5083	0,522									
$\Delta\alpha 4$	0,4999	0,4956	0,5055	0,5055	0,5178	0,5424									
$\Delta\alpha 5$	0,4805	0,4852	0,4918	0,489	0,4887	0,4981	0,5059	0,4824	0,4904	0,4975	0,4909	0,5041	0,5056	0,4483	0,4922
$\Delta\alpha 6$	0,5381	0,5438	0,5564	0,5625	0,5691	0,5741									

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F0,05
Tratamientos	5	0,02	0,004	11,15	2,424
Error Exp.	47	0,017	4E-04		
Total	52	0,037	7E-04		

El análisis de varianza nos muestra un valor de "F" calculado altamente significativo, es decir existe altas diferencias entre los tratamientos (días), pero no indica entre cuales. El coeficiente de variación nos indica que hubo un manejo aceptable de las unidades. Experimentales. Se debe realizar diferentes pruebas para saber cuáles de los tratamientos (días) determinar las diferencias de medias.

Diferencia mínima significativa Toda la comparación de promedios realizados en el texto es del 5% de nivel de significancia

$$\text{DMS} = t_{0,5} (2 * \text{CME}/\text{trat})^{0,5}$$

Tabla N° 15 Comparación de promedios 0,51 ug /L con la "DMS"

		Día 6	Día 1	Día 4	Día 3	Día 2	Día 5
		0,551	0,5112	0,511	0,508	0,502	0,493
Día 5	0,493	0,058	0,0182	0,018	0,015	0,009	
Día 2	0,502	0,049	0,0092	0,009	0,006		
Día 3	0,508	0,043	0,0032	0,003			
Día 4	0,5111	0,04	0,0002				
Día 1	0,5112	0,04					
Día 6	0,551						

Día 6	Día 1	Día 4	Día 3	Día 2	Día 5
0,551	0,511	0,5111	0,508	0,502	0,493

El día 6 es diferente estadísticamente de los demás días. Los días 1, 4, 3,2 y 5 unidos por la línea significan que estadísticamente son iguales, que su diferencia no es mayor a 0,016 y 0,06144.

Tabla N° 16 ANOVA DE LA Prueba del método a 0,51 ug/L de acuerdo a días considerando la DMS

Día 1	0,52	0,51	0,527	0,43	0,51	0,57									
Día 2	0,501	0,505	0,484	0,508	0,507	0,504	0,493	0,499	0,5	0,493	0,5047		0,509	0,509	0,514
Día 3	0,5037	0,517	0,501	0,496	0,5083	0,522									
Día 4	0,4999	0,4956	0,5055	0,5055	0,5178	0,5424									
Día 5	0,4805	0,4852	0,4918	0,489	0,4887	0,4981	0,5059	0,4824	0,4904	0,4975	0,4909	0,5041	0,5056	0,4483	0,4922

Tabla N° 16 a

N° Rept.	media	S	S2	Sxj	Sxj2	
6	0,511167	0,0456	0,002076	3,067	1,57813	
14	0,502193	0,008	6,33E-05	7,0307	3,53159	
6	0,508	0,0099	9,77E-05	3,048	1,54887	
6	0,511117	0,017	0,000291	3,0667	1,56889	
15	0,49004	0,014	0,000196	7,3506	3,60483	
6	0,557333	0,0141	0,0002	3,344	1,86472	
53	3,07985	0,1086	0,002923	26,907	13,697	
				T.C.	=	13,6601
				SCT	=	0,03691
				SCtrat	=	0,02003
				SCerror = SC.T - SC.trat	=	0,01688
		media global				0,50768
		=				
		Coef.Variacion %				3,73334
		=				

Tabla N° 16b

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F0,05
Tratamientos	4	0,00334455	0,00084	2,211	2,424
Error Exp.	42	0,01588367	0,00038		
Total	46	0,01922821	0,00042		

El análisis de varianza nos muestra un valor de "F" calculado no significativo, es decir no existe diferencias entre los tratamientos (días). El coeficiente de variación nos indica que hubo un manejo aceptable de las unidades experimentales.

