



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería Química

**VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE UTILIZANDO EL SPECTROQUANT NOVA 60, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA SECCIÓN DE QUÍMICA INDUSTRIAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERÍA, DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA, USAC**

**Eliett Alvina Areas Blandon**

Asesorado por el Ing. César Alfonso García Guerra

Coasesorado por la Licda. Ingrid Lorena Benítez Pacheco

Guatemala, noviembre de 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE UTILIZANDO EL SPECTROQUANT NOVA 60, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA SECCIÓN DE QUÍMICA INDUSTRIAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERÍA, DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA, USAC**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
POR

**ELIETT ALVINA AREAS BLANDON**

ASESORADO POR EL ING. CÉSAR ALFONSO GARCÍA GUERRA  
COASESORADO POR LA LICDA. INGRID LORENA BENITEZ PACHECO

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

**INGENIERA QUÍMICA**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



**NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA**

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| DECANO     | Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos     |
| VOCAL I    | Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno |
| VOCAL II   | Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco  |
| VOCAL III  | Inga. Elvia Miriam Ruballos Samayoa |
| VOCAL IV   | Br. Walter Rafael Véliz Muñoz       |
| VOCAL V    | Br. Sergio Alejandro Donis Soto     |
| SECRETARIO | Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez     |

**TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO**

|            |   |
|------------|---|
| DECANO     | Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos           |
| EXAMINADOR | Ing. José Manuel Tay Oroxom               |
| EXAMINADOR | Ing. Adolfo Narciso Gramajo Antonio       |
| EXAMINADOR | Ing. Federico Guillermo Salazar Rodríguez |
| SECRETARIO | Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez           |

## **HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE UTILIZANDO EL SPECTROQUANT NOVA 60, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA SECCIÓN DE QUÍMICA INDUSTRIAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERÍA, DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA, USAC**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha agosto de 2013.



**Eliett Alvina Areas Blandon**



Guatemala, 09 de septiembre de 2013

Ingeniero  
Víctor Manuel Monzón  
Director Escuela de Ingeniería Química  
Su Despacho

Estimado Ingeniero Monzón,

Por este medio me dirijo a usted, para informarle que he aprobado el Informe Final de Trabajo de Graduación titulado: **“Verificación de los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible utilizando el spectroquant Nova 60, realizado en el Laboratorio de Análisis Físicoquímico de la sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería, de la Facultad de Ingeniería, USAC”**, elaborado por la estudiante de la carrera de Ingeniería Química, **Eliett Alvina Areas Blandon**, identificada con número de carné **2006-80003**.

Considero adecuado el tema desarrollado por el valor académico que representa y por la metodología planteada por la estudiante universitaria, por lo que muestro mi aprobación para continuar como su asesor de tesis.

Sin otro particular, quedo de usted, atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Ing. César Alfonso García Guerra  
Colegiado 145

ASESOR *César Alfonso García Guerra*  
INGENIERO QUÍMICO  
COLEGIADO No. 145

Cc: Archivo personal.

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
ACREDITADO POR  
Agencia Centroamericana de Acreditación de  
Programas de Arquitectura y de Ingeniería  
Período 2013 - 2015





Guatemala, 08 de octubre de 2013  
 Ref. EI.Q.TG-IF.065.2013

Ingeniero  
**Víctor Manuel Monzón Valdez**  
 DIRECTOR  
 Escuela Ingeniería Química  
 Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Monzón:

Como consta en el Acta TG-047-2012-IF le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

**INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN**

Solicitado por la estudiante universitaria: **Eliett Alvina Areas Blandon.**

Identificada con número de carné: **2006-80003.**

Previo a optar al título de **INGENIERA QUÍMICA.**

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

**VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE UTILIZANDO EL SPECTROQUANT NOVA 60, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA SECCIÓN DE QUÍMICA INDUSTRIAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERÍA, DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA, USAC**

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por el Ingeniero Químico: **César Alfonso García Guerra.**

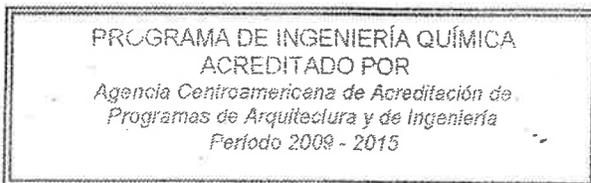
Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

*Adela M. Marroquín González*  
 Inga. Adela María Marroquín González  
 COORDINADORA DE TERNA  
 Tribunal de Revisión  
 Trabajo de Graduación



C.c.: archivo

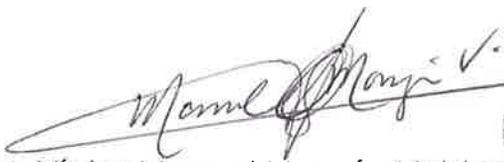


**ACAAI**

Agencia Centroamericana de Acreditación de Programas de Arquitectura y de Ingeniería



El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **ELIETT ALVINA AREAS BLANDON** titulado: "**VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE UTILIZANDO EL SPECTROQUANT NOVA 60, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DE LA SECCIÓN DE QUÍMICA INDUSTRIAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERÍA, DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA, USAC**". Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

  
Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez  
DIRECTOR  
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, octubre 2013

Cc: Archivo  
VMMV/ale



El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE UTILIZANDO EL SPECTROQUANT NOVA 60, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA SECCIÓN DE QUÍMICA INDUSTRIAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERÍA, DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA, USAC**, presentado por la estudiante universitaria: **Eliett Alvina Areas Blandon**, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Ing. Murphy Olympos Palacios  
Decano



Guatemala, noviembre de 2013

/cc

## **ACTO QUE DEDICO A:**

- Dios** Por darme la vida, amor, por permitirme alcanzar mis metas y darme fortaleza en momentos difíciles.
- Virgen María** Por darme su amor, consuelo y cuidar de mí siempre, especialmente en los momentos que mi mamá no pudo estar conmigo.
- Mi mamá** Pastora Blandon. Por su amor, por ser mi fuente de inspiración, por ser una mujer luchadora y por estar siempre pendiente de mí a pesar de la distancia.
- Mi papá** Roger Areas. Por enseñarme lo valioso que es tener a la familia unida y luchar.
- Mis hermanos** Judith y Roni Areas Blandon. Por su amor, admiración y por tantos momentos que hemos compartido juntos.
- Mi novio** Marcelo Chacón. Por su amor, cuidarme y darme su apoyo. Por recorrer este camino juntos y compartir alegrías, estrés, sueños y metas. Y además por prestarme a sus papás.

## **AGRADECIMIENTOS A:**

### **Mis padres**

Por confiar en mí, por la ayuda que me brindaron en la carrera. Por quererme, aconsejarme y tolerar mis momentos de estrés estos años.

### **Mis hermanos**

Por compartir tantos momentos de alegría, tristeza y por darme tanto amor a pesar de la distancia.

### **Mi novio**

Marcelo Chacón. Por hacer buen grupo durante toda la carrera, por todos los momentos buenos y malos que hemos vivido juntos, por su amor, porque además de ser mi novio es mi mejor amigo y mi confidente.

### **Mis suegros**

Eluvia de Chacón y Jesús Chacón. Por su apoyo incondicional, cariño, por esa tarea difícil de ser como padres para mí y tratarme como una hija, por compartir buenos y malos momentos conmigo. Dios los bendiga siempre.

### **Mi sobrino**

Erick Samuel Mayorga. Por ser una bendición, alegría y motivo de unión en mi familia.

**Mis tíos**

Carlos Blandon, Alejandro Blandon, Teresa Blandon, Blanca Areas y Berta Areas. Por su amor y por sus oraciones.

**Mis primos**

Por esos momentos de alegría y apoyo que han dado.

**Familia López**

Por sus oraciones, cariño y por hacerme sentir que tengo otra familia en Guatemala.

**Mis amigos**

Carolina Corzo, Héctor Méndez, Jorge Doradea, Sofía Corado, Brenda Barrios, Jaime Catalán, Iván Pérez, Dimitri Díaz, Claudia Aguilar, Oscar Córdova, Iris López, por su apoyo, por compartir tantos momentos durante la carrera. Sin ustedes este camino hubiese sido más difícil de recorrer.

**Ing. César García**

Por brindarme su colaboración, sus conocimientos, por su enseñanza y apoyo.

**Licda. Ingrid Benitez**

Por su colaboración, enseñanza, ayuda y por enseñarme a ser perseverante para alcanzar una meta. Por su cariño y hacerme sentir parte de un buen grupo de trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

|   |       |
|---|-------|
| ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....                                | V     |
| LISTA DE SÍMBOLOS .....                                     | IX    |
| GLOSARIO .....  | XI    |
| RESUMEN.....  | XV    |
| OBJETIVOS.....  | XVII  |
| Hipótesis.....  | XVIII |
| INTRODUCCIÓN .....  | XIX   |
| <br>  |       |
| 1.    ANTECEDENTES .....                                    | 1     |
| <br>  |       |
| 2.    MARCO TEÓRICO.....                                    | 5     |
| 2.1.    Validación de Métodos .....                         | 5     |
| 2.1.1.    Cuándo se debe validar un método .....            | 5     |
| 2.1.2.    Estrategias para la validación de un método ..... | 6     |
| 2.2.    Verificación de métodos .....                       | 6     |
| 2.2.1.    Parámetros de desempeño.....                      | 7     |
| 2.2.1.1.    Exactitud.....                                  | 7     |
| 2.2.1.2.    Precisión.....                                  | 8     |
| 2.2.1.3.    Especificidad .....                             | 9     |
| 2.2.1.4.    Límite de detección.....                        | 9     |
| 2.2.1.5.    Límite de cuantificación .....                  | 10    |
| 2.2.1.6.    Linealidad .....                                | 11    |
| 2.2.1.5.    Robustez .....                                  | 11    |
| 2.3.    Espectrofotometría .....                            | 12    |
| 2.3.1.    Métodos espectro analíticos .....                 | 12    |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 2.4.      | Métodos colorimétricos .....   | 13 |
| 2.4.1.    | Fotometría .....   | 13 |
| 2.5.      | Radiaciones electromagnéticas .....  | 13 |
| 2.6.      | Espectrofotometría visible .....   | 14 |
| 2.6.1.    | La región visible .....  | 14 |
| 2.7.      | Transmitancia y absorbancia .....  | 15 |
| 2.8.      | Ley de Lambert-Beer.....   | 16 |
| 2.9.      | Ley de Bouguer-Lambert-Beer.....   | 18 |
| 2.10.     | Instrumentación para la medición de absorbancias de la luz visible y ultravioleta: espectrofotómetro visible ..... | 20 |
| 2.11.     | Error fotométrico .....  | 21 |
| 2.12.     | Política de selección y validación de métodos de ensayo.....   | 25 |
| 2.12.1.   | Selección de los métodos de ensayo .....   | 26 |
| 2.12.1.1. | Métodos normalizados .....   | 27 |
| 2.12.1.2. | Métodos no normalizados .....  | 27 |
| 2.12.2.   | Métodos desarrollados por el laboratorio .....   | 28 |
| 3.        | DISEÑO METODOLÓGICO.....   | 29 |
| 3.1.      | Variables .....  | 29 |
| 3.2.      | Delimitación del campo de estudio .....  | 29 |
| 3.3.      | Recursos humanos disponibles .....   | 30 |
| 3.4.      | Recursos materiales disponibles .....  | 30 |
| 3.4.1.    | Equipo .....   | 30 |
| 3.4.2.    | Cristalería .....  | 31 |
| 3.4.3.    | Reactivos .....  | 32 |
| 3.5.      | Técnica cuantitativa.....  | 32 |
| 3.6.      | Recolección de la información .....  | 33 |
| 3.6.1.    | Preparación de muestras .....  | 33 |
| 3.6.2.    | Digestión con ácidos .....   | 35 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.6.3. | Procedimiento fotométrico .....                   | 38 |
| 3.7.   | Tabulación y ordenamiento de la información ..... | 41 |
| 3.7.1. | Programas a utilizar para análisis de datos ..... | 45 |
| 3.8.   | Análisis estadístico .....                        | 45 |
| 4.     | RESULTADOS .....                                  | 49 |
| 4.1.   | Precisión por repetibilidad. ....                 | 49 |
| 4.2.   | Precisión por reproducibilidad. ....              | 50 |
| 4.3.   | Exactitud del método .....                        | 50 |
| 4.4.   | Robustez variando masa .....                      | 51 |
| 4.5.   | Robustez variando tipo de digestión ácida .....   | 52 |
| 4.6.   | Especificidad .....                               | 52 |
| 4.7.   | Límites de cuantificación. ....                   | 55 |
| 5.     | INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....                 | 57 |
|        | CONCLUSIONES .....                                | 63 |
|        | RECOMENDACIONES .....                             | 65 |
|        | BIBLIOGRAFÍA.....                                 | 67 |
|        | APÉNDICES .....                                   | 69 |
|        | ANEXOS .....                                      | 95 |



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### FIGURAS

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1.  | Espectro electromagnético.....  | 15 |
| 2.  | Diagrama de la absorción de un haz que atraviesa un recipiente de tamaño $l$ con cierta solución.....   | 20 |
| 3.  | Espectrofotómetro Spectroquant Nova 60 .....  | 21 |
| 4.  | Relación entre absorbancia y transmitancia.....   | 23 |
| 5.  | Representación de las variaciones en el error relativo debido a la relación aritmética entre absorbancia y transmitancia .....  | 24 |
| 6.  | Error relativo en las concentraciones para un error constante en $T$ de 1/2 por ciento con intervalo óptimo para determinar las concentraciones, mediante medidas de transmitancia, se encuentra entre 20 por ciento y 60 por ciento de $T$ ..... | 25 |
| 7.  | Caliza molida.....  | 33 |
| 8.  | Secado muestra en horno .....   | 34 |
| 9.  | Crisol con muestra seca.....  | 34 |
| 10. | Calcinación .....   | 35 |
| 11. | Agregado de ácido en la digestión .....   | 36 |
| 12. | Calentamiento en la digestión .....   | 36 |
| 13. | Digestión con agua regia .....  | 37 |
| 14. | Filtración .....  | 38 |
| 15. | Corrección de pH .....  | 39 |
| 16. | Muestra a analizar.....   | 39 |
| 17. | Reactivos para análisis espectrofotométrico .....   | 40 |
| 18. | Medición de muestras .....  | 40 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 19. | Muestra precipitada al agregar hierro ..... | 60 |
|-----|---|----|

## TABLAS

|       |  |    |
|-------|--|----|
| I.    | Variables para verificación de método espectrofotométrico para determinar calcio .....   | 29 |
| II.   | Repetibilidad del método .....   | 41 |
| III.  | Exactitud del método. ....   | 42 |
| IV.   | Reproducibilidad del método .....  | 42 |
| V.    | Robustez variando digestión .....  | 43 |
| VI.   | Robustez variando masa. ....   | 44 |
| VII.  | Especificidad del método .....   | 44 |
| VIII. | Análisis de la varianza de la precisión por repetibilidad del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible.....                                 | 45 |
| IX.   | Análisis de la varianza de la precisión por reproducibilidad del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible.....                              | 46 |
| X.    | Análisis de la varianza especificidad del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible al agregar aluminio magnesio y hierro a la muestra ..... | 46 |
| XI.   | Análisis de la varianza de la robustez del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible variando el tipo de digestión ácida .....               | 47 |
| XII.  | Repetibilidad: media, desviación estándar y coeficiente de variación .....   | 49 |
| XIII. | Reproducibilidad: : media, desviación estándar y coeficiente de variación .....  | 50 |
| XIV.  | Porcentaje de error del método .....   | 51 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| XV.    | Robustez con ataque ácido constante: media, desviación estándar y coeficiente de variación .....        | 51 |
| XVI.   | Robustez con masa constante: media, desviación estándar y coeficiente de variación.....                 | 52 |
| XVII.  | Lecturas fotométricas en presencia de aluminio con concentración máxima de 500 mg/L en el analito ..... | 53 |
| XVIII. | Lecturas fotométricas en presencia de magnesio con concentración máxima de 500 mg/L en el analito ..... | 54 |
| XIX.   | Lecturas fotométricas en presencia de hierro con concentración máxima de 1 mg/L en el analito .....     | 55 |
| XX.    | Límites de cuantificación.....  | 55 |



## LISTA DE SÍMBOLOS

| <b>Símbolo</b> | <b>Significado</b>  |
|----------------|---------------------|
| <b>A</b>       | Absorbancia         |
| <b>B</b>       | Blanco              |
| <b>cm</b>      | Centímetro          |
| <b>C</b>       | Concentración       |
| <b>S</b>       | Desviación estándar |
| <b>°C</b>      | Grados Celsius      |
| <b>g</b>       | Gramo               |
| <b>L</b>       | Litro               |
| <b>μL</b>      | Microlitro          |
| <b>mg</b>      | Miligramo           |
| <b>mL</b>      | Mililitro           |
| <b>mm</b>      | Milímetro           |
| <b>nm</b>      | Nanómetro           |
| <b>ppm</b>     | Partes por millón   |
| <b>%</b>       | Porcentaje          |
| $\bar{X}$      | Promedio            |
| <b>T</b>       | Temperatura         |
| <b>V</b>       | Volumen             |



## GLOSARIO

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>Ácido</b>      | Compuesto químico que, cuando se disuelve en agua, produce una solución con una actividad de catión hidronio mayor que el agua pura, esto es, un pH menor que 7.  |
| <b>Agua regia</b> | Solución altamente corrosiva y fumante, de color amarillo, formada por la mezcla de ácido nítrico concentrado y ácido clorhídrico concentrado.  |
| <b>Analito</b>    | Especie química cuya presencia o concentración se desea conocer.  |
| <b>Caliza</b>     | Roca sedimentaria compuesta mayoritariamente por carbonato de calcio, generalmente calcita. También puede contener pequeñas cantidades de minerales como arcilla, hematita, siderita, cuarzo, que modifican el color y el grado de coherencia de la roca. |
| <b>COGUANOR</b>   | Comisión Guatemalteca de Normas.  |
| <b>CV</b>         | Coeficiente de Variación.   |
| <b>Dilución</b>   | Reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución.   |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Disolución acuosa</b>        | Disolvente mayoritario en la disolución es agua.   |
| <b>EDTA</b>                     | Ácido etilendiaminotetraacético.   |
| <b>Especificidad</b>            | Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación. |
| <b>Exactitud</b>                | Describe si un resultado experimental es correcto expresado como la cercanía de la medición a un valor verdadero o aceptado.   |
| <b>IAAC</b>                     | Cooperación Interamericana de Acreditación.  |
| <b>ILAC</b>                     | Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios.   |
| <b>ISE</b>                      | Método de Electrodo de Ión Selectivo.  |
| <b>Límite de cuantificación</b> | Indica el valor a partir del cual es posible hacer una afirmación cuantitativa del resultado de una medición, con una determinada incertidumbre.                       |
| <b>LAFIQ</b>                    | Laboratorio de Análisis Físicoquímicos.  |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Medición</b>         | Proceso básico de la ciencia que consiste en comparar un patrón seleccionado con el objeto o fenómeno cuya magnitud física se desea medir para ver cuántas veces el patrón está contenido en esa magnitud. |
| <b>Muestra</b>          | Parte representativa del objeto que ha sido tomada en el espacio y tiempo. La muestra contiene las alícuotas de interés.   |
| <b>OGA</b>              | Oficina Guatemalteca de Acreditación.  |
| <b>pH</b>               | Medida de acidez o alcalinidad de una disolución.  |
| <b>Precisión</b>        | Comparación estadística de las dispersiones entre series de datos obtenidos.   |
| <b>Repetibilidad</b>    | Concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo analito en las mismas condiciones.   |
| <b>Reproducibilidad</b> | Concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo analito haciendo variar las condiciones de la medición.  |
| <b>Robustez</b>         | Capacidad de un método analítico de no ser afectado por pequeños cambios deliberados de parámetros operativos.   |

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>Solución</b>        | Mezcla en la cual una o más sustancias están mezcladas o disueltas en forma homogénea en otra sustancia.   |
| <b>Solución patrón</b> | Disolución de una sustancia utilizada como referencia al momento de hacer una valoración o estandarización, que tiene composición conocida y elevada pureza. |
| <b>USAC</b>            | Universidad de San Carlos de Guatemala.  |

## RESUMEN

Derivado de la necesidad de disponer de un método de análisis verificado confiable para la determinación calcio por espectrofotometría visible, se desarrolló y verificó un método analítico para evaluar los parámetros de desempeño.

