



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

**VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR
ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE PARA DETERMINAR BORO EN SUELOS**

Brenda Carolina González Dorantes

Asesorado por la Inga. Carmen Elizabeth Cifuentes Castillo

Guatemala, mayo de 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR
ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE PARA DETERMINAR BORO EN SUELOS**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

BRENDA CAROLINA GONZÁLEZ DORANTES
ASESORADO POR LA INGA. CARMEN ELIZABETH CIFUENTES CASTILLO

AL CONFERÍRSE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, MAYO DE 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL I	Ing. Angel Roberto Sic García
VOCAL II	Ing. Pablo Christian de León Rodríguez
VOCAL III	Ing. Elvia Miriam Ruballos Samayoa
VOCAL IV	Br. Raúl Eduardo Ticún Córdova
VOCAL V	Br. Henry Fernando Duarte García
SECRETARIA	Inga. Lesbia Magalí Herrera López

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía
EXAMINADOR	Ing. Estuardo Edmundo Monroy Benítez
EXAMINADOR	Ing. Erwin Manuel Ortiz Castillo
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:

VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE PARA DETERMINAR BORO EN SUELOS

Tema que me fue asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha enero de 2014.


Brenda Carolina González Dorantes

Guatemala, 8 de enero del 2016

Ingeniero Carlos Salvador Wong Davi
Director de la Escuela de Ingeniería Química.
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente.

Por este medio hago de su conocimiento que habiendo asesorado y realizado las revisiones pertinentes doy mi aprobación al informe final de trabajo de graduación **“Validación y Comparación de Dos Métodos Analíticos por Espectrofotometría Visible Para Determinar Boro en Suelos”**, elaborado por la estudiante de Ingeniería Química Brenda Carolina González Dorantes, quien se identifica con el número de carné 200515955.

Por la atención a la presente muy agradecida

Atentamente



Ingeniera Química

Carmen Elizabeth Cifuentes Castillo

Colegiado No. 1,160

Inga. Carmen E. Cifuentes Castillo
INGENIERA QUÍMICA
COLEGIADA No. 1,160



Guatemala, 25 de febrero de 2016.
 Ref. EIQ.TG-IF.009.2016.

Ingeniero
 Carlos Salvador Wong Davi
 DIRECTOR
 Escuela de Ingeniería Química
 Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Wong:

Como consta en el registro de evaluación del informe final EIQ-PRO-REG-007 correlativo **143-2013** 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: **Brenda Carolina González Dorantes**.
 Identificada con número de carné: **2005-15955**.
 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:

VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE PARA DETERMINAR BORO EN SUELOS

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por la Ingeniera Química: **Carmen Elizabeth Cifuentes Castillo**.

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"

[Handwritten signature]

Ing. César Alfonso García Guerra
 COORDINADOR DE TERNA
 Tribunal de Revisión
 Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



Ref.EIQ.TG.031.2016

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, **BRENDA CAROLINA GONZÁLEZ DORANTES** titulado: **"VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE PARA DETERMINAR BORO EN SUELOS"**. Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

"Id y Enseñad a Todos"

Ing. Carlos Salvador Wong Davi
Director
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, mayo 2016

Cc: Archivo
CSWD/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: **VALIDACIÓN Y COMPARACION DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE PARA DETERMINAR BORO EN SUELOS**, presentado por la estudiante universitaria: **Brenda Carolina González Dorantes**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, se autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
Decano



Guatemala, mayo de 2016

/cc

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Creador y dador de vida. Bondad infinita, a quien debo la culminación de mi meta personal.
- Mis padres** Javier González y Julia Dorantes, por su amor infinito e incondicional, por caminar conmigo en todas las etapas de mi vida.
- Mis hermanos** Merlyn y Marwin González, por todos estos años de amistad y crecimiento personal.
- Mis sobrinos** Marcela y Sofía Ambrosio, Marco González (q. e. p. d.) y Ana Julia Cálix, por ser mis angelitos de la guarda y mi motivo para ser mejor persona.
- Mis amigos** Por su influencia positiva en mi vida, sabios consejos y buenos momentos en armonía.