Tabla N° 16 Parámetros de precisión Reproducibilidad y Repetibilidad a una concentración de 0,51 ug/l

Suma de cuadrados		Desv. Standart	Parámetro X 2,83	
SC		S		
Scrat = S2 R	0,00335	5,77E-03	2,40E-02	Reproducibilidad
Scerror= S2r	0,01588	3,87E-03	5,20E-02	Repetibilidad
SCT	0,019229			

El análisis de varianza nos muestra un valor de "F" calculado no significativo, es decir no existe diferencias tratamientos (días). El coeficiente de variación nos indica que hubo un manejo aceptable de las unidades experimentales. Se debe realizar diferentes pruebas para saber cuáles de los tratamientos (días) determina las diferencias de medias

12.4. Prueba del tamaño de las capsulas

Tabla N° 17 ANOVA de comparación de capsulas pequeñas, medianas y grandes de las pruebas

Tratamientos	No	Pequeño	Mediano	Grande	
REPETICIONES	1	0,520	0,527	0,510	
	2	0,510	0,430	0,570	
	3	0,501	0,5037	0,5047	
	4	0,505	0,493	0,547	
	5	0,484	0,499	0,509	
	6	0,508	0,500	0,509	
	7	0,507	0,493	0,514	
	8	0,5037	0,501	0,5083	
	9	0,517	0,496	0,522	
	10	0,4999	0,5055	0,5178	
	11	0,4956	0,5055	0,5424	
	12	0,4805	0,4981	0,4909	
	13	0,4852	0,5059	0,5041	
	14	0,4918	0,4824	0,5056	
	15	0,4890	0,4904	0,4483	
	16	0,4887	0,4975	0,4922	
	17	0,5381	0,5564	0,5691	
	18	0,5438	0,5625	0,5741	Total
No rep		18	18	18	54

Tabla N° 17a

S_{xj}		9,0683	9,0466	9,3385	27,4534
s_{xj}²		4,8237	4,8096	5,1119	14,7452
	T.C.	=	13,9572		
	SCT	=	0,7880		
	SCtrat	=	-9,3038		
SCerror = SC.T - SC.trat					
=			10,0918		

Tabla N° 17b

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F _{0,05}
Tratamientos	2	-9,3038	-4,6519	-23,5089	1,734
Error Exp.	51	10,0918	0,1979		
Total	53	0,78801	0,0149		

El análisis de varianza nos muestra un valor de "F" calculado no significativo, es decir no existe diferencias entre las capsulas o que las muestras provienen de poblaciones que tienen todas ellas sus medias en el mismo valor.

12.5. Determinación del error sistemático respecto a valores verdaderos

Tabla N° 18 Determinación del error sistemático respecto a valores verdaderos

Valor certificado	Tratamiento	No Rep	Media	Desv. Standart	t(Calculado)	t(tablas)	Observación
0,2315	Día 1	2	0,2365	0,00495	1,4285	4,3	No difiere
	Día 2	2	0,23	0,00707	-0,3000	4,3	No difiere
	Día 3	2	0,2365	0,00354	1,9975	4,3,	No difiere
	Día 4	2	0,23805	0,00799	1,1593	4,3	No difiere
	Día 5	2	0,22875	0,00516	-0,7537	4,3	No difiere
	Día 6	2	0,24635	0,00205	10,2443	4,3,	Difiere
0,6945	Día 1	2	0,6835	0,00495	-3,1424	4,3	No difiere
	Día 2	2	0,67115	0,00021	-157,2345	4,3	Difiere
	Día 3	2	0,72835	0,01605	2,9824	4,3,	No difiere
	Día 4	2	0,7184	0,00113	29,9088	4,3	Difiere
	Día 5	2	0,7014	0,00849	1,1493	4,3	No difiere
	Día 6	2	0,7326	0,00424	12,7069	4,3,	Difiere
0,5181	Día 1	6	0,50100	0,03556	-1,1781	2,450	No difiere
	Día 2	15	0,50518	0,01388	-1,6055	2,140	NO Difiere
	Día 3	6	0,50800	0,00989	-2,5027	2,45	Difiere
	Día 4	6	0,51111	0,01705	-1,0042	2,45	No difiere
	Día 5	15	0,49000	0,01399	-7,7815	2,1400	Difiere

Los valores observados de t menores que el valor crítico (tablas), la hipótesis nula se retiene o ninguna de las medias difieren significativamente: no hay evidencia de error sistemático. Hay que señalar que esto no significa que no existan errores sistemáticos, sino que no se ha podido constatar su existencia. En el caso de valores mayores al valor crítico tiene una mayor probabilidad de la existencia de errores sistemáticos.

