



Programa Iberoamericano
de Ciencia y Tecnología
para el Desarrollo

Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas



Red Iberoamericana de Laboratorios de Calidad

Editores: Ricardo O. Crubellati
Cecilia D. Di Risio



Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas

Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas

Ricardo Crubellati - Cecilia D. Di Risio (Editores)

COMITÉ EDITORIAL

Validación de Métodos Analíticos:

- María Luisa Castro de Esparza (Perú)
- Claudia Campos (Colombia)
- Saúl Peñaranda (Colombia)
- Susana Casas (Chile)
- Yamileth Astorga (Costa Rica)
- Aída Álvarez Alonso (Cuba)
- Francesc Ventura Amat (España)
- Patricia Simone (Uruguay)

Cálculo de Incertidumbre:

- Ricardo Crubellati (Argentina)
- Cecilia Di Risio (Argentina)
- Wilson Beita (Costa Rica)
- Norma Ramírez (México)
- Claudia Cordero (Guatemala)
- Dalys Rovira (Panamá)
- Rita Rodríguez Medina (Paraguay)



Area de Desarrollo Sostenible

Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas /
Ricardo Crubellati ...
[et.al.]. - 1a ed. - Buenos Aires : Ciencia y Tecnología para el Desarrollo -
CYTED, 2009.

150 p. ; 21x14 cm.

ISBN 978-987-96413-8-5

1. Agua. 2. Sistemas de Redes. 3. Calidad del Agua. I. Crubellati, Ricardo
CDD 333.9

Diseño y compaginación:  PABLOPOMA

Editores: Ricardo Crubellati y Cecilia D. Di Risio

Imprenta: CCC Educando

Av. Warnes 2361/5 (1417)

Capital Federal

Con una tirada de 200 ejemplares

Impreso en Argentina

Queda hecho el depósito que previene la ley 11.723

ISBN 978-987-96413-8-5

No se permite la reproducción total o parcial, de este libro, ni su almacenamiento en un sistema informático, ni su transmisión en cualquier forma o por cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia u otros métodos, sin el permiso previo del editor.

Prefacio

En el mes de enero de 2005 inició sus actividades la Red Iberoamericana de Laboratorios de Calidad de Aguas, dentro del Área de Desarrollo Sostenible del Programa CYTED.

Esta publicación cierra un ciclo, ya que la Red está finalizando sus actividades, y representa un esfuerzo que intenta conjugar una parte de las múltiples actividades realizadas, y una de las más provechosas de todas ellas.

En la última actividad de la Red realizada en la ciudad de Cusco, Perú, se ha realizado un Taller que ha logrado resumir las experiencias de toda esta fructífera etapa de trabajo, y en él se propuso la realización de esta Guía, sobre la base del material presentado y el aportado posteriormente por los distintos integrantes del Comité Editorial.

A lo largo de estos fructíferos cuatro años de trabajo, y a través de las reuniones de coordinación, cursos, talleres, jornadas, la temática relacionada con la validación y el cálculo de incertidumbre en las mediciones ha sido objeto de discusiones y aportes diversos. Incluso en la actualidad, es un tema no del todo resuelto, ya que son muchas las acepciones y las formas de enfrentarlos en los laboratorios de la Región.

Se ha querido cerrar las actividades de la Red tratando de realizar un aporte sobre esta problemática a la que nos vemos expuestos como usuarios. Es por ello que esta publicación no intenta ser una gran enciclopedia, sino una guía práctica de aplicación, para que pueda ser útil y aplicable en el trabajo cotidiano de los laboratorios de análisis de aguas, tanto como en otros laboratorios de análisis. Es también intención del presente trabajo realizar un aporte en el campo de la docencia práctica en este tema, a nivel universitario.

No se pretende que su contenido sea excluyente, y es de destacar que representa el fruto de cuatro años de discusiones y de experiencia volcados en estas páginas, que los autores consideran

un aporte valioso para todos los potenciales usuarios, y que se espera pueda aplicarse con provecho.

Como uno de los editores de esta obra, y como Coordinador de la Red, quiero agradecer todas las contribuciones para este libro, y espero que el material presentado sea un aporte para mejorar este aspecto metodológico tan importante en el trabajo de los laboratorios químicos de análisis.

Ricardo Crubellati
Coordinador Internacional - RILCA
Red Iberoamericana de Laboratorios de Calidad de Aguas
Área Desarrollo Sostenible - Programa CYTED

Prólogo

En este libro se abordan dos temas relacionados con uno de los más importantes aspectos en lo relativo a la calidad de la información generada por un laboratorio de análisis químico: la validación de los métodos utilizados, y la forma expresión de los resultados, esto es, el cálculo de incertidumbre en las medidas realizadas.

En el Taller Iberoamericano sobre Validación y Cálculo de Incertidumbres, realizado del 14 al 17 de octubre de 2008 en la Universidad San Antonio Abad en Cusco, Perú, este tema fue discutido por representantes de laboratorios de diferentes países de Iberoamérica, y surgió la inquietud de producir una guía práctica para uniformar los criterios en cuanto a los procedimientos de validación y en cuanto a la expresión de resultados y cálculo de incertidumbres.

Si bien se dispone de profusa información bibliográfica, la realidad demuestra (por ejemplo, en las participaciones en ensayos interlaboratorio), que distintos laboratorios suelen utilizar criterios no uniformes para abordar estos temas. También hay otros, especialmente los no dedicados únicamente al análisis de muestras como actividad principal (por ejemplo, los que desarrollan sus tareas en las Universidades), que se enfrentan a la necesidad cada vez más creciente de demostrar que su información es de la calidad adecuada para el uso previsto.

Uno de los objetivos básicos del material presentado en este libro es ofrecer guías tendientes a la homogeneización de las metodologías de cálculo entre los laboratorios que han participado en el Proyecto de la Red Iberoamericana de Laboratorios de Calidad de Aguas (RILCA-CYTED), y tratar de promover su uso en otros laboratorios de la región, a fin de lograr que la información producida por diferentes laboratorios químicos sea de calidad y comparable.

Este libro está organizado en dos grandes secciones, una relacionada con la validación y la otra con el cálculo de incertidumbres. En ambas, se ha dado énfasis a los casos prácticos, considerando el día a día del quehacer en el laboratorio, en el cual

debe estar claro para el analista o el responsable de calidad, qué parámetros debe estudiar de un método a fin de proceder a su validación, qué mediciones debe realizar para asegurar el cálculo de su incertidumbre, y qué documentación básica debe generar y poseer registrada a fin de trabajar en condiciones que garanticen la calidad de sus resultados.

Todas las referencias bibliográficas básicas y de consulta han sido mencionadas en la sección correspondiente, ya que, salvo algunos casos específicos, no se desarrollan exhaustivamente los principios de las metodologías de cálculo, sino que se hace énfasis en los procedimientos prácticos a aplicar. En ese sentido, se ha preferido explicar detenidamente qué se debe hacer ante un caso particular (un cálculo de límites de detección para una determinación en particular, el desarrollo de un procedimiento normalizado de operación, una expresión para la incertidumbre en un dado método de análisis químico), y, más que referirse a los documentos generales, se ha optado por ejemplificar con situaciones cotidianas en el trabajo del laboratorio.

Como marco general, se ha desarrollado brevemente el concepto de validación de los métodos de análisis, y cuáles se ha considerado que son las características básicas a evaluar cuando se procede a la validación de un método. En el caso del cálculo de incertidumbres, se presentan los dos tipos de metodologías actualmente utilizadas, la del criterio Eurachem, y la que promueve el cálculo de incertidumbres basándose en los datos obtenidos en la validación previa del método; en ambos casos, se presentan también ejemplos prácticos de aplicación, con datos reales obtenidos en diferentes laboratorios.

Esperamos que este material sea útil para el trabajo en los laboratorios de análisis, y pueda contribuir, ofreciendo una metodología sencilla y explicada con ejemplos concretos, a que más y más laboratorios en los cuales se producen datos analíticos, puedan aumentar su propia confianza en los resultados que obtienen, y ofrecer así información cada vez de mayor calidad.

Índice

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN	11
2 LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS	15
2.1 Aspectos Generales	15
2.2 Características a Evaluar	20
2.3 Ejemplo 1: Procedimiento Normalizado de Operación	33
2.4 Ejemplo 2: Cálculo del Límite de Detección para la determinación volumétrica de cloruro	41
2.5 Ejemplo 3: Validación de un Método Cromatográfico	51
2.6 Ejemplo 4: Cálculo de Límites de Detección para la determinación de plomo y otros metales por técnicas de espectrometría atómica	58
2.7 Ejemplo 5: Estimación del Límite de Detección para Métodos Cuantitativos Microbiológicos	63
3 INCERTIDUMBRE EN MEDICIONES QUÍMICAS	75
3.1 Aspectos Generales	75
3.2 Cálculo de Incertidumbre mediante el criterio Eurachem	77
3.3 Ejemplo 6: Cálculo de incertidumbre para métodos gravimétricos (Eurachem)	83
3.4 Ejemplo 7: Cálculo de incertidumbre para métodos volumétricos (Eurachem)	92
3.5 Cálculo de Incertidumbre en base a la información obtenida en la Validación	113
3.6 Ejemplo 8: Cálculo de incertidumbre asociada a la determinación de cromo utilizando un material de referencia certificado	122
3.7 Ejemplo 9: Cálculo de la incertidumbre asociada a la determinación de plomo por comparación con un método de referencia	131
4 BIBLIOGRAFÍA Y FUENTES DE INFORMACIÓN	139

1.- INTRODUCCIÓN

Actualmente, 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 (calidad del agua, del aire y del suelo, procesos de contaminación, protección general del medio ambiente, investigaciones criminales en análisis forenses y otros muchos ejemplos).

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.

Cuando una muestra llega a un laboratorio, se supone que ha sido enviada porque el laboratorio posee la experiencia y experticia necesaria para entregar un resultado “real”, o sea, apropiado para el uso previsto. Por esa razón, cualquier laboratorio debe ser capaz de presentar sus resultados de forma tal que la persona que va a utilizarlos los pueda comprender y obtener de ellos las conclusiones correctas para elucidar el problema que ha llevado a que la muestra sea analizada. Normalmente, los clientes no conocen las características de los métodos de análisis, y por qué son aplicables a la resolución del problema presentado. Los **procedimientos de validación** son los que permiten a los

laboratorios demostrar que sus métodos de análisis son los adecuados para cada situación concreta.

Todo lo anterior está basado en el supuesto de que la muestra empleada es apropiada para evaluar el problema que se desea resolver. Una de las propiedades analíticas supremas es la representatividad de la muestra, y ésta tiene su soporte en el muestreo adecuado. Es una tarea difícil que requiere mucha experiencia, y una clara comprensión del problema y de su conexión con la química; por ejemplo, en el caso de los análisis de aguas, muchos laboratorios ofrecen el servicio de toma de muestras, en el conocimiento de que ese paso es fundamental para garantizar que los datos analíticos entregados (que pueden ser muy buenos desde la óptica interna del laboratorio) puedan ser útiles y legalmente aceptables para evaluar la situación real que da origen a la llegada de la muestra al laboratorio.

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.

Según la Guía ISO 3534-1 la incertidumbre es “una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se afirma que está el valor verdadero”. Esta definición presenta la dificultad filosófica de que el “valor verdadero” no puede conocerse, ante lo cual resulta útil la definición planteada por el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM): “la incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de valores que pueda ser razonablemente atribuido al mensurando” (el mensurando es “la magnitud sujeta a medida”, lo que en análisis químicos corresponde a la concentración del analito o a la propiedad que se está determinando). La incertidumbre proporciona entonces una idea de la calidad del resultado, ya que

indica cuánto puede alejarse un resultado del valor considerado como “valor verdadero”.

En algunos sectores de la química analítica existe además un requisito formal, generalmente legislativo, para que los laboratorios introduzcan el aseguramiento de calidad de las mediciones, de manera de asegurar que ellos son capaces de proporcionar los datos con la calidad requerida. El aseguramiento de la calidad incluye el uso de métodos de análisis validados, el uso de procedimientos internos definidos de control de calidad, la participación en ensayos de aptitud, la acreditación según ISO 17025.2005, y el establecimiento de la **trazabilidad** de los resultados de las mediciones.

Históricamente en el trabajo en Química Analítica, ha existido gran énfasis en la precisión de los resultados obtenidos usando un método especificado, más que en su trazabilidad a patrones obtenidos. Esto ha llevado al uso de métodos recomendados (oficiales, estandarizados, etc.), para cumplir con los requisitos legislativos y comerciales. Sin embargo, como existe un requisito formal para establecer la confianza de los resultados, es esencial que el resultado de la medición sea trazable a un patrón definido, tal como una unidad SI, un material de referencia o, cuando es aplicable, a un método definido o empírico.

El concepto de trazabilidad complementa el concepto de exactitud (CITAC/EURACHEM 2000). La trazabilidad se define formalmente como "la propiedad del resultado de una medición que consiste en que se pueda establecer el resultado previsible de su comparación directa con los patrones apropiados, por lo general, nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones reales". Básicamente, esto significa que es posible, dado un resultado obtenido, conectarlo con una referencia acreditada. Aquí surge la cuestión de la distinta concepción de la trazabilidad, según se haga referencia a mediciones físicas o químicas, ya que se debe demostrar que es posible hacer análisis químicos trazables, debido a que normalmente una medición química en cualquier laboratorio implica la realización de más de una etapa independiente, y eso lo

diferencia de, por ejemplo, un proceso de medida donde sólo intervienen magnitudes físicas. La forma práctica de comprobar la trazabilidad es comparar los resultados entre laboratorios, y para ello, la comparación debe realizarse utilizando métodos normalizados. Aquí se recurre a lo que en el caso de magnitudes físicas sería la comparación con un patrón, trabajando con materiales de referencia certificados.

En esta breve síntesis inicial, se han abordado y definido los tres grandes conceptos que hacen, hoy en día, a la calidad de la información generada por un laboratorio químico: la validación de los métodos, la incertidumbre de las mediciones, y la trazabilidad de los resultados obtenidos.

Estos serán explicados con más detalle en las siguientes secciones, haciendo énfasis en la aplicación práctica para diferentes casos particulares. Es importante remarcar, como conclusión final, que para obtener trazabilidad es necesario proceder a la validación de los métodos de medida que se desarrollan en los laboratorios. El proceso de validación de los métodos implica el conocimiento profundo de una determinada serie de características operativas de los mismos, que debe ser estudiada en detalle en cada laboratorio, a fin de garantizar la calidad de los resultados.

Los más prestigiosos 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.

2.- LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

2.1- ASPECTOS GENERALES

Según la literatura especializada la validación puede definirse como:

- ✧ Un proceso para establecer las características y limitaciones de un método analítico y para identificar las influencias que pueden modificar esas características y en qué medida.
- ✧ Un proceso para verificar que un método es apropiado para un propósito, es decir para ser utilizado para resolver un problema analítico particular.

El proceso de validación debe poder contestar estas preguntas: ¿Qué analitos pueden ser determinados, en qué matrices y en presencia de qué interferentes? ¿Dentro de estas condiciones, qué niveles de exactitud y precisión pueden ser alcanzados?

La Validación es la confirmación mediante examen y entrega de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso previsto específico. La Validación de un método de ensayo es la demostración de que un método de ensayo es apto para un uso previsto.

En la práctica, que un método analítico sea adecuado para un determinado propósito se determina mediante estudios de validación, y éstos proporcionan información sobre el procedimiento completo y sobre la influencia de factores individuales, de tal forma que pueden ser aplicados además a la estimación de la incertidumbre asociada con los resultados de los métodos en uso.

Los métodos de validación de los procedimientos analíticos están muy estrechamente vinculados a los métodos de desarrollo de dichos procedimientos y a veces no es posible

determinar exactamente dónde termina el desarrollo del método y dónde comienza la validación. La mayoría de las características de los métodos asociados a los procesos de validación han sido de hecho evaluadas, al menos aproximadamente, en el desarrollo del método.

Un procedimiento debe ser validado en mayor o menor extensión cuando:

- ✓ se desarrolla un método nuevo para resolver un problema particular;
- ✓ un método establecido se modifica para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema;
- ✓ el control de calidad indica que un método establecido está cambiando con el tiempo;
- ✓ un método establecido se usa en un laboratorio diferente, o con diferentes analistas o instrumentación;
- ✓ se pretende demostrar la equivalencia entre dos métodos, uno nuevo y uno estándar.

Es preciso aclarar que aún cuando el procedimiento analítico haya sido aceptado sin cambios de una fuente reconocida (como sucede típicamente, por ejemplo, con los procedimientos estandarizados para los laboratorios de calidad de agua), y posea una documentación de validación apropiada, no resulta recomendable asumir que la misma se ajusta a las condiciones del Laboratorio sin antes comprobar y garantizar, con todas las acciones necesarias, que el laboratorio es capaz de alcanzar los niveles de aptitud declarados en el procedimiento.

Diseño de la validación

Para que los resultados de la validación sean confiables ante cualquier cliente, incluidos los Órganos Internacionales, Regionales y Nacionales de Acreditación, los diseños empleados deben ajustarse a alguna de las guías y/o documentos técnicos emitidos por Instituciones, Comités y/o publicaciones reconocidas internacionalmente. En este sentido se han redactado guías, metodologías y otros documentos técnicos en el campo del análisis

de los alimentos y de productos farmacéuticos, que abordan los aspectos vinculados al proceso de medición en su conjunto de manera amplia y rigurosa. En el campo del análisis de agua (industrial, de consumo humano y aguas residuales) las referencias documentales más utilizadas tratan el tema de una manera más general, sin profundizar en el mismo.

Es de señalar que, sin estar vinculadas a un campo de análisis en específico, las guías de EURACHEM y de IUPAC consideran las situaciones que en general pueden presentarse en un laboratorio de ensayo.

Lo cierto es que independientemente de la rama con la que están vinculadas las entidades que han emitido cualquiera de los documentos anteriormente mencionados, éstos son aplicables en cualquier campo del análisis, haciendo las consideraciones y ajustes necesarios.

Es importante tener en cuenta además, que antes de emprender un proceso de validación es preciso asegurar que el equipamiento a emplear posee la calibración requerida, los insumos (reactivos, materiales consumibles, etc.) se corresponden con las especificaciones establecidas, y que el personal que llevará a cabo tanto la parte experimental como la interpretación de los datos, posee la experiencia adecuada.

Alcance de la validación

El alcance de la validación de un procedimiento introducido en rutina dependerá de cuán completo fue el proceso de desarrollo del procedimiento, de la naturaleza de los cambios realizados una vez aplicado éste y de la confiabilidad de la fuente de la que fue tomado. Algunas recomendaciones generales al respecto se dan en la literatura especializada.

El alcance de la validación debe ser establecido sobre la base de un adecuado compromiso entre costo y rigor: o sea, tratando de minimizar la cantidad de trabajo experimental

requerido para obtener la información necesaria con una confiabilidad aceptable.

Existe profusa literatura sobre los métodos de validación mediante estudios interlaboratorios. Están además disponibles un gran número de protocolos y otras publicaciones relacionados con este tipo de validación. Estos resultan los métodos de validación más completos y proporcionan la mayor cantidad de información sobre los procedimientos analíticos. Por eso, cuando un método es desarrollado para un amplio uso, como ocurre con los procedimientos estándar, es imprescindible este tipo de validación. No obstante, en la vida normal de un Laboratorio esto no siempre es posible. Los métodos que aplica el Laboratorio pueden no tener una amplia aplicación en otros Laboratorios: esto pasa frecuentemente en los laboratorios industriales, que se enfrentan a la realidad de que no existen otros laboratorios interesados en participar en este tipo de ensayos. En esos casos pueden ser empleados los métodos de validación en un sólo Laboratorio, los comúnmente denominados métodos de validación “in house”.

Que la validación en un único laboratorio pueda ser aceptada para fines oficiales depende de las disposiciones de cada área con respecto a las mediciones específicas de que se trate. Esto puede ser establecido por los organismos reguladores mediante sus políticas. Un ejemplo de este hecho son las disposiciones de los reguladores de las aguas potables en Inglaterra donde tales validaciones están permitidas, bajo ciertas restricciones. Basándonos en esto, se puede recomendar, para los Laboratorios de Calidad del Agua, una validación en diferentes etapas:

- ✧ un diseño de validación dentro del laboratorio (“in house”).
- ✧ un diseño gradual de validación en tres etapas: dentro del laboratorio; con uno o dos laboratorios externos y finalmente un estudio interlaboratorio.

En general, el reconocimiento oficial de un método requiere una caracterización basada en estudios interlaboratorios apropiados.

El alcance de la validación implica definir:

- ❖ Características de las muestras (matriz). En el ejemplo de la matriz agua, deberá especificarse por ejemplo: potable, uso industrial, efluentes de desecho, etc.
- ❖ Tipo de información: cuantitativa y/o cualitativa.
- ❖ Requerimientos del cliente sobre la calidad de los resultados (en el ejemplo, estas son usualmente las Normas de Calidad de Agua de aplicación local).
- ❖ Condiciones del laboratorio (hay que definir si se van a emitir resultados aplicando el procedimiento en uno o varios equipos, en un mismo laboratorio o en laboratorios diferentes, y entonces es obvio que el diseño deberá tener en cuenta tales circunstancias).
- ❖ Los parámetros a evaluar y sus valores críticos de acuerdo a los requerimientos establecidos.

Suele suceder que el cliente establece requerimientos en costo y tiempo y no en términos de confiabilidad de los resultados; esto queda entonces a criterio del Laboratorio, en cuyo caso éste deberá establecerlos sobre la base de las posibilidades de los procedimientos disponibles.

Los métodos estándar que están disponibles fueron desarrollados y validados, sin embargo algunas veces no incluyen todas las características del método, por ejemplo la calibración. Por eso, estos métodos deben ser considerados como métodos recomendados de base, y partir de allí cada método debe adaptarse y validarse a las condiciones de cada laboratorio.

Esta Guía se ha fundamentado en presentar los requerimientos necesarios para evaluar y validar en un Laboratorio aquellos procedimientos analíticos que están basados en métodos recomendados, ya sean normalizados, estandarizados o publicados por organismos de reconocido prestigio internacional (EPA, ASTM; TAPPI, AOAC, etc.).

2.2- CARACTERÍSTICAS A EVALUAR

En esta guía se ha acordado que para validar un método, se deben evaluar las siguientes características:

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.

También debe considerarse otro tipo de selectividad cuando un analito puede existir en la muestra en más de una forma: inorgánico u organometálico, con diferentes grados de oxidación, etc., lo que comúnmente se conoce como “especiación” del analito en cuestión.

Salvo una situación imprevista, los estudios de selectividad para una matriz específica se realizan en la fase de desarrollo del procedimiento. Ejemplos de pérdida de selectividad pueden darse en HPLC ó CI con la presencia de picos “impuros” con señales de más de un compuesto, sin que puedan ser discriminados por el sistema de detección. Para mencionar otro ejemplo, también

deben estudiarse las interferencias espectrales que pueden ocurrir en ICP para un ancho de banda dado siempre que las relaciones de concentración interferente/analito sean lo suficientemente significativas, de otro modo no es posible garantizar la selectividad del método.

Esta es una característica muy importante, que es necesario evaluar aún cuando se trabaje con un método recomendado y de amplia difusión, ya que puede haber ligeras diferencias en las matrices a utilizar que provoquen interferencias y lleven a resultados poco confiables.

Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método (cambios en una o más de las condiciones de trabajo); se dice que un método es robusto cuando se puede demostrar su invariabilidad durante el uso normal. Cuando se estudia esta característica de un método analítico, pueden ser determinadas las variables con efectos más significantes sobre el método y además definir las formas de controlarlas durante su uso.

La robustez suele ser estudiada por los Laboratorios que elaboran un método antes de entrar en estudios con otros Laboratorios, y es necesario evaluarla cuando no se ha considerado validar un método recomendado.

Linealidad

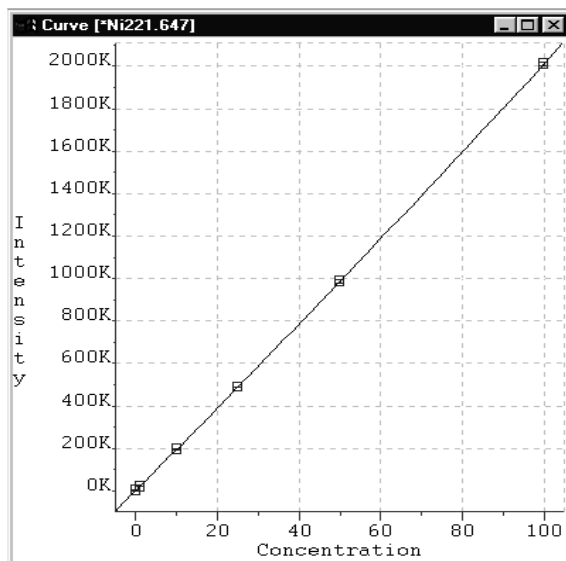
Se define como la relación lineal entre la señal y la concentración del analito. Para los métodos cuantitativos es necesario conocer el rango de concentraciones del analito o valores de la propiedad en que se basa el método sobre el cual el método puede ser aplicado. Generalmente se habla del rango en la solución de trabajo más que en la muestra original, aunque muchas veces resulta cómodo también referirlo a la muestra de origen para

poder saber si en verdad se han cumplido los objetivos deseados. En el extremo inferior del rango de concentraciones, los factores limitantes son los límites de detección o cuantificación, de los que hablaremos más adelante. En el extremo superior las limitaciones están dadas por las características de la respuesta del instrumento.

Dentro del ámbito de trabajo generalmente existe un rango de respuesta lineal, dentro del cual habrá una relación lineal entre la señal y la concentración del analito o el valor de la propiedad que se mida. Los cálculos de la regresión (como los coeficientes de correlación R^2) suelen ser insuficientes para demostrar la linealidad del gráfico de calibración, y en general de cualquier tipo de ajuste. Para ello es preferible un análisis visual o el análisis de los residuos. En general para comprobar la linealidad se requiere de al menos 10 puntos.

La evaluación del rango de trabajo y el rango lineal son también importantes a la hora de planificar el grado de calibración requerido para los métodos de rutina. Es aconsejable también investigar la varianza a través del rango de trabajo. Dentro del ámbito lineal, un punto de calibración puede ser suficiente para establecer la pendiente del gráfico de calibración. Para establecer el rango de trabajo se requiere en cambio de varios puntos, preferiblemente 6 ó más. La relación entre la respuesta del instrumento y la concentración no tiene que ser necesariamente lineal para que el método sea efectivo, pero la curva debe ser repetible de un día a otro.

El equipamiento moderno permite tener una visualización rápida del proceso de calibración, lo que facilita la determinación del rango de trabajo y el rango lineal. La figura muestra el gráfico de calibración obtenido en un ICP-OES.



Límite de detección (LD)

La posibilidad de detectar un cierto parámetro en una muestra depende del método recomendado, la calibración del método y del equipo verificado. Cuando las mediciones se realizan a niveles bajos del analito o propiedad que se mida, en el análisis de trazas, es importante conocer cuál es el límite inferior del analito o propiedad que puede ser detectado con certeza por el método. Aunque se trata de un término muy polémico y existen diversas denominaciones para el mismo: ISO “mínima concentración neta detectable”, IUPAC “mínimo detectable valor verdadero”, para los fines de la validación es suficiente una indicación del nivel a partir del cual la detección se vuelve problemática, para ello el valor del “blanco + 3,3 s” es una medida apropiada.

Para calcularlo se toman no menos de 10 réplicas (a) del blanco o (b) del blanco fortificado con los elementos a determinar en su menor concentración aceptable y se evalúa la desviación estándar del blanco o del blanco fortificado expresándose el LD como el valor de la señal del blanco + 3,3 s_B o como $0 + 3,3 s_{BF}$.

Entonces:

- ✧ Cuando el método detecta la señal del blanco, el LD se calcula como el valor de la señal del blanco más su desviación estándar multiplicada por el factor 3,3.

$$LD = B + 3,3 s_B$$

- ✧ Cuando no hay señal, se utiliza un blanco fortificado (en baja concentración). El LD se calcula como tres veces la desviación estándar del blanco fortificado.

$$LD = 0 + 3,3 s_{BF}$$

Límite de cuantificación (LQ)

El límite de cuantificación es estrictamente la menor concentración de analito que puede ser determinada con un aceptable nivel de repetibilidad y exactitud. Se obtiene al multiplicar por tres el límite de detección, en casos especiales por cinco.

Otras convenciones lo definen como la concentración de analito correspondiente a un valor del blanco + 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Se denomina a veces también límite de determinación.

El LQ no debe ser usado para la toma de decisión. Ni el LD ni el LQ representan niveles en los cuales la cuantificación es imposible. Su significado práctico está asociado a que, simplemente, en la región del LD la magnitud de la incertidumbre asociada es comparable al resultado real.

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.

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 medidas más comunes de la precisión son repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad (de resultados de mediciones): grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición; es la medida de la variabilidad de los resultados cuando el método es aplicado por un solo analista, con un mismo equipo, en un corto periodo de tiempo, etc.

Reproducibilidad: grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mensurando efectuadas bajo condiciones de medición modificadas. Es el caso al realizar diversas réplicas en diversos días cambiando instrumento, analista e incluso el laboratorio.

Cuando se calcula la precisión en condiciones de repetibilidad, se obtienen valores distintos que al calcular la precisión en condiciones de reproducibilidad. Las condiciones de repetibilidad dan lugar a los mínimos valores de precisión y las condiciones de reproducibilidad dan lugar a los máximos valores de precisión. Entre estas dos podemos encontrar condiciones intermedias (por ejemplo, diversas réplicas en diversos días cambiando instrumento y analista pero dentro de un mismo laboratorio); estas condiciones suelen considerarse

tradicionalmente como reproducibilidad, aunque lo más correcto en esos casos es hablar de la “precisión intermedia”.

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.

Veracidad (Sesgo)

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

en 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.

La tabla que se presenta a continuación muestra un ejemplo de comparación de un método nuevo desarrollado por ICP-OES, con otro ya establecido y utilizado por largo tiempo en un Laboratorio en el que se emplea la técnica de Absorción Atómica para el análisis de aguas residuales. En este ejemplo se han empleado las herramientas estadísticas adecuadas para la comparación.

Elemento	Valor de EAA	Valor de ICP	t calculado	Signif.
As (mg/L)	0.432	0.414	0.826	No
Cd (mg/L)	0.048	0.048	0.000	No
Cr (mg/L)	1.044	1.014	1.759	No
Cu (mg/L)	0.493	0.473	1.844	No
Fe (mg/L)	0.203	0.216	1.040	No
Mg (mg/L)	3.127	3.049	1.876	No
Mn (mg/L)	0.058	0.060	0.787	No
Ni (mg/L)	0.535	0.537	0.287	No
Pb (mg/L)	1.055	1.081	1.408	No
Sb (mg/L)	0.413	0.419	0.999	No
Zn (mg/L)	0.213	0.206	0.932	No

En la tabla siguiente se muestra otro ejemplo para la evaluación del sesgo en una prueba de recuperación en una muestra fortificada, ya que en este caso no fue posible comparar con otros métodos ni se disponía de MCR.

Elemento	Contenido en la muestra	% de Recuperación
Ag ($\mu\text{g/mL}$)	0.142	97.3
Ba ($\mu\text{g/mL}$)	2.57	100.3
Hg ($\mu\text{g/L}$)	8.96	97.8
Se ($\mu\text{g/L}$)	17.34	100.4

La fortificación es la acción de añadir un analito, sustancia, matriz química o un material de referencia certificado (MRC) a una muestra en cualquier etapa de un análisis químico, para verificar la respuesta del sistema de medición con un objetivo determinado.

El porcentaje de recuperación es solo un componente de la veracidad. Es útil para decidir la carta de control que se emplea en el monitoreo de la calidad en muestras con matrices complejas que presentan grandes interferencias, casos en los cuales no suele ser fácil disponer de MRC.

Las metas de recuperación deben estar claras y dependen del método aplicado. Los límites en general son de 95-105%, pero habría que establecer las metas por grupos de parámetros. Por ejemplo, para el análisis de compuestos orgánicos se recomienda la utilización de compuestos marcados con ^{13}C o ^2H .

Incertidumbre

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.

La estimación de la incertidumbre debe tomar en cuenta:

- ✓ variaciones en el tiempo,
- ✓ el sesgo y su incertidumbre,
- ✓ la incertidumbre de la calibración,
- ✓ cualquier otro efecto significativo.

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.

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

Conclusiones

- ❖ Los métodos de validación nos dan información sobre las características del método, sus posibilidades y limitaciones.
- ❖ Deben ser empleados en rutina bajo un control de calidad. Este control es necesario para verificar que el método conserva sus propiedades, es decir que trabaja en la forma esperada.
- ❖ Entre los elementos para el control de calidad, deben incluirse:
 - Determinación de blancos, asociado al cálculo de la precisión.
 - Muestras de control interno, asociado al seguimiento de la calidad de los datos. Se puede usar un estándar primario o una muestra de concentración conocida estabilizada. El laboratorio debe establecer con qué frecuencia se va a usar.
 - Muestras de referencia certificadas, asociado con la trazabilidad. El laboratorio debe establecer la frecuencia con que deben ser utilizadas, dependiendo del método.

- Muestras de desempeño o ensayos de aptitud, asociado al control externo y en casos especiales a la trazabilidad. Se recomienda realizarlos al menos una vez al año.
- ✧ Durante la validación el método se aplica comúnmente a muestras de concentración conocida, mientras que en la rutina se aplicará a muestras de diversa concentración. El Laboratorio puede decidir así si el método requiere alguna optimización o es adecuado para el objetivo propuesto.
- ✧ Es una práctica acertada dentro del control de calidad reanalizar muestras conocidas cada cierto tiempo, para mantener la confianza en los resultados.

A continuación, se presenta una Tabla Resumen con las características anteriormente mencionadas, donde se explicita, para diferentes parámetros que suelen determinarse en muestras de agua, cuáles de ellas deben ser investigadas en el proceso de validación y cuáles son los elementos básicos del control de calidad que deben ser tenidos en cuenta para cada método.

2.3- EJEMPLO 1: PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

A continuación, se detalla y comenta un procedimiento normalizado de operación (PNO).

Un procedimiento normalizado de operación presenta los pasos sucesivos a llevar a cabo cuando se desea determinar algún parámetro en particular en alguna muestra. Detalla las distintas etapas que sirven al analista para analizar una muestra, y generalmente está basado en alguna normativa (ISO; ASTM, EPA, etc.); debe presentar además información sobre el alcance del método y sobre el control de calidad interno propuesto.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

PARA ...*(la determinación del parámetro, por ej “alcalinidad total”)* POR EL MÉTODO DE ...*(citar el método de análisis, por ej “titulación potenciométrica”)*

Deben incluirse al pie de la primera página los datos relativos al personal que preparó, revisó y aprobó el procedimiento:

		Fecha:	Firma:
Preparado por:	(Analista Instrumental) (Analista Químico)		
Revisado por:	(Supervisor de Calidad)		
Aprobado por:			

Se incluyen además los datos del documento:

Fecha de emisión:	Revisión:	No. de páginas:
-------------------	-----------	-----------------

Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento sin previa autorización del Supervisor del Laboratorio.

El PNO debe contener tanto del detalle del procedimiento como la forma de realizar el control de calidad del método analítico.

SECCION DEL PROCEDIMIENTO

1. Aplicación

- 1.1 Este método es aplicable a la determinación de en muestras de (*especificar la matriz en la que se puede aplicar el método, por ejemplo "aguas residuales"*)
- 1.2 El límite de detección de este método es mg/L

El alcance del método debe ser especificado claramente::

- 1.3 Mediante este método se puede determinar.....en un rango deamg/L, y por dilución, concentraciones máximas de

2. Resumen del método

Es necesario presentar una breve descripción de la metodología analítica, y los principios básicos del método.

3. Precauciones de seguridad

Deben figurar las condiciones relativas a la Higiene y Seguridad en el trabajo, considerando los reactivos y el equipamiento utilizado, y especificando el destino de los residuos generados en el procedimiento analítico.

4. Precauciones

Se refiere a los cuidados especiales que deben tenerse en cada uno de los pasos del procedimiento.

5. Interferencias

Deben detallarse todas las fuentes posibles, en ítems separados. Por ejemplo, en un método espectrométrico, deberían figurar las interferencias físicas, las químicas y las espectrales.

6. Instrumental/materiales

Deben detallarse todos los instrumentos y material de laboratorio, en ítems separados; en el ejemplo citado anteriormente debería comenzarse por el tipo de equipo espectrométrico; y siguiendo por las pipetas, matraces, vasos, filtros si son necesarios en el pretratamiento de las muestras, etc.

7. Reactivos

Deben figurar tanto los reactivos puros como la forma de preparación detallada de las soluciones necesarias.

8. Calibración del equipo

Indicar todos los pasos previos para garantizar que el equipo está funcionando correctamente (por ejemplo., para un método espectrométrico atómico, ajuste de longitud de onda, ancho de ranura, flujo gaseoso, etc.)

9. Calibración del método

Esto se refiere a la calibración química de la metodología. Se deben indicar los diferentes pasos, y cómo preparar las soluciones que se van a utilizar para construir la curva de calibrado. También debe incluirse el tiempo de vencimiento de cada solución.

10. Muestreo y preservación

Se definen las características necesarias para garantizar que la muestra a analizar sea representativa del problema analítico en cuestión. Asimismo, debe garantizarse que la muestra una vez extraída llegue al laboratorio sin que se altere el parámetro a determinar. También debe

informarse la forma de preservación en el laboratorio y el tiempo máximo permisible antes del análisis.

11. Procedimiento de análisis

Se debe detallar en pasos sucesivos cada una de las etapas, desde el volumen de muestra tomado hasta la lectura final. Es la guía práctica para el trabajo del analista.

12. Análisis de datos

Se debe detallar el procedimiento de cálculo, teniendo en cuenta cómo transformar el dato leído por el analista en el resultado final que se debe entregar en el informe.

El contenido de en la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$C = \frac{W_{As}}{V_m}$$

donde:

C = concentración de en la muestra.

W_{As} = cantidad de obtenida de la curva de calibración en μg .

V_m = volumen de la muestra en mL.

El resultado se debe reportar en $\text{mg/L} \pm I$, donde I es la incertidumbre calculada.

13. Registro

Se detallan todos los registros que deben realizarse y preservarse, para garantizar la trazabilidad del resultado.

Se generan los siguientes registros, los cuales se encuentran en la sala de instrumental:

Cuaderno de Toma de Muestras, es un registro de las muestras para análisis de, donde se consigna el nombre del analista,

fecha de análisis, el método que se aplica, la identificación de la muestra, acompañado de su control de calidad, alícuota tomada sea en peso o volumen y volumen final a la que se lleva.

Formulario de preparación de reactivos, donde se registra la fecha de preparación, reactivo preparado, volumen de la solución preparada, marca y lote del reactivo, tiempo de duración máxima, nombre del analista que preparó.

Formulario de preparación de Estándares de Calibración y Control, donde se registra fecha de preparación, volumen preparado, nombre del analista que preparó, marca y lote del estándar; igualmente el frasco de almacenamiento tiene una etiqueta donde se indica estándar preparado o estándar control, fecha de preparación, iniciales del analista, la concentración de cada analito, preservación, tiempo de duración máxima.

Cuaderno de Mantenimiento de los Equipos, donde se señalan los problemas en el equipo, para el mantenimiento preventivo y correctivo del mismo.

Cuaderno de Disposición de Muestras y extractos, donde se registra fecha de ingreso, lote, fecha de eliminación, nombre del responsable de las muestras y extractos en custodia.

Cuaderno de No Conformidades, donde se registran la fecha y nombre del responsable, la identificación del problema, causas del problema y las acciones correctivas o preventivas del mismo.

Resultados Analíticos

Resultados de los Análisis, donde se archivan los resultados finales.

Cartas de control, donde se archivan las cartas de control mensuales.

SECCION DE CONTROL DE CALIDAD

1. Límite de detección

El límite de detección del método (LDM) es ... mg .../L y se calcula de acuerdo al procedimiento descrito en el Manual de Control de Calidad.

2. Control de la veracidad (sesgo)

Para comprobar la veracidad del análisis se puede usar una muestra de control de ... o una muestra de control preparada en ... u otro material de referencia. Se analiza como se describe en la *Sección de procedimiento*. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Los resultados obtenidos deben estar dentro de los límites de control establecidos. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis. Los límites de control se verifican anualmente o si se realizan modificaciones en el método. La muestra de control se analiza cada ... días, o dentro del mismo día, cada muestras.

3. Control de la precisión

En el caso del análisis de una serie de muestras, se debe realizar un ... (*especificar el número de replicados*) después de cada ... (*especificar cada cuántas muestras*). La desviación promedio relativa (RPD) no debe ser mayor del ... (*especificar el % aceptable, que provendrá de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia realizados en la etapa de validación*). Sólo para los duplicados cuyas concentraciones se encuentren en el orden de 1 y 5 veces el límite de detección del método (LDM), la RPD puede ser menor o igual a ... (*especificar el % aceptable, de acuerdo a los datos de la validación*).

$$RPD = \frac{C_1 - C_{1-d}}{(C_1 + C_{1-d})/2} * 100$$

Donde:

RPD: desviación promedio relativa porcentual
 C_1 : concentración de la muestra
 C_{1-d} : concentración de la muestra duplicada

De no cumplirse esta regla se debe repetir el análisis de la muestra y su duplicado. Si los datos de precisión siguen

manteniendo una diferencia significativa con respecto a los datos obtenidos en la validación, todo el lote medido debe considerarse fallido y proceder nuevamente a su análisis.

4. Fortificación y ensayo de recuperación

En cada lote de muestras se analiza una muestra por duplicado, al duplicado se le agrega ... mL de solución estándar de ... mg/L. El porcentaje de recuperación del estándar debe estar entre el ... % y ... % (variable dependiendo de la técnica utilizada, por lo general 90-110 %). De no cumplirse esta regla se debe repetir el análisis de la muestra y su duplicado con la adición. En caso de que no se logre la recuperación esperada repetir el lote de muestras analizadas.

5. Control de blancos

En cada lote de muestras se analiza un blanco de trabajo, los blancos analíticos deben estar preparados con agua ultra pura en cada lote de muestra y tratados de la misma forma que las muestras para identificar posibles fuentes de contaminación (blanco de reactivos del método). El resultado obtenido debe ser menor que el límite de detección del método (LDM). Si es necesario realizar acciones correctivas, éstas deben estar documentadas.

6. Estándares de verificación

La curva de calibración se verifica con (*especificar el número*) estándares de ... y ... mg .../L con cada lote de muestras. Los estándares de verificación se preparan a partir de una solución madre diferente a la utilizada para la preparación de la curva de calibración. El valor obtenido no debe diferir de \pm ... % del valor del estándar. En caso contrario preparar una nueva curva de calibración. Si es necesario realizar acciones correctivas, éstas deben estar documentadas.

7. **Cartas de control**

Se debe mantener al día las cartas de control para los blancos, las muestras duplicadas y los estándares de verificación. Calcular los límites de control y advertencia, construir la carta de control como se indica en el Manual de Control de Calidad Analítico. Inmediatamente después de analizar las muestras control, ingresar el valor en la carta de control. Se debe tomar una acción correctiva en los siguientes casos:

- Si el valor determinado está fuera de los límites de control, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis.
- Si 2 de 3 valores determinados sucesivamente están fuera de los límites de advertencia, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis.
- Si 7 de 8 valores determinados sucesivamente se encuentran al mismo lado de la línea promedio, se debe revisar el procedimiento.

8. **Incertidumbre**

Se debe especificar la metodología utilizada para el cálculo de la incertidumbre.

Informar la concentración de la muestra como $C \pm I$

9. **Referencias**

Citar las normas que se utilizaron como base para la preparación del procedimiento (por ejemplo, ISO, ASTM, AOAC, etc.). Si se trata de un método desarrollado “in house”, se debe aclararlo.

2.4- EJEMPLO 2: CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN VOLUMÉTRICA DE CLORURO

En este ejemplo se presenta el cálculo de una de las características que, como se especificó en la sección 2.2, es necesario evaluar en un método analítico. Se detallarán los principios básicos del análisis estadístico y los aplicará a un ejemplo concreto, mostrando la metodología utilizada para el cálculo haciendo uso de las herramientas estadísticas e informáticas de una planilla de cálculo.

Una vez obtenidos los resultados, en el laboratorio se deberá evaluar si el límite de detección es o no es aceptable de acuerdo a la norma en la que se basó el procedimiento (por ej, una norma ISO tiene como información el LD estimado) y además, debe compararse con la legislación regulatoria vigente (si la hubiere) para la cual fue solicitado el ensayo analítico.

A continuación, se resume el método utilizado:

Materiales y Reactivos

- Agua destilada
- Solución estándar de cloruro 1125 mg Cl⁻/L
- Solución de nitrato de mercurio 0,0141 N. Disolver 2,54 g de Hg(NO₃)₂·H₂O en 50 mL agua, adicionar 0,5 mL de HNO₃ concentrado y diluir a 1 litro. Normalizar la solución con una solución estándar de cloruro.
- Solución indicadora de difenilcarbazona. Pesar 0,5 g de difenilcarbazona, agregar 0,05 g de azul de bromofenol y llevar a 100 mL con alcohol etílico. Guardar en frasco oscuro.
- Material de vidrio común de laboratorio

- Bureta manual o titulador automático
- Formularios para el informe y tratamiento de resultados - técnica volumétrica
- Erlenmeyers o vasos de 250 mL

Procedimiento de la Medición

- Medir 100 mL de agua destilada (por duplicado) y adicionar a cada uno de los erlenmeyers o vaso.
- Adicionar 1 mL del indicador difenilcarbazona a cada erlenmeyer o vaso. Se obtiene una solución de coloración azul-violeta.
- Adicionar luego, gota a gota, una solución de ácido nítrico 0,1 N hasta coloración amarilla, adicionando luego 3 gotas en exceso.
- Titular las muestras blanco (de agua destilada) con nitrato de mercurio 0,0141 N. El punto final de la titulación se visualiza por el cambio de color de la solución a azul-violeta.
- Anotar todos los datos y resultados en mL de volumen de titulante en el formulario apropiado. Multiplicar dicho volumen por 5 para obtener la concentración en mg Cl⁻/L.

Cálculo - Para 100 mL de muestra:

$$\text{mg/Cl} = \frac{G \times 0.5 \times 1000}{100} = 5 G$$

$G = \text{Volumen consumido de nitrato mercúrico (mL)}$

NOTA: Esta operación será repetida en 6 días diferentes consecutivos.