Con esta finalidad se desarrolló el método fotométrico visible para la determinación de calcio, debido que cumple con las características necesarias para ser utilizado como un método verificado. Este satisface los requerimientos de la verificación para este tipo de metodología de análisis.

Los parámetros de desempeño que se evaluaron en el método fotométrico para la determinación de calcio fueron precisión, exactitud, robustez, especificidad y límite de cuantificación, los cuales se obtuvieron por medio del análisis de una muestra de caliza, la cual se calcinó y se le realizó digestión con ácido o con agua regia para poder obtener una muestra en estado acuoso para posteriormente hacer diluciones y realizar las lecturas en el fotómetro Spectroquant Nova 60 por medio de un método colorimétrico.

El método fotométrico se utilizó debido a que satisface los requerimientos de verificación para este tipo de metodología de análisis. El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de varianza Anova, determinando por medio de diferencias significativas según la probabilidad obtenida.



## **OBJETIVOS**

### **General**

Verificar los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible utilizando el equipo Spectroquant Nova 60, realizado en el Laboratorio de Análisis Físicoquímico (LAFIQ) de la Sección de Química Industrial, del Centro de Investigaciones, Facultad de Ingeniería, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### **Específicos**

1. Determinar la precisión del método mediante la cuantificación de los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad de los analistas del Laboratorio de Análisis Físicoquímico (LAFIQ).
2. Determinar la exactitud del método mediante la obtención del porcentaje de error utilizando valores de referencia estándar.
3. Evaluar la robustez del método mediante la variación de la masa inicial de muestra y del tipo de digestión ácida en la preparación del analito.
4. Evaluar la especificidad del método en muestras que incluyen magnesio, aluminio y hierro.
5. Comprobar los límites de cuantificación del método a través de la medición de patrones estándar.

6. Evaluar si existe diferencia significativa entre los valores obtenidos experimentalmente mediante el análisis de varianza Anova.

## **Hipótesis**

- **Hipótesis científica**

Es posible verificar los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible utilizando el equipo Spectroquant Nova 60, realizado en el Laboratorio de Análisis Fisicoquímico (LAFIQ) de la Sección de Química Industrial, del Centro de Investigaciones, Facultad de Ingeniería, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

- **Hipótesis estadística**

### **Hipótesis alternativa (Hi):**

En la determinación de calcio por espectrofotometría (Spectroquant Nova 60) existe diferencia significativa entre los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible.

### **Hipótesis nula (Ho):**

En la determinación de calcio por espectrofotometría (Spectroquant Nova 60) no existe diferencia significativa entre los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible.

## INTRODUCCIÓN

En los laboratorios es una práctica frecuente realizar control de calidad, actualmente los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados confiables y adecuados para su finalidad o propósito, es por ello que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos resultados proporcionan. La validación y verificación de metodologías, entre otras actividades que se realizan en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados confiables.

Verificar un método analítico consiste en la evaluación del desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación. El laboratorio debe realizar la verificación de los métodos y evidenciar si cumplen con los parámetros de desempeño en las condiciones del laboratorio. Es importante que el laboratorio evalúe los diferentes métodos y seleccione aquel que mejor se adecue a las necesidades y recursos.

A partir de esto se propuso la verificación de los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible realizado en el Laboratorio de Análisis Físicoquímico (LAFIQ) de la Sección de Química Industrial, del Centro de Investigaciones, Facultad de Ingeniería, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Además es necesario que el laboratorio verifique los parámetros de desempeño como precisión, exactitud, robustez y límites de cuantificación, ya que de esta forma se obtienen resultados comparables.

## 1. ANTECEDENTES

Por medio del Acuerdo Gubernativo Número 145-2002, publicado el 6 de mayo del 2002 en el Diario Oficial, se crea la Oficina Guatemalteca de Acreditación Encargada de la Evaluación, Control e Idoneidad de los Organismos de Evaluación de la Conformidad (OGA).

El estado legal de la OGA fue modificado a través del Decreto Número 78-2005, Ley del Sistema Nacional de la Calidad; en el cual se establece que la OGA es un componente del Sistema Nacional de Calidad del Ministerio de Economía.

La OGA es signataria de:

- Acuerdo de Reconocimiento Multilateral de la Cooperación Interamericana de Acreditación (IAAC) para laboratorios de calibración, laboratorios de ensayo, incluyendo los laboratorios que realizan análisis clínicos.
- Acuerdo Mutuo de Reconocimiento de la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC), para laboratorios de calibración, laboratorios de ensayo, incluyendo los laboratorios que realizan análisis clínicos.

Son sujetos de acreditación:

- Los laboratorios de ensayo y de calibración

- Los laboratorios de ensayo clínico
- Los organismos de certificación
- Los organismos de inspección

A través del Acuerdo Gubernativo Número 314-2003, se establecen las tarifas de la Oficina Guatemalteca de Acreditación. La OGA, derivado de su función, ha establecido relaciones con diferentes organismos e instituciones del sistema nacional de la calidad, ministerios de estado, entes de cooperación, organismos acreditados y otros, para lo cual ha realizado un análisis de su relación con éstos, tomando en consideración la importancia de la imparcialidad e independencia que se requiere en su gestión; para ello, se ha definido procedimientos y disposiciones que regulan y aseguran la objetividad del proceso de acreditación.

En noviembre de 2010 se realizó el proyecto: Cuantificación de flúor en enjuagues bucales fluorados a través del Método de Electrodo de Ión Selectivo (ISE), elaborado por la licenciada Doren Sucely Amézquita Maldonado.

El proyecto fue realizado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, el cual tuvo como objetivo general cuantificar el flúor en enjuagues bucales fluorados a través del Método de Electrodo de Ión Selectivo (ISE) y de manera específica comprobar que los enjuagues bucales analizados cumplieran con la cantidad de flúor declarada en la etiqueta del producto, y establecer si contenían la concentración de flúor recomendada por la Asociación Dental Americana. Para lo cual se hizo uso de varias marcas de enjuagues bucales.

En el análisis realizado verificó el desempeño del método analítico, evaluando la exactitud, precisión, linealidad del sistema, rango analítico y especificidad del mismo, y tomaron como referencia el documento de OGA-

GEC 016-2007, Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo, emitido por la Organización de Acreditación de Guatemala (OGA), para lo cual se obtuvo resultados satisfactorios.

En 1987 se generan normas que son herramientas de apoyo en el desarrollo de sistemas de aseguramiento y gestión de la calidad y que son las Normas ISO 9000. En 1982 la Guía ISO 25 para el caso de los laboratorios, actualmente sustituida por la Norma ISO/ IEC 17025: requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

La Norma ISO vigente en los países de la región para acreditar laboratorios es la ISO/ IEC 17025/1999 *General requirements for competence of calibration and testing laboratories*. Esta norma se ha elaborado por consenso internacional, opera bajo un sistema de calidad, evalúa la competencia técnica del laboratorio, los laboratorios acreditados tienen la capacidad de generar resultados válidos y hay un reconocimiento mutuo con otros laboratorios del mundo.

En mayo del 2005 ISO publicó la versión 2005, dicha versión está siendo revisada por los organismos normativos de la región para ser homologada y adecuar las acreditaciones a la nueva versión de la norma. El cambio más importante es el requisito explícito referente al mejoramiento continuo del sistema de gestión y a la comunicación con el cliente. Ahora la norma indica en forma explícita que esta norma no es para efectuar certificación.

En Ingeniería Química se realizó la validación de un ensayo en la Facultad de Ingeniería asegurando la calidad del procedimiento, este proyecto se realizó en el 2010 con el título: Diagnóstico de la aplicación de un Sistema de Gestión de Calidad a través de la Norma ISO/IEC 17025:2005 en el Laboratorio de

Fisicoquímica y validación del ensayo: determinación de la constante de disociación ácida del Rojo de Metilo. Elaborado por el ingeniero Luis Rodolfo Castro García.

El proyecto fue realizado en el Laboratorio de Fisicoquímica de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el cual se comprometió a mantener un sistema de gestión de calidad y competencia técnica al realizar el ensayo: Determinación de la constante de disociación ácida del rojo de metilo, sobre la base de la Norma ISO/IEC 17025:2005, para dicho ensayo fue necesario que tanto catedráticos, auxiliares y estudiantes conozcan, implementen, se comprometan a cumplirla y a mejorar el desempeño continuamente dentro de las actividades que se realizan para aplicar y adquirir conocimientos en el laboratorio.

Entre los factores se encuentran: los factores humanos, las instalaciones y las condiciones ambientales; los métodos de ensayo y la validación de los métodos; los equipos; la trazabilidad de las mediciones; el muestreo; el manejo de los objetos a ensayar. El laboratorio enfatiza los factores anteriores para poder desarrollar los métodos y procedimientos para dicho ensayo.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Validación de métodos**

La validación de un método, es el proceso de demostración experimental y documentada de que un método analítico realiza lo que se espera de él. Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación son exactitud, precisión, especificidad, robustez, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo.

#### **2.1.1. Cuándo se debe validar un método**

Un método se valida cuando se necesita verificar que sus parámetros de aptitud son adecuados para usar para un problema analítico particular. Como por ejemplo:

- Cuando se desarrolla un método nuevo.
- Cuando se revisa un método ya establecido para mejorar o extender a un nuevo problema.
- Cuando el control de calidad indica que el método en uso está cambiando con el tiempo.
- Cuando se usa un método ya establecido en un laboratorio diferente o con diferente analista o con diferente instrumental.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos.

### **2.1.2. Estrategias para la validación de un método**

La validez de un método específico, debe demostrarse con experimentos de laboratorio utilizando muestras o patrones que sean similares a las muestras desconocidas analizadas rutinariamente. Los posibles pasos para una validación completa del método de ensayo se mencionan a continuación:

- Desarrollar un procedimiento de validación.
- Definir la aplicación, propósito y alcance del método.
- Definir los parámetros de desempeño y criterios de aceptación.
- Definir los experimentos de validación.
- Verificar las características pertinentes de los equipos.
- Cuantificar materiales; por ejemplo patrones y reactivos.
- Ajustar los parámetros del método y criterios de aceptación, si es necesario.
- Realizar completamente los experimentos internos y externos de validación.
- Desarrollar un procedimiento normalizado o no normalizado de operación para ejecutar el método rutinariamente.
- Definir tipo y la frecuencia de las pruebas apropiadas del sistema y las comprobaciones del control de la calidad para la rutina.
- Documentar los experimentos de validación y los resultados en un informe de validación.

### **2.2. Verificación de métodos**

La verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación. Además indica el proceso que

se lleva a cabo el laboratorio con el fin de demostrar su capacidad para ejecutar correctamente un método.

La verificación se puede realizar mediante análisis, pruebas o una combinación de ambos. La verificación puede incluir la revisión del diseño del procedimiento.

### **2.2.1. Parámetros de desempeño**

Los parámetros de desempeño, son los criterios cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico. Son, por lo tanto los criterios que se utilizan en la validación de los métodos analíticos (para demostrar su validez en la resolución de un problema analítico). Los parámetros de desempeño son la materialización o expresión numérica de características o indicadores de calidad de los métodos tales como la precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad. A continuación se definen parámetros de desempeño importantes.

#### **2.2.1.1. Exactitud**

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método, y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo.

Para poder realizar un cálculo de la exactitud del método a validar es necesario disponer de un valor de referencia. Mediante las pruebas realizadas se comparan los valores y se determina si entre el valor medio de los mismos y el valor de referencia no existen diferencias que se consideren inaceptables. Si estas diferencias existieran, se redefinirá el procedimiento (por ejemplo,

incluyendo la realización de correcciones) de manera que los resultados obtenidos con el replanteamiento sean coherentes.

#### **2.2.1.2. Precisión**

Se podrá determinar la precisión de un método de ensayo mediante la comparación estadística de las dispersiones entre series de datos obtenidos en el mismo laboratorio con el método a validar.

Las series de datos pueden provenir de análisis de duplicados, análisis múltiples o adiciones conocidas.

Las condiciones en las que se realicen los ensayos deben quedar claramente establecidas, indicando si son condiciones de repetibilidad o reproducibilidad, y en qué varían durante los ensayos. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo.

La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

Este parámetro deberá evaluarse en el rango de trabajo definido en el método de ensayo.

### **2.2.1.3. Especificidad**

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios.

En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Las pruebas a realizar para asegurar la selectividad o especificidad del método podrán ser diferentes en función del tipo de muestra a analizar, la técnica utilizada, la información bibliográfica disponible. Entre las pruebas más utilizadas se encuentran las siguientes:

Método de adiciones, comparando los resultados (o la respuesta) de la muestra que contiene las posibles interferencias con el resultado de otra muestra sin dichas interferencias.

Comparación de los resultados obtenidos por un método con los resultados obtenidos por otro método (método de confirmación).

### **2.2.1.4. Límite de detección**

El límite de detección, es una característica de las pruebas de límite. Es la concentración más baja de un determinado analito que puede ser detectada en forma concluyente por un método dado.

Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente. Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales.

#### **2.2.1.5. Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación indica el valor a partir del cual es posible hacer una afirmación cuantitativa del resultado de una medición, con una determinada incertidumbre. Es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra. Es la misma cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Para métodos no instrumentales, el límite cuantitativo se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

#### **2.2.1.6. Linealidad**

Es la habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si aparece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos).

#### **2.2.1.7. Robustez**

Es la medida de la capacidad para no ser afectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método.

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir bajo qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de estos resultados confiables.

Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas.

Entre las condiciones analíticas que podrían afectar a un método se encuentran:

- Analistas
- Equipos
- Reactivos
- pH
- Temperatura
- Tiempo de reacción
- Estabilidad de la muestra
- Otros

### **2.3. Espectrofotometría**

La espectrofotometría se refiere a los métodos cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como métodos espectrofotométricos y según sea la radiación utilizada como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta, infrarroja.

#### **2.3.1. Métodos espectro analíticos**

Un método analítico, depende del sistema químico observado y de la calidad de los instrumentos utilizados para observarlo.

La cantidad de ruido presente en un sistema químico y/o instrumental determina la concentración de analito más pequeña que puede medirse con exactitud, y también fija la precisión de la medida a concentraciones más grandes.

## **2.4. Métodos colorimétricos**

Se aplican a la determinación de metales, no metales y compuestos orgánicos en el análisis cuantitativo, representan de forma más simple el análisis absorciométrico.

### **2.4.1. Fotometría**

Dentro de los métodos colorimétricos, un gran número de determinaciones que se realizan habitualmente en el laboratorio, utiliza medidas de energía radiante, ya sea emitida, absorbida o reflejada. Estas medidas se determinan a través de técnicas fotométricas. Las técnicas fotométricas tienen su fundamento en las interacciones de las radiaciones electromagnéticas sobre la materia.

## **2.5. Radiaciones electromagnéticas**

Pueden considerarse como un conjunto de corpúsculos, llamados fotones, los cuales llevan asociada una onda. La energía de radiación está relacionada con la longitud de onda. Las longitudes de onda más cortas poseen mayor energía que las longitudes de onda más largas. De tal manera un espectro electromagnético constituido por las radiaciones electromagnéticas, mismo que se ha dividido en varias regiones, de acuerdo con la longitud de onda ( $\lambda$ ) y la energía.

- Rayos X (1-100 nanómetros).
- Ultravioleta (100-390 nanómetros).
- Visible (390-700 nanómetros).
- Infrarrojo (700-100 000 nanómetros).
- Microondas (100 000- 1 000 000 nanómetros).