12.6. Determinación del sesgo respecto al valor verdadero

Tabla N° 19 Determinación del error sistemático respecto a valores verdaderos

Valor certificado	Tratamiento	No Rep	Media	%Sesgo
0,2315	Día 1	2	0,2365	-2,1598
	Día 2	2	0,23	0,6479
	Día 3	2	0,2365	-2,1598
	Día 4	2	0,23805	-2,8294
	Día 5	2	0,22875	1,1879
	Día 6	2	0,24635	-6,4147
0,6945	Día 1	2	0,6835	1,5839
	Día 2	2	0,67115	3,3621
	Día 3	2	0,72835	-4,8740
	Día 4	2	0,7184	-3,4413
	Día 5	2	0,7014	-0,9935
	Día 6	2	0,7326	-5,4860
0,5181	Día 1	6	0,50100	3,30052
	Día 2	15	0,50518	2,49373
	Día 3	6	0,50800	1,94943
	Día 4	6	0,51111	1,34893
	Día 5	15	0,49000	5,42366

12.7. Procedimiento para el Cálculo de Linealidad

a) Validación de la Metodología Propuesta

La definición ISO de validación aplicada a los métodos analíticos podría interpretarse como el proceso mediante el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica requerida.

Existe una gran variedad de documentación acerca de la validación de los métodos analíticos especialmente para métodos concretos y numerosas organizaciones promueven su difusión e importancia, como la AOAC(Association of Oficial American Chemists), EPA(Environmental Protection Agency), FDA(Food and Drug Administration), ICH (Internacional Conference on Harmonization), USP (united States Pharmacopoeia), EURACHEM(European Analytical Chemistry), etc.

b) Rango Dinámico Lineal y Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico se define como su capacidad (dentro de un rango) para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito de la muestra. La linealidad, se evaluó, en primera instancia, mediante la inspección visual de las rectas obtenidas y posteriormente, se evaluaron los resultados mediante tratamientos estadísticos. Para evaluar estadísticamente la linealidad se siguieron dos criterios.

- Coeficiente de correlación lineal, considerando lineal el calibrado si $r > 0.999$.
- Desviación estándar relativa de la pendiente inferior al 5%

El porcentaje de linealidad se calculo, a partir de la pendiente de la recta de calibrado y su desviación estándar según:

Ecuación a utilizar:

$$\% \text{ linealidad} = \left[1 - \frac{S_b}{b} \right] \times 100$$

Siendo:

- S_b = desviación estándar de la pendiente
- b = pendiente

Las rectas de calibrado fueron elaboradas a partir de disoluciones acuosas de los patrones de los principios activos, seleccionados a los niveles de concentración adecuados.

Tabla N° 20 Rectas de calibrado, coeficientes de regresión, porcentaje de linealidad

Lotes	Y = bX + a	Coef. Regresión	% Linealidad
12-nov	$y = (0,269 \pm 0,0878) X + 0,001 \pm 0,0053$	0,99986	88,25
15-nov	$y = 0,269 \pm 0,331 X + 0,001 \pm 0,0007$	0,99994	90,45
17-nov	$y = 0,269 \pm 0,275 X - 0,001 \pm 0,003$	0,99959	88,5
18-nov	$y = 0,269 \pm 0,252 X - 0,001 \pm 0,003$	0,99976	87,46
22-nov	$y = 0,269 \pm 0,284 X - 0,001 \pm 0,0003$	0,99771	88,87
24-nov	$y = 0,269 \pm 0,240 X + 0,001 \pm 0,001$	0,99986	86,83

12.8 Evaluación del límite de detección (LD) y cuantificación

La evaluación del límite de detección que a continuación se detalla, se basa en el principio de la aditividad de la covarianza.

Ecuación a utilizar:

$$LD = Y = Y_B + S_B$$

Dónde:

- Y_B = Cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco.
- S_B = Desviación estándar del blanco

Sensibilidad, límite de detección y cuantificación

La sensibilidad, definida como la pendiente de la curva de calibrado a una concentración determinada de analito, no se emplea como tal en los procedimientos de validación. En su lugar utilizan parámetros inversamente relacionados con ella, como el límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

En términos generales, el límite de detección se define como la menor concentración o cantidad de analito que proporciona en el instrumento una señal significativamente diferente a la señal del “blanco” o “ruido de fondo”; esta concentración de analito puede ser detectada, pero no cuantificada.

Ecuación a utilizar:

$$X_{LOQ} = \frac{3S_b}{b}$$

Expresión en la X_{LOD} representa la señal originada por una concentración de analito igual al límite de detección; S_b la desviación estándar de la ordenada en el origen y b la pendiente de la curva de calibrado.