Bases estadísticas para el cálculo del LD según el diseño experimental seleccionado

El análisis de varianza, "ANOVA", es una técnica estadística empleada para aislar y estimar las varianzas que contribuyen para el error total de un experimento, para analizar si hay o no diferencia entre los lotes.

Dada una serie de datos:

Réplicas	Lotes					
	1	2	3	4	5	6
1	x ₁₁	x ₁₂	x ₁₃	x ₁₄	x ₁₅	x ₁₆
2	x ₂₁	x ₂₂	x ₂₃	x ₂₄	x ₂₅	x ₂₆

Se acepta que cualquier valor x_{ij} es la combinación de tres componentes:

$$x_{ij} = \mu + L_i + e_{ij}$$

μ = valor real (desconocido)

L_i = efecto de las condiciones propias del lote, L (desconocido)

e_{ij} = error experimental (desconocido)

μ = se estima por la media general de todos los datos, \bar{x}

L_i = se estima por la diferencia entre la media del lote \bar{x}_i y la media general \bar{x}

$$(L_i = \bar{x}_i - \bar{x})$$

e_{ij} = se estima por la diferencia entre el valor x_{ij} , y la media del lote, \bar{x}_i

$$e_{ij} \cong (x_{ij} - \bar{x}_i)$$

$$(x_{ij} - \bar{x}) = (\bar{x}_i - \bar{x}) + (x_{ij} - \bar{x}_i)$$

$$\therefore x_{ij} = \bar{x} + (\bar{x}_i - \bar{x}) + (x_{ij} - \bar{x}_i),$$

Las desviaciones individuales se cancelarían en las sumas, debido a los valores positivos y negativos de igual magnitud; esto se evita elevándolos al cuadrado:

$$\sum \sum (x_{ij} - \bar{x})^2 = \sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2 n_i + \sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 =$$

$$SQO = \sum_{i=1}^k S_i^2 (n_i - 1)$$

suma de los
cuadrados
totales

$$\boxed{SQ_t}$$

suma de los
cuadrados
lotes

$$\boxed{SQ_l}$$

suma de los
cuadrados residual

$$\boxed{SQ_0}$$

Grados de libertad:

a) total, $N_t = m \cdot n - 1$ $m = n^\circ$ de lotes (6)

b) lotes, $N_l = m - 1$ $n = n^\circ$ de repetición de análisis (2)

c) residual, $N_0 = m (n - 1)$

Interpretación de una tabla de ANOVA:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
Entre lotes, SQ_1	$\sum (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2 n_i$	$N_1 = m - 1$	$M_1 = \frac{SQ_1}{N_1}$
Dentro del lote SQ_0 (residual)	$\sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$N_0 = m(n - 1)$	$M_0 = \frac{SQ_0}{N_0}$
Total $SQ_0 = \sum_{i=1}^k S_i^2 (n_i - 1)$	$\sum \sum (x_{ij} - \bar{\bar{x}})^2$	$N_t = N_1 + N_0$	

La comparación entre M_1 y M_0 , que son los cuadrados medios entre lotes y dentro del lote se efectúa por la prueba "F".

$$F \text{ calculado} = \frac{M_1}{M_0}$$

Los cuadrados medios M_1 y M_0 se deben comparar para determinar si M_1 es significativamente mayor que M_0 , por ejemplo, para ver si hay una fuente de error estadísticamente significativa entre los lotes.

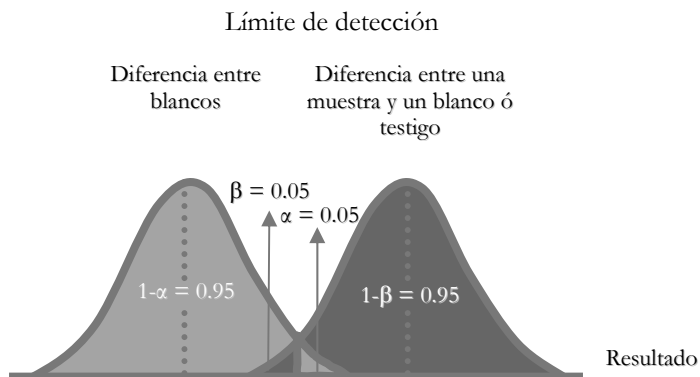
Lo normal es que M_1 sea mayor que M_0 , ya que de lo contrario el método y la técnica deben ser examinados rigurosamente para detectar cualquier fuente anormal de error. El valor de F debe ser siempre mayor que 1, por definición, o sea que si M_1 fuera menor que M_0 , debe invertirse el orden en la fórmula anterior.

El test F es indicativo de si hay o no evidencia de diferencias significativas entre lotes y dentro de los lotes. Si

$F_{\text{calculado}}$ es mayor que $F_{\text{teórico}}$ todo este procedimiento de cálculo no es aplicable.

Procedimiento para el Cálculo del Límite de Detección

- Se realizan análisis repetitivos para condiciones diferentes (métodos, analistas, lotes, equipamientos, etc.).
- Se anotan en el cuadro de la hoja de cálculo los resultados de la titulación de las muestras de agua destilada duplicadas día a día, durante los 6 días.
- Se trata de hallar la variabilidad en el mismo día y la variabilidad en diferentes días. Se obtienen los promedios diarios y el Gran Promedio de la Concentración obtenida (GMC). El programa de la planilla de cálculo evalúa automáticamente el análisis de varianzas, estudiando los efectos debido a los errores analíticos (variación dentro de los análisis) y a las condiciones diferentes (variación entre análisis).
- Se estiman las dispersiones (a través de las medidas de las desviaciones estándar) para los errores analíticos (S_d = dentro del lote), en diferentes condiciones (S_e = entre lotes) y el total (S_t).
- El Límite de detección se calcula en base a la estimación del Criterio de Detección a partir de la variabilidad obtenida en los blancos y previendo un error de tipo alfa y de tipo beta no superior ninguno de ellos al 5 %.



Aplicación asociada a la planilla de cálculo

Cada procedimiento de medición es susceptible de ser esquematizado (“modelado”) mediante algún tipo de fórmula o algoritmo (plantilla Excel) en el que el resultado final está ligado a un conjunto de mediciones concretas. Esta plantilla puede variar si se trata de otros métodos de análisis cuantitativos.

Lo normal es que el LD que interesa calcular sea el resultado final de diversas operaciones y cálculos. Las muestras “blanco” ó “testigo” deben estar sujetas a todas las fuentes de error en las diversas fases del proceso, no solamente en las propiamente analíticas sino también en las pre-analíticas.

Tabulación de las lecturas:

En la planilla Excel se anotan los resultados de forma tal que queden como en la tabla siguiente:

Muestra No.	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
	Result. No.	Result. No.	Result. No.	Result. No.	Result. No.	Result. No.
Blanco 1						
Blanco 2						

En la siguiente figura se muestra el resultado de la entrada de los datos:

SOLUCION	Prueba	Resultados en unidades de mg/L					
		1	2	3	4	5	6
	1	0,75	0,80	0,82	0,83	0,78	0,75
Blanco	2	0,77	0,81	0,80	0,81	0,75	0,76

Tratamiento de los datos:

La planilla Excel dispone de una Herramienta que es el Análisis de Varianza. Para ello, en Herramientas y Análisis de Datos, debe buscarse Análisis de Varianza de un Factor. En rango de entrada se debe seleccionar la matriz de datos correspondiente a las dos filas y a las seis columnas de la Tabla Anterior. Se debe seleccionar agrupamiento por columnas, un valor de alfa de 0,01 (requisito para el test F) y en opciones de salida, que la presentación de los resultados sea en una hoja de cálculo nueva.

En la tabla siguiente se presentan los resultados del análisis de varianza para los datos del ejemplo. En la primera columna figura el origen de las variaciones (entre grupos, dentro de grupos y total), en la segunda columna la suma de cuadrados (SQ_1 , SQ_0 y SQ_{total}), en la tercera columna los grados de libertad respectivos, en la cuarta columna los cuadrados medios o el promedio de los cuadrados, en la quinta columna el valor de F calculado, en la sexta columna el valor de probabilidad del test F y en la séptima el valor crítico para el test F. Debe recordarse que

este valor crítico no debe ser mayor que el valor de F calculado, que en el ejemplo es 8,7043.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	2	1,52	0,76	0,0002		
Columna 2	2	1,61	0,805	5E-05		
Columna 3	2	1,62	0,81	0,0002		
Columna 4	2	1,64	0,82	0,0002		
Columna 5	2	1,53	0,765	0,00045		
Columna 6	2	1,51	0,755	5E-05		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,00834167	5	0,00166833	8,70434783	0,01012006	8,74589526
Dentro de los grupos	0,00115	6	0,00019167			
Total	0,00949167	11				

Estimación del límite de detección

Normalmente y considerando el error de tipo alfa y el error de tipo beta, el límite de detección se calcula de la siguiente manera:

$$L.D. = 3,3 Sd \text{ (del blanco ó testigo)}$$

El factor 3,3 es el valor del parámetro estadístico z para un nivel de confianza del 95 % multiplicado por 2. El valor de Sd es el valor de desviación estándar dentro del grupo obtenido

por raíz cuadrada del valor del cuadrado medio dentro. Se utiliza el valor de desviación estándar dentro del grupo, ya que se ha probado mediante el test F que no hay diferencias significativas entre lotes y dentro de lotes.

En nuestro ejemplo, el valor de Sd es la raíz cuadrada de 0,00019167, o sea 0,01384, con lo cual resulta:

$$\mathbf{L.D. = 3,3 Sd \text{ (del blanco ó testigo) = 0,0457 mg/L}}$$

2.5- EJEMPLO 3: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO

El objetivo de este ejemplo es mostrar la validación de la metodología de determinación de contaminantes orgánicos en matrices acuosas, mediante métodos cromatográficos, para la evaluación de diferentes características del método. Se presentan resultados reales obtenidos en un laboratorio de control de calidad de aguas.

Con los resultados obtenidos:

- ❖ Se acota el ámbito y el rango de aplicación para cada compuesto en cada tipo de matriz.
- ❖ Se obtiene la caracterización de cada compuesto en cada matriz: LD, LQ, exactitud.
- ❖ Se procede al estudio de las incertidumbres para cada compuesto.
- ❖ Se acota el rango de aceptación de los materiales de control y de los interlaboratorios.

Ámbito de aplicación

Conviene presentar una breve descripción de la metodología. En el caso amplio, se podría utilizar las siguientes, si bien el ejemplo se restringe a sólo una de ellas.

Extracción: SPE (on-line o off-line), SPME, CLSA, P&T

Separación: HPLC, UPLC, CG

Detección: FLD, PDA, UV, MS, MS/MS, ECD, FID, NPD, MS, MS/MS

Debe además hacerse una descripción de los compuestos a determinar.

Es necesario especificar el tipo de matriz, que en este caso podría ser: Agua residual, Agua natural, Agua tratada.

Calibración, rango de linealidad, límites de detección y cuantificación

Es recomendable realizar un estudio a tres niveles de concentración distintos:

- ✧ nivel alto: concentración cercana a la máxima usada en la calibración.
- ✧ nivel medio: concentración cercana a la media usada en la calibración o bien cercana a los valores legislados.
- ✧ nivel bajo: concentración cercana a la menor usada en la calibración o bien cercana al límite de cuantificación (LQ).

Con la calibración de la metodología se obtiene:

- ✧ El rango de aplicación: Concentración máxima y mínima a la que se puede aplicar la metodología analítica en cada matriz.
- ✧ El límite de detección de cada compuesto (LD), en cada matriz.
- ✧ El límite de cuantificación de cada compuesto (LQ), en cada matriz.

Exactitud (Veracidad y Precisión)

Estudios de Repetibilidad y Reproducibilidad:

Es recomendable realizar una fortificación de cada una de las matrices a los tres niveles de concentración, durante unos siete días distintos, y disponer de los resultados como se muestra en la tabla:

Agua residual	nivel alto	x 7 días distintos	%RSD
	nivel medio		CV
	nivel bajo		% recuperación
Agua natural	nivel alto	x 7 días distintos	Exactitud
	nivel medio		%RSD
	nivel bajo		CV
Agua tratada	nivel alto	x 7 días distintos	% recuperación
	nivel medio		Exactitud
	nivel bajo		%RSD
	nivel alto		CV
	nivel medio		% recuperación
	nivel bajo		Exactitud

En ejemplo siguiente se muestra la validación del método para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

1. Ámbito de aplicación

1.1 Objetivos:

- ✧ Validar la metodología descrita en el procedimiento PNT MA/QO-01, evaluando los valores de los límites de detección y cuantificación, y exactitud, a tres niveles de concentración.
- ✧ Determinar si los resultados obtenidos permiten cumplir con los requisitos reglamentarios.

1.2 Breve descripción de la metodología:

- ✧ Determinación de PAHs por SPE y HPLC-FLD.
- ✧ Extracción de 500 mL de agua con cartuchos para SPE (ODS-18), elución con cloruro de metileno y concentración a 500 μ L con acetonitrilo.
- ✧ Análisis cromatográfico por HPLC, con columna RP-18, inyección de 20 μ L y detección por fluorescencia.

1.3 Descripción de los compuestos a determinar:

- ❖ Analitos legislados: Fluoranteno, Benzo (b) fluoranteno, Benzo (k) fluoranteno, Benzo(a)pireno, Benzo (g,h,i)perileno, Indeno(1,2,3,c,d).
- ❖ Analitos no legislados: Benzo(a) antraceno, Criseno, Dibenzo (a,h) antraceno.

1.4 Tipo de matriz: Aguas continentales naturales, tratadas y de consumo.

2. Calibración

- Patrón de calibración: solución certificada de 16 PAHs (Supelco), con el cual se procede al estudio de calibración (recta, LD, LQ, rango de aplicación).
- Los resultados obtenidos para los analitos legislados, a partir de la calibración del método son:

Analito	Rango de aplicación		
	Conc. Inferior (LQ) µg/L	Conc. Superior µg/L	LQ µg/L
Fluoranteno	0,007	0,7	0,007
Benzo(b)fluoranteno	0,007	0,3	0,007
Benzo(k)fluoranteno	0,003	0,3	0,003
Benzo(a)pireno	0,007	0,3	0,007
Benzo(g,h,i)perileno	0,030	1,2	0,030
Indeno(1,2,3,c,d)pireno	0,030	0,9	0,030

3. Estudios de Repetibilidad

Se realiza una fortificación de cada una de las matrices a tres niveles de concentración, analizando siete replicados en un mismo día.

Analito	µg/L		
	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Fluoranteno	0,005	0,010	0,100
Benzo(b)fluoranteno	0,002	0,004	0,040
Benzo(k)fluoranteno	0,002	0,004	0,040
Benzo(a)pireno	0,005	0,010	0,099
Benzo(g,h,i)perileno	0,008	0,016	0,160
Indeno(1,2,3,c,d)pireno	0,005	0,010	0,100

Los resultados deben ser presentados informando los parámetros estadísticos correspondientes:

Repetibilidad a nivel bajo						
PAH	Fluoran- teno	Benzo(b) ft	Benzo(k) ft	Benzo(a) py	Benzo(g,h,i) per	In(1,2,3,c,d) py
Promedio (ng)	0,11	0,04	0,04	0,11	0,17	0,12
Desv.est.	0,02	0,00	0,01	0,02	0,03	0,03
CV	19,97	13,57	18,67	13,98	16,20	22,18
ng teóricos	0,10	0,04	0,04	0,10	0,16	0,10
% Rec	114,58	93,77	96,70	110,58	106,46	122,18

Repetibilidad a nivel medio						
PAH	Fluora n-teno	Benzo(b) ft	Benzo(k) ft	Benzo(a) py	Benzo(g,h,i) per	In(1,2,3,c,d) py
Promedio (ng)	0,19	0,07	0,07	0,20	0,31	0,19
Desv.est.	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02
CV	4,31	10,65	25,66	15,39	6,76	8,78
ng teóricos	0,20	0,08	0,08	0,20	0,31	0,20
% Rec	98,07	87,90	93,13	102,75	98,47	94,07

Repetibilidad a nivel alto						
PAH	Fluoran- teno	Benzo(b) ft	Benzo(k) ft	Benzo(a) py	Benzo(g,h,i) per	In(1,2,3,c,d) py
Promedio (ng)	2,16	0,70	0,69	1,80	2,46	1,59
Desv.est.	0,09	0,05	0,07	0,13	0,29	0,20
CV	4,05	7,77	10,77	6,98	11,76	12,72
ng teóricos	1,97	0,79	0,78	1,96	3,14	1,98
% Rec	109,82	88,83	87,89	91,74	78,47	80,67

4. Estudios de Reproducibilidad

Se presentan los resultados obtenidos procediendo a la fortificación de cada una de las matrices a tres niveles de concentración, durante siete días distintos.

Analito	µg/L		
	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Fluoranteno	0,005	0,010	0,100
Benzo(b)fluoranteno	0,002	0,004	0,040
Benzo(k)fluoranteno	0,002	0,004	0,040
Benzo(a)pireno	0,005	0,010	0,099
Benzo(g,h,i)perileno	0,008	0,016	0,160
Indeno(1,2,3,c,d)pireno	0,005	0,010	0,100

Reproducibilidad a nivel bajo						
PAH	Fluo- rante- no	Benzo (b)ft	Benzo (k)ft	Benzo(a) py	Benzo(g,h, i)per	In(1,2,3, c,d)py
Promedio (ng)	0,10	0,04	0,04	0,11	0,15	0,11
Desv.est.	0,01	0,00	0,01	0,02	0,03	0,02
CV	5,26	11,39	13,99	17,04	19,47	15,87
ng teóricos	0,10	0,04	0,04	0,10	0,16	0,10
% Rec	102,04	90,84	96,34	108,24	98,09	107,87
% Exact.	2,04	-9,16	-3,66	8,24	-1,91	7,87

Reproducibilidad a nivel medio						
PAH	Fluoranteno	Benzo(b)ft	Benzo(k)ft	Benzo(a)py	Benzo(g,h,i)per	In(1,2,3,c,d)py
Promedio (ng)	0,19	0,07	0,07	0,20	0,29	0,18
Desv.est.	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01
CV	5,97	9,41	17,25	14,15	6,91	5,86
ng teóricos	0,20	0,08	0,08	0,20	0,31	0,20
% Rec	97,49	86,26	89,11	103,84	91,01	91,76
% Exact.	-2,51	-13,74	-10,89	3,84	-8,99	-8,24

Reproducibilidad a nivel alto						
PAH	Fluoranteno	Benzo(b)ft	Benzo(k)ft	Benzo(a)py	Benzo(g,h,i)per	In(1,2,3,c,d)py
Promedio (ng)	2,12	0,79	0,78	2,01	3,01	1,73
Desv.est.	0,11	0,03	0,04	0,09	0,18	0,17
CV	5,26	4,00	5,41	4,25	6,08	9,61
ng teóricos	1,97	0,79	0,78	1,96	3,14	1,98
% Rec	108,06	100,28	99,53	102,83	95,96	87,73
% Exact.	8,06	0,28	-0,47	2,83	-4,04	-12,27

5. Estudios adicionales

Para cumplimentar todos los requerimientos de la validación, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos:

- ✦ Determinar los criterios de aceptación de materiales de control distintos de los utilizados en la validación, pero con los mismos analitos y semejante nivel de concentración.
- ✦ Estudio de la variación del tiempo de retención de los picos cromatográficos en el tiempo, característica instrumental que siempre debe ser corroborada.
- ✦ Estudio de seguimiento en las recuperaciones al variar los lotes de cartuchos SPE utilizados en la etapa previa a la corrida cromatográfica, característica de los insumos utilizados en el procedimiento analítico.
- ✦ Cálculo de incertidumbres.

2.6- EJEMPLO 4: CÁLCULO DE LÍMITES DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO Y OTROS METALES

En forma similar a lo detallado para el caso de la determinación de cloruro, se muestra otro ejemplo, donde se procede al cálculo del límite de detección para la determinación de plomo en muestras de agua por la técnica de espectrometría de absorción atómica por horno de grafito.

Para realizar el cálculo del LD, se miden dos soluciones blanco, durante 6 días consecutivos, y se registran los datos obtenidos a partir de la curva de calibración. La planilla de cálculo a utilizar es similar al caso ya detallado y la tabla de introducción de datos es la siguiente:

SOLUCION	Prueba	Resultados en unidades de mg/l					
		1	2	3	4	5	6
	1	0,006	0,007	0,005	0,006	0,008	0,007
Blanco	2	0,009	0,006	0,006	0,008	0,007	0,009

Tratamiento de los datos:

Se aplica la misma herramienta que es el análisis de varianza. Para ello en Herramientas y Análisis de Datos debe buscarse Análisis de Varianza de un Factor. En rango de entrada se debe seleccionar la matriz de datos correspondiente a las dos filas y a las dos columnas de la tabla Anterior. Se debe seleccionar agrupamiento por columnas, un valor de alfa de 0,01 y en opciones de salida que la presentación de los resultados sea una hoja nueva.

Los resultados del análisis estadístico se reflejan en la tabla siguiente, donde en el análisis de varianza, figura en la primera columna el origen de las variaciones (entre grupos, dentro de grupos y total), en la segunda columna la suma de cuadrados (SQ_1 , SQ_0 y SQ_{total}), en la tercera columna los grados de libertad respectivos, en la cuarta columna los cuadrados medios o el promedio de los cuadrados, en la quinta columna el valor de F calculado, en la sexta columna el valor de probabilidad del test F y en la séptima el valor

crítico para el test F. Debe recordarse que este valor crítico no debe ser mayor que el valor de F calculado, que en el ejemplo es 0,96.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	2	0,015	0,0075	0,0000045		
Columna 2	2	0,013	0,0065	0,0000005		
Columna 3	2	0,011	0,0055	0,0000005		
Columna 4	2	0,014	0,007	0,0000002		
Columna 5	2	0,015	0,0075	0,0000005		
Columna 6	2	0,016	0,008	0,0000002		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000008	5	0,0000016	0,96	0,50759539	8,74589526
Dentro de los grupos	0,00001	6	1,6667E-06			
Total	0,000018	11				

Estimación del límite de detección

Utilizando para el cálculo del límite de detección la expresión

$$LD = 3,3 Sd \text{ (del blanco ó testigo),}$$

y considerando que en el ejemplo, el valor de Sd es la raíz cuadrada de $1,6667 \times 10^{-6}$, o sea 0,00129, se obtiene:

$$LD = 0,0043 \text{ mg/L}$$

Como en todos los casos, se deberá especificar si el límite de detección es o no es aceptable de acuerdo a la norma analítica que se siguió para aplicar este procedimiento y además, debe compararse con la regulación vigente y para la cual fue solicitado el ensayo analítico. El plomo corresponde al grupo de metales que es necesario controlar en cuestiones ambientales, por lo tanto deberá compararse con lo permitido en la legislación ambiental vigente, de acuerdo a la calidad del agua deseada (normalmente, esto se define en las legislaciones de acuerdo a su uso: potable, de fuentes de provisión, residual, etc.)

Otra forma de proceder cuando se está utilizando una técnica instrumental donde necesariamente debe emplearse una curva de calibrado, es la siguiente:

Se construye la curva de calibrado como se realiza habitualmente con seis puntos aproximadamente tratando de cubrir todo el ámbito de trabajo lineal.

Esta curva tendrá una ordenada al origen y una pendiente, y a su vez un coeficiente de correlación que deberá ser muy próximo al valor de 1, lo que asegurará la bondad del ajuste de la curva.