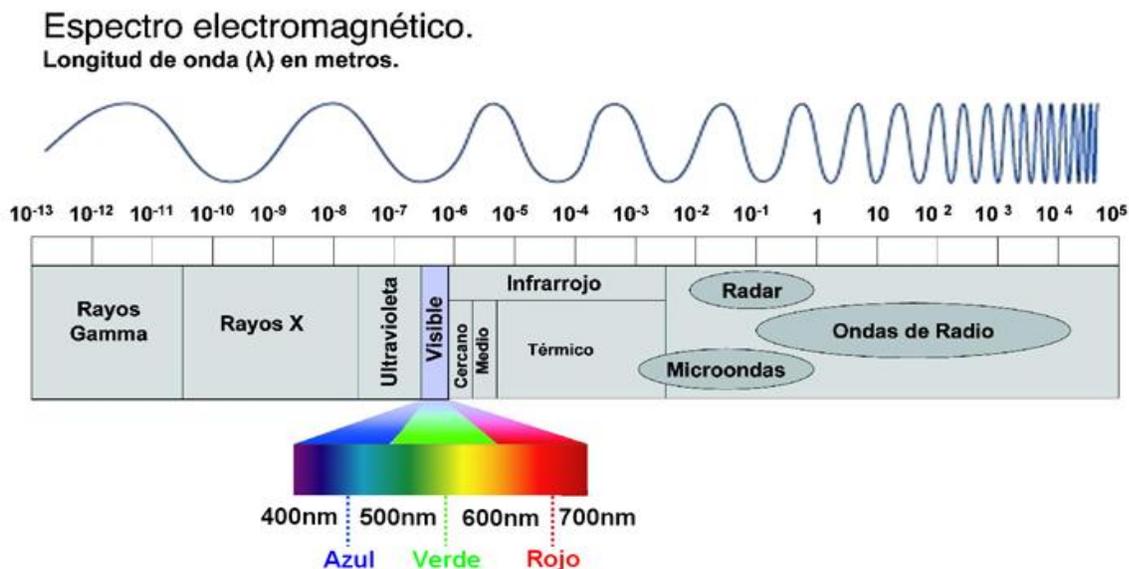
## **2.6. Espectrofotometría visible**

La fotometría visible es un método óptico de análisis que mide la cantidad de luz absorbida por una sustancia coloreada. Como cualquier otro método espectroscópico, se basa en la medida de la intensidad y la longitud de onda de la radiación electromagnética que ha atravesado la materia o que ésta emite.

### **2.6.1. La región visible**

La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio. En la región visible, se aprecia el color de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nanómetros.

Figura 1. Espectro electromagnético



Fuente: <http://zavalasss.blogspot.com/p/ondas-electromagneticas-y-espectro.html>.

Consulta: 20 de junio de 2012.

## 2.7. Transmitancia y absorbancia

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad  $I_0$  incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente ( $I_a$ ) y dejará pasar el resto ( $I_t$ ), de forma que se cumple:  $I_0 = I_a + I_t$ .

La transmitancia ( $T$ ) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra,  $I_t$ , y la cantidad de luz que incidió sobre ella,  $I_0$ , y se representa normalmente en tanto por ciento:  $\% T = \frac{I_t}{I_0} \times 100$ .

La transmitancia da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre el porcentaje de transmitancia (T) y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de 1/T, en consecuencia:  $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t / I_o$ . Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ( $I_o = I_t$ ), la transmitancia es del 100 por ciento e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale  $\log 1 = 0$ . La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste.

## 2.8. Ley de Lambert-Beer

La relación entre la absorción de luz por una solución diluida y la concentración de la fase absorbente, viene dada por la ley de Beer, y la relación entre la absorción de la luz y el camino recorrido por esta viene, dada por la ley de Lambert. Considerando ambas leyes conjuntamente expresan la relación entre absorbancia de luz de longitud de onda fija y la concentración en una solución:

$$\text{Ecuación 1} \quad A = \epsilon Cl$$

Donde:

A= absorbancia

$\epsilon$ = coeficiente de extinción (característico de cada sustancia)

$l$  = largo del paso de la cubeta

$C$  = concentración

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará; y por último, depende de  $\epsilon$ , una constante de proporcionalidad -denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromóforo. Como  $A$  es adimensional, las dimensiones de  $\epsilon$  dependen de las de  $c$  y  $l$ .

La segunda magnitud ( $l$ ) se expresa siempre en cm mientras que la primera ( $c$ ) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_M$ ). Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de molaridad (mol/litro), por ejemplo  $g \cdot L^{-1}$ , las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser distintas, por ejemplo  $g^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$ , y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico ( $\epsilon_s$ ).

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de  $c$  altos,  $\epsilon$  varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio.

## 2.9. Ley de Bouguer-Lambert-Beer

La ley Bouguer-Lambert-Beer también se conoce como ley de Beer-Lambert-Bouguer y fue descubierta de formas diferentes e independientes en primer lugar por el matemático y astrónomo francés Pierre Bouguer en 1729, luego por el filósofo y matemático alemán, Johann Heinrich Lambert en 1760 y por último el físico y matemático también alemán, August Beer en 1852.

Esta ley se trata de un medio o método matemático, el cual es utilizado para expresar de qué modo la materia absorbe la luz. En óptica la ley de Beer afirma que la totalidad de luz que emana de una muestra puede disminuir debido a tres fenómenos de la física, que serían los siguientes:

- El número de materiales de absorción en su trayectoria, lo cual se denomina concentración.
- Las distancias que la luz debe atravesar a través de la muestra. Se denomina a este fenómeno, distancia del trayecto óptico.
- Las probabilidades que hay de que el fotón de esa amplitud particular de onda pueda absorberse por el material. Esto es la absorbancia o también coeficiente de extinción.

La relación anterior puede ser expresada de la siguiente manera:

$$\text{Ecuación 2} \quad A = -\epsilon cd$$

Donde:

A = absorbancia

$\epsilon$  = coeficiente molar de extinción

d = recorrido (en cm)

c = concentración molar

A medida que la luz atraviesa un medio que la absorbe, la cantidad de luz absorbida en cualquier volumen corresponde a la intensidad de luz que incide, luego se multiplica por el coeficiente de la absorción. Frecuentemente la intensidad de un haz de luz incidente declina significativamente a medida que pasa a través del medio absorbente. Cuando esta relación se expresa como Ley de Ley de Bouguer-Lambert-Beer, se tiene que:

$$\text{Ecuación 3} \quad T = 10^{-\epsilon cd} \quad \text{o} \quad T = 10^{-A}$$

Donde:

T = transmitancia

$\epsilon$  = coeficiente molar de extinción

c = concentración molar del absorbente

d = recorrido en centímetros

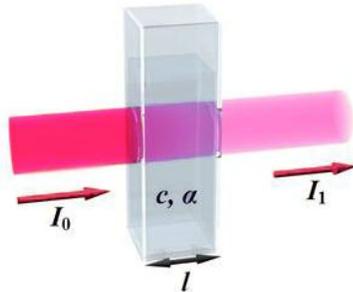
La transmitancia se puede expresar como la intensidad de la radiación incidente,  $I_0$ . Esto puede dividirse a la luz que emerge de la muestra, I. Se refiere a la relación  $I/I_0$  como transmitancia o como T.

La transmitancia se puede trazar con relación a la concentración, pero esta relación no sería lineal. Aunque el logaritmo negativo en base 10 de la transmitancia sí es lineal con la concentración. De esta forma, la absorción es medida como:

$$\text{Ecuación 4} \quad A = -\log_{10}(I/I_0) \quad \text{o} \quad A = -\log_{10}(T)$$

A continuación se puede observar un diagrama de la absorción de un haz que atraviesa un recipiente de tamaño l.

Figura 2. **Diagrama de la absorción de un haz que atraviesa un recipiente tamaño  $l$  con cierta solución**



Fuente: [http:// ley-de-bouguer-lamber-beer.html](http://ley-de-bouguer-lamber-beer.html). Consulta: 10 de agosto de 2012.

## 2.10. Instrumentación para la medición de absorbancias de la luz visible

La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros. Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura, de:

- Una fuente de energía radiante: lámpara de tungsteno.
- Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
- Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente.
- Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
- Un registrador o sistema de lectura de datos.

- Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida.

Hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de doble haz (con dos celdillas para dos cubetas). Se mide primero la absorbancia del disolvente (conocido como blanco) y al que se le asigna el valor de cero mediante el ajuste del mando, de forma que la intensidad incidente y transmitida sean iguales ( $I_0 = I_t$ ), y por tanto la absorbancia es cero.

Figura 3. **Espectrofotómetro Spectroquant Nova 60**



Fuente: <http://www.selectscience.net/products/spectroquant-nova-60-photometer/?prodID=7986>.

Consulta: 15 de enero de 2013.

### **2.11. Error fotométrico**

El error aleatorio asociado con la medida de la intensidad de la luz se denomina error fotométrico, y la precisión de una medida depende de este

error. Sin embargo, por la relación logarítmica entre T y A, la precisión en la medida de la concentración difiere según el intervalo de absorbancia medible.

Recordar que la transmitancia  $P/P_0$  es la magnitud directamente medida. Sin embargo, normalmente, en los análisis se utiliza la absorbancia ya que su valor es directamente proporcional a la concentración de las especies que absorben la luz. Para ver los cambios en la precisión, se supone que el error relativo en la medida de T es  $\pm 0,5$  por ciento para todos los valores de T entre 0 y 1. Esto es un error relativo de 0,0005 para T. Tal como se muestra en la figura 4, el error relativo en A disminuye de forma continua de mayores a menores valores de A.

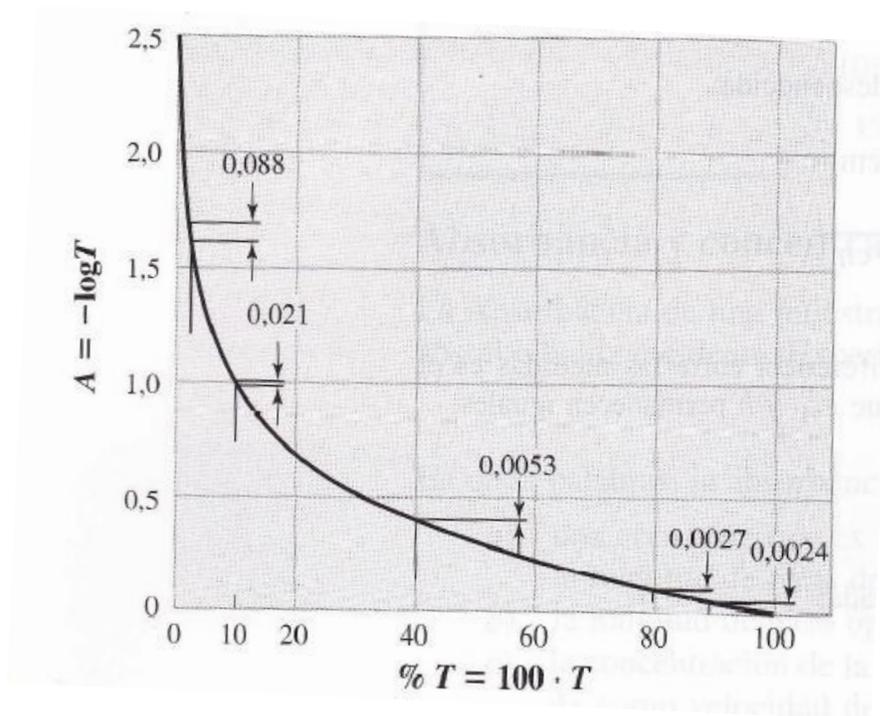
A continuación, se va a ver el error relativo en la absorbancia; es la medida de la precisión analítica. En las figuras 5 y 6, se observa que a bajas concentraciones, 90 por ciento T ( $A = 0,045$ ), y las concentraciones relativamente altas, <2 por ciento T ( $A > 1,70$ ), el error relativo es mayor a 5 por ciento. Claramente, en estas condiciones la medida es menos precisa que en otros intervalos. El intervalo en el que el error relativo para los resultados es más pequeño se encuentra en valores de absorbancia entre 0,4-0,7 ó 20-60 por ciento T.

En otras palabras, para alcanzar la mayoría de precisión en un experimento de absorción, la concentración de la muestra a la longitud del paso óptico a través de la muestra debería ajustar, si es posible, a aquella en la absorbancia a la salida del instrumento esté en el intervalo de 0,4-0,7.

Se llega a esta conclusión teniendo en cuenta únicamente la relación entre la absorbancia y la transmitancia, y teniendo fijo el error aleatorio de la transmitancia. En efecto, el error en T no es constante a lo largo de todo el

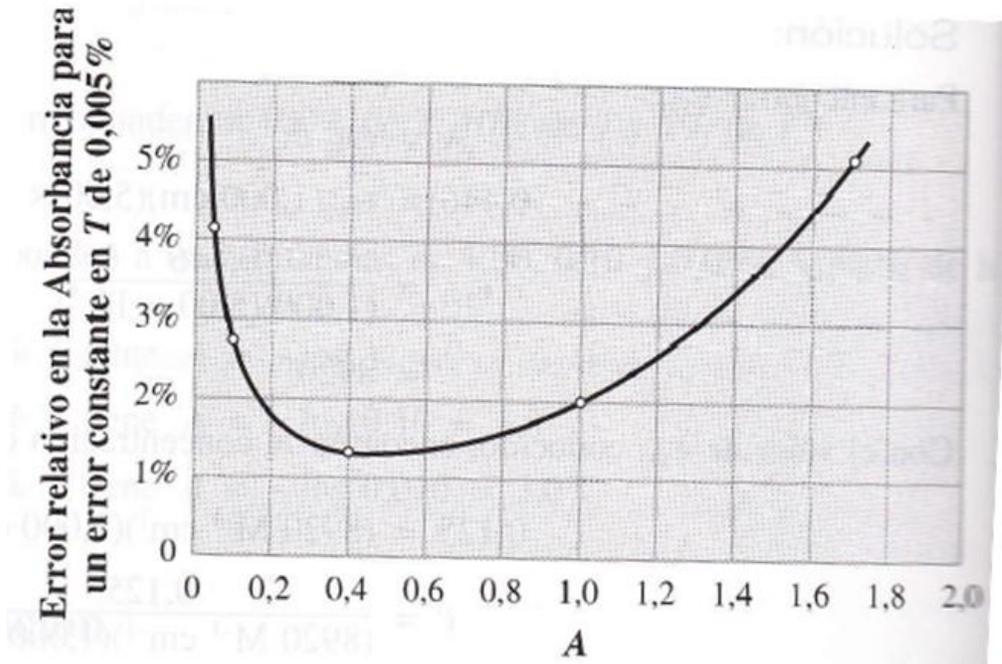
intervalo, y cada instrumento tiene sus propias características. Sin embargo, se puede aplicar la descripción general que se ha hecho y se debería considerar cuando se vaya a llevar a cabo un análisis.

Figura 4. **Relación entre absorbancia y transmitancia**



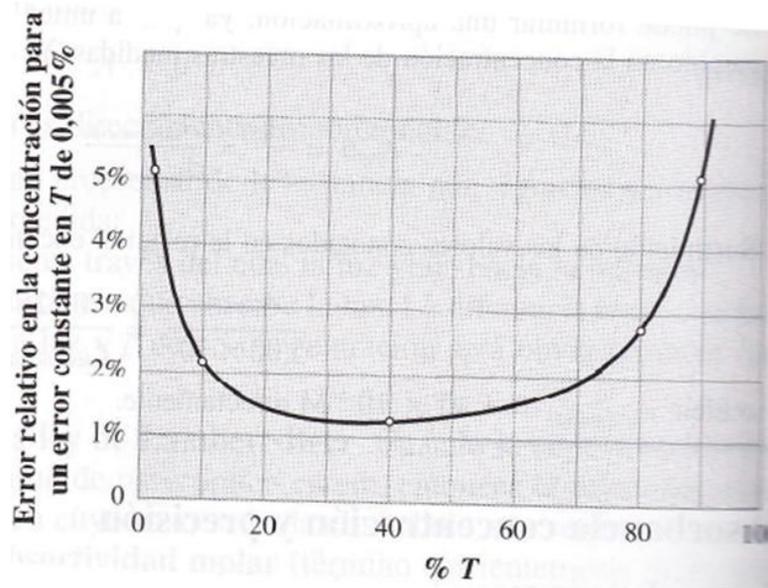
Fuente: RUBINSON, Kenneth. Análisis Instrumental. p.304.

Figura 5. Representación de las variaciones en el error relativo debido a la relación aritmética entre absorbancia y transmitancia



Fuente: RUBINSON, Kenneth. Análisis Instrumental. p.304.

Figura 6. **Error relativo en las concentraciones para un error constante en T de 1/2 por ciento con intervalo óptimo para determinar las concentraciones, mediante medidas de transmitancia, se encuentra entre 20 por ciento y 60 por ciento de T**



Fuente: RUBINSON, Kenneth. Análisis Instrumental. p.304.

## 2.12. Política de selección y validación de métodos de ensayo

Es común que para la determinación de cierto analito en un tipo específico de muestra haya varios métodos analíticos disponibles, de orígenes muy variados. Existen muchas entidades nacionales e internacionales que publican métodos para los diferentes campos analíticos (físicos, químicos y biológicos) y sus aplicaciones. El laboratorio usuario de la metodología debe evaluar los diferentes métodos disponibles y seleccionar aquel que mejor se adecue a las necesidades y los recursos del caso.

El método seleccionado debe haber sido validado como parte de su desarrollo. Además, como parte de la implementación del método, el laboratorio usuario debe verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación. La verificación del método, unida a la cualificación del equipo involucrado, permite evaluar el desempeño del sistema completo y, por ende, su adecuación al propósito del análisis, demostrando así el laboratorio usuario que domina el método y lo usa correctamente.

### **2.12.1. Selección de los métodos de ensayo**

Es responsabilidad del laboratorio utilizar los métodos apropiados para el propósito, según el alcance requerido. Estos métodos pueden ser normalizados, no normalizados o desarrollados por el propio laboratorio.