Calculo de límites de cuantificación

El límite de cuantificación es la cantidad mínima que puede cuantificarse con un nivel aceptable de exactitud (sesgo y precisión).

El objetivo de su evaluación es establecer la región de cuantificación y el verdadero límite inferior del rango de trabajo.

Ecuación a utilizar:

$$LC = Y = Y_B + 10 S_B$$

Dónde:

- Y_B = Cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco.
- S_B = Desviación estándar del blanco.

Al igual que para el LD, el modelo o es muy práctica cuando:

Ecuación a utilizar:

$$LD = 3S_{x/y} / b_1$$

Dónde:

- La respuesta del blanco es cero y por ende la desviación estándar también es cero.
- Cuando la respuesta del blanco da resultados negativos y como principio de los análisis fisicoquímicos no existe concentraciones negativas de un analito.

Para estas situaciones se usa también datos, la evaluación del intervalo lineal o curvas de calibración para métodos instrumentales. En estos casos el modelo del ajuste lineal es:

12.9. Calculo del modelo del ajuste lineal

Ecuación a utilizar:

$$Y = b_0 + b_1 X$$

Dónde:

- b_0 = Intersección
- b = Pendiente
- X = Valores de referencia
- Y = Respuesta o valor de laboratorio

Por lo tanto:

$$Y = b_0 + 10S_{x/y}$$

Ecuación a utilizar:

$$LC = 10 S_{xy} / b_1$$

Los resultados obtenidos deben cumplir con las especificaciones iniciales establecidas en el plan de validación y deben cumplir los siguientes criterios.

- ❖ El límite de detección siempre debe ser menor al límite de cuantificación
- ❖ El límite de cuantificación debe ser igual o menor al límite inferior del intervalo lineal.
- ❖ El intervalo lineal debe estar dentro del rango de trabajo.
- ❖ El rango de trabajo es desde el límite de cuantificación hasta el límite superior definido en función al estudio de las recuperaciones.

Tabla 21 Límites de detección y de cuantificación

Caract.	Códigos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
B. control	Media	0,012	0,0406	0,0152	0,016	0,0201	0
	Desv. standar	0,0045	0,0009	0,0018	0,0024	0,0007	0
Spyke 0,1 ug/L	Media	0,11	0,1066	0,1116	0,1932	0,1123	0,1033
	Desv. standar	1,55E-17	0,008	0,0015	0,0019	0,0019	0,0004
	Analito	0,098	0,066	0,0964	0,1772	0,0922	0,1033
Limite de detección		0,1025	0,0669	0,0982	0,1796	0,0929	0,1033
Limite de cuantificación		0,1427	0,0749	0,1143	0,201	0,0992	0,1033

Los límites de detección oscilan entre 0,0669 y 0,1033 ug/L y los límites de cuantificación oscilan 0,0749 a 0,1033 de acuerdo a los tratamientos o días.

12.10. Prueba del tiempo de desecamiento de las capsulas con muestras de 0,51 ug/L

Tabla No 22 Concentración leída de las muestras (0,51 ug/l) considerando el tiempo de desecado
Comparación de días 2 y 5

Tiempo	MEDICIONES (n=3)											S	S2	Sxj2	Sxj
	X1	X2	X3	X4	x5	x6	x7	x8	X9	Promedio	n				
90 min	0,505	0,547	0,509	0,509	0,514	0,499				0,5138	6	3,0825	9,5018	1,5851	1,5836
120 min	0,501	0,505	0,494	0,508	0,507	0,5037	0,499	0,5	0,498	0,5017	9	4,5157	20,3915	2,2659	2,2657
SUMATORIA												7,5982	29,8934	3,851	3,8494

Tabla No 23 ANOVA de La variación del tiempo desecamiento

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	F0,05
Entre Muestras	5,57E-04	1	5,57E-04	4,53E+00	6,414
Dentro Muestras	1,60E-03	13	1,23E-04		
Total	2,16E-03	14			

$$CV = 2,18\%$$

El análisis de varianza nos muestra un valor de "F" calculado no significativo, es decir no existe diferencias estadísticas de las concentraciones leídas afectadas por el tiempo de desecamiento de las muestras de Boro en las capsulas o que las muestras provienen de poblaciones que tienen similares medias.

13. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla N° 24 Resultados finales

Parámetros	Especificaciones	Resultado	Evaluación
Veracidad o Sesgo	%Sesgo <= -8% a 8%	-6,4% a 5%	aceptable
Linealidad	80 a 100% r >0.999	87,5% a 90,4% R = 0,9991 – 0,99987	Aceptable
Limite de detección	0.2 µg de B LD <= LC	0,0669 – 0,1796	0,1 ug detectable
Limite de cuantificación	LD <= LC	0,0749 – 0,2010	0,1 ug detectable
Limite de Repetibilidad	Sr <= 2%	0,01%	Aceptable
Limite de Reproducibilidad	SR <= 3%	0,02%	Aceptable
LC	LC <= 10	LC = 2.4248	Okey
Ocurrencia de error sistemático		16,7 % a 30 %	aceptable
Coefficiente de variación nivel bajo, nivel medio y nivel alto	5 – 10%	0% -6,1%	Excelente
Coefficiente de variación del blanco de control	<31%	2,2% 37%	Muy malo

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta validación se determino las cifras que los parámetros como repetibilidad y reproducibilidad límite de detección, limite de cuantificación, reproducibilidad, robustez, en las cuales nos indican que el método de determinación de Boro con Curcumina es adecuado para el análisis, ya que los valores obtenidos se encuentra dentro de los parámetros permitidos (Tabla 4A).

Grafico 2 Carta de Control 1

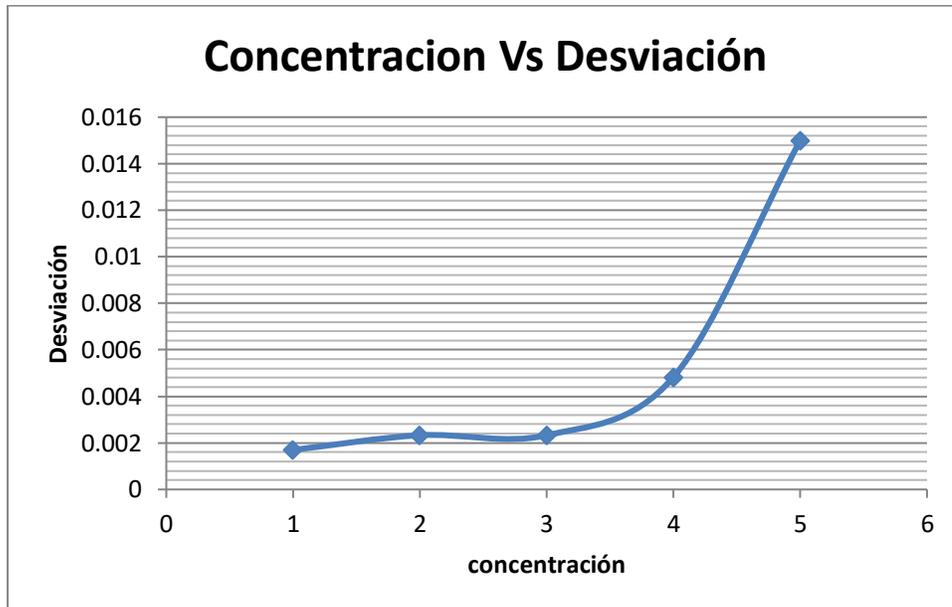
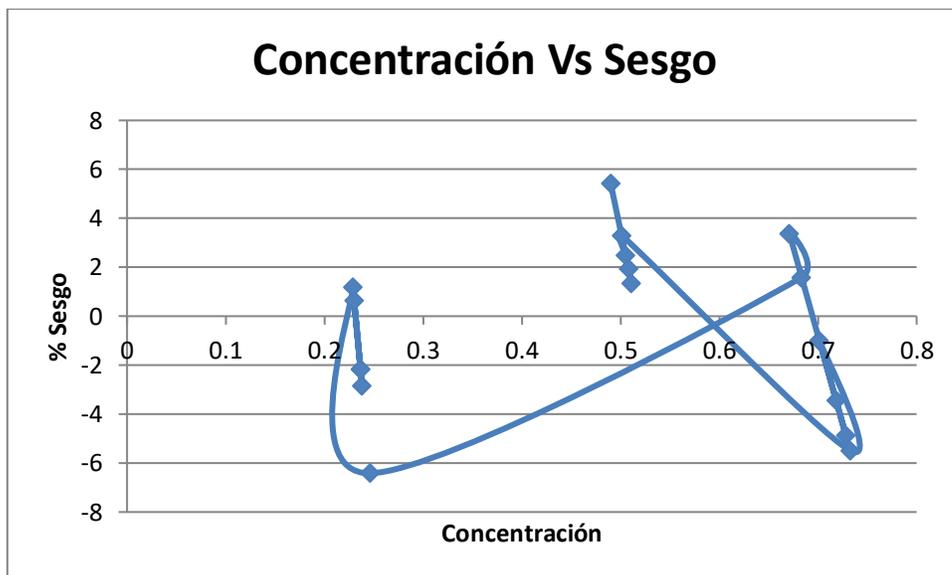