Se procede a leer varias veces, aproximadamente 20, un blanco de reactivos o un estándar muy bajo en concentración y próximo a lo que se espera sea el límite de detección. Generalmente, y a través de la bibliografía, este valor se puede estimar.

El valor de desvío estándar obtenido, multiplicado por el factor 3,3 corresponderá a la lectura en donde se puede diferenciar un blanco de una muestra.

Aplicando la ordenada al origen y la pendiente a este valor, se obtiene el LD de cada caso en particular.

En la tabla siguiente se muestra un ejemplo de cálculo para tres diferentes metales

Análisis de metales totales en aguas por Abs. Atómica (Caso A)

BK No.	Cu	BK No.	Fe	BK No.	Zn
1	0,0014	1	0,0006	1	0,0066
2	0,0010	2	0,0016	2	0,0054
3	0,0018	3	0,0003	3	0,0054
4	0,0010	4	0,0011	4	0,0056
5	0,0024	5	0,0015	5	0,0047
6	0,0014	6	0,0014	6	0,0046
7	0,0012	7	0,0005	7	0,0054
8	0,0010	8	0,0009	8	0,0044
9	0,0017	9	0,0014	9	0,0050
10	0,0010	10	0,0010	10	0,0043
11	0,0022	11	0,0018	11	0,0069
12	0,0016	12	0,0011	12	0,0059
13	0,0021	13	0,0012	13	0,0060
14	0,0019	14	0,0016	14	0,0058
15	0,0021	15	0,0014	15	0,0058
16	0,0017	16	0,0005	16	0,0063
17	0,0025	17	0,0014	17	0,0064
18	0,0023	18	0,0017	18	0,0067
19	0,0022	19	0,0011	19	0,0060
20	0,0023	20	0,0008	20	0,0066
SUM	0,0348	SUM	0,0229	SUM	0,1138
Media	0,0017	Media	0,0011	Media	0,0057
S	0,00051748	S	0,00043465	S	0,000787334
3,3 * S	0,001708	3,3 * S	0,001434	3,3 * S	0,002598
Y= A + BX =	0,001708	Y= A + BX	0,001434	Y= A + BX =	0,002598
A=	0,0004152	A=	0,0003469	A=	0,00043412
B=	0,153996	B=	0,070351	B=	0,348602
LD=	0,00839305	LD=	0,015457444	LD=	0,006207888
0,0084	mg/L	0,0155	mg/L	0,0062	mg/L

En la tabla siguiente se presentan resultados utilizando otra técnica, en este caso ICP-OES, con valores obtenidos en un laboratorio de análisis de muestras ambientales.

Análisis de metales totales en aguas por ICP-OES (Caso B)

Bk No.	Cu (ICP)	BK No.	Fe (ICP)	BK No.	Zn (ICP)
1	33,97	1	1,516	1	4,707
2	35,55	2	1,621	2	3,768
3	37,78	3	1,626	3	3,7650
4	37,89	4	2,392	4	4,7670
5	35,54	5	1,591	5	3,842
6	36,03	6	1,577	6	3,821
7	36,38	7	1,625	7	4,799
8	32,41	8	1,546	8	3,8190
9	35,84	9	1,590	9	3,823
10	35,76	10	1,564	10	3,866
11	32,81	11	1,608	11	3,875
12	36,76	12	1,604	12	3,829
13	37,19	13	1,582	13	3,9000
14	34,65	14	1,616	14	4,896
15	31,65	15	1,677	15	3,88
16	35,35	16	1,590	16	3,887
17	36,43	17	1,720	17	5,016
18	36,26	18	1,605	18	3,99
19	35,42	19	1,612	19	4,913
20	36,56	20	1,576	20	3,965
SUM	710,23	SUM	32,837615	SUM	83,128
Media	35,5115	Media	1,6419	Media	4,1564
S	1,68365603	S	0,1817686	S	0,47225221
3,3 * S	5,5561	3,3 * S	0,5998	3,3 * S	1,5584
Y= A + BX =	41,0676	Y= A + BX	2,2417	Y= A + BX =	5,7148
A=	37,9072	A=	1,50209	A=	4,36048
B=	614,2932	B=	235,1449	B=	307,2112
LD=	0,00514472	LD=	0,00314541	LD=	0,00440854
	0,0051 ppm		0,0031 ppm		0,0044 ppm

2.7- EJEMPLO 5: ESTIMACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PARA MÉTODOS CUANTITATIVOS MICROBIOLÓGICOS

En este ejemplo se retoma el cálculo del Límite de Detección (LD) para un caso particular, como es el de las determinaciones microbiológicas (métodos cuantitativos microbiológicos en los cuales el cálculo cuantitativo se basa en el conteo de partículas).

En la investigación sobre Validación Microbiológica se requieren datos bajo la suposición de que provienen de una distribución Poisson; sin embargo, esta suposición no siempre es razonable. En ese caso, aplicar métodos estadísticos adecuados para variables Poisson puede producir conclusiones equivocadas.

En este tratamiento, se propone una prueba de razón de verosimilitudes generalizada (PRVG) para probar la hipótesis de distribución Poisson contra la hipótesis alternativa compuesta de la Binomial Negativa o la Binomial.

El cociente entre la media y la varianzas muestrales (γ) se usa como indicador para elegir la alternativa apropiada. Si (γ) < 1 la alternativa es la distribución Binomial Negativa; si (γ) > 1, la alternativa es la Binomial. La prueba paramétrica propuesta es consistente con los resultados obtenidos en conjuntos de datos Poisson ampliamente conocidos.

$$\gamma = \frac{\text{media}}{\text{varianza}} = \frac{\mu}{\sigma^2}$$

La prueba que se propone tiene como finalidad verificar si una muestra aleatoria proviene de una distribución de Poisson, cuando las posibles alternativas son la Binomial Negativa o la Binomial. El criterio estadístico que se propone se denominará “Prueba del Modelo Poisson”, en el cual se supone que se tiene una muestra aleatoria X_1, X_2, \dots, X_n de tamaño n de la distribución Poisson.

Entonces, la prueba consiste en:

1. Estimar γ como: $\hat{\gamma} = \frac{\bar{X}}{S^2}$ donde \bar{X} es la media y S^2 la varianza de la muestra microbiológica.

2. Seleccionar la prueba correspondiente dependiendo del valor de $\hat{\gamma}$, a saber:

Si $\hat{\gamma} < 1$ seleccionar la PRVG (Prueba de la Razón de Verosimilitudes Generalizada) para la distribución Poisson contra la Binomial Negativa.

Si $\hat{\gamma} > 1$ seleccionar la PRVG para la distribución Poisson contra la distribución binomial.

Es de notar que debido a la variabilidad de los datos del experimento es poco probable que ocurra $\hat{\gamma} = 1$.

3. Plantear el juego de hipótesis: H_0 : Poisson vs H_a : Binomial Negativa. Si se rechaza H_0 , entonces se rechaza el modelo Poisson a favor de la distribución Binomial Negativa. Si H_0 no se rechaza, entonces no hay evidencia para negar el modelo Poisson.

Recuentos Totales

En microbiología se admite que la mejor representación de la dispersión de los resultados de un conteo bacteriano se realiza mediante las variables aleatorias siguientes:

- Ley de Poisson: $P(\lambda)$, se caracteriza porque la media es igual a la Varianza:

$$E(X) = \text{Var}(X) = \lambda$$

Donde $E(X)$, representa la media y $\text{Var}(X)$, representa la varianza.

- Ley Binomial Negativa: $B_{\text{neg}}(\lambda, K)$, se caracteriza porque la Varianza es igual a K multiplicada por la Media.

$$\text{Var}(X) = K \times E(X)$$

Donde $E(X)$, representa la Media, $\text{Var}(X)$, representa la varianza y K es el coeficiente de sobredispersión.

La ley log-normal es una aproximación aceptable a la binomial negativa, cuando se estima la media puntualmente en un material (cepa), pero no es una aproximación aceptable al estimar sobre todo el ámbito de concentración.

Para tener una representación completa y objetiva de la Dispersión (variabilidad) de los resultados de un conteo bacteriano (Z), basta con tener una estimación de dos parámetros: λ y K . Para considerar estos dos parámetros a partir de una serie de “n” datos contados x_i , basta con calcular la Media y la Varianza estimadas:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad y \quad s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

λ es estimada por \bar{x}

K es estimada por $\frac{s^2}{\bar{x}}$

En el ejemplo siguiente se presentan los datos de un conteo bacteriano en 20 cajas, a un nivel de concentración bajo:

Se obtuvieron los siguientes resultados (x_i):

1, 0, 5, 3, 1, 1, 2, 7, 2, 2, 2, 3, 3, 0, 2, 0, 1, 2, 1, 5

Realizando los cálculos pertinentes, se obtiene

n: 20

Media: 2,15

Varianza: 3,292

Por lo tanto:

Estimación de λ : 2,15

Estimación de **K**: 1,53

Para continuar con el proceso de cálculo matemático y obtener información objetiva y confiable, necesitamos calcular la Variabilidad Estándar Relativa al cuadrado, que se calcula como el cociente entre K y la media. Para los datos de este ejemplo, entonces:

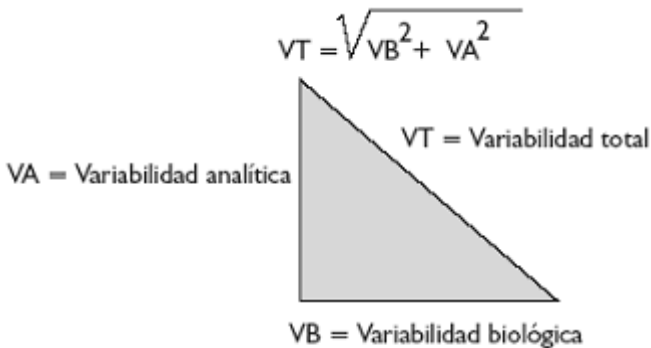
Variabilidad estándar Relativa W^2 : 0,7122

$$W^2 = \frac{S^2}{\bar{x}^2} = 0,7122$$

Variabilidad Total

La variabilidad observada en el proceso microbiológico es la suma de todos los factores biológicos que operan desde antes de la toma de la muestra, combinados con los factores analíticos que intervienen durante su estudio en el laboratorio.

Como se muestra en la figura, se puede calcular el cuadrado de la variabilidad total (VT) como de la suma del cuadrado de la variabilidad biológica (VB) más el cuadrado de la variabilidad analítica (VA).

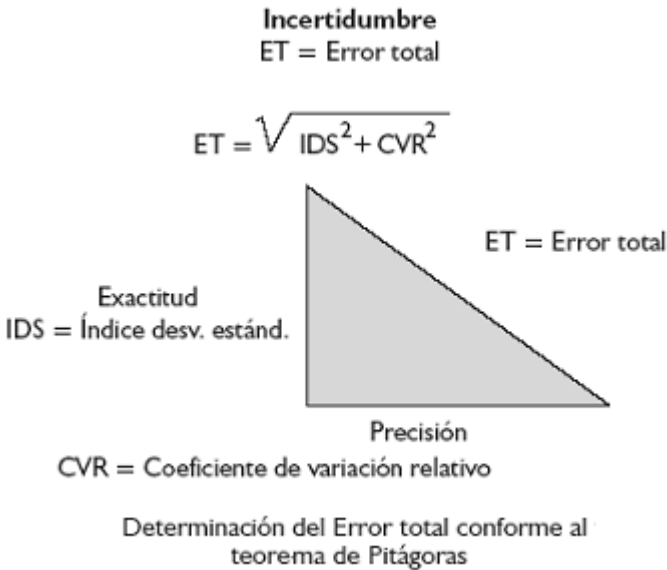


Determinación de la variabilidad total conforme al teorema de Pitágoras

En el proceso microbiológico, dentro de la variabilidad analítica hay dos incertidumbres que se deben medir por separado y en conjunto:

1. Imprecisión = Coeficiente de variación relativo
2. Inexactitud = Índice de desviación estándar

Las cuales en conjunto nos permiten estimar el error total, como se muestra en la figura.



La forma de cálculo de W^2 describe el modelo de dispersión:

$$W_d^2 = \sum W^2 = \frac{s^2}{\bar{x}^2} = 0,7122 = W_{tot}^2$$

En forma reducida:

$$W_{tot}^2 = \sum W^2$$

Se trata de un modelo lineal simple (aditivo), donde la dispersión W_d^2 generada por los diferentes factores es representada por W^2 .

Por lo tanto la dispersión total es:

$$W_{tot}^2 = W_d^2 = W_{Poisson}^2 + W_{Vmuestra}^2 + W_{Alicuota}^2 + W_f^2 + W_{Rcolonias}^2 + W_{Confirmación}^2$$

Y cada una de las varianzas relativas al cuadrado tiene su diseño y forma específica de cálculo.

Se pueden agrupar algunos de los factores para incluirlos en la varianza del método de análisis:

$$W_{Método de análisis}^2 = W_{Vmuestra}^2 + W_{Alicuota}^2 + W_f^2 + W_{Rcolonias}^2 + W_{Confirmación}^2$$

Por lo tanto:

$$W_{tot}^2 = W_d^2 = W_{Poisson}^2 + W_{Método de análisis}^2$$

O lo que es lo mismo:

$$W_{tot}^2 = W_{Poisson}^2 + W_{Método de análisis}^2$$

Para estimar $W_{Método de análisis}^2$, tenemos que diseñar estadísticamente experimentos para evaluar cada una de las fuentes de dispersión. El costo de este trabajo global, tanto en tiempo como en dinero, es relativamente alto para un laboratorio, sobre todo si no cuenta con materiales de referencia certificados.

Una alternativa pragmática y objetiva sería globalizar estas varianzas relativas a la varianza relativa del método analítico, siendo necesario para esto contar con un material de referencia bien caracterizado y conocer el sesgo del laboratorio. El laboratorio de microbiología debe tener sistemas de aproximarse a este valor de referencia y poder ver cual es el sesgo del laboratorio.

El valor $W_{\text{Método de análisis}}^2$, podría evaluarse estadísticamente de la siguiente forma:

- 1- En condiciones de REPETIBILIDAD, en la misma serie analítica:

$$W_{\text{tot}}^2 = W_{\text{Poisson}}^2 + W_{\text{ir}}^2$$

- 2- En condiciones de REPRODUCIBILIDAD INTRA-LABORATORIO, es decir en el seno del mismo laboratorio, pero en series analíticas diferentes:

$$W_{\text{tot}}^2 = W_{\text{Poisson}}^2 + W_{\text{ir}}^2 + W_{\text{ir}}^2$$

- 3- En condiciones de REPRODUCIBILIDAD INTER-LABORATORIO, es decir en el seno de un laboratorio a otro laboratorio (programas interlaboratorios).

$$W_{\text{tot}}^2 = W_{\text{Poisson}}^2 + W_{\text{ir}}^2 + W_{\text{ir}}^2 + W_{\text{IR}}^2$$

- 1- La estimación de W_{ir}^2 se puede realizar teniendo como base los resultados del control de calidad interno del laboratorio (CC), a condición de que tenga réplicas. Más generalmente, toda serie de ensayos repetidos en condiciones de repetibilidad, preferentemente sobre muestras naturalmente contaminadas.

En el siguiente ejemplo se muestra una determinación de W_{ir}^2 a partir de 15 medidas repetidas sobre un mismo material (cepa), en la misma serie analítica.

Los resultados obtenidos (x_i) son:

38-33-42-37-36-26-34-35-40-29-27-22-29-28-33

Aplicando el cálculo estadístico correspondiente, se obtienen los parámetros:

n: 15

Media: 32,6

Varianza: 31,83

Estimación de λ : 32,6

Estimación de K: 0,97

Variabilidad Estándar Relativa W^2 : 0,0299

Cálculo de W^2_{Poisson} : 0,0307

Cálculo de W^2_{ir} : -0,0007

El valor W^2_{Poisson} se calcula como la inversa de la media, por lo tanto el valor de W^2_{ir} se calcula como la diferencia entre W^2 y W^2_{Poisson} . El resultado negativo -0,0007 significa que la dispersión de los resultados observados sigue la ley de Poisson (estimador λ sesgado), $K = 1,0$. El error vinculado al método de conteo parece insignificante por lo tanto: $W^2_{\text{ir}} = 0$, y se ha obtenido el primero de los componentes buscados.

- 2- El segundo término W^2_{ir} se puede estimar con los datos del control interno de calidad. Es necesario el uso de materiales de referencia certificados y que el laboratorio esté bajo control analítico o de calidad.

En el siguiente ejemplo se muestra la determinación de W^2_{ir} , a partir de los resultados de un control de calidad interno, realizando una medida al día durante 30 días sobre un material de referencia:

Los resultados obtenidos (x_i) son:

34-24-16-35-41-32-35-38-41-30-25-33-28-46-35-
15-34-30-26-30-25-23-42-39-18-39-32-26-28-41

Aplicando el cálculo estadístico correspondiente, se obtienen los parámetros:

n: 30

Media: 31,37

Varianza: 61,96

Estimación de λ : 31,37

Estimación de K: 2,0

Variabilidad Estándar Relativa W^2 : 0,0630

Cálculo de W^2_{Poisson} : 0,0319

W^2_{ir} : 0,0000 (calculado anteriormente)

Cálculo de W^2_{IR} : 0,0311

- 3- Para estimar el último término W^2_{IR} , el laboratorio debe estar participando en un programa interlaboratorios, que se base en un ensayo de aptitud sobre materiales representativos y tan diversos como sea posible. Esto se muestra en el ejemplo siguiente, a partir de los resultados de un ensayo interlaboratorio en el que participan 100 laboratorios, de los cuales el laboratorio de interés es uno de ellos.

n: 100

Media: 27,44

Varianza: 300,06

Estimación de λ : 27,44

Estimación de K: 10,9

Variabilidad Estándar Relativa W^2 : 0,3986

Cálculo de W^2_{Poisson} : 0,0364

W^2_{ir} : 0,0000

W^2_{IR} : 0,0311

Cálculo de W^2_{IR} : 0,3310

Como:

$$W_{tot}^2 = W_{Poisson}^2 + W_{ir}^2 + W_{iR}^2 + W_{IR}^2$$

Se obtiene a partir de los datos:

$$W_{tot}^2 = W_{Poisson}^2 + 0,0000 + 0,0311 + 0,3310$$

$$W_{tot}^2 = W_{Poisson}^2 + 0,3621$$

Se puede comprobar analizando los datos del ejemplo que el error de medida intralaboratorio (en el seno de la misma serie) es insignificante; en cambio, sobre el material considerado en el momento del ensayo interlaboratorios, el error de medida interlaboratorio sí es notable.

Expresión de la Incertidumbre:

En agua, el valor de E. coli debe ser de 0 ufc/100mL, para considerarla potable según el Decreto Nacional de agua potable.

Por lo tanto dar un valor de incertidumbre es muy poco entendible, por consiguiente es mejor expresar la incertidumbre en forma de un límite de detección (LD), estimado por la siguiente ecuación:

$$LIMITE DE DETECCION = LD = \frac{P_0^{-W_{Método de análisis}^2} - 1}{W_{Método de análisis}^2}$$

En este ejemplo, el límite de detección calculado para el método es:

$$LD = \frac{0,05^{-0,3621} - 1}{0,3621} = 5,4$$

Para facilitar todos estos cálculos, se puede emplear una planilla de cálculo, ya que permite combinar los resultados de los diferentes experimentos diseñados para llevar a cabo el control de calidad. La misma se muestra a continuación.

Ejemplo No1	Ejemplo No2	Ejemplo No3	Ejemplo No4	
X_i	X_i	X_i	No Laboratorio	X_i
1	38	34	1	34
0	33	24	2	24
5	42	16	3	16
3	37	35	4	35
1	36	41	5	41
1	26	32	6	32
2	34	35	7	35
7	35	38	.	38
2	40	41	.	41
2	29	30	.	30
2	27	25	.	25
3	22	33	39	33
3	29	28	40	28
0	28	46	41	46
2	33	35	42	35
0		15	43	15
1		34	44	34
2		30	45	30
1		26	.	26
5		30	.	30
		25	.	25
		23	.	23
		42	66	42
		39	67	39
		18	.	18
		39	.	39
		32	.	32
		26	.	26
		28	99	28
		41	100	41

n	20	15	30	100
Media	2,15	32,6	31,4	27,4
Varianza	3,29	31,83	61,96	300,06
Estimación de λ :	2,15	32,60	31,37	27,44
Estimación de K:	1,5	1,0	2,0	10,9
Variab Est Rel W^2 :	0,7122	0,0299	0,0630	0,3986
Calculo de $W_{Poisson}^2$:		0,0307	0,0319	0,0364
Calculo de $W_{I_r}^2$:		-0,0007	0,0000	0,0000
Calculo de $W_{R_r}^2$:			0,0311	0,0311
Calculo de $W_{IR_r}^2$:				0,3310
Calculo de W_{tot}^2 :				0,3621
Límite de detección LD:				5,4

Para facilitar la construcción de la Tabla, debe tenerse en cuenta que la columna B corresponde al ejemplo 1, la D al ejemplo 2, la F al ejemplo 3 y la I al ejemplo 4 (donde por simplicidad no se han cargados los 100 datos).

A partir de la fila 35 aparecen los resultados y los estadísticos calculados en cada caso, por ejemplo el número de datos, el promedio, la varianza, etc.

- a) La celda B35 indica el número de datos del Ejemplo 1
- b) La celda B36 es el promedio de los datos del Ejemplo 1
- c) La celda B37 es la varianza de los datos del Ejemplo 1
- d) La celda B39 es la estimación de λ y coincide con la celda B36
- e) La celda B40 es la estimación de K y es el cociente entre B37 y B36
- f) La celda B41 es la variabilidad estándar relativa y es igual al cociente entre B37 y la potencia cuadrada de B36
- g) En el Ejemplo 2 el valor de la potencia cuadrada de W de Poisson es la inversa del valor de estimación de λ
- h) En el Ejemplo 2 el valor de la potencia cuadrada de W_{IR} es la resta de D42 y D44
- i) En el Ejemplo 3 el valor de la potencia cuadrada de W_{IR} se obtiene por comparación con el valor obtenido en el Ejemplo 2, siendo 0 si ese valor era negativo y siendo ese valor si aquel era positivo.
- j) En el Ejemplo 3 el valor de la potencia cuadrada de W_{IR} es la resta de F42, F44 y F45
- k) En el Ejemplo 4 el valor de la potencia cuadrada de W_{IR} es la resta de I42, I44, I45 y I46
- l) En el Ejemplo 4 el valor de la potencia cuadrada de W_{tot} es la suma de I45 a I47
- m) En el Ejemplo 4 el valor del LD es el número 0,05 elevado a la potencia negativa de I49 menos 1 y luego dividido por I49

3.- INCERTIDUMBRE EN MEDICIONES QUÍMICAS

3.1- ASPECTOS GENERALES

El Vocabulario Internacional de Metrología define el **error** como “la diferencia entre el resultado obtenido y el valor verdadero del mensurando”. La **incertidumbre** y el error están asociados, ya que la incertidumbre debe considerar todas las posibles fuentes de error del proceso de medida. De todos modos, hay diferencias entre ambos conceptos.

Puede darse el caso de que un resultado tenga un error despreciable, ya que por casualidad, este resultado puede estar muy próximo al valor verdadero. Además, el error cometido al analizar varias muestras con un método analítico no es siempre el mismo ya que los errores aleatorios hacen que el error cometido en cada uno de los análisis sea diferente.