- El laboratorio, de común acuerdo con el cliente, puede seleccionar los métodos utilizando su propio criterio o utilizar aquellos métodos normalizados vigentes en el país.
- Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe demostrar que éste corresponde a la última edición, a menos que sea apropiado o posible el uso de una versión anterior del método.
- Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe establecer un sistema para evaluar la factibilidad de implementar los posibles cambios introducidos en las nuevas versiones del método, determinando las diferencias en cuanto a equipo, formación del personal, instalaciones, y demás aspectos necesarios para la ejecución del ensayo.

### **2.12.1.1. Métodos normalizados**

Las normas de calidad y regulaciones frecuentemente requieren el uso de métodos normalizados. A la vez, el uso de métodos normalizados es deseable en situaciones en las que el método será ampliamente utilizado; sin embargo, algunas veces el laboratorio puede contar con un método propio más adecuado para el propósito. Los métodos normalizados deben ser utilizados por el laboratorio exactamente como están descritos.

### **2.12.1.2. Métodos no normalizados**

Los métodos no normalizados deben estar apropiadamente validados para poder utilizarlos, ya sean éstos desarrollados por un tercero o resultado de la modificación de un método normalizado. En el caso de modificaciones, es necesario demostrar que éstas no tienen una repercusión sobre la calidad de los resultados.

La nota del numeral 5.4.4 de la Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025, adoptada por la OGA como un criterio de acreditación para laboratorios de ensayo y calibración, establece que el laboratorio debe desarrollar un procedimiento de ensayo que incluya al menos la siguiente información, previo a la utilización de un nuevo método:

- La identificación apropiada.
- El alcance.
- La descripción del tipo de objeto a ensayar o a calibrar.
- Los parámetros o magnitudes a ser determinados y los rangos correspondientes.
- Los aparatos y equipos, incluyendo los requisitos de desempeño técnico

- Los patrones de referencia y materiales de referencia requeridos.
- Las condiciones ambientales requeridas y cualquier período de estabilización necesario.
- La descripción del procedimiento, incluyendo:
  - La colocación de marcas de identificación, manejo, transporte, almacenamiento y preparación de ítems.
  - La verificación a realizar antes de comenzar el trabajo.
  - La verificación que el equipo está trabajando apropiadamente y, cuando sea necesario, ajustar y calibrar el equipo antes de cada uso.
  - El método de registro de las observaciones y los resultados.
  - Las medidas de seguridad a observar.
- Los criterios o requisitos para la aprobación o el rechazo.
- Los datos a ser registrados y el método de análisis y presentación.
- La incertidumbre o el procedimiento para estimarla.

### **2.12.2. Métodos desarrollados por el laboratorio**

Cuando sea el caso, el laboratorio debe demostrar que tiene un plan en el que se incluye la evaluación de su capacidad en cuanto a personal, equipo y demás recursos que le permitan desarrollar métodos propios.

Los métodos desarrollados por el laboratorio deben estar adecuadamente validados, documentados y autorizados antes de su uso. Cuando sea posible, se debe emplear material de referencia con una matriz equivalente a la de la muestra, o bien debe utilizarse un método de ensayo normalizado alterno, preferiblemente de diferente principio de medición, para comparar los resultados.

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1. Variables

Las variables involucradas en esta investigación, se clasifican como variables dependientes, independientes y de control, según su intervención en el diseño metodológico.

Tabla I. **Variables para verificación de método espectrofotométrico para determinar calcio**

| Variable      | Independiente | Dependiente | Controlable |    |
|---------------|---------------|-------------|-------------|----|
|               |               |             | Si          | No |
| Tiempo        |               | X           | X           |    |
| pH            |               | X           | X           |    |
| Concentración | X             |             |             | X  |

Fuente: elaboración propia.

#### 3.2. Delimitación del campo de estudio

El campo de estudio de esta investigación, corresponde al área fotometría de análisis químico de la línea de gestión de calidad de métodos analíticos. El proyecto consiste en la verificación de los parámetros analíticos del método para determinar calcio por espectrofotometría realizado en el Laboratorio de Análisis Físicoquímico de la Sección de Química Industrial del Centro de

Investigaciones de Ingeniería, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.  
Primer nivel del edificio T-3, Ciudad Universitaria, zona 12 Guatemala.

### **3.3. Recursos humanos disponibles**

Profesores e investigadores del Centro de Investigaciones de Ingeniería, de la Facultad de Ingeniería, USAC, participaron activamente en la ejecución de esta investigación. Se listan a continuación.

- Autora: Eliett Alvina Areas Blandon.
- Asesor: Ing. César Alfonso García Guerra.
- Coasesora: Licda. Ingrid Lorena Benítez Pacheco.
- Personal del Laboratorio de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería, USAC.

### **3.4. Recursos materiales disponibles**

Los suministros con los que se contó para la ejecución de esta investigación, se clasifican en; equipo, cristalería y reactivos, los cuales se describen brevemente a continuación.

#### **3.4.1. Equipo**

El equipo utilizado en la investigación, fue empleado para la medición directa e indirecta de variables, así como para el control de las condiciones experimentales.

- Libros de la Biblioteca Central y de la Facultad de Ingeniería, USAC
- Información por internet

- Computadora marca Toshiba, Windows 8
- Impresora marca Canon ip 1200 Pixma
- Espectrofotómetro Nova 60
- Cubetas de 1 centímetro de paso de luz de cuarzo
- Balanza analítica Radwag, rango 750 g ramod
- Plancha de calentamiento Isotemp, rango 5 a 540 Celsius
- Sistema de Filtración por gravedad
- Papel filtro Wathman No. 41 y 42
- Test de pH rango 1-14 prueba tiras de papel
- Campana de extracción de gases de 240 centímetro de alto
- Horno de 0 a 105 grados Celsius
- Mufla Fischer Scientific temperatura máxima 1200 grados Celsius
- Desecadora con tapadera de 300 milímetros de diámetro
- Cronómetro 9 horas 59 minutos 59 segundos
- Equipo de protección personal, guantes, bata y mascara.

### **3.4.2. Cristalería**

A continuación se enlista la cristalería utilizada para la realización de diversas mediciones durante la experimentación, que fue necesaria para el desarrollo de esta investigación.

- Beakers 100 mililitros
- Beakers 25 mililitros
- Erlenmeyer 250 mililitros
- Erlenmeyer 25 mililitros
- Balones aforados 250 mililitros
- Balones Aforados 25 mililitros

- Bureta 25 mililitros
- Probeta 50 mililitros
- Pizeta 250 mililitros
- Pipeta volumétrica 5 mililitros
- Lápiz de succión
- Micropipeta (10 a 100 microlitros)
- Tubos de ensayo
- Espátula
- Pinzas
- Crisoles de porcelana
- Embudos de vidrio

### **3.4.3. Reactivos**

Los reactivos utilizados en la investigación, fueron empleados durante la etapa de preparación de muestras, en la digestión con ácidos y en el procedimiento fotométrico para el análisis.

- *Kit* de test de calcio (rango de detección 5 a 160 miligramos/litros)
- Ácido nítrico concentrado (68 por ciento)
- Ácido clorhídrico grado reactivo (37 por ciento)
- Hidróxido de potasio (3 molar)
- Agua desmineralizada

### **3.5. Técnica cuantitativa**

La técnica instrumenta utilizada en esta investigación para la medición y la cuantificación de las variables de interés es la fotometría, se determinó la

concentración de calcio por medio de la coloración que presentan las muestras en el tiempo de reacción.

### 3.6. Recolección de la información

Las variables fueron obtenidas en 3 etapas experimentales que se describen a continuación, cabe resaltar, que en la última etapa que es el procedimiento fotométrico, se obtuvieron los datos de mayor importancia en esta investigación.

#### 3.6.1. Preparación de muestras

Las muestras a analizar, requieren de cierta preparación para realizar el análisis en medio acuoso, esto se realiza por medio del método de digestión para lo cual lo primero se selecciona la muestra analizar en este caso utilizaremos una caliza molida.

Figura 7. Caliza molida



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

- Se realiza es el secado de la muestra en el horno, con una masa de 20 gramos a una temperatura de 105 grados Celsius, por un tiempo de 90 minutos.

Figura 8. **Secado de muestra en horno**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

- Pesar 1 gramo (de la muestra previamente seca), tomar dos crisoles y colocar 1 gramo en cada crisol, para obtener el duplicado.

Figura 9. **Crisol con muestra seca**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

- Se procede a calcinar en la mufla, introducir los dos crisoles a una temperatura de 950 grados Celsius y retirarlos después de 20 minutos, después de retirarlos colocar los crisoles en una desecadora, dejar enfriar, esto aproximadamente durante 15 minutos, pesarlos e introducirlos nuevamente a la mufla por 20 minutos, colocarlos en la desecadora, enfriarlos y pesar nuevamente.

Figura 10. **Calcinación**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

- Verificar que el peso de la muestra sea constante, esto se hace después de calcinar en dos etapas cada una de 20 minutos.
- Se toma 0,15 gramos (en duplicado) de muestra calcinada para realizar la digestión.

### **3.6.2. Digestión con ácidos**

La digestión con ácidos es una técnica de disolución de muestras para el análisis, consiste en disolver la muestra con ácido clorhídrico o con la mezcla de ácido clorhídrico y ácido nítrico, conocida como agua regia. Las muestras deben estar completamente disueltas para poder tener un resultado confiable y reproducible.

- Si la digestión se realiza con ácido clorhídrico (37 por ciento), colocar la 0,15 gramos de la muestra en un beacker de 100 mililitros, en la campana de extracción, agregar un volumen de 35 mililitros de ácido clorhídrico.

Figura 11. **Agregado de ácido en la digestión**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

- Mezclar la muestra con el ácido y llevar a ebullición en una plancha de calentamiento, a una temperatura de 250 grados Celsius hasta evaporar y obtener el volumen más bajo posible (aproximadamente 10 mililitros) evitando que las sales comiencen a cristalizar.

Figura 12. **Calentamiento en la digestión**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

- Para realizar la digestión con agua regia, realizar el mismo procedimiento del paso anterior, con la única variante que se agrega un volumen de 20 mililitros de ácido clorhídrico y 15 mililitros de ácido nítrico concentrado al 68 por ciento.

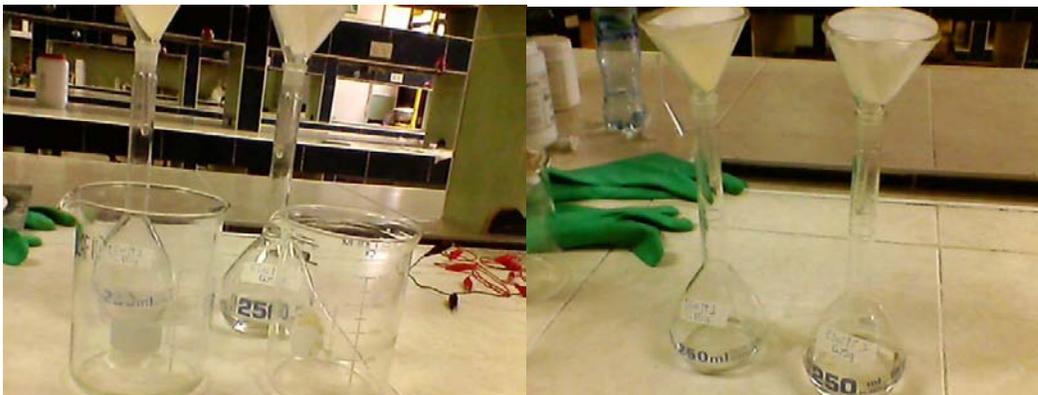
Figura 13. **Digestión con agua regia**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

- A la muestra evaporada agregar una cantidad de aproximadamente 75 mililitros de agua desmineralizada caliente, mezclar y dejar enfriar.
- Transferir a un balón de 250 mililitros con un embudo y papel filtro, para disolver los residuos restantes, se lavan las paredes del beaker con agua desmineralizada y se filtra por gravedad.

Figura 14. **Filtración**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

- El filtrado se afora a 250 mililitros con agua desmineralizada y se mezcla bien. La solución obtenida se diluye en proporción de 1:10.

### **3.6.3. Procedimiento fotométrico**

Para realizar el procedimiento por fotometría, es necesario haber realizado previamente la digestión con ácidos en las muestras de interés, para realizar las mediciones en el espectrofotómetro.

- Comprobar que el valor del potencial de hidrógeno se encuentre en el intervalo de 4-10, en caso necesario, corregir el valor del potencial de hidrógeno añadiendo gota a gota solución diluida de hidróxido de sodio 3 molar.

Figura 15. **Corrección de pH**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico, Facultad de Ingeniería. USAC.

- Pipetear en un tubo de ensayo 0,10 mililitros de la muestra (dilución 1:10).

Figura 16. **Muestra a analizar**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico, Facultad de Ingeniería. USAC.

- Añadir 5 mililitros del reactivo 1 con una pipeta y mezclar.
- Añadir 4 gotas del reactivo 2 y mezclar.
- Agregar 4 gotas del reactivo 3 y mezclar.

Figura 17. **Reactivos para análisis espectrofotométrico**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico, Facultad de Ingeniería. USAC.

- Esperar un tiempo de reacción de 8 minutos para realizar la medición en el espectrofotómetro Spectroquant Nova 60.
- Seleccionar el método con el AutoSelector.
- Trasladar la muestra en una cubeta de cuarzo de 1,0 centímetro de paso de luz.
- Colocar la cubeta en el compartimiento para cubetas.
- Medir y anotar concentración de calcio.

Figura 18. **Medición de muestras**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico, Facultad de Ingeniería. USAC.

### 3.7. Tabulación y ordenamiento de la información

En este apartado se indica la forma en que se tabuló toda la información en la investigación, y como se ordenó de acuerdo a la elaboración de cada etapa.

Se inició con el procedimiento con la obtención de la precisión para lo cual se midió la concentración de calcio para obtener la repetibilidad, en la que se midió en el espectrofotómetro la misma concentración de disolución preparada, en duplicado. Se realizaron 10 mediciones por el mismo analista.

Tabla II. **Repetibilidad del método**

| <b>Medición</b> | <b>Concentración<br/>Balón 1 (mg/L)</b> | <b>Concentración<br/>Balón 2 (mg/L)</b> |
|-----------------|---|---|
| <b>1</b>        |   |   |
| <b>2</b>        |   |   |
| <b>3</b>        |   |   |
| <b>4</b>        |   |   |
| <b>5</b>        |   |   |
| <b>Promedio</b> |   |   |

Fuente: elaboración propia.

En la determinación de la exactitud del método se realizaron 5 diluciones de la solución patrón de calcio, por medio de duplicados, realizados por el mismo analista, en el rango de detección del método.

Tabla III. **Exactitud del método**

| <b>Dilución</b> | <b>Dato teórico (mg/L)</b> | <b>Concentración Balón 1 (mg/L)</b> | <b>Concentración Balón 2 (mg/L)</b> | <b>Promedio</b> |
|-----------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| <b>1/200</b>    |                            |                                     |                                     |                 |
| <b>1/25</b>     |                            |                                     |                                     |                 |
| <b>1/12</b>     |                            |                                     |                                     |                 |
| <b>1/8</b>      |                            |                                     |                                     |                 |
| <b>1/6</b>      |                            |                                     |                                     |                 |

Fuente: elaboración propia.

Para obtener la reproducibilidad, se realizaron diez mediciones por cada analista, para un total de tres analistas, con la misma cantidad de masa.

Tabla IV. **Reproducibilidad del método**

|                   | <b>Medición</b> | <b>C Balón 1 (mg/L)</b> | <b>C Balón 2(mg/L)</b> |
|-------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|
| <b>Analista 1</b> | 1               |                         |                        |
|                   | 2               |                         |                        |
|                   | 3               |                         |                        |
|                   | 4               |                         |                        |
|                   | 5               |                         |                        |
| Promedio          |                 |                         |                        |
| <b>Analista 2</b> | 1               |                         |                        |
|                   | 2               |                         |                        |
|                   | 3               |                         |                        |
|                   | 4               |                         |                        |
|                   | 5               |                         |                        |
| Promedio          |                 |                         |                        |
| <b>Analista 3</b> | 1               |                         |                        |
|                   | 2               |                         |                        |
|                   | 3               |                         |                        |
|                   | 4               |                         |                        |
|                   | 5               |                         |                        |
| Promedio          |                 |                         |                        |

Fuente: elaboración propia.

En la determinación de robustez del método se hicieron dos tipos de ataques con ácidos, realizando duplicado en ambos, efectuados por el mismo analista con la misma masa de la muestra.

Tabla V. **Robustez variando digestión**

|                   | <b>Medición</b> | <b>Concentración Balón 1 (mg/L)</b> | <b>Concentración Balón 2(mg/L)</b> |
|-------------------|-----------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Analista 1</b> | 1               |                                     |                                    |
|                   | 2               |                                     |                                    |
|                   | 3               |                                     |                                    |
|                   | 4               |                                     |                                    |
|                   | 5               |                                     |                                    |
| Promedio          |                 |                                     |                                    |
| <b>Analista 2</b> | 1               |                                     |                                    |
|                   | 2               |                                     |                                    |
|                   | 3               |                                     |                                    |
|                   | 4               |                                     |                                    |
|                   | 5               |                                     |                                    |
| Promedio          |                 |                                     |                                    |
| <b>Analista 3</b> | 1               |                                     |                                    |
|                   | 2               |                                     |                                    |
|                   | 3               |                                     |                                    |
|                   | 4               |                                     |                                    |
|                   | 5               |                                     |                                    |
| Promedio          |                 |                                     |                                    |

Fuente: elaboración propia.

Se determinó la robustez variando la masa de la muestra, realizando seis mediciones por cada masa, se hizo el mismo tipo de digestión con ácido clorhídrico para las tres masas diferentes.