Grafico 3 Carta de Control 2



14. CONCLUSIONES

- Como existe una correlación aceptable de las curvas de calibración se verifica que existe un aumento de su señal por el aumento del analito por lo que el método se considera selectivo y específico con el Boro.
- De acuerdo a las comparaciones de las concentraciones leídas por días y concentraciones de nivel bajo, nivel medio y nivel alto en las ANOVAS respectivas, se llegó a determinar que no existe diferencia significativa entre los días (tratamientos) por lo tanto existe una probabilidad del 95% de que no haya una diferencia estadística de los resultados obtenidos entre días, considerándose el método confiable.
- Los parámetros de repetibilidad, reproducibilidad, sesgo, veracidad y coeficiente de variación, límites de detección, límites de cuantificación, estos valores determinados en las diferentes pruebas y comparados con los límites permisibles se concluye que el método de determinación de Boro es aceptable
- Considerando la variación del tiempo de desecamiento, se llegó a determinar que el tiempo, no influye significativamente en las medias de las concentraciones leídas corroborando la robustez del método.
- Se determina que el tamaño de las capsulas, no afecta en la lectura de las concentraciones de Boro en las muestras.
- Con estos resultados nombrados anteriormente se ha cumplido los objetivos planteados en el Plan de Validación se ha cumplido, ya que se ha logrado recopilar, analizar y extraer la información necesaria para la validación.

15. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Instituto de Normalización y Calidad (Bolivia), Requisitos Generales para la competencia Técnica de los Laboratorios de ensayo y de calibración NB-ISO – 17025:2005, La Paz, Bolivia.
2. Guerrero Postigo Hugo, Política sobre la Trazabilidad de los resultados de medición, La Paz, Bolivia, Instituto Boliviano de Metrología Dirección Técnica de Acreditación.
3. Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria, 1990, “Validación de Métodos Analíticos”, Edición HEWLETT PACKARD, España.
4. Analytical Chemistry in Europe. Guía para la validación de métodos y Tópicos Relacionadas-Guía EURACHEM. Traducción México.
5. Garfield Frederick M. 1993, “Principios de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos”, Edición Española, A.O.A.C. INTERNATIONAL, E.E.U.U.
6. Métodos de Análisis, Instituto de Nutrición de CENTRO América y Panamá, Laboratorios de Química y Bioquímica, 1992.
7. James N. Miller, Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4 Edición, Printer In Spain.
8. “Standard Methods” 20th edition año 2000 E.E.U.U.
9. AOAC(Association of Official American Chemists)96, EPA(Environmental Protection Agency), FDA(Food and Drug Administration), ICH (International Conference on Harmonization), USP (United States Pharmacopoeia), EURACHEM(European Analytical Chemistry)
10. Servant, Zaretsky Validación de un procedimiento para determinación de Boro, Manganeso Comisión Nacional de Energía Atómica Buenos Aires Argentina 2010
11. Little, T. y F. Hills, (1983). Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Editorial Trillas.
- 12.

TABLAS ESTADÍSTICAS

Se presentan a continuación tablas:

La mayor parte de estas tablas abreviadas han sido tomadas, de Elementary Statistics Tables, de Henry R. Neave, publicado por Routledge

Tabla A.1. Valores críticos de F para un contraste de una cola (P = 0.05).

V2 V1,

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

V1 = número de grados de libertad del numerador y V2 = número de grados de libertad del denominador.

Los valores críticos de t son adecuados para un contraste de dos colas. Para un contraste de una cola el valor se toma de la columna para dos veces el valor de P deseado, es decir, para un contraste de una cola, $P = 0.05$, S grados de libertad, el valor crítico se lee de la columna $P = 0.10$ Yes igual 2,02.

Tabla A.2. La distribución t.

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de t para valores de P de número de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58