Sin embargo, la incertidumbre de todos los resultados obtenidos al analizar esa muestra es siempre la misma ya que se utiliza siempre el mismo método analítico. Por tanto, si se calcula la incertidumbre para un método analítico y un tipo de muestras determinado, todos los resultados obtenidos para las mismas muestras de ese tipo que se analicen con ese método tendrán la misma incertidumbre, aunque no tienen por qué tener el mismo error asociado.

La **veracidad** de un resultado se define como el grado de concordancia entre el valor medio obtenido a partir de una serie de resultados de ensayo y un valor de referencia aceptado. La incertidumbre y la veracidad están muy relacionadas entre sí, ya que si no se ha verificado la veracidad de un resultado, no se puede garantizar que se hayan corregido todos los errores sistemáticos del mismo y, por lo tanto, no es posible asegurar que el intervalo (*Valor estimado* \pm *Incertidumbre*) contenga al valor considerado verdadero con una determinada probabilidad.

Al expresar un resultado analítico como (*Valor estimado* \pm *Incertidumbre*), el analista debe verificar que el Valor estimado no tiene un error sistemático. Si la veracidad del resultado se ha verificado utilizando un estándar nacional o internacional (CRM, método de referencia, etc.), en ese proceso también se verifica la **trazabilidad** del resultado frente al estándar utilizado. En este caso, la incertidumbre y la trazabilidad también están relacionadas entre sí.

La incertidumbre debe incluir un término asociado a la **precisión** intermedia del experimento, y otro término asociado a verificar si el método tiene o no un error sistemático. Esto hace que la incertidumbre siempre sea mayor que la variabilidad de los resultados debida a la precisión intermedia.

Incertidumbre y precisión de un resultado analítico son términos muy relacionados. Los analistas están acostumbrados a asociar el término precisión a un determinado múltiplo de la desviación estándar o a un intervalo de confianza, resultante de repetir el análisis de la muestra problema.

El concepto de incertidumbre es más global, en el sentido de considerar todas las fuentes posibles de error que intervienen el resultado final. Probablemente la diferencia más importante se encuentra en el hecho de que el concepto de incertidumbre está íntimamente ligado con el concepto de trazabilidad, no así el de precisión, que indica una mera dispersión de los datos. ISO define la incertidumbre como "una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el rango de valores dentro de los cuales se afirma que está el valor verdadero". Prácticamente esto nos está diciendo que ya que la estimación de la incertidumbre debe incluir el valor verdadero, no tiene ningún sentido calcular la incertidumbre sin antes haber verificado la trazabilidad del procedimiento analítico, ya que solamente en estas circunstancias podremos asegurar que el valor verdadero cae dentro de nuestra incertidumbre.

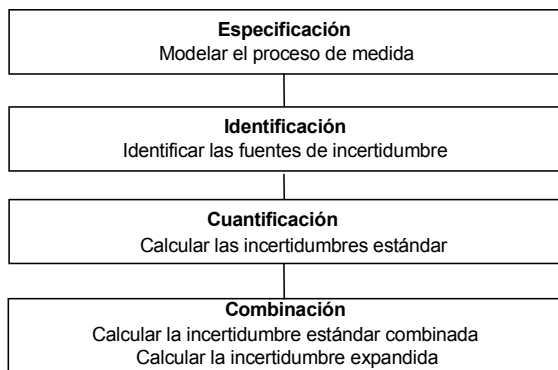
3.2- CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE MEDIANTE EL CRITERIO EURACHEM

El método para el cálculo de incertidumbres promovido por la ISO fue primero aplicado a resultados físicos, y posteriormente adaptado al campo de las mediciones químicas por el EURACHEM (CITAC/EURACHEM 2000).

En este enfoque se divide el proceso de medida químico en bloques o pasos, se busca la incertidumbre de cada bloque o paso, y finalmente se combinan para encontrar la incertidumbre total en sus partes fundamentales mediante la identificación, estimación y combinación de todas las fuentes de incertidumbre asociadas con el proceso de medida.

Esta aproximación puede ser usada con métodos clásicos de análisis o bien con otros casos muy simples. Para otras metodologías, las dificultades para establecer una relación matemática entre los resultados analíticos y los parámetros que intervienen el procedimiento analítico lo hacen muy complejo, y suele ser mejor dividir el proceso de medida en un número de bloques como el muestreo, los pretratamientos de la muestra, la separación del analito, la medida instrumental, los cálculos, etc., en lugar de intentar buscar una expresión algebraica del tipo $y = f(x_1, x_2, x_3, \dots)$.

El procedimiento para cuantificar la incertidumbre total se muestra en el esquema siguiente:



Especificación

Ya que normalmente el resultado de una medida depende de diversos parámetros (otros mensurandos que puedan haberse estimado, constantes y otras cantidades), es necesario especificar la relación entre la cantidad medida (y) y estos parámetros (x_i, x_j, x_k, \dots). En lo posible, esta relación debe expresarse como una expresión algebraica del tipo $y = f(x_i, x_j, x_k, \dots)$.

Una vez hecho esto, se llevará a cabo la identificación y la cuantificación de las fuentes de incertidumbre de cada bloque, y se calculará la incertidumbre total combinando los valores de las incertidumbres individuales calculadas.

Identificación

Es necesario identificar, a partir del conocimiento del método analítico, todas las fuentes de incertidumbre posibles, independientemente de la importancia que tenga cada una de ellas.

Algunos de los ejemplos de las fuentes de incertidumbre en un procedimiento analítico son el muestreo, los pretratamientos, el analista, los errores sistemáticos del instrumento, la calibración, la pureza de los reactivos, las condiciones de medida, la contaminación y los errores computacionales.

Cuantificación

Una vez que se han identificado las fuentes de incertidumbre, se las debe cuantificar. Como no todos los componentes identificados tendrán una contribución significativa en la incertidumbre total, conviene hacer una selección preliminar de los componentes que contribuirán de forma importante, basada en sus incertidumbres individuales.

La cuantificación de los componentes individuales puede hacerse analizando replicados especialmente para este fin, o utilizando datos obtenidos en trabajos anteriores, o usando toda la información que pueda estar disponible en el laboratorio, teniendo en cuenta la experiencia de los analistas.

La cuantificación basada en un análisis estadístico de los resultados experimentales da lugar a una evaluación de la incertidumbre de tipo A. La repetibilidad, reproducibilidad u otras estimaciones de precisión intermedias también se usan frecuentemente para evaluar la importancia de los efectos aleatorios.

La evaluación experimental es la mejor forma de estimar los componentes de incertidumbre. Sin embargo, hay veces que los experimentos no pueden realizarse debido a falta de tiempo, a la no disponibilidad de los recursos necesarios, o a la dificultad intrínseca en la estimación de la incertidumbre de un determinado bloque o parámetro. En este caso, la incertidumbre debe evaluarse a partir de trabajos anteriores o bien a partir del criterio del analista. Estas estimaciones están definidas como una evaluación de la incertidumbre de tipo B.

Las estimaciones basadas en la utilización de datos anteriores se obtienen a partir de la información dada por los proveedores, por ejemplo la tolerancia del material volumétrico. Algunos estudios anteriores pueden proporcionar también información de la incertidumbre asignada a los valores de materiales de referencia, o bien de los errores sistemáticos de los métodos detectados a través de ejercicios de intercomparación.

Sin embargo, en otros casos la única forma de estimar la incertidumbre está basada en la opinión del analista. Por ejemplo, la evaluación de las diferencias entre el nivel de concentración del analito en el material de referencia y en la muestra, la cuantificación de la dependencia de la concentración del analito en estudios de recuperación, o la evaluación de las diferencias de la composición de la matriz entre el material de referencia y la muestra analizada, se estiman a partir de los conocimientos que tiene el analista sobre el mensurando y el procedimiento de medida. Estas estimaciones no son completamente objetivas.

Para obtener la incertidumbre total combinada del proceso de medida siguiendo el principio de propagación de los errores, los valores obtenidos a partir de efectos aleatorios y sistemáticos tienen que estar expresados en las mismas unidades: las incertidumbres estándar. Es frecuente que sea necesario convertir otras medidas de dispersión a incertidumbres estándar. Un ejemplo típico frecuentemente explicado en la literatura específica es el relacionado con el cálculo de la incertidumbre estándar debida a una dilución realizada con un matraz aforado. La información del matraz dada por el proveedor es $250 \pm 0,15$ mL. Si se puede asumir una distribución Gaussiana con un nivel de confianza del 95%, la incertidumbre estándar se calcula dividiendo 0,15 mL por 1.96 (valor z tabulado para ese nivel de confianza). Si la distribución del valor fuera una distribución t , 0.15 debería dividirse por el valor de t tabulado para el número de grados de libertad considerados. Pero si no hay información sobre la función de distribución ni sobre el número de grados de libertad, únicamente puede asumirse que es igualmente probable que el valor esté en cualquier lugar dentro de los límites del intervalo (suponer una distribución rectangular de los valores). En este caso la incertidumbre estándar se obtiene dividiendo 0,15 por la raíz cuadrada de 3. Si los errores pequeños son más probables, la desviación estándar puede calcularse dividiendo el valor correspondiente a la mitad del intervalo por la raíz cuadrada de 9 o por la raíz cuadrada de 6 (dependiendo de que el analista asuma una distribución normal o bien una distribución triangular).

Combinación

Los componentes individuales de incertidumbre estimados como incertidumbres estándar se combinan siguiendo el principio de propagación de errores. Si una cantidad medida, y , es función de diferentes parámetros, $y = f(x_i, x_j, x_k, \dots)$, la incertidumbre combinada estándar viene dada por la expresión general:

$$u(y(x_{i,j,\dots})) = \sqrt{\sum_{i=1,n} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot u(x_i) \right)^2 + \sum_{\substack{i,k=1,n \\ i \neq k}} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot \frac{\partial y}{\partial x_j} \cdot \text{cov}(x_{ik}) \right)}$$

donde:

x_i ($i = 1 \dots n$) son los parámetros de los que depende el resultado del mensurando

$u(x_i)$ incertidumbre del parámetro i expresada como incertidumbre estándar

$\text{cov}(x_{ik})$ es la covarianza entre x_i y x_k

Si todos los parámetros que contribuyen al resultado del mensurando son independientes, el término correspondiente a la covarianza es cero, y la expresión general se simplifica:

$$u(y(x_{i,j,\dots})) = \sqrt{\sum_{i=1,n} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot u(x_i) \right)^2}$$

Si la relación que hay entre el mensurando y los parámetros se expresa únicamente a través de sumas y restas, por ejemplo $y = x_i + x_j - x_k + \dots$, la incertidumbre estándar combinada viene dada por:

$$u(y(x_{i,j,\dots})) = \sqrt{\sum_{i=1,n} (u(x_i))^2} = \sqrt{u(x_i)^2 + u(x_j)^2 + u(x_k)^2 + \dots}$$

Por último, se debe calcular la incertidumbre combinada expandida, que por definición es la cantidad que define un intervalo alrededor del resultado de la medición, del cual se espera que comprenda los valores que razonablemente pudieran ser atribuidos al mensurando.

La incertidumbre expandida proporciona un intervalo correspondiente a un nivel de confianza especificado, y se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada estándar por el factor de incertidumbre, k . Generalmente, se utilizan los valores $k=2$ ó $k=3$, para obtener aproximadamente un nivel de confianza del 95% o del 99% respectivamente. En la mayoría de las situaciones prácticas, se recomienda utilizar el valor $k = 2$.

3.3- EJEMPLO 6: CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE SEGÚN LA GUÍA EURACHEM PARA UNA DETERMINACIÓN GRAVIMÉTRICA

El procedimiento se basa en el uso y la aplicación de expresiones matemáticas que identifican las fuentes de incertidumbre, que se cuantifican como incertidumbres estándar, y a partir de ellas se estiman las incertidumbres combinada y expandida.

Para la realización de los cálculos correspondientes a la incertidumbre, se requiere contar con el procedimiento del método, los resultados de la calibración y/o verificación de instrumentos y materiales utilizados y los resultados de la prueba de desempeño o de estándares de control de calidad.

Así también, para los cálculos de repetibilidad, es necesario contar con cada uno de los resultados de las mediciones por triplicado para cada muestra o estándar.

Hay que seguir los siguientes pasos:

- ❖ Describir el fundamento para la realización de las pruebas, identificando cada uno de los factores importantes que intervienen en la medición.
- ❖ Aplicar el modelo del proceso de medición, para determinar la relación que existe entre el resultado analítico y los factores de los que depende. El modelo se establece en el punto a.
- ❖ Identificar todas las fuentes de incertidumbre involucradas en el modelo y establecer las correspondientes al mensurando a determinar. La identificación se llevará a cabo siguiendo lo establecido en el punto b.
- ❖ Cuantificar todas las fuentes de incertidumbre identificadas en el punto b, aplicando los cálculos establecidos en los puntos del c.1 i) al c.1.iii), c.2. i) al c.2. iii) y c.3. i) al c.3. iv). Las incertidumbres individuales

obtenidas en estos puntos se expresan como incertidumbre estándar.

- ✧ Combinar las incertidumbres estándar, una vez determinadas, siguiendo la Ley de propagación de errores, considerando el modelo matemático que se establece en el punto a. La incertidumbre combinada está dada por la ecuación del punto c.4.
- ✧ Determinar la incertidumbre expandida multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura; $k = 2$. Este valor asume una distribución normal y una confianza aproximada del 95%. En el punto c.5 se da la ecuación que la determina.
- ✧ Realizar el cálculo establecido en el punto c.6. para obtener la incertidumbre relativa.
- ✧ Seguir el punto c.8. para efectuar el cálculo de la incertidumbre en muestras analizadas.

PROCEDIMIENTO

a) Establecer el MODELO MATEMÁTICO que describe el proceso de medición del mensurando.

$$c_1 = \frac{m_2 - m_1}{V}$$

b) Fuentes de incertidumbre del proceso: Para la identificación de las fuentes de incertidumbre significativas, se parte del modelo matemático correspondiente, teniendo en cuenta también otras fuentes que no están descritas explícitamente en el modelo, como certificados de materiales de referencia y de calibración de equipos, y manuales de los instrumentos. Las fuentes de incertidumbre significativas identificadas en el modelo matemático se listan en la tabla siguiente:

$C_1 =$ concentración del mensurando (mg/L)		
$m_1 =$ masa del peso constante del recipiente (mg)	$m_2 = m_1 +$ masa del mensurando (mg)	$V =$ volumen de la muestra (mL).
<ul style="list-style-type: none"> • Repetibilidad • Linealidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Repetibilidad • Linealidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Datos de especificación del fabricante. • Repetibilidad • ΔT: diferencia de temperatura entre la de calibración y la de trabajo, en valor absoluto.

c) Cálculo

El procedimiento de cálculo que se indica del punto c.1 al c.9, se aplica para la medición de Sólidos. Cuando se trate de la medición de Grasas y Aceites (GyA), se deberá repetir el mismo procedimiento para el Blanco hasta el punto c.6, y continuar en el c.8.

c.1. Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente a la masa del peso constante del recipiente (m_1).

i) Repetibilidad de la pesada. Introducir en la tabla modelo los resultados de las masas de peso constante, el número de repeticiones y su desviación estándar. Calcular la incertidumbre estándar de la repetibilidad, con la fórmula siguiente.

$$u_{R1n} = \frac{S}{\sqrt{i}}$$

donde

S = Desviación estándar de las repeticiones del proceso de pesado.

n = Número de crisoles, cápsulas o vasos.

i = Número de repeticiones para cada peso constante.

No. de pesada	$m_{11} =$ masa del peso constante (mg)	$m_{12} =$ masa del peso constante (mg)	$m_{13} =$ masa del peso constante (mg)	$m_{14} =$ masa del peso constante (mg)	$m_{1n} =$ masa del peso constante (mg)
1					
2					
3					
i					
\bar{X}					
s					
u_{R1j}					

$$m_{1j} = m_{11}, m_{12}, \dots, m_{1n}$$

\bar{X} = Valor promedio de las mediciones

El promedio de la incertidumbre para la repetibilidad es:

$$u_{R1} = \frac{\sum_{j=1}^n u_{R1j}}{n}$$

donde n = Número de crisoles, cápsulas o vasos.

ii) Linealidad de la balanza. Calcular la incertidumbre estándar considerando lo establecido en el manual del instrumento o en el certificado de calibración.

$$u_{linealidad} = \frac{U}{k}$$

U = Incertidumbre de la linealidad de la balanza en el intervalo de trabajo con un nivel de confianza del 95%.

k = factor de cobertura = 2

iii) Estimación de la incertidumbre combinada para la masa del peso constante (m_1).

$$u_{m_1} = \sqrt{u_{R1}^2 + u_{linealidad}^2}$$

donde

u_{R1} = Incertidumbre estándar correspondiente a la repetibilidad de la pesada.

$u_{linealidad}$ = Incertidumbre estándar debida a la linealidad de la balanza.

c.2. Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente a la masa del peso constante más la del mensurando (m_2).

i) Repetibilidad de la pesada. Introducir en la tabla modelo los resultados de las masas del peso constante más la del mensurando, el número de repeticiones y su desviación estándar.

Calcular la incertidumbre estándar de la repetibilidad, con la siguiente fórmula.

$$u_{R_{2n}} = \frac{s}{\sqrt{i}}$$

donde

s = Desviación estándar de las repeticiones del proceso de pesado.

n = Número de recipientes

i = Número de repeticiones para cada recipiente.

No. de pesada	$m_{21} = m_1$ Más la masa del mensurando (mg)	$m_{22} = m_1$ más la masa del mensurando (mg)	$m_{23} = m_1$ más la masa del mensurando (mg)	$m_{24} = m_1$ más la masa del mensurando (mg)	$m_{2n} = m_1$ más la masa del mensurando (mg)
1					
2					
3					
i					
\bar{X}					
S					
u_{R2j}					

$$m_{2j} = m_{21}, m_{22}, \dots, m_{2n}$$

El promedio de la incertidumbre para la repetibilidad es:

$$u_{R2} = \frac{\sum_{j=1}^n u_{R2j}}{n}$$

ii) Linealidad de la balanza.

$$u_{linealidad} = \frac{U}{k}$$

$u_{linealidad}$ = La calculada en el punto c.1 ii)

iii) Estimación de la incertidumbre combinada para la masa del peso constante más la del mensurando (m_2).

$$u_{m_2} = \sqrt{u_{R2}^2 + u_{linealidad}^2}$$

donde

u_{R2} = Incertidumbre estándar correspondiente a la repetibilidad de la pesada.

$u_{\text{linealidad}}$ = Incertidumbre estándar debida a la linealidad de la balanza.

c.3. Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente al volumen de la probeta con la cual se mide la muestra (V).

i) Repetibilidad del llenado de la probeta.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

donde

s = Desviación estándar experimental de las repeticiones del proceso de llenado.

n = Número de repeticiones.

ii) Incertidumbre estándar con respecto a la tolerancia del material con el que se mide la muestra, declarada por el fabricante.

$$u_{\text{tol}} = \frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

iii) Incertidumbre debido a la diferencia de temperatura entre la temperatura de especificación del fabricante y la de trabajo.

$$u_{\Delta T} = \frac{V * (T_{\text{trabajo}} - T_{\text{probeta}}) * 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$$

donde

V = Volumen de la probeta con la que se mide la muestra.

T_{probeta} = Temperatura reportada en la especificación de la probeta

T_{trabajo} = Temperatura de trabajo

$2,1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ = Coeficiente de expansión de volumen del agua

iv) Incertidumbre combinada correspondiente al volumen de la muestra.

$$u_V = \sqrt{u_R^2 + u_{tol}^2 + u_{\Delta T}^2}$$

donde

u_R = Incertidumbre estándar de la repetibilidad.

u_{tol} = Incertidumbre estándar correspondiente a la tolerancia del fabricante.

$u_{\Delta T}$ = Incertidumbre estándar debida a la diferencia de temperatura entre la temperatura de especificación y la temperatura de trabajo.

c.4. Estimación de la incertidumbre combinada asociada a la concentración del mensurando en mg/L.

Al modelo matemático del punto a, se le aplica la Ley de propagación de la Incertidumbre, efectuando la raíz cuadrada de las derivadas parciales de la concentración del parámetro con respecto a cada uno de los factores que la afectan, multiplicadas por la incertidumbre del factor correspondiente a cada derivada, elevadas al cuadrado. El resultado se da en la siguiente expresión.

$$u_{c1\text{ STD}} = \sqrt{\left(-\frac{u_{m1}}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_{m2}}{V}\right)^2 + \left(-\frac{(m_2 - m_1) * u_V}{V^2}\right)^2}$$

c.5. Estimar la incertidumbre expandida considerando un nivel de confianza del 95% que equivale a un factor de cobertura de “2”.

$$U'_{c1\text{ STD}} = 2 * u_{c1\text{ STD}}$$

donde

U'_{c1} = Incertidumbre expandida

c.6. Una vez calculada la incertidumbre expandida, transformarla a incertidumbre relativa, de la siguiente forma:

$$U_{c1 STD} = \frac{U'_{c1 STD}}{c_1}$$

donde

$U'_{c1 STD}$ = Incertidumbre de los estándares.

c_1 = Concentración promedio obtenida de los cinco estándares. Para cuando el cálculo se aplique para los Blancos, utilizar la concentración promedio de los mismos.

c.7. Una vez que se ha calculado la $U_{c1 STD}$ y $U_{c1 BCO}$, aplicar la Ley de Propagación de errores para determinar la U_{c1} del mensurando.

$$U_{c1} = \sqrt{(U_{c1 BCO})^2 + (U_{c1 STD})^2}$$

donde

U_{c1} = Incertidumbre total relativa del mensurando

c.8. Determinar la incertidumbre de la muestra analizada multiplicando su concentración por la incertidumbre total relativa (U_{c1}).

$$U_{mta} = \text{Concentración de la muestra} * U_{c1}$$

c.9. Expresión del resultado:

$$\text{Concentración de la muestra} \pm U_{mta}$$

3.4- EJEMPLO 7: CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE SEGÚN LA GUÍA EURACHEM PARA EL CASO DE MÉTODOS VOLUMÉTRICOS

Este procedimiento se basa en el uso y la aplicación de expresiones matemáticas que identifican las fuentes de incertidumbre que se cuantifican como incertidumbres estándar, y a partir de ellas se estiman las incertidumbres combinada y expandida.

a) Describir el método de medición del analito en una muestra, considerando que las mediciones volumétricas se basan en la titulación de la muestra con una solución titulante utilizando un indicador. Establecer la ecuación de la reacción.

NOTA: Proceso de medición. Para llevar a cabo la medición del analito en la muestra, se requiere de la preparación de una solución de un estándar primario de concentración conocida (c_1) que se emplea para valorar la solución titulante (c_2), la cual se utiliza para la determinación de la concentración del analito en la muestra. El titulante reacciona con el analito y la reacción finaliza en las inmediaciones del punto de equivalencia.

b) Indicar los modelos de procesos de medición establecidos en el punto a) iii), elegir el que corresponda al analito a determinar, en el cual debe evidenciarse la relación que existe entre el resultado analítico y los parámetros de los que depende.

c) En base al modelo elegido, y las fuentes de incertidumbre identificadas para cada uno de ellos en el punto b), establecer las correspondientes al analito a determinar, considerando las tablas adecuadas.

d) Cuantificar todas las fuentes de incertidumbre establecidas en el punto b), aplicando los cálculos establecidos en los puntos del c) i) al c iv), d) i) al d vi) y e) i) al e iv). Las incertidumbres individuales obtenidas en estos apartados se expresan como incertidumbres estándar.

e) Una vez determinadas las incertidumbres estándar (incertidumbre asociada a la concentración del estándar primario, la asociada a la concentración del titulante y la asociada a la concentración del analito), éstas deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores, considerando para ello cada uno de los pasos involucrados en el proceso de medición, y de esta forma obtener las incertidumbres combinadas. Realizar los cálculos de acuerdo a lo establecido en los puntos c) v), d) vii) y e) v).

f) Determinar la Incertidumbre Expandida multiplicando la incertidumbre combinada (calculada con la fórmula del punto e) v) por un factor de cobertura $k = 2$. Este valor asume una distribución normal y una confianza aproximada del 95% de contener el valor verdadero.

g) Realizar el cálculo establecido en el punto e) vii) y obtener la incertidumbre relativa.

h) Para el cálculo de la incertidumbre en las muestras analizadas, aplicar la fórmula del punto e) viii).