Tabla VI. **Robustez variando masa**

| <b>Medición</b> | <b>Masa (g)</b> | <b>Concentración Balón 1 (mg/L)</b> | <b>Concentración Balón 2 (mg/L)</b> |
|-----------------|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1               |                 |                                     |                                     |
| 2               |                 |                                     |                                     |
| 3               |                 |                                     |                                     |
| 1               |                 |                                     |                                     |
| 2               |                 |                                     |                                     |
| 3               |                 |                                     |                                     |
| 1               |                 |                                     |                                     |
| 2               |                 |                                     |                                     |
| 3               |                 |                                     |                                     |

Fuente: elaboración propia.

Se determinó la especificidad del método, agregando concentraciones conocidas de magnesio, aluminio y hierro a la disolución que contenía calcio, realizado por el mismo analista, con masa constante y el mismo tipo de ataque.

Tabla VII. **Especificidad del método**

| <b>Nombre del analito</b> |                             |                                     |                                     |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Medición</b>           | <b>Concentración máxima</b> | <b>Concentración Balón 1 (mg/L)</b> | <b>Concentración Balón 2 (mg/L)</b> |
| 1                         |                             |                                     |                                     |
| 2                         |                             |                                     |                                     |
| 3                         |                             |                                     |                                     |
| 4                         |                             |                                     |                                     |
| 5                         |                             |                                     |                                     |
| Promedio                  |                             |                                     |                                     |

Fuente: elaboración propia.

### 3.7.1. Programas a utilizar para análisis de datos

Se utilizó el software de uso común para el procesamiento de datos. Los programas que se utilizaron para realizar diagramas, tablas, gráficas, procesamiento y cálculo de la información fueron:

- Microsoft Word
- Microsoft Excel
- Microsoft Visio

### 3.8. Análisis estadístico

Para la evaluación de los parámetros de desempeño analítico: precisión, especificidad y robustez se realizó un análisis de varianza de dos factores.

Los resultados obtenidos del Anova se utilizaron para descartar o comprobar la hipótesis alternativa planteada en esta investigación, que, a su vez, está relacionada al objetivo específico 6.

Tabla VIII. **Análisis de la varianza de la precisión por repetibilidad del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible**

| F.V.                      | SC     | GL | PC     | F    | p-valor | F <sub>tabulada</sub> | Nivel de significación |
|---------------------------|--------|----|--------|------|---------|-----------------------|------------------------|
| <b>Muestra mediciones</b> | 33,75  | 4  | 8,44   | 0,09 | 0,98    | 6,39                  | 0,05                   |
|                           | 160,00 | 1  | 160,00 | 1,72 | 0,26    | 7,71                  | 0,05                   |
| <b>Error</b>              | 371,25 | 4  | 92,81  |      |         |                       |                        |
| <b>Total</b>              | 565,00 | 9  |        |      |         |                       |                        |

Fuente: elaboración propia.

Tabla IX. **Análisis de la varianza de la precisión por reproducibilidad del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible**

| <b>F.V.</b>     | <b>SC</b> | <b>GL</b> | <b>PC</b> | <b>F</b> | <b>p-valor</b> | <b>F<sub>tabulada</sub></b> | <b>Nivel de significación</b> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>muestra</b>  | 4013,75   | 2         | 2006,87   | 10,55    | 0,0005         | 3,40                        | 0,05                          |
| <b>analista</b> | 541,87    | 1         | 541,87    | 2,85     | 0,10430        | 0,10                        | 0,05                          |
| <b>error</b>    | 1448,75   | 2         | 724,37    |          |                |                             |                               |
| <b>total</b>    | 10566,88  | 29        |           |          |                |                             |                               |

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Análisis de la varianza especificidad del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible al agregar aluminio magnesio y hierro a la muestra**

| <b>F.V.</b>                 | <b>SC</b> | <b>GL</b> | <b>PC</b> | <b>F</b> | <b>p-valor</b> | <b>F<sub>tabulada</sub></b> | <b>Nivel de significación</b> |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>replica en duplicado</b> | 227,81    | 1         | 227,81    | 4,20     | 0,06           | 4,49                        | 0,05                          |
| <b>muestra</b>              | 14715,31  | 1         | 14715,31  | 271,41   | 1,86<br>E-11   | 4,49                        | 0,05                          |
| <b>error</b>                | 867,50    | 16        | 54,22     |          |                |                             |                               |
| <b>Total</b>                | 6495,00   | 19        |           |          |                |                             |                               |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Análisis de la varianza de la robustez del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible variando el tipo de digestión ácida**

| <b>F.V.</b>                | <b>SC</b> | <b>GL</b> | <b>PC</b> | <b>F</b> | <b>p-valor</b> | <b>F<sub>tabulada</sub></b> | <b>Nivel de significación</b> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>Duplicado</b>           | 15,30     | 1         | 15,31     | 0,21     | 0,65           | 4,49                        | 0,05                          |
| <b>variación de ataque</b> | 138,00    | 1         | 137,81    | 1,90     | 0,19           | 4,49                        | 0,05                          |
| <b>Error</b>               | 1163,00   | 16        | 72,66     |          |                |                             |                               |
| <b>Total</b>               | 1406,00   | 19        |           |          |                |                             |                               |

Fuente: elaboración propia.



## 4. RESULTADOS

En esta sección, los resultados se presentan organizados en apartados correspondientes a los objetivos específicos de esta investigación que contiene la verificación del método para la determinación de calcio.

### 4.1. Precisión por repetibilidad

Este parámetro se evaluó para el método en el que se determina calcio, a partir de 0,15 gramos de muestra preparada por medio de la digestión ácida con un potencial de hidrógeno igual a 5.

Tabla XII. **Repetibilidad: media, desviación estándar y coeficiente de variación**

|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| <b>Promedio mg/L</b>               | 29,00 |
| <b>Desviación estándar</b>         | 7,92  |
| <b>Coficiente de variación (%)</b> | 27,32 |

Fuente: elaboración propia.

#### 4.2. Precisión por reproducibilidad

Este parámetro se evaluó a través de 3 diferentes analistas, utilizando la misma muestra con masa inicial de 0,15 gramos y el mismo tipo de digestión ácida, el tipo de digestión que se utilizó es ácida.

Tabla XIII. **Reproducibilidad: media, desviación estándar y coeficiente de variación**

| <b>Analista</b> | <b>Promedio mg/L</b> | <b>Desviación estándar</b> | <b>Coficiente de variación (%)</b> |
|-----------------|----------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Analista 1      | 29,00                | 7,92                       | 27,32                              |
| Analista 2      | 47,22                | 11,89                      | 25,17                              |
| Analista 3      | 50,28                | 15,23                      | 30,29                              |

Fuente: elaboración propia.

#### 4.3. Exactitud del método

Se evaluó este parámetro utilizando valores de referencia estándar de calcio en concentraciones diferentes y conocidas, utilizados como concentraciones teóricas, utilizando la misma masa en las concentraciones experimentales.

Tabla XIV. **Porcentaje de error del método**

| Concentración teórica (mg/L) | Porcentaje de error |
|------------------------------|---------------------|
| 40,00                        | 6,25%               |
| 80,00                        | 6,88%               |
| 120,00                       | 3,33%               |
| 160,00                       | 0,31%               |

Fuente: elaboración propia.

#### 4.4. Robustez variando masa

Se evaluó este parámetro variando la masa inicial utilizando 3 masas diferentes, utilizando el mismo tipo de ataque ácido para las tres diferentes masas, realizado por el mismo analista.

Tabla XV. **Robustez: media, desviación estándar y coeficiente de variación**

| Masa (g) | Promedio mg/L | Desviación estándar | Coficiente de variación (%) |
|----------|---------------|---------------------|-----------------------------|
| 0,60     | 56,67         | 8,61                | 15,20                       |
| 0,30     | 131,25        | 8,91                | 6,79                        |
| 0,15     | 49,25         | 5,98                | 12,14                       |

Fuente: elaboración propia.

#### 4.5. Robustez variando tipo de digestión ácida

Para la obtención de este parámetro el tipo de digestión ácida se tuvo que variar en la preparación del analito utilizando la misma cantidad de masa y realizado por el mismo analista.

Tabla XVI. **Robustez con masa constante: media, desviación estándar y coeficiente de variación**

| Tipo de ataque ácido | Promedio mg/L | Desviación estándar | Coeficiente de variación (%) |
|----------------------|---------------|---------------------|------------------------------|
| Ácido clorhídrico    | 64,25         | 7,82                | 12,17                        |
| Agua regia           | 66,00         | 9,66                | 14,64                        |

Fuente: elaboración propia.

#### 4.6. Especificidad

Para este parámetro se utilizaron 3 analitos diferentes el primero contenía aluminio en la muestra inicial que contenía únicamente calcio, el segundo analito contenía magnesio y el tercero contenía hierro.

Tabla XVII. **Lecturas fotométricas en presencia de aluminio con concentración máxima de 500 mg/L en el analito**

| Medición   | Concentración inicial de calcio de la muestra (mg/L) | Concentración de la muestra con aluminio (mg/L) |
|--|--|---|
| 1  | 7,00   | 10,00   |
| 2  | 8,00   | 8,00  |
| 3  | 9,00   | 15,00   |
| 4  | 10,00  | 9,00  |
| 5  | 11,00  | 14,00   |
| 6  | 12,00  | 7,00  |
| 7  | 13,00  | 8,00  |
| 8  | 14,00  | 13,00   |
| Rango de concentración en presencia de aluminio (mg/L) | 7-9  |   |

Fuente: elaboración propia.

El segundo analito incluye magnesio en la muestra inicial que contenía únicamente calcio para el cual se obtuvieron las siguientes concentraciones en las dos muestras diferentes.

Tabla XVIII. **Lecturas fotométricas en presencia de magnesio con concentración máxima de 500 mg/L en el analito**

| <b>Medición</b>  | <b>Concentración inicial de calcio de la muestra (mg/L)</b> | <b>Concentración de la muestra con magnesio (mg/L)</b> |
|--|---|--|
| 1  | 7,00  | 9,00   |
| 2  | 8,00  | 6,00   |
| 3  | 9,00  | 11,00  |
| 4  | 10,00   | 3,00   |
| 5  | 11,00   | 5,00   |
| 6  | 12,00   | 5,00   |
| 7  | 13,00   | 5,00   |
| 8  | 14,00   | 10,00  |
| Rango de concentración en presencia de magnesio (mg/L) | 7-9   |  |

Fuente: elaboración propia.

El tercer y último analito incluye hierro en la muestra inicial que contenía únicamente calcio a continuación se muestra su respectiva tabla con los datos obtenidos.

Tabla XIX. **Lecturas fotométricas en presencia de hierro con concentración máxima de 1 mg/L en el analito**

| Medición   | Concentración inicial de calcio de la muestra (mg/L) | Concentración de la muestra con hierro (mg/L) |
|--|--|---|
| 1  | 7,00   | 9,00  |
| 2  | 8,00   | 5,00  |
| 3  | 9,00   | 13,00   |
| 4  | 10,00  | 4,00  |
| 5  | 11,00  | 12,00   |
| 6  | 12,00  | 12,00   |
| 7  | 13,00  | 11,00   |
| 8  | 14,00  | 9,00  |
| Rango de concentración en presencia de hierro (mg/L) | 7-12   |   |

Fuente: elaboración propia.

#### 4.7. Límites de cuantificación

Los límites de cuantificación para determinar calcio, son proporcionados por método fotométrico utilizado debido a que cuenta con su respectiva validación y es un parámetro previamente establecido.

Tabla XX. **Límites de cuantificación**

| Límite de cuantificación | Concentración mg/ L |
|--------------------------|---------------------|
| Máximo                   | 160                 |
| Mínimo                   | 5                   |

Fuente: elaboración propia.



## 5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se llevó a cabo la verificación de los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible utilizando el equipo para la medición fotométrica Spectroquant Nova 60, realizado en el Laboratorio de Análisis Físicoquímico de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería, de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

El Laboratorio de Análisis Físicoquímico de la Sección de Química Industrial se encuentra en proceso de acreditación, por lo tanto la verificación del método para determinar calcio por espectrofotometría visible, se considera útil y necesario, debido a que en el laboratorio se realizan ensayos y análisis diversos materiales, para lo cual es necesario que en cada procedimiento que se realiza el personal encargado debe aplicar en forma ordenada y correcta el procedimiento de los métodos establecidos; desde el equipo de seguridad hasta la cristalería apropiada para cada prueba.

El laboratorio se encuentra debidamente equipado para la realización del método, se cuenta con un espacio delimitado para el análisis espectrofotométrico; un espectrofotómetro Spectroquant Nova 60 en buen estado, cubetas de 1 centímetro en buen estado, balanza calibrada, reactivos apropiados y cristalería necesaria para la realización del análisis. Todo lo anterior para reconocer la capacidad del laboratorio para evaluar los parámetros de desempeño en la verificación.

Este método se propuso porque es una técnica de análisis, sencilla y útil para determinar calcio en pequeñas cantidades en muestras de interés para el laboratorio; además la mayoría de laboratorios en Guatemala cuentan con al menos un espectrofotómetro.

Luego de desarrollar el método analítico, fue necesario verificar por medio de estudios de laboratorio, que las características del método cumplirán con los parámetros establecidos para las aplicaciones analíticas. Se evaluaron los siguientes parámetros: precisión, exactitud, especificidad, robustez y límites de cuantificación.

El parámetro de precisión indica el grado de concordancia entre las mediciones al hacerlas repetidas veces. Para la evaluación de este parámetro se dividió en:

- Repetibilidad: se analizó una caliza en solución acuosa; las muestras fueron realizadas por el mismo analista, el mismo día y en el mismo equipo. Se obtuvo un promedio de 29,00 miligramo por litro de calcio; una desviación estándar de 7,92 y un coeficiente de variación de 27,32 por ciento. El coeficiente de variación no se considera aceptable; por lo que se puede decir que el método no cumple con el parámetro de repetibilidad porque tiene un valor mayor a 20 por ciento.
- Reproducibilidad: para evaluar el parámetro de reproducibilidad se realizó el mismo tipo de muestra por el método utilizando, tres analistas diferentes con el mismo equipo, y se realizó una intercomparación de los valores obtenidos para cada una de las concentraciones a través de un análisis de varianza Anova, obteniendo una de probabilidad (P) menor a 0,05 lo que indica que existen diferencias significativas entre los

analistas, y no hay buena reproducibilidad. Para los valores del segundo y tercer analista, se realizó la prueba de Q de Dixon debido a que había valores sospechosos en la realización del análisis y se evaluó la posibilidad de descartarlos, para lo cual se utilizó un 90 por ciento de confianza, obteniendo el rechazo del valor de 92,5 miligramo por litro para el analista 2 y un valor de 122,50 miligramo por litro para el analista 3. El analista 3, con mayor coeficiente de variación muestra mayor heterogeneidad en sus valores y el analista 2 con menor coeficiente de variación muestra mayor homogeneidad en los valores.

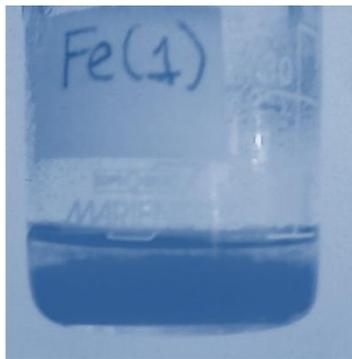
Estos resultados indican que el método utilizado no es reproducible a todas las concentraciones, debido a la diferencia significativa entre analistas y los coeficientes de variación altos, no están dentro del rango de precisión aceptable. Esto puede deberse a problemas con el equipo de medición o a errores humanos en el analista.

El parámetro de exactitud se determinó a través del porcentaje de error, utilizando como valor de referencia cuatro concentraciones diferentes del estándar de calcio con concentraciones conocidas, haciendo diluciones del estándar que se encontraba a una concentración de 1 000 miligramo por litro para lo cual las cuatro concentraciones se tomaron dentro del intervalo de detección del método que es de 5 miligramo por litro a 160 miligramo por litro, el mayor porcentaje de error relativo se obtuvo para la concentración de 80 miligramo por litro siendo este error de 6,88 por ciento, debido que en fotometría, a mayores concentraciones existe mayor error fotométrico.

El parámetro de especificidad se determinó al agregar aluminio, magnesio o hierro a las muestras en el análisis para determinar si es afectada la medición de calcio a poseer otros componentes en la muestra, se utilizó la misma

concentración de muestra de calcio, el aluminio que se agregó estaba a una concentración de 500 miligramo por litro, el magnesio a 500 miligramo por litro y el hierro a 1 miligramo por litro; cabe mencionar que la concentración máxima de hierro es de 1 miligramo por litro debido a que a mayores concentraciones de hierro, el método no determina calcio, debido a que la muestra interfiere en la formación del cromóforo que da la señal analítica.

Figura 19. **Muestra precipitada al agregar hierro**



Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Facultad de Ingeniería. USAC.

Se realizaron cinco repeticiones en duplicado de cada muestra que contenía calcio y se realizaron las mismas repeticiones al analito incluyendo aluminio, magnesio o hierro para comparar y obtener la variación en miligramo por litro de las lecturas de las concentraciones (ver tablas XVII, XVIII y XIX).

Se descartó la concentración inicial de calcio en la muestra de 15 miligramo por litro y 16 miligramo por litro debido a que a esas concentraciones las mediciones obtenidas son las mismas y el método continúa leyendo la misma concentración aunque se varíe la concentración. En la lectura fotométrica con el grado de error solo se puede leer calcio en presencia de aluminio a concentración de 500 miligramo por litro, de 7 miligramo por litro a 9

miligramo por litro, el magnesio con concentración de 500 miligramo por litro, solo puedo leer de 7 miligramo por litro a 9 miligramo por litro y en el caso del hierro a concentración de 1 miligramo por litro, de 7 miligramo por litro a 12 miligramo por litro.

Para determinar el parámetro de robustez se varió las condiciones analíticas: el tipo de ataque ácido utilizando ácido clorhídrico y agua regia, y la masa inicial de la muestra para determinar que el procedimiento del método analítico no es afectado por pequeñas variaciones, este procedimiento fue realizado por el mismo analista.