PROCEDIMIENTO

a) Establecer el modelo matemático que corresponda, dependiendo del parámetro que se trate.

a) i) Modelo matemático que describe el proceso de preparación del estándar primario (material de referencia) para la valoración de la solución titulante:

$$c_1 = \frac{m * P}{V_0 * M}$$

c_1 = concentración promedio de siete mediciones del estándar primario

m = masa del compuesto utilizado como estándar primario

P = pureza del estándar primario

V_0 = volumen preparado de la solución

M = masa molar del estándar primario

a) ii) Ecuación que describe el proceso de valoración de la solución titulante, considerando los siguientes casos:

Caso 1 – Normalidad (Nitrógeno total Kjeldahl, Nitrógeno amoniacal y Alcalinidad)

$$c_2 = \frac{m * P}{Meq * V_2}$$

c_2 = concentración del titulante

m = masa del estándar primario

P = pureza del estándar primario

Meq = masa equivalente del estándar primario

V_2 = volumen gastado de titulante

Caso 2 – Relación de concentraciones entre el estándar primario y titulante:

$$c_2 = \frac{c_1 * V_1}{V_2}$$

c_2 = concentración del titulante

c_1 = concentración del estándar primario

V_1 = Volumen del estándar primario

V_2 = Volumen gastado del titulante

a) iii) Ecuación que describe el método de medición del analito en estudio:

- Demanda Química de Oxígeno

$$c_{ANALITO} = \frac{(V_{BCO} - V_{MTRA})(c_2)}{V} (8)$$

- Dureza total

$$c_{ANALITO} = \frac{(V_{MTRA})(c_2)}{V}$$

- Alcalinidad total

$$c_{ANALITO} = \frac{(V_{MTRA})(c_2)}{V} (50)$$

- Nitrógeno

$$c_{ANALITO} = \frac{(V_{MTRA} - V_{BCO})(c_2)}{V} (14)$$

- Cloruros

$$c_{ANALITO} = \frac{(V_{MTRA} - V_{BCO})(c_2)(35,45)}{V}$$

b) Identificación de las fuentes de incertidumbre:

Para la identificación de las fuentes de incertidumbre significativas, se parte del modelo matemático correspondiente, así como de aquellas fuentes que no están descritas explícitamente en el modelo y que provienen de otras fuentes.

b) i) Proceso de preparación de la solución del estándar primario:

$C_1 = \text{concentración del estándar primario}$			
$m = \text{masa del estándar primario (g)}$	$P = \text{pureza del estándar primario}$	$V_0 = \text{volumen de la solución del estándar primario (L)}$	$M = \text{masa molar del estándar primario (g/mol)}$
* Repetibilidad * Linealidad (Balanza)	* Certificado	* Datos de calibración o especificación del fabricante. * Repetibilidad * ΔT diferencia entre la temperatura de calibración y la de trabajo, en valor absoluto.	* Masas atómicas de los elementos que conforman el material de referencia.

b) ii) Proceso de valoración de la solución titulante:

$C_2 = \text{concentración promedio de la solución titulante}$					
$C_1 =$ concentración del estándar primario	$P =$ pureza del estándar primario	$m =$ masa del estándar primario (g)	$M_{eq} =$ Masa equivalente (g/mol)	$V_1 =$ volumen de la alícuota de la solución de referencia (L)	$V_2 =$ volumen gastado por la solución titulante empleado en la valoración (L)
* Incertidumbre combinada	* Certificado	* Repetibilidad * Linealidad (Balanza)	* Masa Molar del estándar primario.	* ΔT diferencia entre la temperatura de calibración y la de trabajo, en valor absoluto. * Calibración o especificación de la pipeta o matraz volumétrico	* ΔT diferencia entre la temperatura de calibración y la de trabajo, en valor absoluto. * Calibración o especificación de la bureta. * Repetibilidad

b) iii) Proceso de titulación para la medición del analito en estudio en la muestra.

$C_{\text{analito}} = \text{concentración del analito en estudio en la muestra}$			
$C_2 = \text{concentración promedio de la solución titulante}$	$V = \text{volumen de la muestra a determinar (L)}$	$V_{\text{BCO}} = \text{volumen promedio gastado en la titulación de seis blancos (L)}$	$V_{\text{MTRA}} = \text{volumen promedio gastado en la titulación de siete estándares (L)}$
Incertidumbre combinada	* ΔT diferencia entre la temperatura de calibración y la de trabajo, en valor absoluto. * Repetibilidad * Calibración o especificación de la pipeta o matraz volumétrico	* ΔT diferencia entre la temperatura de calibración y la de trabajo, en valor absoluto. * Repetibilidad * Calibración o especificación de la bureta	* ΔT diferencia entre la temperatura de calibración y la de trabajo, en valor absoluto. * Repetibilidad * Calibración o especificación de la bureta
		$M_{\text{eq}} = \text{Masa equivalente (g/mol)}$	$M_{\text{eq}} = \text{Masa Molar}$

c) Estimación de las incertidumbres estándar correspondientes a la preparación de la solución del estándar primario.

c) i) Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente a la masa del estándar primario.

Con la siguiente expresión, se calcula:

$$u_m = \sqrt{U^2 + R^2}$$

- Repetibilidad de la pesada (R).

Repetibilidad (precisión) de la balanza en el intervalo de trabajo declarada por el fabricante.

- Linealidad de la balanza (U)

Incertidumbre de la linealidad de la balanza en el intervalo de trabajo con un nivel de confianza del 95%.

$$U = \frac{u}{2}$$

u = linealidad de la balanza declarada por el fabricante

c) ii) Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente a la pureza del estándar primario (u_p), la cual se calcula de la siguiente manera:

$$u_p = \frac{U_{PZA}}{2}$$

U_{PZA} = incertidumbre del estándar declarada en el certificado

c) iii) Estimación de la incertidumbre correspondiente al volumen del matraz volumétrico en el cual se prepara la solución del estándar primario, la cual se obtiene con la siguiente expresión:

$$u_{V0} = \sqrt{(u_{tol})^2 + (u_R)^2 + (u_{\Delta T})^2}$$

- Incertidumbre estándar con respecto a la tolerancia del matraz volumétrico declarada por el fabricante (u_{tol}).

$$u_{tol} = \frac{\textit{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

- Incertidumbre con respecto a la repetibilidad de llenado del matraz volumétrico.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n = Número de mediciones

s = Desviación estándar experimental de las repeticiones

- Incertidumbre debido a la diferencia de temperatura entre la temperatura de especificación del fabricante y la de trabajo.

$$u_{\Delta T} = \frac{V_o * |T_{lab} - T_{matraz}| * 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$$

T_{matraz} = Temperatura reportada en la especificación del matraz volumétrico

T_{lab} = Temperatura en el laboratorio

$2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ = Coeficiente de expansión del agua

c) iv) Estimación de la incertidumbre estándar para la masa molar del estándar primario.

$$u_M = \sqrt{u_{\text{Selemento}1}^2 + u_{\text{Selemento}2}^2 + u_{\text{Selemento}3}^2 + \dots + u_{\text{Selemento}n}^2}$$

$u_{\text{Selemento}}$ = Incertidumbre estándar de cada elemento que forma la molécula del estándar primario

Considerando lo establecido en la Tabla 1, completar la misma con los datos correspondientes al estándar primario utilizado. La incertidumbre por cada elemento que forma el estándar primario, se obtiene:

$$u = u_{\text{elemento}} * z$$

u_{elemento} = La incertidumbre del elemento (ver Tabla 2)

z = Número de átomos presentes en la molécula del estándar primario

Y la incertidumbre estándar, de la siguiente manera:

$$u_{\text{Selemento}} = \frac{u}{\sqrt{z}}$$

Tabla 1. Resumen de incertidumbres por molécula del estándar primario

FUENTE DE INCERTIDUMBRE (ELEMENTO)	MASA ATÓMICA	Nº. DE ÁTOMOS EN MOLÉCULA (Z)	INCERTIDUMBRE DEL ELEMENTO (u_{elemento})	INCERTIDUMBRE u	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR $u_{\text{Selemento}}$

Tabla 2. Incertidumbre por elemento

SÍMBOLO	MASA ATÓMICA (g/mol)	INCERTIDUMBRE (g/mol)
Carbono (C)	12,0107	0,0008
Oxígeno (O)	15,9994	0,0003
Nitrógeno (N)	14,0067	0,0002
Sodio (Na)	22,989770	0,000002
Cloro (Cl)	35,453	0,002
Calcio (Ca)	40,078	0,004
Potasio (K)	39,0983	0,0001
Cromo (Cr)	51,9961	0,0006

c) v) Estimación de la incertidumbre combinada asociada a la concentración c_1 de la solución del estándar primario. Esta se obtiene aplicando la Ley de Propagación de la incertidumbre a la ecuación de preparación de la solución.

De la ecuación del punto a) i)

$$u_{c_1} = \sqrt{\left(\frac{P^* u_m}{V_0^* M}\right)^2 + \left(\frac{m^* u_p}{V_0^* M}\right)^2 + \left(-\frac{mP^* u_{V_0}}{V_0^2 * M}\right)^2 + \left(-\frac{mP^* u_M}{V_0^* M^2}\right)^2}$$

m = masa del estándar primario

V_0 = volumen de la solución del estándar primario

M = Masa molar del estándar primario

u_m = Incertidumbre de la masa del estándar primario
(punto c) i))

u_p = Incertidumbre de la pureza del estándar primario
(punto c) ii))

u_{V_0} = Incertidumbre del volumen preparado de solución
de estándar primario (punto c) iii))

u_M = Incertidumbre de la masa molar del estándar
primario (punto c) iv))

d) Estimación de las incertidumbres estándar correspondientes al proceso de valoración de la solución titulante.

d) i) Incertidumbre estándar correspondiente al volumen de la pipeta volumétrica, pipeta automática o matraz volumétrico con la(el) cual se toma la alícuota de la solución del estándar primario. Dicha incertidumbre es expresada con la siguiente ecuación:

$$u_{V_1} = \sqrt{(u_{tol})^2 + (u_R)^2 + (u_{\Delta T})^2}$$

d) ii) Tolerancia de la pipeta volumétrica, automática o del matraz volumétrico declarada(o) por el fabricante.

$$u_{tol} = \frac{\textit{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

d) iii) Repetibilidad de llenado de la pipeta volumétrica, automática o matraz volumétrico.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n = Número de repeticiones

s = Desviación estándar experimental de las repeticiones

d) iv) Incertidumbre debida a la diferencia de temperatura entre la temperatura de especificación del fabricante y la temperatura de trabajo, de la pipeta volumétrica, automática o matraz volumétrico.

$$u_{\Delta T} = \frac{V_1 * |T_{trabajo} - T_{especificación}| * 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$$

$T_{especificación}$ = Temperatura de especificada por el fabricante

$T_{trabajo}$ = Temperatura en el laboratorio

$2,1 \times 10^{-4}$ = Coeficiente de expansión del agua

d) v) Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente al volumen de la bureta empleada en la valoración de la solución titulante.

$$u_{V_2} = \sqrt{(u_{tol})^2 + (u_R)^2 + (u_{\Delta T})^2}$$

- Tolerancia de la bureta declarada por el fabricante.

$$u_{tol} = \frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

- Repetibilidad de llenado de la bureta.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n = Número de repeticiones

s = Desviación estándar experimental de las repeticiones

- Incertidumbre debida a la diferencia de temperatura entre la temperatura de especificación del fabricante y la temperatura de trabajo.

$$u_{\Delta T} = \frac{V_2 * |T_{trabajo} - T_{especificación}| * 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$$

d) vi) Estimación de la incertidumbre estándar para la masa equivalente del estándar primario.

$$u_{Meq} = \frac{u_M}{\text{Nequivalentes}}$$

u_M = Incertidumbre de la masa molar

Nequivalentes = No. de equivalentes

d) vii) Incertidumbre combinada asociada a la concentración c_2 .

$$u_{c_2} = \sqrt{u_R^2 + u_{c_2}'^2}$$

- La Incertidumbre asociada a la valoración de la solución titulante con la solución del estándar primario (u'_{c2}), se estima aplicando la Ley de Propagación de la Incertidumbre.
- Caso: Nitrógeno total Kjeldahl, Nitrógeno amoniacal y Alcalinidad

$$u'_{c2} = \sqrt{\left(\frac{u_m}{V_2 * Meq}\right)^2 + \left(\frac{m * u_p}{V_2 * Meq}\right)^2 + \left(-\frac{m * u_{Meq}}{V_2 * Meq^2}\right)^2 + \left(-\frac{m * u_{V2}}{V_2^2 * Meq}\right)^2}$$

- Caso Cloruro y Dureza

$$u'_{c2} = \sqrt{\left(\frac{V_1 * u_{c1}}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{c_1 * u_{V1}}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{c_1 * V_1 * u_{V2}}{V_2^2}\right)^2}$$

- Caso Demanda Química de Oxígeno

$$u'_{c2} = \sqrt{\left(\frac{V_1 * u_{c1}}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{c_1 * u_{V1}}{V_2}\right)^2 + \left(-\frac{c_1 * V_1 * u_{V2}}{V_2^2}\right)^2}$$

m = Masa del estándar primario

V_1 = Volumen del estándar primario

V_2 = Volumen gastado del titulante

Meq = Masa equivalente

u_m = Incertidumbre de la masa del estándar primario
(punto c) i))

u_p = Incertidumbre de la pureza del estándar primario
(punto c) ii))

u_{V1} = Incertidumbre del volumen de estándar primario
(punto c) iii))

u_{V2} = Incertidumbre del volumen gastado del titulante
(punto c) iv))

u_{c1} = Incertidumbre de la concentración del estándar primario (punto d) v))

u_{Meq} = Incertidumbre de la masa equivalente (punto d) vi))

- Estimación de la incertidumbre asociada a la concentración c_2 considerando la repetibilidad (u_R) de la titulación de la solución titulante con el estándar primario. Ésta se obtiene a partir de la valoración de la solución titulante.

De las repeticiones realizadas, es posible obtener la desviación estándar. Una vez calculada, se debe obtener la incertidumbre de las repeticiones mediante la siguiente ecuación:

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

s = Desviación estándar de las repeticiones de la valoración

n = Número de repeticiones

e) Estimación de las incertidumbres estándar correspondientes al proceso de titulación de la medición del analito en cuestión:

e) i) Incertidumbre estándar correspondiente al volumen de la muestra.

$$u_v = \sqrt{u_{tol}^2 + u_R^2 + u_{\Delta T}^2}$$

- Tolerancia de la pipeta volumétrica, automática o del matraz volumétrico declarada por el fabricante.

$$u_{tol} = \frac{\textit{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

- Repetibilidad de llenado de la pipeta volumétrica, automática o matraz volumétrico.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n = Número de repeticiones

s = Desviación estándar

- Incertidumbre debida a la diferencia de temperatura entre la temperatura de especificación del fabricante y la temperatura de trabajo.

$$u_{\Delta T} = \frac{V * |T_{trabajo} - T_{especificación}| * 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$$

V = Volumen tomado de muestra

$T_{especificación}$ = Temperatura de especificación del fabricante

$T_{trabajo}$ = Temperatura en el laboratorio

$2,1 \times 10^{-4}$ = Coeficiente de expansión del agua

e) ii) Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente al volumen de la bureta empleada para titular el blanco. Dicha incertidumbre es expresada con la siguiente ecuación:

$$u_{V_{bco}} = \sqrt{u_{tol}^2 + u_R^2 + u_{\Delta T}^2}$$

- Tolerancia de la bureta declarada por el fabricante.

$$u_{tol} = \frac{tolerancia}{\sqrt{3}}$$

- Repetibilidad de llenado de la bureta.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n = Número de repeticiones

s = Desviación estándar

- Incertidumbre debida a la diferencia de temperatura entre la temperatura de especificación del fabricante y la temperatura de trabajo.

$$u_{\Delta T} = \frac{V_{bco} * |T_{trabajo} - T_{especificación}| * 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$$

V_{bco} = volumen gastado por el blanco

e) iii) Estimación de la incertidumbre estándar correspondiente al volumen de la bureta empleada para titular la muestra.

$$u_{Vmtra} = \sqrt{u_{tol}^2 + u_R^2 + u_{\Delta T}^2}$$

- Tolerancia de la bureta declarada por el fabricante.

$$u_{tol} = \frac{\textit{tolerancia}}{\sqrt{3}}$$

- Repetibilidad de llenado de la bureta.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n = Número de repeticiones

s = Desviación estándar

- Incertidumbre debida a la diferencia de temperatura entre la temperatura de especificación del fabricante y la temperatura de trabajo.

$$u_{\Delta T} = \frac{V_{mtra} * |T_{trabajo} - T_{especificación}| * 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$$

V_{mtra} = Volumen gastado por la muestra.

e) iv) Incertidumbre estándar correspondiente a la masa equivalente del analito en estudio.

$$u_{ME_{\text{analito}}} = \sqrt{u_{\text{Selemento } 1}^2 + u_{\text{Selemento } 2}^2 + u_{\text{Selemento } 3}^2 + \dots + u_{\text{Selemento } n}^2}$$

Completar la tabla modelo con los datos correspondientes a los elementos que constituyen la molécula del analito. La incertidumbre por cada elemento que forma el analito, se obtiene:

$$u = u_{\text{elemento}} * Z$$

Y la incertidumbre estándar se obtiene:

$$u_{\text{Selemento}} = \frac{u}{\sqrt{3}}$$

Resumen de incertidumbres por molécula del analito

FUENTE DE INCERTIDUMBRE (ELEMENTO)	MASA ATÓMICA	Nº. DE ÁTOMOS EN MOLÉCULA (Z)	INCERTIDUMBRE DEL ELEMENTO (u_{elemento})	INCERTIDUMBRE u	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR $u_{\text{Selemento}}$

e) v) Estimación de la Incertidumbre combinada asociada a la concentración del analito (u_{Canalito}).

$$u_{\text{Canalito}} = \sqrt{u_{c'_{\text{analito}}}^2 + u_R^2}$$

- Estimación de la incertidumbre asociada a la concentración c'_{analito} de una titulación de estándar para el analito en estudio. Aplicando la Ley de propagación de la Incertidumbre tenemos la siguiente expresión que determina la incertidumbre combinada aplicable para la:

- Demanda Química de Oxígeno:

$$u_{c_{analito}} = \sqrt{\left(\frac{8 * c_2 * u_{mitra}}{V}\right)^2 + \left(\frac{8 * c_2 * u_{bco}}{V}\right)^2 + \left(\frac{8 * c_2 * (V_{bco} - V_{mitra}) * u_V}{V^2}\right)^2 + \left(\frac{8 * (V_{bco} - V_{mitra}) * u_{c_2}}{V}\right)^2 + \left(\frac{c_2 * (V_{bco} - V_{mitra}) * u_{PE}}{V}\right)^2}$$

- Cloruros :

$$u_{c_{analito}} = \sqrt{\left(\frac{3545 * c_2 * u_{mitra}}{V}\right)^2 + \left(\frac{3545 * c_2 * u_{bco}}{V}\right)^2 + \left(\frac{3545 * c_2 * (V_{mitra} - V_{bco}) * u_V}{V^2}\right)^2 + \left(\frac{3545 * (V_{mitra} - V_{bco}) * u_{c_2}}{V}\right)^2 + \left(\frac{c_2 * (V_{mitra} - V_{bco}) * u_{PE}}{V}\right)^2}$$

- Dureza:

$$u_{c_{analito}} = \sqrt{\left(\frac{c_2 * u_{Vmitra}}{V}\right)^2 + \left(-\frac{c_2 * V_{mitra} * u_V}{V^2}\right)^2 + \left(\frac{V_{mitra} * u_{C_2}}{V}\right)^2}$$

- Nitrógeno total Kjeldahl y Nitrógeno amoniacal:

$$u_{c_{analito}} = \sqrt{\left(\frac{14 * c_2 * u_{mitra}}{V}\right)^2 + \left(\frac{14 * c_2 * u_{bco}}{V}\right)^2 + \left(\frac{14 * c_2 * (V_{mitra} - V_{bco}) * u_V}{V^2}\right)^2 + \left(\frac{14 * (V_{mitra} - V_{bco}) * u_{c_2}}{V}\right)^2 + \left(\frac{c_2 * (V_{mitra} - V_{bco}) * u_{Meq}}{V}\right)^2}$$

- Alcalinidad total:

$$u_{c_{analito}} = \sqrt{\left(\frac{50c_2 * u_{Vmitra}}{V}\right)^2 + \left(-\frac{50c_2 * V_{mitra} * u_V}{V^2}\right)^2 + \left(\frac{50V_{mitra} * u_{C_2}}{V}\right)^2 + \left(\frac{c_2 * V_{mitra} * u_{Meq}}{V}\right)^2}$$

- Estimación de la incertidumbre asociada a la concentración del analito considerando la repetibilidad (u_R) de la titulación de la muestra con la solución titulante.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

s = Desviación estándar de las repeticiones de la titulación de la muestra

$n = 7$ = Número de repeticiones

e) vi) Estimar la incertidumbre expandida considerando un nivel de confianza del 95% que equivale a un factor de cobertura de “2”.

$$U_{analito} = 2 * u_{c_{analito}}$$

$U_{analito}$ = Incertidumbre expandida del analito

e) vii) Una vez calculada la incertidumbre expandida, calcular la relativa ($U_{relativa}$):

$$U_{relativa} = \frac{U_{analito}}{c_{analito}}$$

e) viii) Con el valor de $U_{relativa}$ obtener la incertidumbre para cada muestra analizada.

$$U_{mtra-anal} = (U_{relativa}) * c_{mtra-anal}$$

$U_{mtra-anal}$ = Incertidumbre de la muestra analizada

$c_{mtra-anal}$ = Concentración de la muestra analizada

3.5- CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE MEDIANTE EL MÉTODO BASADO EN UTILIZAR LA INFORMACIÓN OBTENIDA EN EL PROCESO DE VERIFICACIÓN DE LA TRAZABILIDAD

Esta forma de cálculo de incertidumbre se aplica, con preferencia al conocido Método Eurachem, cuando se trabaja con metodologías analíticas muy complejas. Fue introducido por Maroto, y consiste en aprovechar la información obtenida en la verificación de la trazabilidad de un método analítico.

Puede utilizarse únicamente cuando se ha verificado en forma preliminar el cumplimiento de la trazabilidad del método.

Para obtener la incertidumbre total asociada al resultado analítico, de acuerdo a la ley de propagación de errores, el componente de incertidumbre obtenido a partir de la verificación de la trazabilidad se combina con otros componentes no considerados previamente (muestreo, submuestreo, etapas previas no tenidas en cuenta en la verificación de la trazabilidad, etc.).

En la verificación de la trazabilidad se obtiene información sobre la varianza asociada al método analítico en condiciones intermedias de tiempo, s_1^2 (en el capítulo dedicado a validación se introdujo el concepto de precisión intermedia).

Se debe recordar que s_1^2 se obtiene mediante un análisis de la varianza a través de un diseño anidado:

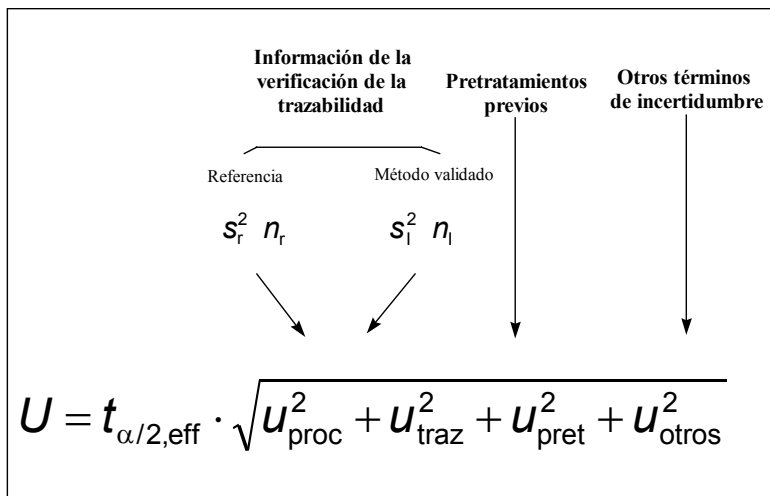
TABLA ANOVA

Varianza	Expresión	Grados de libertad
Repetibilidad (s_r^2)	CMD	p. (n-1)
Entre series (s_{serie}^2)	$\frac{CM_{serie} - CMD}{n}$	
Intermedia (s_I^2)	$s_{serie}^2 + s_r^2$	
Promedios ($s_{\bar{x}}^2$)	$\frac{CM_{serie}}{n}$	p-1

donde p representa la cantidad de series que se han empleado variando todas las condiciones dentro del laboratorio y n representa la cantidad de veces que se repite cada muestra (si son duplicados n=2). Las condiciones intermedias de tiempo, es decir, cambio de analista, instrumento, patrones, ubicación, condiciones de uso y tiempo, garantizan la obtención de una estimación de la incertidumbre asociada a los resultados de las muestras problema que incorpora la variación de estos factores.

Es importante recalcar que en la tarea rutinaria de un laboratorio intervienen muchos factores diferentes y todos ellos deben ser considerados al calcular la incertidumbre para que los resultados de una misma muestra problema obtenidos en diferentes condiciones (por ejemplo en días diferentes y/o por diferentes analistas) puedan ser comparables. Es decir, el resultado obtenido unos días después debe estar contenido dentro del intervalo de valores proporcionado por el resultado del primer análisis realizado y la incertidumbre asociada al método analítico.

Los componentes de incertidumbre asociados a un resultado analítico, que deben ser estimados y posteriormente combinados, se agrupan en cuatro términos. Esto queda ilustrado en la figura siguiente.



Cálculo de la incertidumbre total utilizando la información obtenida en el proceso de verificación de la trazabilidad

Incertidumbre asociada al procedimiento analítico (u_{proc})

Esta incertidumbre se debe a la variación experimental cuando se aplica el procedimiento analítico a muestras rutinarias. Este término está relacionado con la variabilidad de los resultados analíticos debida a los errores aleatorios que se producen en las diferentes etapas del procedimiento analítico. Los errores aleatorios son los únicos que pueden ser considerados para un estudio estadístico.

Si cada una de las muestras rutinarias se pudiese analizar un número elevado de veces, n_s , en condiciones intermedias de tiempo, se podría evaluar este término de incertidumbre como:

$$u_{\text{proc}} = \frac{s_l}{\sqrt{n_s}}$$

Sin embargo, cuando un laboratorio recibe muchas muestras en forma simultánea para determinar varios parámetros, esta tarea es prácticamente imposible de llevar a cabo. Generalmente el

resultado de una muestra rutinaria se obtiene a partir de un único análisis ($n_s=1$) o como mucho a partir de tres análisis ($n_s=3$). En este caso, la varianza en condiciones intermedias del método no puede obtenerse a partir de los resultados de los análisis de dicha muestra, ya que el número de análisis realizados es insuficiente.

Para solucionar este problema, lo que se hace es utilizar la varianza obtenida en condiciones intermedias de tiempo estimada en el proceso de la verificación de la trazabilidad del método. Debe recordarse que un laboratorio debe comenzar a analizar muestras rutinarias luego del proceso de validación correspondiente. Cuando se evalúa el alcance del análisis, es necesario que el mismo sea muy amplio, ya que permite que las muestras a analizar rutinariamente sean similares a las utilizadas en el proceso de verificación de la trazabilidad. Esto significará un esfuerzo mayor cuando se evalúen todas las condiciones del proceso de validación. Además, hay que garantizar que las condiciones de aseguramiento de la calidad se lleven a cabo en el laboratorio de forma efectiva.

Es importante recordar que mediante el uso de diseños experimentales como los diseños anidados (*nested designs*), se puede descomponer s_j^2 en sus componentes de repetibilidad (s_r^2) y entre series (s_{series}^2), por lo que, si una muestra de rutina se analiza por ejemplo dos veces en condiciones de repetibilidad, la información obtenida al efectuar este duplicado puede ser utilizada para disminuir el término correspondiente a la repetibilidad.

Incetidumbre de la verificación de la trazabilidad (u_{traz})

En la verificación de la trazabilidad del método analítico se comprueba si el error sistemático (sesgo, o bias en inglés) del laboratorio y/o del método es estadísticamente significativo. El tipo de sesgo depende de la referencia usada al comprobar la trazabilidad del método (si se utiliza un método de referencia dentro del mismo laboratorio se comprueba únicamente si el sesgo del método es significativo, con un material de referencia se

verificaría conjuntamente si el sesgo del método y del laboratorio son o no significativos).

Si el sesgo no es significativo, el método es trazable a la referencia utilizada pero, sin embargo, hay un componente de incertidumbre debida al propio proceso de verificación de la trazabilidad. El sesgo, δ , se estima a partir de los resultados generados en la verificación de la trazabilidad como:

$$\delta = \bar{x}_R - \bar{x}_r$$

donde \bar{x}_R es la media de los resultados analíticos de la muestra de referencia obtenidos en condiciones intermedias de tiempo y \bar{x}_r es el valor asignado a la muestra de referencia. La incertidumbre asociada al propio proceso de verificación de trazabilidad viene dada por la incertidumbre del sesgo estimado. Esta incertidumbre viene dada por una desviación estándar que llamaremos s_d :

$$u_{\text{traz}} = S_d$$

Esta desviación estándar se estima a partir de la varianza del método en el cuál se ha verificado la trazabilidad, y de la varianza asociada al valor asignado a la muestra de referencia en el certificado provisto.

Como primera medida, habrá que comparar ambas varianzas para determinar si existe diferencia significativa entre ellas (test F).

Si ambas varianzas no son significativamente diferentes, s_d se obtiene a partir de la varianza conjunta:

$$s_d = \sqrt{\left(\frac{(n_l - 1) \cdot s_l^2 + (n_{mm} - 1) \cdot s_{mm}^2}{n_l + n_{mm} - 2} \right) \left(\frac{1}{n_l} + \frac{1}{n_{mm}} \right)}$$

donde s_{rm} es la desviación estándar asociada al valor de referencia y n_{rm} es el número de resultados utilizados para obtener el valor de referencia (este valor figura en el certificado que acompaña al material de referencia). Los grados de libertad asociados a s_d son $(n_1 + n_{rm} - 2)$.

Si las varianzas son significativamente diferentes, s_d se calcula como:

$$s_d = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_{rm}^2}{n_{rm}}}$$

Los grados de libertad se calculan con la aproximación de Satterthwaite.

Incertidumbre asociada a etapas previas (u_{pret})

Este componente es necesario para incluir las fuentes de incertidumbre asociadas al submuestreo o bien a etapas previas (filtrado, pesado, secado, etc.) no consideradas en el proceso de verificación de la trazabilidad.

Esta incertidumbre puede ser estimada a partir de una muestra que tenga las mismas características que las muestras que se analizarán posteriormente. El submuestreo y/o etapas previas tienen que hacerse variando representativamente todos los factores de variabilidad que los pueden afectar (operador, material, tiempo, etc.). Los resultados analíticos de cada muestra submuestreada y/o pretratada se obtienen bajo condiciones de repetibilidad (mismo analista, día, calibrado, etc.). Esto se hace para no sobreestimar la incertidumbre ya que, si las muestras se analizaran bajo condiciones de intermedias de tiempo, la variabilidad de los resultados no correspondería únicamente a la variabilidad experimental de las etapas previas y/o del submuestreo sino que también correspondería a la variabilidad experimental del método. Por tanto, estaríamos incluyendo un componente de incertidumbre que ya ha sido considerado previamente.

La incertidumbre de este término corresponde a la desviación estándar de los resultados analíticos de las muestras submuestreadas y/o pretratadas, s_{pret} .

$$u_{\text{pret}} = s_{\text{pret}}$$

El número de grados de libertad asociados a u_{pret} es $n_{\text{pret}}-1$ (siendo n_{pret} el número de muestras submuestreadas y/o pretratadas). En este término también queda incluida la repetibilidad del método analítico. Como la repetibilidad del método suele ser despreciable frente a las condiciones intermedias de tiempo debida a etapas previas y/o submuestreo, la incertidumbre total apenas se sobreestima. En todo caso, si se dispone de la desviación estándar en condiciones de repetibilidad, ésta se puede sustraer de s_{pret} .

Incertidumbre debida a otras fuentes de variación (u_{otros})

Este último término contiene todos los otros componentes de incertidumbre que no han sido considerados previamente. Muchos de estos componentes están considerados como incertidumbres de "Tipo B". Algunos ejemplos de fuentes de incertidumbre incluidos en este término son debidas a diferencias entre la muestra de referencia utilizada en la verificación de trazabilidad y la muestra futura (o muestra de trabajo).

La estimación de estos términos no es fácil. Suele evaluarse a partir de la experiencia y el conocimiento del analista y también a partir de otro tipo de información (certificados de calibración, resultados de estudios de intercomparación, etc.).

Todos los términos de incertidumbre debidos a fuentes de variación no considerados previamente, se combinan siguiendo la ley de propagación de errores:

$$u_{\text{otros}} = \sqrt{\sum_i s_i^2}$$

donde s_i es la incertidumbre estándar asociada a cada una de las fuentes de variación no consideradas previamente. Como es una varianza combinada, el número de grados de libertad se obtiene a partir de la aproximación de Satterthwaite:

$$v_{\text{otros}} = \frac{(u_{\text{otros}}^2)^2}{\sum_i \frac{(s_i^2)^2}{v_i}}$$

donde v_{otros} son los grados de libertad asociados a u_{otros} y v_i los grados de libertad asociados a cada s_i . Sin embargo, muchas veces no se dispone de información sobre los grados de libertad. En este caso, se utiliza el factor de incertidumbre, k (ya explicado en la aproximación propuesta por la ISO).

Estimación de la incertidumbre total

Una vez que se han evaluado y calculado las varianzas de cada término y sus grados de libertad asociados, la incertidumbre total estándar se calcula combinando estas varianzas.

$$u = \sqrt{u_{\text{proc}}^2 + u_{\text{traz}}^2 + u_{\text{pret}}^2 + u_{\text{otros}}^2}$$

La incertidumbre total expandida se obtiene multiplicando la incertidumbre total estándar por el valor de t efectivo tabulado de dos colas a una probabilidad α y con el número de grados de libertad efectivos, v_{eff} obtenidos a partir de la aproximación de Satterthwaite.

$$U = t_{\alpha/2, \text{eff}} \cdot \sqrt{u_{\text{proc}}^2 + u_{\text{traz}}^2 + u_{\text{pret}}^2 + u_{\text{otros}}^2}$$

La incertidumbre total expandida proporciona un intervalo de confianza en el cual el valor del resultado analítico está incluido con una probabilidad $1-\alpha$. En vez de utilizar el valor de t efectivo, puede usarse el factor de cobertura, k , para obtener la incertidumbre total expandida. No es una mala aproximación siempre y cuando el número de grados de libertad de las varianzas combinadas sea elevado (especialmente el de la varianza que tenga una contribución mayor). De todas formas, es más correcto utilizar el valor de t efectivo.

3.6- EJEMPLO 8: CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA DETERMINACIÓN DE CROMO EN AGUA SUPERFICIAL POR LA TÉCNICA DE ICP-OES UTILIZANDO UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO

Para asegurar la trazabilidad de su método de análisis, el laboratorio X adquirió un material de referencia certificado (NIST 1643d de Estados Unidos), con los siguientes valores asociados:

Valor certificado: 18,43 $\mu\text{g/L}$

Incertidumbre, $U = 0,20 \mu\text{g/L}$

Número de resultados: 15

En primer lugar, para poder aplicar el modelo propuesto, se debe verificar la trazabilidad. Para ello, el laboratorio analizó 15 veces el cromo del CRM en condiciones intermedias (en diferentes días y con diferentes analistas), obteniendo los siguientes resultados (en $\mu\text{g/L}$). Las 15 determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

(16,0 – 16,5) – (17,0 – 17,9) – (18,6 – 19,0) – (18,7 – 19,4) – (17,0 – 17,9) – (20,0 – 21,5) – (17,8 – 18,2) – (17,0 – 18,5) – (19,0 – 19,8) – (21,0 – 20,0) – (17,1 – 17,9) – (18,2 – 18,8) – (17,4 – 17,9) – (18,3 – 18,7) – (18,1 – 19,0)

La primera cuestión a verificar es si los resultados obtenidos por el laboratorio son o no trazables al material de referencia.

Para verificar si el método es trazable debemos corroborar que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración certificada de cromo del material del NIST, \bar{x}_{CRM} , y la concentración media obtenida, \bar{x} , al analizar el CRM en el laboratorio.

En primer lugar, se deberá buscar la desviación estándar asociada a la concentración del CRM. Como el intervalo de confianza es $k \cdot s_{\text{CRM}} / \sqrt{n_{\text{CRM}}} = 0,20$, donde $n_{\text{CRM}}=15$ y asumiendo que $k = 2$, se obtiene $s_{\text{CRM}} = 0,387 \mu\text{g/L}$.

Se debe aplicar el diseño anidado para calcular la repetibilidad y la precisión intermedia (ANOVA). En la planilla de cálculo, se cargan los datos de a pares como se indica en el ejemplo siguiente.

Serie 1	16	16,5
Serie 2	17	17,9
Serie 3	18,6	19
Serie 4	18,7	19,4
Serie 5	17	17,9
Serie 6	20	21,5
Serie 7	17,8	18,2
Serie 8	17	18,5
Serie 9	19	19,8
Serie 10	21	20
Serie 11	17,1	17,9
Serie 12	18,2	18,8
Serie 13	17,4	17,9
Serie 14	18,3	18,7
Serie 15	18,1	19

La planilla Excel tiene en su menú desplegable, el ítem “Herramientas”. Dentro de ese ítem figura entre sus varios submenús el “Análisis de datos” y dentro de él figura "Análisis de varianza de un factor". Después de seleccionada esa opción, se debe marcar un rango de entrada, que corresponde a la matriz numérica con los datos obtenidos en el análisis y que se indica en la figura anterior. En el ejemplo es una matriz de dos columnas y quince filas. Se selecciona el agrupamiento por filas y se acepta la salida de datos en una hoja nueva y con un valor de alfa de 0,05, lo que corresponde a un nivel de confianza del 95 %.

Para los valores del ejemplo, se obtendrán los siguientes resultados:

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	32.5	16.25	0.125	
Fila 2	2	34.9	17.45	0.405	
Fila 3	2	37.6	18.8	0.08	
Fila 4	2	38.1	19.05	0.245	
Fila 5	2	34.9	17.45	0.405	
Fila 6	2	41.5	20.75	1.125	
Fila 7	2	36	18	0.08	
Fila 8	2	35.5	17.75	1.125	
Fila 9	2	38.8	19.4	0.32	
Fila 10	2	41	20.5	0.5	
Fila 11	2	35	17.5	0.32	
Fila 12	2	37	18.5	0.18	
Fila 13	2	35.3	17.65	0.125	
Fila 14	2	37	18.5	0.08	
Fila 15	2	37.1	18.55	0.405	
			18.4066667		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	39.8786667	14	2.84847619	7.74042443	0.00015896	2.42436471
Dentro de los grupos	5.52	15	0.368			
Total	45.3986667	29	2.48047619	1.2402381		1.4242381

Como ya se ha visto en otros ejemplos, figura en la primera columna el origen de las variaciones (entre grupos, dentro de grupos y total), en la segunda columna la suma de cuadrados, en la

tercera columna los grados de libertad respectivos, en la cuarta columna los cuadrados medios o el promedio de los cuadrados, en la quinta columna el valor de F calculado, en la sexta columna el valor de probabilidad del test F y en la séptima el valor crítico para el test F para un nivel de probabilidad del 0,05, o sea 95 % de confianza. Cabe hacer la aclaración que el valor del promedio general (18,407) no es informado como resultado en la planilla de cálculo, y por ello se efectúa la operación con la misma hoja de cálculo, como el promedio de todos los promedios informados.

A continuación conviene realizar, en la misma hoja de cálculo, algunas operaciones que permiten obtener los parámetros estadísticos que se requieren para el cálculo de la incertidumbre, y que fueran detallados en la explicación de la Tabla Anova. A continuación se muestran los mismos y los valores obtenidos con los datos del ejemplo.

CMD	0,368
sr ²	0,368
CMSerie	2,84847619
S ² serie	1,2402381
Si ²	1,6082381
SI	1,26816328
S ² promedio	1,4242381

- El valor de CMD es el cuadrado medio dentro, o sea que tiene un valor de 0,368, tal como figura en la tabla de resultados del análisis de varianza. La varianza de repetibilidad es el valor del cuadrado medio dentro.
- El cuadrado medio de la serie es el cuadrado medio entre, y su valor es 2,8485.
- El valor de varianza entre series (s^2_{serie}) se obtiene, tal como fue definido en la tabla ANOVA, por diferencia entre el cuadrado medio de la serie y el cuadrado medio dentro y dividido por dos, ya que cada serie contiene dos resultados (duplicados). En el ejemplo el valor es 1,2402.

- d) El valor de la varianza intermedia se obtiene por suma de la varianza de repetibilidad y de la varianza entre series, o sea 1,608.
- e) El valor de desvío estándar correspondiente a la precisión intermedia es la raíz cuadrada de la varianza intermedia, o sea 1,2682.
- f) La varianza del promedio es el valor del cuadrado medio de la serie dividido por dos, ya que hay dos resultados por serie.

Para verificar la trazabilidad se debe hacer un estudio de comparación de medias entre el valor del CRM y el valor medio obtenido por el laboratorio.

El valor certificado para el cromo en el CRM es de 18,43 µg/L y el valor medio del laboratorio es de 18,41 µg/L. Se lleva a cabo el test t de significación.

Para aplicar el test t se debe conocer previamente si hay o no diferencia significativa entre las varianzas correspondientes al CRM y al laboratorio.

Se realiza un test F para comparar las varianzas.

$$F = \frac{s_l^2}{s_{CRM}^2} = \frac{1,61}{0,387^2} = 10,74$$

El valor de F calculado se compara con el valor de F de tablas para 14 grados de libertad en el numerador (número de filas menos 1) y 14 grados de libertad en el denominador (número de resultados menos 1). En nuestro ejemplo ese valor de F es 2,42, como figura en la séptima columna de la tabla de Análisis de varianza. Como F calculado es mayor que el F de tablas se debe seguir el procedimiento para ese fin.

Se calcula el valor de S_d de la siguiente manera

$$s_D = \sqrt{\frac{s_I^2}{n_1} + \frac{s_{CRM}^2}{n_2}} = 0,342$$

El valor t se obtiene utilizando el dato del promedio obtenido en el laboratorio (18,41), el valor del certificado del CRM (18,43) y el valor de S_d calculado.

$$t_{calc} = \frac{|\bar{X}_{lab} - \bar{X}_{CRM}|}{s_D} = 0,0585$$

El valor de t debe compararse con el valor de tablas calculando el valor de los grados de libertad con la aproximación de Satterthwaite, ya que se ha demostrado que las varianzas no son comparables.

$$\text{grados de libertad} = \frac{(s_I^2/n_1 + s_{CRM}^2/n_2)^2}{\frac{(s_I^2/n_1)^2}{n_1 - 1} + \frac{(s_{CRM}^2/n_2)^2}{n_2 - 1}} = 16,73$$

Cabe destacar que n_1 y n_2 son respectivamente 15 ya que hay quince series para el cálculo de la precisión intermedia y son quince los resultados correspondientes al CRM. Aproximando al valor entero más cercano, el número de grados de libertad es 17.

El valor de t de tablas es 2,11 para un valor de probabilidad del 0,05. Al comparar el valor t calculado (0,0585) con el t de tablas (2,11) podemos concluir que es trazable el método del laboratorio.

Si $t_{calc} < t_{tabla}$ entonces el método es trazable.

En este momento se puede comenzar con el cálculo de la incertidumbre, ya que se ha comprobado que el método es trazable.

Estimación de incertidumbre del procedimiento analítico

La incertidumbre debida al procedimiento está asociada a la varianza de la serie y a la varianza propia de la repetibilidad. Si cada muestra en el laboratorio se analiza rutinariamente en una única serie y con una única determinación, la ecuación que refleja la incertidumbre del procedimiento analítico es:

$$u_{\text{proced.}} = \sqrt{\frac{s_{\text{serie}}^2}{p_s n_s} + \frac{s_r^2}{n_s}}$$

donde los valores de s_{serie}^2 y de s_r^2 ya han sido calculados para la verificación de la trazabilidad y además como la muestra se analiza en un única serie p_s es 1 y como se hace una única determinación n_s es 1.

Por lo tanto, resulta

$$u_{\text{proced.}} = \sqrt{\frac{s_{\text{serie}}^2}{p_s n_s} + \frac{s_r^2}{n_s}} = s_I = 1,27$$

El valor de 1,27 es el desvío estándar correspondiente a la precisión intermedia que fue considerado y calculado anteriormente.

El número de grados de libertad es el valor obtenido usando la ecuación de Welch-Satterthwaite, aplicable a este tipo de metodologías de cálculo:

$$\text{grados de libertad} = \frac{u_{\text{proced.}}^4}{\frac{(s_{\text{serie}}^2)^2}{p-1} + \frac{(s_r^2)^2}{p \cdot (n-1)}} = 21,75$$

Estimación de incertidumbre debida a la trazabilidad

Debido a que se comprobó que el método es trazable, se puede calcular la incertidumbre debida a la trazabilidad.

$$u_{\text{traz}} = \sqrt{u(x_{\text{CRM}})^2 + \frac{S_I^2}{n}}$$

$$u_{\text{traz}} = \sqrt{0,20^2 + \frac{1,61}{15}} = 0,384$$

donde el número de grados de libertad es el valor obtenido usando la ecuación de Welch-Satterthwaite:

$$\text{grados de libertad} = \frac{u_{\text{traz}}^4}{\frac{(u(\text{CRM})^2)^2}{15-1} + \frac{\left(\frac{S_I^2}{n}\right)^2}{15-1}} = 9,70$$

Estimación de incertidumbre debida a los pasos de preprocesamiento

Esta estimación es necesaria cuando no se han tenido en cuenta las fuentes de incertidumbre derivadas del submuestreo y del preprocesamiento en el proceso de cálculo de la incertidumbre debida a la trazabilidad.