En promedio, se puede determinar que el procedimiento analítico es capaz de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, provee entonces una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales. La muestra con masa inicial de 0,30 gramos, sus valores obtenidos fueron rechazados por medio de la Q de Dixon, debido a que sus valores no muestran secuencia entre las tres masas iniciales que se variaron.

Los límites de cuantificación para el método fotométrico los proporciona el *kit* de reactivos, el mínimo es 5 miligramo por litro y el máximo es 160 miligramo por litro.

Y para finalizar el análisis estadístico se tomó en cuenta el Análisis de Varianza (Anova) y la prueba de Q de Dixon para determinar las variaciones que puedan afectar en la realización del método. Para esto se recurrió a Microsoft Excel que realiza pruebas estadísticas. Por lo que al comparar los resultados se puede determinar cómo verificado el método espectrofotométrico.

En base a la hipótesis se puede decir que en general no existe diferencia significativa entre los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible, es decir se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

## CONCLUSIONES

1. Se verificó el método analítico utilizando el fotómetro Spectroquant Nova 60 para determinar calcio por fotometría visible, de acuerdo a la determinación y evaluación de los parámetros de desempeño.
2. Los valores obtenidos para la precisión demuestran que no existen diferencias significativas entre la precisión del método en la repetibilidad debido a que la probabilidad es mayor a 5 por ciento en la intercomparación de datos.
3. En el estudio de la repetibilidad el coeficiente de variación es de 27,32 por ciento, lo cual indica que no hay precisión, debido a que los coeficientes de variación mayor a 20 por ciento no se consideran aceptables. Los valores obtenidos para la precisión demuestran que existen diferencias significativas entre la precisión del método en la repetibilidad debido a que la probabilidad es menor al 5 por ciento en la intercomparación de datos.
4. La reproducibilidad del método es 27,32 por ciento, 25,17 por ciento y 30,29 por ciento, con coeficientes de variación que no son aceptables, porque coeficientes mayores al 20 por ciento. Los valores obtenidos para la precisión al aplicar un análisis de varianza se obtuvieron valores de probabilidad mayores a 0,05, al analizar la misma muestra en diferentes analistas, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas.

5. El método para determinar calcio, es robusto, debido a que al realizar la intercomparación de resultados entre ataques ácidos diferentes y masas diferentes, su probabilidad es mayor al 5 por ciento, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas.
6. En presencia de aluminio a concentración de 500 miligramo por litro, el rango de concentración que puede determinar calcio es de 7 miligramo por litro a 9 miligramo por litro.
7. En presencia de magnesio a concentración de 500 miligramo por litro, el rango de concentración que puede determinar calcio es de 7 miligramo por litro a 9 miligramo por litro.
8. En presencia de hierro a concentración de 500 miligramo por litro, el rango de concentración que puede determinar calcio es de 7 miligramo por litro a 12 miligramo por litro.
9. El hierro por razones de insolubilización, formando hidróxido de hierro precipita a concentraciones mayores de 1 miligramo por litro.
10. El límite de cuantificación mínimo es 5,00 miligramo por litro y máximo es 160,00 miligramo por litro. El método para determinar calcio es exacto para concentraciones de 80 miligramo por litro a 160 miligramo por litro.
11. La concentración máxima de hierro es de 1 miligramo por litro debido a que mayores concentraciones el método no determina calcio, debido a que la muestra interfiere en la formación del cromóforo que da la señal analítica.

## RECOMENDACIONES

1. Evaluar los parámetros de desempeño con un método espectrofotométrico alternativo al verificado.
2. Calibrar el equipo de medición espectrofotométrica para la realización cualquier tipo análisis en el laboratorio.
3. Disminuir la concentración de hierro a 1 miligramo por litro si se quiere tener un método versátil, al precipitarse antes de leer calcio, centrifugar y decantar.
4. Realizar una intercomparación de datos obtenidos en el espectrofotómetro Spectroquant Nova 60 con otros equipos de medición espectrofotométrica, para evaluar la reproducibilidad.
5. Realizar capacitaciones de los instrumentos de medición espectrofotométrica que determine el uso adecuado del equipo, para tener personal capacitado dentro laboratorio y lograr mayor precisión en los resultados.
6. Realizar el procedimiento verificado en el orden correcto, tomando en cuenta las especificaciones indicadas como tiempo de reacción, pH y concentración, para un mejor análisis.



## BIBLIOGRAFÍA

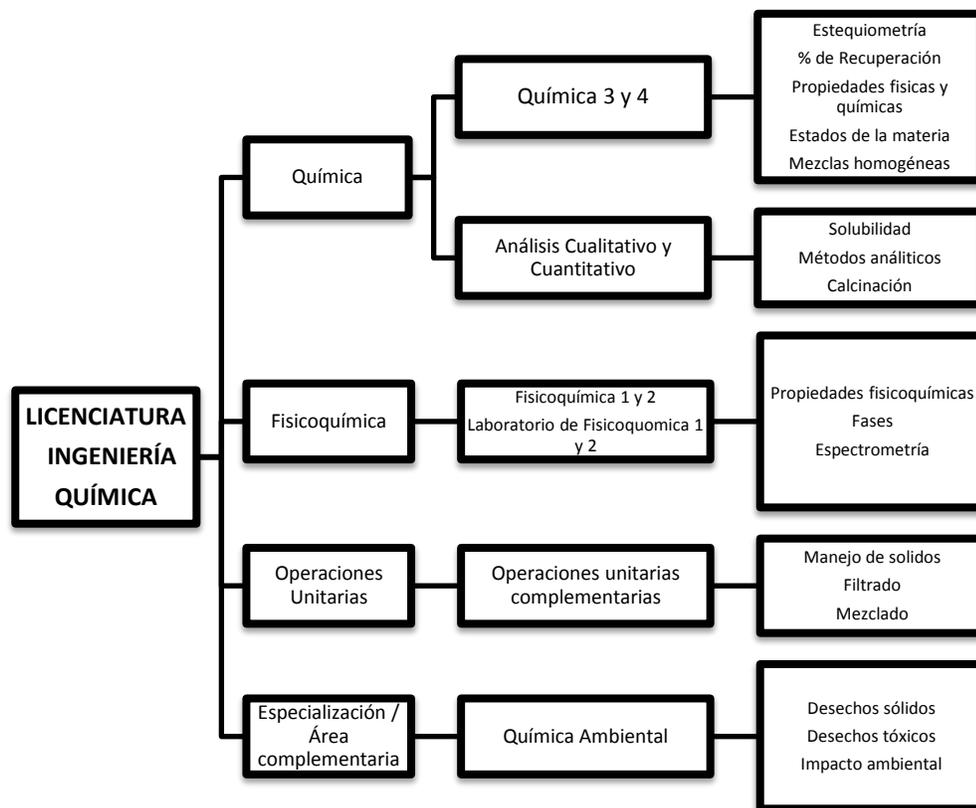
1. CHANG, Raymond. *Química*. 7a ed. Colombia: McGraw-Hill, 2002. 1004 p.
2. CLAVIJO DIAZ, Alfonso. *Fundamentos de química analítica. Equilibrio iónico y análisis químico*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2002. 983 p.
3. DAY, R. A. *Química analítica cuantitativa*. 5a ed. México: Prentice-Hall Inc., 1989. 621 p.
4. DOUGLAS, C. Montgomery. *Diseño y análisis de experimentos*. 2a ed. México: Limusa, 2004. 686 p.
5. HARRIS, Daniel C. *Análisis químico cuantitativo*. 3a ed. España: Reverté, 2007. 554 p.
6. MILLER, JAMES C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4a. ed. Madrid: Pearson Educación, 2002. 296 p.
7. RUBINSON, Kenneth A.; RUBINSON, Judith F. *Análisis instrumental*. España: Pearson Educación, 2001. 872 p.
8. SIERRA, Alonso Isabel. *Análisis instrumental*. España: Netbiblio, 2010. 270 p.

9. SKOOG, Douglas; HOLLER, James; CROUCH, Stanley. *Principios de análisis instrumental*. Anzures, María Bruna (Trad). 6a ed. México: Cengage Learning, 2008. 1038 p. ISBN: 97-068-6829-1

## **APÉNDICES**



Figura 20. **Tabla de requisitos académicos**



Fuente: elaboración propia.

## 1. Muestra de cálculo

- Promedio

Este parámetro estadístico es muy importante ya que en la experimentación es muy poco probable que una única medición sea suficiente para definir el valor de alguna propiedad o característica, es por ello que se necesita el valor medio de las repeticiones realizadas.

### Ecuación 5. Promedio

$$x = \sum x_i / n$$

Fuente: elaboración propia.

Donde:

- x: promedio
- $x_i$ : resultado i
- n: cantidad de resultados

- Desviación estándar

Esta es una medida de la dispersión de los resultados obtenidos de las repeticiones de un procedimiento experimental con respecto del valor promedio, representa el error aleatorio.

Ecuación 6. **Desviación estándar**

$$S = \sqrt{\frac{\sum_0^i (x_i - x_{promedio})^2}{n - 1}}$$

Fuente: elaboración propia.

Donde:

- S: desviación estándar
- $x_i$ : resultado i
- $x_{prom}$  resultado promedio
- n: número de repeticiones

- Q de Dixon

Esta técnica está diseñada para detectar un único valor atípico en un grupo de datos. Este valor se compara con un valor crítico de una tabla, y el valor se declara valor atípico si supera ese valor crítico.

Si D calculado > D tabulado

Ecuación 7. **Q de Dixon**

$$Q = \frac{\text{Diferencia entre el dato sospechosos y su vecino más cercano recorrido}}{\text{Diferencia numérica entre el dato de mayor valor y el de menor valor}}$$

Fuente: elaboración propia.

- Método de mínimos cuadrados

El método de mínimos cuadrados se requerirá en el ensayo para el ajuste de la curva de absorbancia versus concentraciones, para determinar los errores en los valores tomados como coordenadas y como coordenadas x, suponiendo que las incertidumbres de todos los valores son similares entre si.

Sea la Ecuación de la recta:

$$\text{Ecuación 8. } \mathbf{y = mx + b}$$

Fuente: elaboración propia

Donde m es la pendiente y b es la ordenada al origen. La desviación vertical para un punto  $(x_i, y_i)$  está dada por  $y_i - y$ , donde y es la ordenada del punto perteneciente a la recta en el cual  $x = x_i$ .

Desviación vertical:

$$\text{Ecuación 9. } \mathbf{d_i = y_i - y = y_i - (mx_i + b)}$$

Para minimizar la magnitud de las desviaciones independientemente de sus signos, es posible elevar al cuadrado todas las desviaciones de manera que se tengan solo cantidades positivas:

$$\text{Ecuación 10. } \mathbf{d_i^2 = (y_i - y)^2 = (y_i - mx_i + b)^2}$$

La pendiente y la ordenada al origen de la mejor recta son:

$$\text{Ecuación 11. } m = \frac{\sum x_i y_i}{\sum y_i} \div D$$

$$\text{Ecuación 12. } b = \frac{\sum (x_i)^2}{\sum x_i} \div D$$

Donde el número **D** está dado por

$$\text{Ecuación 13. } D = \frac{\sum (x_i)^2}{\sum x_i} \div n$$

y **n** es el número de puntos.

## 2. Datos calculados

- Coeficiente de variación

Tabla XXI. **Evaluación de la precisión del método analítico por medio de la repetibilidad**

| <b>Medición</b> | <b>Concentración obtenida (mg/L)</b> |
|-----------------|--------------------------------------|
| 1               | 32,50                                |
| 2               | 17,50                                |
| 3               | 25,00                                |
| 4               | 20,00                                |
| 5               | 30,00                                |
| 6               | 22,50                                |
| 7               | 40,00                                |
| 8               | 40,00                                |
| 9               | 35,00                                |
| 10              | 27,50                                |
| Promedio (mg/L) | 29,00                                |
| S               | 7,92                                 |
| <b>C.V. (%)</b> | <b>27,32</b>                         |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXII. Evaluación de la precisión del método analítico por medio de la reproducibilidad.

|                   | Medición | Concentración (mg/L) | Concentración (mg/L) | $\bar{X}$ (mg/L) | S     | CV (%)       |
|-------------------|----------|----------------------|----------------------|------------------|-------|--------------|
| <b>Analista 1</b> | 1        | 32,50                | 22,50                | 29,00            | 7,92  | <b>27,32</b> |
|                   | 2        | 17,50                | 40,00                |                  |       |              |
|                   | 3        | 25,00                | 40,00                |                  |       |              |
|                   | 4        | 20,00                | 35,00                |                  |       |              |
|                   | 5        | 30,00                | 27,50                |                  |       |              |
| <b>Analista 2</b> | 1        | 40,00                | 57,50                | 47,22            | 19,91 | <b>25,17</b> |
|                   | 2        | 92,50                | 45,00                |                  |       |              |
|                   | 3        | 60,00                | 37,50                |                  |       |              |
|                   | 4        | 32,50                | 35,00                |                  |       |              |
|                   | 5        | 52,50                | 65,00                |                  |       |              |
| <b>Analista 3</b> | 1        | 55,00                | 37,50                | 50,28            | 28,98 | <b>30,29</b> |
|                   | 2        | 87,50                | 42,50                |                  |       |              |
|                   | 3        | 122,50               | 42,50                |                  |       |              |
|                   | 4        | 45,00                | 47,50                |                  |       |              |
|                   | 5        | 55,00                | 40,00                |                  |       |              |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIII. **Determinación de la robustez variando la masa**

| Medición No. | Masa (g)    | Concentración obtenida (mg/L) | Concentración obtenida (mg/L) | $\bar{X}$ (mg/L) | S    | C.V          |
|--------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------|--------------|
| 1            | <b>0,60</b> | 62,50                         | 55,00                         | 56,67            | 8,61 | <b>15,20</b> |
| 2            |             | 60,00                         | 40,00                         |                  |      |              |
| 3            |             | 60,00                         | 62,50                         |                  |      |              |
| 1            | <b>0,30</b> | 135,00                        | 117,50                        | 131,25           | 8,91 | <b>6,79</b>  |
| 2            |             | 140,00                        | 130,00                        |                  |      |              |
| 3            |             | 140,00                        | 125,00                        |                  |      |              |
| 1            | <b>0,15</b> | 44,00                         | 57,50                         | 49,25            | 5,98 | <b>12,14</b> |
| 2            |             | 46,00                         | 55,00                         |                  |      |              |
| 3            |             | 43,00                         | 50,00                         |                  |      |              |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIV. **Determinación de la robustez variando el tipo de ataque**

| <b>Ataque</b>     | <b>Medición No.</b> | <b>Concentración obtenida (mg/L)</b> | <b><math>\bar{X}</math> (mg/L)</b> | <b>S</b>    | <b>C.V (%)</b> |
|-------------------|---------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------|----------------|
| <b>HCl</b>        | 1                   | 65,00                                | <b>64,25</b>                       | <b>7,82</b> | <b>12,17</b>   |
|                   | 2                   | 67,50                                |                                    |             |                |
|                   | 3                   | 72,50                                |                                    |             |                |
|                   | 4                   | 65,00                                |                                    |             |                |
|                   | 5                   | 75,00                                |                                    |             |                |
|                   | 6                   | 47,50                                |                                    |             |                |
|                   | 7                   | 57,50                                |                                    |             |                |
|                   | 8                   | 65,00                                |                                    |             |                |
|                   | 9                   | 67,50                                |                                    |             |                |
|                   | 10                  | 60,00                                |                                    |             |                |
| <b>AGUA REGIA</b> | 1                   | 62,50                                | <b>66,00</b>                       | <b>9,66</b> | <b>14,64</b>   |
|                   | 2                   | 67,50                                |                                    |             |                |
|                   | 3                   | 60,00                                |                                    |             |                |
|                   | 4                   | 72,50                                |                                    |             |                |
|                   | 5                   | 70,00                                |                                    |             |                |
|                   | 6                   | 50,00                                |                                    |             |                |
|                   | 7                   | 80,00                                |                                    |             |                |
|                   | 8                   | 75,00                                |                                    |             |                |
|                   | 9                   | 70,00                                |                                    |             |                |
|                   | 10                  | 52,50                                |                                    |             |                |

Fuente: elaboración propia.

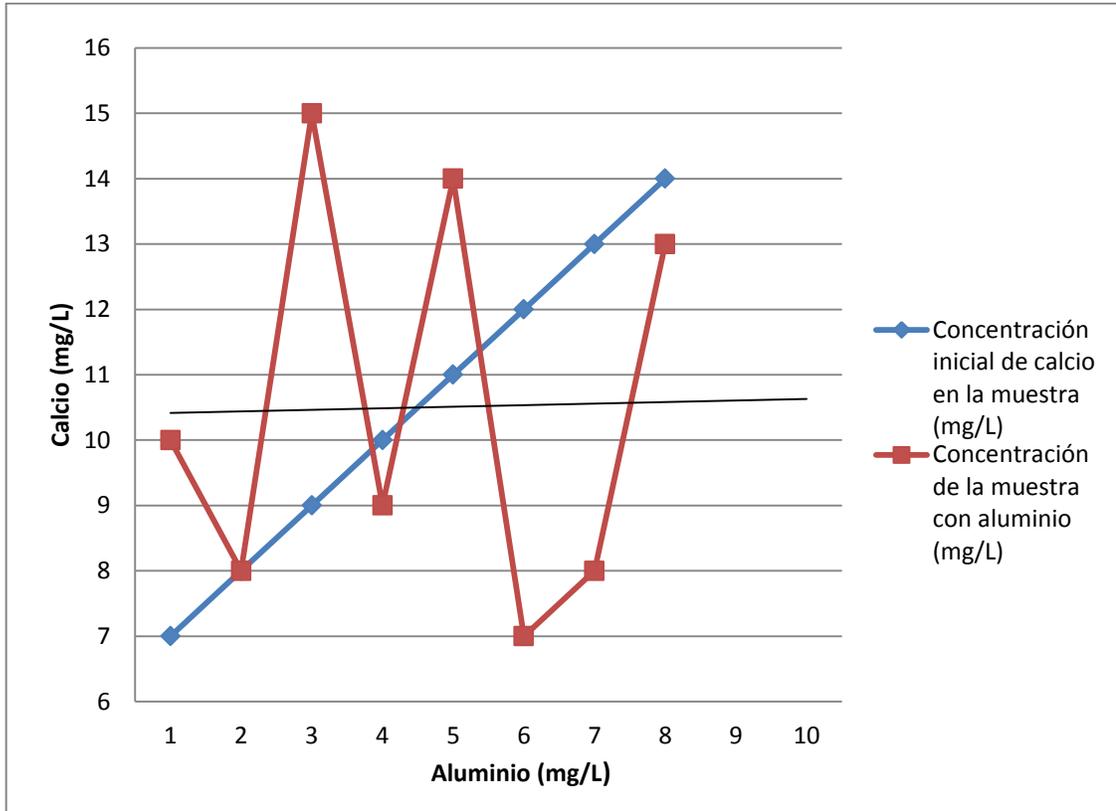
## Método de mínimos cuadrados

Tabla XXV. **Intercepto y pendiente en el método para determinar calcio por espectrofotometría visible agregando aluminio al analito con una concentración de 500 mg/L**

| Medición | Concentración inicial de calcio de la muestra (mg/L) | Concentración de la muestra con aluminio (mg/L) |
|----------|--|---|
| 1        | 7,00   | 10,00   |
| 2        | 8,00   | 8,00  |
| 3        | 9,00   | 15,00   |
| 4        | 10,00  | 9,00  |
| 5        | 11,00  | 14,00   |
| 6        | 12,00  | 7,00  |
| 7        | 13,00  | 8,00  |
| 8        | 14,00  | 13,00   |
| m        | 0,02   |   |
| b        | 10,25  |   |

Fuente: elaboración propia.