En este caso, esa componente es nula debida a que las muestras son homogéneas y porque además se le hacen los mismos pretratamientos tanto al CRM como a las muestras de rutina.

Si se tuviera que calcular la incertidumbre debida a los pasos de preprocesamiento, se deberían tomar diez submuestras de la misma muestra y analizarlas en condiciones de repetibilidad, lo cual será considerado en el siguiente ejemplo.

Estimación de incertidumbre debida a otras fuentes

La mayoría de estas fuentes deberían estar asociadas a diferencias entre las muestras de rutina y la muestra de ensayo, o al

sesgo del CRM (que se puede estimar trazando el CRM a otros CRM's con mayor nivel de trazabilidad). Aquí se debe tener en cuenta la experiencia y el conocimiento del analista, de las referencias bibliográficas y de cualquier otra fuente de información valedera. En este ejemplo, no se tendrá en cuenta esta contribución.

Estimación de la incertidumbre global

La incertidumbre global se calcula combinando las incertidumbres derivadas del procedimiento analítico, de la verificación de la trazabilidad, de los pasos de preprocesamiento y de otras fuentes, con lo cual, resulta:

$$U = t_{calc, \alpha/2} \sqrt{u_{proced.}^2 + u_{traz}^2 + u_{preproces}^2 + u_{otras\ fuentes}^2} = t_{calc, \alpha/2} \sqrt{1,27^2 + 0,384^2} = t_{calc, \alpha/2} 1,33$$

donde $t_{calc, \alpha/2}$ es el valor de t para un valor de α igual a 0,05 y donde el número de grados de libertad se calcula se calcula como se ha mostrado en casos anteriores:

$$gr.lib. = \frac{u^4}{\sum_{i=1}^n \frac{(u(x_i))^4}{v_i}}$$

$$gr.lib. = \frac{\left(\sqrt{u_{proced.}^2 + u_{traz}^2}\right)^4}{\frac{u_{proced.}^4}{22} + \frac{u_{traz}^4}{10}} = 25,7$$

El valor de t de tablas para un valor de α igual a 0,05 y 26 grados de libertad es igual a 2,06, por lo cual, la incertidumbre global es igual a:

$$U = 2,06 \times 1,33 = 2,73 \mu\text{g} / \text{L}$$

Por lo tanto, el resultado de la medición del laboratorio se expresará como

$$(18,4 \pm 2,7) \mu\text{g/L}$$

3.7- EJEMPLO 9: CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN MUESTRAS CONTAMINADAS DE ARCILLAS POR LA TÉCNICA DE ICP-OES POR COMPARACIÓN CON UN MÉTODO DE REFERENCIA

Se desea emplear un método X que se ha desarrollado para la determinación de plomo en muestras de arcillas contaminadas, y compararlo con un método de referencia J. Para ello, simultáneamente se tratan las mismas muestras por el método X y por el método de referencia J. La diferencia entre X y J radica en el procedimiento de digestión de las muestras y en la determinación propiamente dicha.

A continuación se pueden apreciar los resultados obtenidos por el método J y por el método X, aplicando un diseño anidado.

El laboratorio analizó 12 veces el plomo por el método X en condiciones intermedias (en diferentes días y con diferentes analistas), y por duplicado, obteniendo los siguientes resultados (en $\mu\text{g/L}$).

$$(34,4 - 34,9) - (36,2 - 37,9) - (35,5 - 36,6) - (33,4 - 35,4) - (34,8 - 34,9) - (36,1 - 34,9) - (31,8 - 33,6) - (33,7 - 35,0) - (37,2 - 36,5) - (34,4 - 33,0) - (36,1 - 37,9) - (39,4 - 37,8)$$

También el laboratorio analizó 12 veces el plomo por el método J en condiciones intermedias (en diferentes días y con diferentes analistas), y por duplicado, obteniendo los siguientes resultados (en $\mu\text{g/L}$).

$$(36,4 - 36,9) - (36,2 - 36,9) - (38,5 - 37,0) - (35,4 - 36,4) - (35,8 - 36,4) - (36,1 - 37,4) - (34,8 - 35,6) - (36,7 - 35,9) - (36,2 - 35,8) - (37,4 - 37,0) - (36,1 - 36,9) - (39,4 - 39,0)$$

Lo que primero a verificar es si el método recién desarrollado (X) es trazable o no al método de referencia (J).

Para ver si el método es trazable debemos verificar que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de plomo obtenida por el método J \bar{x}_J , y la concentración obtenida por el método X \bar{x}_X , al analizar las muestras en el laboratorio.

La comprobación entre los valores medios se efectúa mediante un test t .

Se debe aplicar el diseño anidado para calcular la repetibilidad y la precisión intermedia usando ambas metodologías analíticas. Para ello, se aplica un diseño ANOVA. En la planilla de cálculo, se cargan los datos de a pares como se indica a continuación:

	Método X			Método J	
Serie 1	34,4	34,9	Serie 1	36,4	36,9
Serie 2	36,2	37,9	Serie 2	36,2	36,9
Serie 3	35,5	36,6	Serie 3	38,5	37
Serie 4	33,4	35,4	Serie 4	35,4	36,4
Serie 5	34,8	34,9	Serie 5	35,8	36,4
Serie 6	36,1	34,9	Serie 6	36,1	37,4
Serie 7	31,8	33,6	Serie 7	34,8	35,6
Serie 8	33,7	35	Serie 8	36,7	35,9
Serie 9	37,2	36,5	Serie 9	36,2	35,8
Serie 10	34,4	33	Serie 10	37,4	37
Serie 11	36,1	37,9	Serie 11	36,1	36,9
Serie 12	39,4	37,8	Serie 12	39,4	39

La planilla Excel tiene en su menú desplegable, el ítem "Herramientas". Dentro de ese ítem figura entre sus varios submenús el "Análisis de datos" y dentro de él figura "Análisis de varianza de un factor". Después de seleccionada esa opción, se

debe marcar un rango de entrada, que corresponde a la matriz numérica con los datos obtenidos en el análisis y que se indica en la figura anterior. En el ejemplo, será la matriz de dos columnas y quince filas correspondientes al Método X o la matriz de dos columnas y quince filas correspondientes al Método J. Se selecciona el agrupamiento por filas y se acepta la salida de datos en una hoja nueva y con un valor de alfa de 0,05, lo que corresponde a un nivel de confianza del 95 %.

Se obtendrá, luego de aceptar todo lo indicado, la siguiente hoja de cálculo para el Método J:

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	2	73,3	36,65	0,125
Fila 2	2	73,1	36,55	0,245
Fila 3	2	75,5	37,75	1,125
Fila 4	2	71,8	35,9	0,5
Fila 5	2	72,2	36,1	0,18
Fila 6	2	73,5	36,75	0,845
Fila 7	2	70,4	35,2	0,32
Fila 8	2	72,6	36,3	0,32
Fila 9	2	72	36	0,08
Fila 10	2	74,4	37,2	0,08
Fila 11	2	73	36,5	0,32
Fila 12	2	78,4	39,2	0,08
			36,675	

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	23,125	11	2,10227273	5,97802671	0,00226125	2,71732858
Dentro de los grupos	4,22	12	0,35166667			
Total	27.345	23				

La siguiente corresponde a los datos para el Método X:

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	69,3	34,65	0,125
Fila 2	2	74,1	37,05	1,445
Fila 3	2	72,1	36,05	0,605
Fila 4	2	68,8	34,4	2
Fila 5	2	69,7	34,85	0,005
Fila 6	2	71	35,5	0,72
Fila 7	2	65,4	32,7	1,62
Fila 8	2	68,7	34,35	0,845
Fila 9	2	73,7	36,85	0,245
Fila 10	2	67,4	33,7	0,98
Fila 11	2	74	37	1,62
Fila 12	2	77,2	38,6	1,28
			35,475	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	62,275	11	5,66136364	5,91265132	0,00237582	2,71732858
Dentro de los grupos	11,49	12	0,9575			
Total	73,765	23				

Como se ha visto en ejemplos anteriores, en la salida de los datos del análisis de varianza, figura en la primera columna el origen de las variaciones (entre grupos, dentro de grupos y total), en la segunda columna la suma de cuadrados, en la tercera columna los grados de libertad respectivos, en la cuarta columna los cuadrados medios o el promedio de los cuadrados, en la quinta columna el valor de F calculado, en la sexta columna el valor de probabilidad del test F y en la séptima el valor crítico para el test F para un nivel de probabilidad del 0,05, o sea 95 % de confianza. Cabe hacer la aclaración que el valor del promedio general, como ocurría con el ejemplo anterior, no aparece en el cálculo, y por ello se efectúa la operación con la misma hoja de cálculo, luego de obtenida la misma.

A continuación se realizan algunos cálculos que permiten obtener, a partir de dicho conjunto de valores, los parámetros estadísticos que se requieren para el cálculo de la incertidumbre. Primero, se muestran los que corresponden al Método J y luego los que corresponden al Método X. El significado de cada uno de los parámetros es el detallado en el ejemplo 8 presentado anteriormente.

CMD	0,35166667
s^2_r	0,35166667
CMSerie	2,10227273
S^2_{serie}	0,87530303
S^2_i	1,2269697
S_i	1,10768664
$S^2_{promedio}$	1,05113636
CMD	0,9575
s^2_r	0,9575
CMSerie	5,66136364
S^2_{serie}	2,35193182
S^2_i	3,30943182
S_i	1,81918438
$S^2_{promedio}$	2,83068182

Para verificar la trazabilidad se debe hacer un estudio de comparación de medias entre los dos valores medios de ambas metodologías.

El valor medio de concentración de Pb por el método J es de 36,68 $\mu\text{g/g}$ y el valor medio obtenido por el método X es de 35,48 $\mu\text{g/g}$. Se lleva a cabo el test t de significación, para lo cual se debe conocer previamente si hay o no diferencia significativa entre las varianzas correspondientes a ambas metodologías.

Se realiza un test F para comparar las varianzas.

$$F = \frac{s^2_{I(\bar{X})}}{s^2_{I(J)}} = \frac{3,31}{1,23} = 2,69$$

El valor de F calculado se compara con el valor de F de tablas para 11 grados de libertad en el numerador y 11 grados de libertad en el denominador. En nuestro ejemplo ese valor de $F_{\text{teórico}}$ es 2,72 (la planilla de cálculo ya informa ese valor).

Como F calculado es menor que el F de tablas, debe seguirse el procedimiento de cálculo para la comparación de medias que corresponde:

Se calcula el valor de S_d de la siguiente manera

$$s_D = \sqrt{\left[\frac{(\rho_X - 1) \cdot s_{I(X)}^2 + (\rho_J - 1) \cdot s_{I(J)}^2}{\rho_X + \rho_J - 2} \right] \left[\frac{1}{\rho_A} + \frac{1}{\rho_J} \right]} = 0,615$$

donde ρ_X igual a 12 y ρ_J también igual a 12.

El valor t se obtiene de la siguiente manera

$$t_{\text{calc}} = \frac{\left| \bar{X}_{\text{Método X}} - \bar{X}_{\text{Método J}} \right|}{s_D} = 1,95$$

El valor de t debe compararse con el valor de tablas para un número de grados de libertad igual a 22. El valor de t de tablas es 2,07. Si $t_{\text{calc}} < t_{\text{tabla}}$ entonces el método es trazable.

Al comparar el valor t calculado (1,95) con el t de tablas (2,07) podemos concluir que el método X desarrollado en el laboratorio es trazable al método de referencia J.

Obtenida la información sobre la trazabilidad del nuevo método propuesto, se puede comenzar con el cálculo de la incertidumbre, ya que se ha comprobado que el método es trazable. La forma de cálculo, y los componentes de la incertidumbre, han sido detallados en el ejemplo 8.

Estimación de incertidumbre del procedimiento analítico

La incertidumbre debida al procedimiento está asociada a la varianza de la serie y a la varianza propia de la repetibilidad.

Si cada muestra en el laboratorio se analiza rutinariamente en una única serie y con una única determinación, la ecuación que refleja la incertidumbre del procedimiento analítico es:

$$u_{\text{proced.}} = \sqrt{\frac{s_{\text{serie}}^2}{p_s n_s} + \frac{s_r^2}{n_s}}$$

donde los valores de s_{serie}^2 y de s_r^2 ya han sido calculados para la verificación de la trazabilidad del método X; como la muestra se analiza en un única serie p_s es 1 y como se hace una única determinación n_s es 1.

Por lo tanto, resulta

$$u_{\text{proced.}} = \sqrt{\frac{s_{\text{serie}}^2}{p_s n_s} + \frac{s_r^2}{n_s}} = s_I = 1,82$$

El número de grados de libertad se calcula teniendo en cuenta que p es el número de series (12) y n es el número de veces que se repitió cada serie (2). Aproximando, el valor obtenido es 19.

$$\text{grados de libertad} = \frac{u_{\text{proced.}}^4}{\frac{(s_{\text{serie}}^2)^2}{p-1} + \frac{(s_r^2)^2}{p \cdot (n-1)}} = 18,91$$

Estimación de incertidumbre debida a la trazabilidad

Debido a que se comprobó que el método X es trazable, se puede calcular la incertidumbre debida a la trazabilidad. La incertidumbre estándar se puede estimar con el valor de s_D ya calculado (0,615 $\mu\text{g/g}$) con 22 grados de libertad.

Estimación de incertidumbre debida a los pasos de preprocesamiento

Esta estimación es necesaria cuando no se han tenido en cuenta las fuentes de incertidumbre derivadas del submuestreo y del preprocesamiento en el proceso de cálculo de la incertidumbre debida a la trazabilidad.

En este caso, esa componente se calcula tomando diez porciones de una de las muestras de arcilla contaminadas, analizándolas en condiciones de repetibilidad.

Supongamos que los valores obtenidos fueron los siguientes:

34,1 – 37,9 – 34,8 – 38,2 – 34,8 – 34,0 – 37,0 – 35,0 – 38,5 – 35,1

Si se calculan los parámetros estadísticos para esta serie de 10 datos, la varianza resulta igual a 3,11. Como la varianza de repetibilidad resultó igual a 0,957, según los cálculos anteriores, la varianza de pretratamiento y muestreo es igual a la diferencia entre 3,11 y 0,957, o sea 2,15. La incertidumbre estándar correspondiente (raíz cuadrada de la varianza) es igual a 1,47 $\mu\text{g/g}$, con 9 grados de libertad.

Estimación de incertidumbre debida a otras fuentes

Como se comentó en el ejemplo 8, esta estimación debería tener en cuenta todas las fuentes de incertidumbre no consideradas en los apartados anteriores.

La mayoría de estas fuentes deberían estar asociadas a diferencias entre las muestras de rutina y la muestra de ensayo, o al sesgo del CRM (que se puede estimar trazando el CRM a otros CRM's con mayor nivel de trazabilidad). Aquí, se debe tener en cuenta la experiencia y el conocimiento del analista, las referencias bibliográficas y cualquier otra fuente de información valedera.

Supongamos que en nuestro ejemplo, el método J se trazó a un CRM que tenía similares propiedades que las muestras.

El CRM se analizó por el método J, aplicando un diseño experimental similar al anterior, obteniéndose un promedio de 35,24 $\mu\text{g/g}$ con una varianza intermedia de 1,55 $\mu\text{g/g}$. El valor certificado del CRM, como resultado del análisis de 10 laboratorios fue de 35,99 $\mu\text{g/g}$ con una varianza de 1,99 $\mu\text{g/g}$.

La incertidumbre estándar se calcula de la siguiente manera:

$$u_{\text{otros términos}} = \sqrt{\sum_i s_i^2} = \sqrt{1,55 + \frac{1,99}{10}} = 1,32$$

El número de grados de libertad se calcula como sigue:

$$\text{grados de libertad} = \frac{u_{\text{otros términos}}^4}{\frac{(s_i^2)^2}{22} + \frac{\left(\frac{s_{\text{CRM}}^2}{10}\right)^2}{9}} = 26,7$$

Estimación de la incertidumbre global

La incertidumbre global se calcula combinando las incertidumbres derivadas del procedimiento analítico, de la verificación de la trazabilidad, de los pasos de preprocesamiento y de otras fuentes, con lo cual, resulta:

$$U = t_{\text{calc}, \alpha/2} \sqrt{u_{\text{proced.}}^2 + u_{\text{traz.}}^2 + u_{\text{preproces.}}^2 + u_{\text{otras fuentes}}^2}$$

$$U = t_{\text{calc}, \alpha/2} \sqrt{1,82^2 + 0,615^2 + 1,47^2 + 1,32^2} = t_{\text{calc}, \alpha/2} \cdot 2,76$$

donde $t_{calc, \alpha/2}$ es el valor de t para un valor de α igual a 0,05 y el número de grados de libertad calculado adecuadamente:

$$gr.lib. = \frac{u^4}{\sum_{i=1}^n \frac{(u(x_i))^4}{v_i}}$$

Este número de grados de libertad resulta en nuestro caso:

$$grados\ lib. = \frac{\left(\sqrt{u_{proced.}^2 + u_{traz}^2 + u_{pretr.}^2 + u_{otros\ tér\ min\ os}^2} \right)^4}{\frac{u_{proced.}^4}{19} + \frac{u_{traz}^4}{22} + \frac{u_{pretr.}^4}{9} + \frac{u_{otros\ tér\ min\ os}^4}{27}} = 47,4$$

El valor de t de tablas para un valor de α igual a 0,05 y 47 grados de libertad es igual a 1,96, por lo cual, la incertidumbre global es igual a:

$$U = 1,96 \times 2,76 = 5,41 \mu\text{g} / \text{g}$$

Por lo tanto, el resultado de la medición del laboratorio se expresará como

$$(35,5 \pm 5,4) \mu\text{g}/\text{g}$$

Este valor informa entonces el valor más probable y la incertidumbre del resultado, y presupone que con un 95% de confianza, el valor verdadero se encuentra en ese intervalo.

Como comentario final, es importante retomar el tema de la realidad de un laboratorio. Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo y el anterior hacen referencia a la realización de muchos replicados del análisis de una muestra. Esto es lo que debe hacerse en el proceso de validación, y la herramienta para el cálculo de la incertidumbre.

Sin embargo, las muestras rutinarias, como ya se ha comentado, se analizan una única vez en la mayoría de los casos. Los resultados que hemos obtenido en este ejemplo, servirán para informar la incertidumbre de muestras de similar matriz y de similar concentración. Por ejemplo, si se analiza una muestra de arcilla para determinar plomo y el valor de una única determinación es 39,14 $\mu\text{g/g}$, el laboratorio puede informar ese resultado como $(39,1 \pm 5,9) \mu\text{g/g}$, basándose en la proporcionalidad entre la incertidumbre y el valor de la concentración.

Es por ello que al hacer la estimación de los valores de incertidumbre, se debe trabajar a por lo menos 5 niveles de concentración diferentes, intentando abarcar todo el ámbito de trabajo del método, desde el límite de cuantificación hasta el límite superior.

4.- BIBLIOGRAFÍA Y FUENTES DE INFORMACIÓN

- A Manual Analytical Quality Control for the Water Industry, NS30, Water Research Centre, UK 1998.
- AOAC Peer-verified Methods Program/AOAC Internat. 1998.
- Cálculo de la Incertidumbre en los resultados analíticos. X. Rius. Cuaderno Tecnológico N°1. Segemar. 2007.
- CEPIS/OPS, 1996. Manual de Control de Calidad
- CEPIS. Preparación de procedimientos normalizados de operación. Lima; CEPIS; 2002.
- CEPIS/OPS, 2004. Procedimiento Normalizado de Operación para determinación de cloruros por el método de nitrato mercuríco.
- Codex Alimt. Commission on Methods of Analysis and Sampling (CX/MAS 95/3; 1995). Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes.
- EA-2/09. EA Policy on the Accreditation of Providers of Proficiency Testing Schemes, 2000.
- EA-01/12. History of EA Interlaboratory Comparisons (ILC) in Calibration and Testing, 2001.
- EA-2/10. EA Policy for Participation in National and International Proficiency Testing Activities, 2001.

- EAL INTERLABORATORY COMPARISONS, EAL-P7 1996.
- EURACHEM Guide - Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories, 1999.
- EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, 2a. Ed. 2000.
- General principles of validation, US Food and Administration. May 1987.
- Guía metas 2001-10, Coeficientes de expansión del agua, México.
- Guía Técnica sobre Trazabilidad e Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que emplean la Técnica de Titulación Volumétrica/mayo 2004, Revisión 00, EMA-CENAM
- Green, J.M. A Practical guide to analytical method Validation. Analytical Chemistry News & Features, 1/5/96. pp 305 A – 309 A.
- Guidelines for Collaborative Study - Procedures to Validate Characteristics of a Method of analysis, AOAC International, revised May 1994, originally published J. Assoc. Off. Anal.Chem. 72, 694-704 (1989).
- Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes, ILAC-G13:2000.
- Guidelines for submitting samples and analytical data for method validation, US Food and Drug administration, 1987.

- Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. IUPAC, Techn. Report. Pure Appl. Chem. Vol 74, No. 5, p 835-855, 2002.
- Harmonized Protocols for the Adoption of Standardized Analytical Methods and for the presentation of their Performance Characteristics, (IUPAC), Pure & Appl. Chem., 1990, 62(1), pp. 149-162.
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the registration of Pharmaceuticals for Human use. Validation of analytical procedures: Methodology ICH-Q2B, Geneva, 1996.
- ISO 3534-1:1993. "Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: Probability and general statistical terms". Statistics, terminology.
- ISO 8402:1994. Quality - Vocabulary.
- ISO-17025.2005
- Maroto, A., Riu, J., Boqué, R., Rius, F. Estimating uncertainties of analytical results using informations from the validation process. Anal. Chim. Acta, 1999, 391, 173-185.
- Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., Rius, F., Evaluating uncertainty in routine analysis. Trends Anal. Chem., 1999, 18, 577-584.
- NMKL Procedure 4 (1996) Validation of Chem. Anal. Methods (Vers. 1).
- Pocklington, W.D., "Guidelines for the development of standard methods by collaborative trial", LGC, 5th Edition, 1990. ISBN 0 948926 03 1.

- Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, (IUPAC), Pure & Appl. Chem., 1995, 67(2), pp. 331-343.A
- Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM/CITAC Guide, Second edition, 2000.
- Satterthwaite, F.E., Psychometrika, 1941, 6, 309-316.
- Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. 21 th Ed. 2005.
- STM E 1060 - 85: Standard Practice for Interlaboratory Testing of Spectrochemical Methods of Analysis.
- The fitness for purpose of analytical methods. EURACHEM; 1998.
- Validation of analytical methods for food control. Report of Joint FAO/IAEA. Expert Consultation, December 1997, FAO Food and Nutrition Paper No. 68, FAO, Rome (1998).
- Vessman J. Selectivity or Especificity? Validation of Analytical methods from the perspective of an analytical chemist in pharmaceutical industry. J. Pharm & Biomed Analysis, 14(1996) p. 867-869.

*Se terminó de imprimir en el mes
de Marzo del 2009 en la editorial
CCC Educando. Av. Warnes 2361/5
Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina*



ISBN 978-987-96413-8-5



9 789879 641385