Figura 21 **Lectura fotométrica en presencia de aluminio a 500 mg/L**



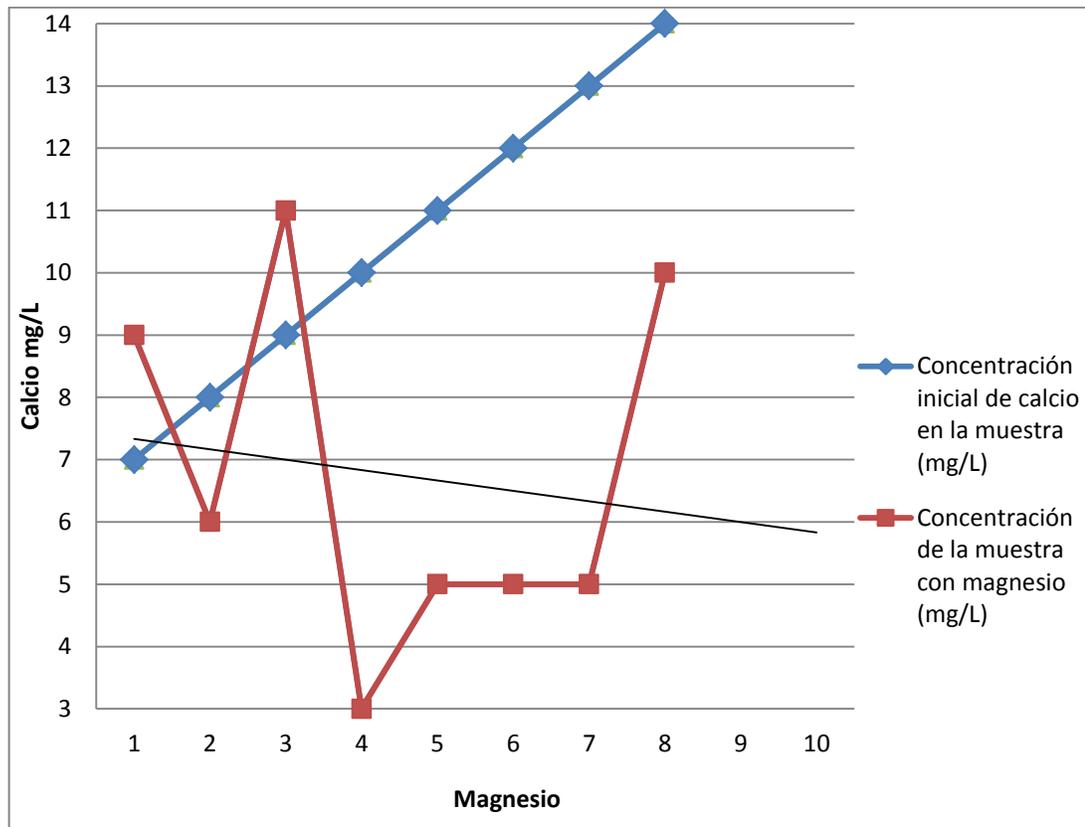
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXVI. **Intercepto y pendiente en el método para determinar calcio por espectrofotometría visible agregando magnesio al analito con una concentración de 500 miligramo por litro**

| Medición | Concentración inicial de calcio de la muestra (mg/L) | Concentración de la muestra con magnesio (mg/L) |
|----------|--|---|
| 1        | 7,00   | 9,00  |
| 2        | 8,00   | 6,00  |
| 3        | 9,00   | 11,00   |
| 4        | 10,00  | 3,00  |
| 5        | 11,00  | 5,00  |
| 6        | 12,00  | 5,00  |
| 7        | 13,00  | 5,00  |
| 8        | 14,00  | 10,00   |
| m        | -0,17  |   |
| b        | 8,50   |   |

Fuente: elaboración propia.

Figura 22. Lectura fotométrica en presencia de magnesio a 500 mg/L



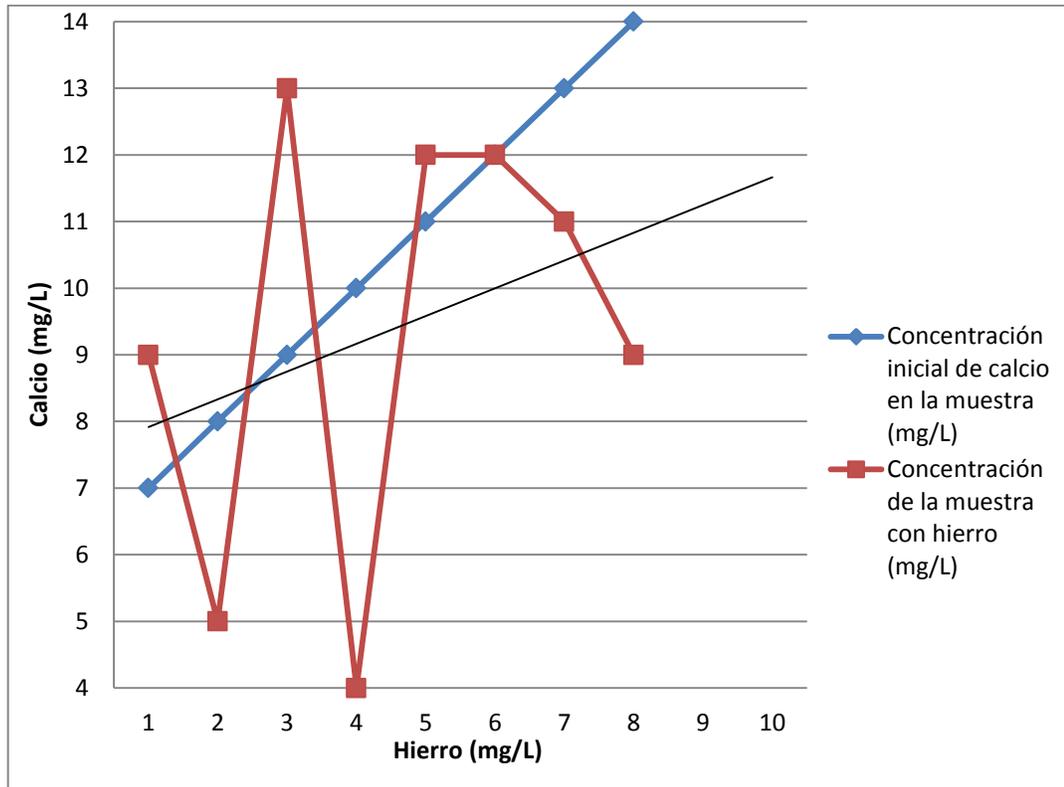
Fuente: elaboración propia.

Tabla XXVII. **Intercepto y pendiente en el método para determinar calcio por espectrofotometría visible agregando hierro al analito con una concentración de 1 mg/L**

| Medición | Concentración inicial de calcio de la muestra (mg/L) | Concentración de la muestra con hierro (mg/L) |
|----------|--|---|
| 1        | 7,00   | 9,00  |
| 2        | 8,00   | 5,00  |
| 3        | 9,00   | 13,00   |
| 4        | 10,00  | 4,00  |
| 5        | 11,00  | 12,00   |
| 6        | 12,00  | 12,00   |
| 7        | 13,00  | 11,00   |
| 8        | 14,00  | 9,00  |
| m        | 0,42   |   |
| b        | 5,0  |   |

Fuente: elaboración propia.

Figura 23. Lectura fotométrica en presencia de hierro a 1 mg/L



Fuente: elaboración propia.

Tabla XXVIII. **Longitud de onda de componentes utilizados para la determinación de calcio por espectrofotometría visible en la especificidad del método**

| <b>Componente</b> | <b>Longitud de onda en nm</b> |
|-------------------|-------------------------------|
| Calcio            | 570                           |
| Aluminio          | 576                           |
| Magnesio          | 660                           |
| Hierro            | 510                           |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIX. **Determinación de la precisión por repetibilidad del método para de calcio por espectrofotometría visible**

| <b>Medición</b> | <b>Concentración obtenida (mg/L)</b> |
|-----------------|--------------------------------------|
| 1               | 32.50                                |
| 2               | 17.50                                |
| 3               | 25.00                                |
| 4               | 20.00                                |
| 5               | 30.00                                |
| 6               | 22.50                                |
| 7               | 40.00                                |
| 8               | 40.00                                |
| 9               | 35.00                                |
| 10              | 27.50                                |
| Promedio mg/L   | 29.00                                |
| S               | 7.92                                 |
| C.V. (%)        | 27.32                                |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXX. **Determinación de la exactitud del método para determinar calcio por espectrofotometría visible**

| Medición | C (mg/L) Balón 1 | C (mg/L) Balón 2 | X (mg/L) | Dato teórico de la concentración (mg/L) | % de error |
|----------|------------------|------------------|----------|---|------------|
| 1        | 37               | 38               | 37,50    | 40,00                                   | 6,25%      |
| 2        | 84               | 87               | 85,50    | 80,00                                   | 6,88%      |
| 3        | 115              | 117              | 116,00   | 120,00                                  | 3,33%      |
| 4        | 163              | 156              | 159,50   | 160,00                                  | 0,31%      |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXI. **Determinación de la especificidad del método para determinar calcio por espectrofotometría visible agregando aluminio al analito con una concentración de 500 mg/L**

| <b>Medición</b>           | <b>Concentración inicial de calcio en la muestra (mg/L)</b> | <b>Concentración de la muestra con aluminio (mg/L)</b> |
|---------------------------|---|--|
| 1                         | 7,00  | 10,00  |
| 2                         | 8,00  | 8,00   |
| 3                         | 9,00  | 15,00  |
| 4                         | 10,00   | 9,00   |
| 5                         | 11,00   | 14,00  |
| 6                         | 12,00   | 7,00   |
| 7                         | 13,00   | 8,00   |
| 8                         | 14,00   | 13,00  |
| 9                         | 15,00   | 10,00  |
| 10                        | 16,00   | 14,00  |
| Promedio (mg/L)           | 10,80   | 11,60  |
| Desviación estándar       | 2,94  | 3,17   |
| Coefficiente de variación | 27,19   | 27,32  |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXII. **Determinación de la especificidad del método para determinar calcio por espectrofotometría visible agregando magnesio al analito con una concentración de 500 mg/L**

| Medición                  | Concentración inicial de calcio en la muestra (mg/L) | Concentración de la muestra con magnesio (mg/L) |
|---------------------------|--|---|
| 1                         | 7,00   | 9,00  |
| 2                         | 8,00   | 6,00  |
| 3                         | 9,00   | 11,00   |
| 4                         | 10,00  | 3,00  |
| 5                         | 11,00  | 5,00  |
| 6                         | 12,00  | 5,00  |
| 7                         | 13,00  | 5,00  |
| 8                         | 14,00  | 10,00   |
| 9                         | 15,00  | 6,00  |
| 10                        | 16,00  | 8,00  |
| Promedio (mg/L)           | 6,80   | 11,60   |
| Desviación estándar       | 2,57   | 3,17  |
| Coefficiente de variación | 37,84  | 27,32   |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXIII. **Determinación de la especificidad del método para determinar calcio por espectrofotometría visible agregando hierro al analito con una concentración de 1 mg/L**

| <b>Medición</b>          | <b>Concentración inicial de calcio en la muestra (mg/L)</b> | <b>Concentración de la muestra con hierro (mg/L)</b> |
|--------------------------|---|--|
| 1                        | 7,00  | 9,00   |
| 2                        | 8,00  | 5,00   |
| 3                        | 9,00  | 13,00  |
| 4                        | 10,00   | 4,00   |
| 5                        | 11,00   | 12,00  |
| 6                        | 12,00   | 12,00  |
| 7                        | 13,00   | 11,00  |
| 8                        | 14,00   | 9,00   |
| 9                        | 15,00   | 7,00   |
| 10                       | 16,00   | 11,00  |
| Promedio (mg/L)          | 9,30  | 11,60  |
| Desviación estándar      | 3,09  | 3,17   |
| Coeficiente de variación | 33,26   | 27,32  |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXIV. **Determinación de la robustez del método para determinar calcio por espectrofotometría visible variando la cantidad de masa inicial en la muestra**

| Medición No. | Masa (g)    | Concentración obtenida (mg/L) | Concentración obtenida (mg/L) | $\bar{X}$ (mg/L) | S    | C.V (%) |
|--------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------|---------|
| 1            | <b>0,60</b> | 62,50                         | 55,00                         | 56,67            | 8,61 | 15,20   |
| 2            |             | 60,00                         | 40,00                         |                  |      |         |
| 3            |             | 60,00                         | 62,50                         |                  |      |         |
| 1            | <b>0,30</b> | 135,00                        | 117,50                        | 131,25           | 8,91 | 6,79    |
| 2            |             | 140,00                        | 130,00                        |                  |      |         |
| 3            |             | 140,00                        | 125,00                        |                  |      |         |
| 1            | <b>0,15</b> | 44,00                         | 57,50                         | 49,25            | 5,98 | 12,14   |
| 2            |             | 46,00                         | 55,00                         |                  |      |         |
| 3            |             | 43,00                         | 50,00                         |                  |      |         |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXV. **Determinación de la robustez del método para de calcio por espectrofotometría visible variando el tipo de digestión**

| Digestión         | Medición No. | Concentración obtenida (mg/L) | $\bar{X}$ (mg/L) | S    | C.V(%) |
|-------------------|--------------|-------------------------------|------------------|------|--------|
| <b>HCl</b>        | 1            | 65,00                         | 64,25            | 7,82 | 12,17  |
|                   | 2            | 67,50                         |                  |      |        |
|                   | 3            | 72,50                         |                  |      |        |
|                   | 4            | 65,00                         |                  |      |        |
|                   | 5            | 75,00                         |                  |      |        |
|                   | 6            | 47,50                         |                  |      |        |
|                   | 7            | 57,50                         |                  |      |        |
|                   | 8            | 65,00                         |                  |      |        |
|                   | 9            | 67,50                         |                  |      |        |
|                   | 10           | 60,00                         |                  |      |        |
| <b>Agua regia</b> | 1            | 62,50                         | 66,00            | 9,66 | 14,64  |
|                   | 2            | 67,50                         |                  |      |        |
|                   | 3            | 60,00                         |                  |      |        |
|                   | 4            | 72,50                         |                  |      |        |
|                   | 5            | 70,00                         |                  |      |        |
|                   | 6            | 50,00                         |                  |      |        |
|                   | 7            | 80,00                         |                  |      |        |
|                   | 8            | 75,00                         |                  |      |        |
|                   | 9            | 70,00                         |                  |      |        |
|                   | 10           | 52,50                         |                  |      |        |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXVI. **Límites de cuantificación del método determinar calcio por espectrofotometría visible**

| <b>Límite de cuantificación</b> | <b>Concentración<br/>mg/ L</b> |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Máximo                          | 160                            |
| Mínimo                          | 5                              |

Fuente: elaboración propia.



## **ANEXOS**



Figura 24. **Tabla de rechazo de datos para uso de la Q de Dixon**

| No. observaciones | 90%   | 95%   | 99%   | nivel de confianza |
|-------------------|-------|-------|-------|--------------------|
| 3                 | 0.941 | 0.970 | 0.994 |                    |
| 4                 | 0.765 | 0.829 | 0.926 |                    |
| 5                 | 0.642 | 0.710 | 0.821 |                    |
| 6                 | 0.560 | 0.625 | 0.740 |                    |
| 7                 | 0.507 | 0.568 | 0.680 |                    |
| 8                 | 0.468 | 0.526 | 0.634 |                    |
| 9                 | 0.437 | 0.493 | 0.598 |                    |
| 10                | 0.412 | 0.466 | 0.568 |                    |

Si  $Q_{\text{calculado}}$  es  $>$  que  $Q_{\text{Tabla}}$  el resultado es rechazado

Figura 25. **Tabla de rechazo de datos para uso de la Q de Dixon**

Tabla A.4 Valores críticos de  $Q$  ( $P = 0.05$ )

| Tamaño de muestra | Valor crítico |
|-------------------|---------------|
| 4                 | 0.831         |
| 5                 | 0.717         |
| 6                 | 0.621         |
| 7                 | 0.570         |
| 8                 | 0.524         |
| 9                 | 0.492         |
| 10                | 0.464         |

Tomados de King, E. P., *J. Am. Statist. Assoc.*, 1958, **48**, 531, con autorización de American Statistical Association.



**OFICINA DE ACREDITACION  
GUATEMALA, C.A.**

**OGA-GEC-016**

***“Política de Selección y Validación  
de Métodos de Ensayo ”***

Guatemala, 29 Enero 2007  
Versión 1

## **Política de la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA) Para la Selección y Validación de Métodos de Ensayo**

### **1 Preámbulo**

La utilización de métodos de ensayo, adecuados para el propósito, permite obtener resultados trazables con un nivel apropiado de incertidumbre; dichos resultados comúnmente son usados como base para la toma de decisiones financieras, regulatorias, etc., relacionadas con el desarrollo y fabricación de productos, así como con la prestación de servicios y otras actividades de importancia en las economías nacionales, regionales e internacionales.

Los métodos de ensayo seleccionados, sean éstos normalizados, no normalizados o desarrollados por el laboratorio, deben estar adecuadamente validados y documentados, previo a su uso. Debe mencionarse que actualmente no existe una sola fuente o autoridad reconocida a nivel internacional respecto a la validación de métodos de ensayo; por lo anterior, aunque hay avances, aún no existe acuerdo unánime entre las diferentes disciplinas, respecto a la interpretación de algunos términos relacionados con el proceso de validación y a la aplicación de los mismos.

### **2 Propósito**

El propósito del presente documento es definir una política para la selección y validación de métodos de ensayo a ser aplicada por la OGA en la evaluación de los laboratorios que le soliciten su acreditación, en evaluaciones de seguimiento y re evaluaciones.

Esta política es acorde a lo internacionalmente aceptado, y aplicado a nivel nacional, y por ello facilitará establecer los Acuerdos de Reconocimiento con la Cooperación Internacional para la Acreditación de Laboratorios (ILAC, por sus siglas en inglés), la Cooperación Interamericana de Acreditación (IAAC, por sus siglas en inglés) y otras Cooperaciones Regionales y Organismos Nacionales de Acreditación.

### **3 Introducción**

El reconocimiento formal de la competencia técnica de los laboratorios de ensayo es uno de los principales objetivos de la OGA, con el fin de que los resultados que estos organismos emitan sean aceptados a nivel nacional, regional e internacional.

El contenido de la política tratada en el presente documento es de carácter general y aplica a las distintas disciplinas cubiertas por los laboratorios de ensayo. A modo de ejemplo, en la sección de Fundamentos, Anexo 2 de este documento, se incluyen algunas de las interpretaciones y formas de aplicación de los términos relacionados con la validación y verificación de los métodos de ensayo, usuales en ciertas disciplinas.

Dada la situación internacional descrita en el preámbulo, existen factores fuera del alcance de la OGA que influyen en el desarrollo y la revisión de su política de selección y validación de los métodos de ensayo.

Los requisitos sobre la selección y validación de los métodos de ensayo, que deben cumplir los laboratorios, se exponen en el capítulo 5.4 Métodos de ensayo y calibración y validación

de métodos, de la Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025 “Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración”.

#### **4 Política de la OGA sobre la selección y validación de los métodos de ensayo**

Es común que para la determinación de cierto analito en un tipo específico de muestra haya varios métodos analíticos disponibles, de orígenes muy variados. Existen muchas entidades nacionales e internacionales que publican métodos para los diferentes campos analíticos (físicos, químicos y biológicos) y sus aplicaciones. El laboratorio usuario de la metodología debe evaluar los diferentes métodos disponibles y seleccionar aquel que mejor se adecue a las necesidades y los recursos del caso.

El método seleccionado debe haber sido validado como parte de su desarrollo. Además, como parte de la implementación del método, el laboratorio usuario debe verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación. La verificación del método, unida a la cualificación del equipo involucrado, permite evaluar el desempeño del sistema completo y, por ende, su adecuación al propósito del análisis, demostrando así el laboratorio usuario que domina el método y lo usa correctamente.

##### **4.1 Selección de los Métodos de Ensayo**

- Es responsabilidad del laboratorio utilizar los métodos apropiados para el propósito, según el alcance requerido. Estos métodos pueden ser normalizados, no normalizados o desarrollados por el propio laboratorio.  
*(Ver definiciones en Anexo 1)*
- El laboratorio, de común acuerdo con el cliente, puede seleccionar los métodos utilizando su propio criterio o utilizar aquellos métodos normalizados vigentes en el país.
- Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe demostrar que éste corresponde a la última edición, a menos que sea apropiado o posible el uso de una versión anterior del método.
- Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe establecer un sistema para evaluar la factibilidad de implementar los posibles cambios introducidos en las nuevas versiones del método, determinando las diferencias en cuanto a equipo, formación del personal, instalaciones, y demás aspectos necesarios para la ejecución del ensayo.

##### **4.1.1 Métodos Normalizados**

Las normas de calidad y regulaciones frecuentemente requieren el uso de métodos normalizados. A la vez, el uso de métodos normalizados es deseable en situaciones en las que el método será ampliamente utilizado; sin embargo, algunas veces el laboratorio puede contar con un método propio más adecuado para el propósito. Los métodos normalizados deben ser utilizados por el laboratorio exactamente como están descritos.

#### 4.1.2 Métodos No Normalizados

Los métodos no normalizados deben estar apropiadamente validados para poder utilizarlos, ya sean éstos desarrollados por un tercero o resultado de la modificación de un método normalizado. En el caso de modificaciones, es necesario demostrar que éstas no tienen una repercusión sobre la calidad de los resultados.

La nota del numeral 5.4.4 de la Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025, adoptada por la OGA como un criterio de acreditación para laboratorios de ensayo y calibración, establece que el laboratorio debe desarrollar un procedimiento de ensayo que incluya al menos la siguiente información, previo a la utilización de un nuevo método:

- la identificación apropiada;
- el alcance;
- la descripción del tipo de objeto a ensayar o a calibrar;
- los parámetros o magnitudes a ser determinados y los rangos correspondientes;
- los aparatos y equipos, incluyendo los requisitos de desempeño técnico;
- los patrones de referencia y materiales de referencia requeridos;
- las condiciones ambientales requeridas y cualquier período de estabilización necesario;
- la descripción del procedimiento, incluyendo:
  - la colocación de marcas de identificación, manejo, transporte, almacenamiento y preparación de ítems
  - la verificación a realizar antes de comenzar el trabajo
  - la verificación que el equipo está trabajando apropiadamente y, cuando sea necesario, ajustar y calibrar el equipo antes de cada uso
  - el método de registro de las observaciones y los resultados
  - las medidas de seguridad a observar
- los criterios o requisitos para la aprobación o el rechazo;
- los datos a ser registrados y el método de análisis y presentación;
- la incertidumbre o el procedimiento para estimarla.

Además, la documentación del método debe incluir las especificaciones principales resultantes de la validación.

#### 4.1.3 Métodos Desarrollados por el Laboratorio

- Cuando sea el caso, el laboratorio debe demostrar que tiene un plan en el que se incluye la evaluación de su capacidad en cuanto a personal, equipo y demás recursos que le permitan desarrollar métodos propios.
- Los métodos desarrollados por el laboratorio deben estar adecuadamente validados, documentados y autorizados antes de su uso. Cuando sea posible, se debe emplear material de referencia con una matriz equivalente a la de la muestra, o bien debe utilizarse un método de ensayo normalizado alterno, preferiblemente de diferente principio de medición, para comparar los resultados. Estos métodos deben cumplir al menos los mismos requisitos de documentación indicados en el numeral 4.1.2.

## 4.2 Validación de los Métodos de Ensayo

En el diseño y desarrollo de métodos, la etapa de validación consiste en el proceso de examinar el método para determinar su conformidad con el uso previsto. La validación normalmente se lleva a cabo sobre la versión final del método desarrollado, bajo condiciones de operación definidas; también puede ser necesario realizarla en etapas previas del proceso de desarrollo. Si existen diferentes usos previstos para el método, se deben llevar a cabo múltiples validaciones. Los parámetros de desempeño que se recomienda incluir en la validación y verificación de diferentes métodos de ensayo pueden ser, según el caso: exactitud, exactitud relativa, desviación, desviación positiva, desviación negativa, efecto matricial, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, sensibilidad, robustez y fortaleza (*ruggedness*), entre otras.

*(Ver definiciones en Anexo 1)*

La validación de los métodos de ensayo debe reflejar las condiciones reales de la aplicación de los mismos. Esto puede conseguirse utilizando, por ejemplo, muestras comerciales o preparadas en el laboratorio con un nivel conocido de la especie o analito de interés. El analista debe estar consciente que una muestra preparada en la matriz de interés sólo imita parcialmente a una muestra real; no obstante, en muchos casos, ésta es la mejor y la única opción disponible. La extensión de la validación depende del propósito del ensayo y de las propiedades del método analítico en cuestión.

Cuando aplique, la validación de un método debe incluir la estimación de la incertidumbre (ver OGA-GEC-015 Política sobre Incertidumbre de Medición para Laboratorios), y además abarcar factores que determinan la desviación (error sistemático) y la recuperación imperfecta (medición de la recuperación del analito con el que se haya enriquecido la muestra, medición de blancos, estudio de interferencias y efectos de matriz). Esta estimación también debe considerar aspectos como la homogeneidad y estabilidad de la muestra.

Los laboratorios deben conservar los datos sobre la validación de los sistemas de ensayo comerciales (kits) que utilicen, de preferencia remitidos por los fabricantes. Al presentarse el caso de no contar con los datos del fabricante, o no disponer de datos sobre validación generados por otra fuente, o si éstos no son plenamente aplicables, el laboratorio deberá desarrollar un procedimiento para calcular y evaluar los parámetros de desempeño que considere necesarios para asegurar la confiabilidad del sistema de ensayo comercial. Este procedimiento de validación puede incluir ejercicios de intercomparación.

El laboratorio que desarrolla o modifica un método analítico, o la entidad que lo publica, es responsable de su validación, para con ello demostrar que se adecua al propósito para el cual fue diseñado. El laboratorio que implementa un método analítico es responsable de verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación, tanto antes de ponerlo en uso como durante su utilización rutinaria, para demostrar que lo domina y usa correctamente.

A continuación se especifica lo anterior, para el caso de los métodos normalizados, no normalizados y desarrollados por el laboratorio usuario. (Ver, adicionalmente, las recomendaciones para el procedimiento de validación presentadas en el “Anexo 2. Fundamentos y aplicaciones”).

#### Caso 1 - Método Normalizado:

El laboratorio que va a utilizar un método normalizado debe verificarlo contra sus especificaciones de validación, atendiendo los requisitos para el aseguramiento de la calidad, y no necesita validarlo. Esta verificación permite demostrar que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente (el uso corresponde al propósito para el que fue desarrollado, con respecto a propiedad medida, matriz, rango, equipos utilizados, repetibilidad, etc.).

En la mayoría de los casos se puede considerar que en el desarrollo de los métodos normalizados se han tenido en cuenta todos los aspectos necesarios relativos a la validación. Al presentarse el caso de no haber evidencia suficiente para deducir que se ha llevado a cabo una correcta validación, el laboratorio usuario deberá definir un procedimiento para calcular y evaluar los parámetros de desempeño que considere necesarios para asegurar la confiabilidad del método.

#### Caso 2 - Método No Normalizado:

El laboratorio que va a modificar un método normalizado debe revalidarlo para demostrar que las especificaciones del método original no se ven afectadas por la modificación introducida. El nivel de revalidación requerido aumenta conforme la magnitud de los cambios realizados. Se consideran cambios menores, por ejemplo, la modificación del tamaño de la muestra y sustitución de reactivos. Se considera cambio mayor, por ejemplo, el cambio de procedimiento o equipo y cambios en el alcance (aplicación a matrices que no se especifican). Para demostrar que una versión modificada de un método cumple las mismas especificaciones que el método original, se deben realizar comparaciones utilizando réplicas. El diseño experimental y el análisis de los resultados deben ser estadísticamente válidos. El laboratorio usuario de un método normalizado modificado debe verificarlo contra sus especificaciones originales, o de revalidación, y así demostrar que domina el ensayo y lo utiliza correctamente.

En el caso de métodos no normalizados, los terceros que los desarrollan son responsables de incluir en dicho proceso la etapa de validación, para demostrar que el método cumple con los criterios de aceptación adecuados para el propósito de aplicación; el laboratorio usuario debe verificar el desempeño del método contra sus especificaciones de validación y así demostrar que domina el ensayo y lo realiza correctamente.

#### Caso 3 - Método desarrollado por el laboratorio:

El laboratorio que desarrolla y utiliza sus propios métodos debe validarlos, para demostrar que cumplen con los criterios de aceptación adecuados para el propósito de aplicación. Una vez está en uso el método, el laboratorio debe verificar su desempeño contra los parámetros de validación, para demostrar que sigue dominando el ensayo y lo realiza correctamente.

### **4.3 Revisión de los métodos de ensayo incluidos en el alcance**

Para cada sector técnico, la alta dirección debe nombrar a una persona experimentada como responsable de la revisión de los métodos, con el fin de incluir modificaciones,

actualizaciones o desarrollar e implementar nuevos métodos. Como parte de la revisión se debe incluir, pero no circunscribirse a, lo indicado a continuación.

- Para confirmar que el método se ajusta al uso previsto en el laboratorio es necesario determinar su desempeño (verificar) conforme una o una combinación de las siguientes técnicas, según lo establecido en la nota 2 del numeral 5.4.5.2 de la Norma COGUANOR NTG/ISO/IEC 17025, adoptada por la OGA como un criterio de acreditación para laboratorios de ensayo y calibración:
  - la calibración utilizando patrones de referencia o materiales de referencia;
  - la comparación con resultados obtenidos por otros métodos;
  - las comparaciones interlaboratorios (ver Política Ensayos de Aptitud, OGA-GAC-014);
  - la evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado;
  - la evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica.
- Aún cuando se haya realizado la validación del método, el laboratorio tendrá que verificar periódicamente que se cumplen los parámetros de desempeño documentados por parte de la organización que lo desarrolló, modificó y/o publicó. Para esta verificación el laboratorio puede utilizar, por ejemplo, muestras inoculadas o materiales de referencia incorporados a las matrices más representativas. También tiene que tomar en cuenta los resultados obtenidos de las auditorías internas y externas de sus sistemas de gestión, dejando registro de las verificaciones.
- La documentación de la modificación, actualización, validación y verificación del método debe incluir registros de la determinación de los parámetros de desempeño, limitaciones de su aplicabilidad, procedimientos para control de calidad, calibración y control de documentos. Estos registros deben estar disponibles a solicitud de los miembros del equipo evaluador durante las visitas en sitio, ya sea de evaluación para la acreditación, seguimiento o reevaluación.
- Los procedimientos y responsabilidades para el desarrollo, validación, verificación e implementación de los métodos deben ser descritos en detalle dentro de la documentación del sistema de calidad del laboratorio. Los diagramas de flujo son una herramienta para describir el procedimiento; para métodos complejos también se pueden utilizar programas informáticos de gestión de procesos. El personal responsable debe dejar establecidos los requisitos mínimos de calidad antes de empezar el proceso de validación e implementación del método, o mejor aún establecerlos antes de comenzar todo el proceso de desarrollo.

Para ensayos acreditados, cuando el método es modificado, actualizado o sustituido por uno nuevo, el caso debe ser analizado por la OGA, antes de que se pueda considerar incluido dentro del alcance de la acreditación, según se indica en los documentos OGA-PGE-006, Procedimiento General de Acreditación y OGA-PEC-007, Procedimiento de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración.

## 5 Vigencia y Revisiones

Esta política entrará en vigencia seis meses después de su publicación por parte de la OGA.

La OGA considera que esta política necesitará ser revisada y actualizada, conforme su aplicación y las tendencias internacionales pertinentes.

## 6 Referencias

APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20<sup>th</sup> Edition. American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Environment Federation. USA. 1998.

BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM:1993). ISO.

Brown, R., Caphart, M., Faustino, P., Frankewich, R., Gibbs, J., Leutzinger, E., Lunn, G. Ng, L., Rajagopalan, R., Chiu, Y., Sheinin, E. Analytical Procedures and Method Validation: Highlights of the FDA's Draft Guidance. LCGC Vol. 19, No. 1, 2001.

Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y. C., Zhang, X.M. (Eds.). Analytical Method Validation and Instrumentation Performance Verification. Wiley-Interscience. USA. 2004

CITAC/EURACHEM. Guide to Quality in Analytical Chemistry. An Aid to Accreditation. 2002.

COGUANOR. Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración.

COGUANOR. Norma COGUANOR NGR/ISO 9000:2000 Sistemas de Gestión de Calidad-Fundamentos y Vocabulario.

Dux, J. Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory. 2 Ed. Chapman & Hall. USA,1990

ENAC. CGA-ENAC-LEC:2001 Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración.

ENAC. G-ENAC-04:2002 Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Web Edition. 1998.

EURACHEM/CITAC. Traceability in Chemical Measurement, A guide to achieving comparable results in chemical measurement. 2003.

Garfield, F. M. Principios de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos. AOAC Internacional. EUA, 1993.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline Q2A Text on Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1994.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1994.

ILAC. ILAC-G18:2002 The Scope of Accreditation and Consideration of Methods and Criteria for the Assessments of the Scope in Testing.

ISO. Standard ISO/TR 13843:2000 Water quality – Guidance on Validation of Microbiological Methods.

IUPAC. Compendium on Analytical Nomenclature. Chap 18, QA Processes. Web Edition. 2002

Johnson, J. D., Van Buskirk, G. E. Analytical Method Validation. Journal of Validation Technology. Vol. 2, No. 2, 1996, p 88-105.

Kenkel, J. A Primer on Quality in the Analytical Laboratory. National Science Foundation / Lewis Publishers - CRC Press LLC. USA. 2000.

NCCLS. Approved Guideline Document GP21 A Quality System Model for Health Care. National Committee of Clinical Laboratory Standards (Samaza, K, Ed.). USA. 1999.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. Fundamentals of Analytical Chemistry. 6<sup>th</sup>. Ed. Saunders College Publishing. USA. 1992.

USP. United States Pharmacopeia 28 and National Formulary 23. United States Pharmacopeial Convention. USA. 2005

---