AGRADECIMIENTOS A:

- Dios** Porque me has prestado la vida y me has permitido culminar con éxito esta meta personal, por prestarme a mis padres tan maravillosos, por darme a mis angelitos de la guarda y por no abandonarme en mi camino.
- Mis padres** Por su esfuerzo, su sacrificio y su amor. Por ser mi fortaleza y consuelo en el fracaso y mi alegría en el éxito.
- Mis hermanos** Por estar conmigo en cada paso de mi vida, por ser mis amigos y mi apoyo cuando no tengo fuerzas para seguir.
- Karla Mis** Por vivir conmigo la aventura de la vida universitaria. Por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores, y por ser mi compañera de viaje.
- Mis amigos** Por ser mis hermanos del alma y por su apoyo incondicional, y por los momentos inolvidables que compartimos. Son un tesoro de vida.
- Ing. Carmen Cifuentes** Por su valiosa asesoría y conocimientos compartidos en el presente trabajo.

Facultad de Ingeniería

Por ser el lugar que me brindó la luz del conocimiento en mi carrera profesional.

**Universidad de San
Carlos de Guatemala**

Por ser la mejor universidad del país, y una importante influencia en mi carrera.

**Mis compañeros de
trabajo**

Por su cariño, los ánimos, apoyo e insistencia, pues me ayudaron a llegar al final de mi meta.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	VII
LISTADO DE SÍMBOLOS.....	IX
GLOSARIO.....	XI
RESUMEN.....	XVII
OBJETIVOS.....	XIX
Hipótesis.....	XX
INTRODUCCIÓN.....	XXI
1. ANTECEDENTES.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Suelo.....	3
2.1.1. La fase sólida.....	5
2.1.2. La fase líquida.....	6
2.1.3. La fase gaseosa.....	6
2.1.4. Composición y propiedades del suelo.....	7
2.1.4.1. Propiedades físicas.....	7
2.1.4.2. Características mineralógicas.....	14
2.1.4.3. Características químicas.....	14
2.2. Boro.....	17
2.2.1. Funciones en la planta.....	19

2.3.	Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible	20
2.3.1.	Espectro electromagnético	21
2.3.1.1.	Región ultravioleta (de 190 a 320 nm) .	22
2.3.1.2.	Región visible (de 320 a 750 nm)	23
2.3.2.	Transmitancia y absorbancia.....	25
2.3.2.1.	Tipos de absorción	27
2.3.3.	Desviaciones de la Ley de Beer	30
2.3.3.1.	Desviaciones reales	31
2.3.3.2.	Desviaciones instrumentales.....	32
2.3.3.3.	Desviaciones químicas.....	34
2.3.3.4.	Errores personales	36
2.3.4.	Análisis cuantitativo	37
2.3.5.	Análisis cualitativo	37
2.3.6.	Errores asociados a los métodos espectrofotométricos	38
2.4.	Espectrofotómetro	40
2.4.1.	Uso de celdas.....	41
2.4.2.	Limpieza de celdas.....	42
2.4.3.	Espectrofotómetro UV-Visible, Lambda 25.....	43
2.5.	Métodos utilizados.....	45
2.5.1.	Determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)	45

2.5.1.1.	Preparación de reactivos para la solución extractora.....	45
2.5.1.2.	Preparación de la solución extractora..	46
2.5.1.3.	Preparación de la solución patrón madre, intermedia y soluciones estándar.....	46
2.5.1.4.	Preparación de reactivos para la lectura en el espectrofotómetro de UV-visible.....	47
2.5.1.5.	Preparación de la curva de calibración	49
2.5.1.6.	Preparación de las muestras	49
2.5.2.	Determinación de boro en agua caliente, usando calentamiento con microondas	50
2.5.2.1.	Preparación de la solución extractora..	52
2.5.2.2.	Procedimiento para la preparación de muestras	52
2.5.2.3.	Preparación de soluciones para la determinación de boro por espectrofotometría por el método de azometina H.....	53
2.5.2.4.	Procedimiento para la lectura en el espectrofotómetro.....	54
2.6.	Validación de métodos analíticos	55
2.6.1.	Estadística básica.....	55
2.6.1.1.	Media.....	55
2.6.1.2.	Desviación estándar (σ , S)	56

	2.6.1.3.	Coeficiente de variación (CV).....	56
	2.6.1.4.	Varianza	56
	2.6.1.5.	Distribución normal.....	57
	2.6.1.6.	Nivel de significancia (Alfa, σ)	58
	2.6.1.7.	Factor de cobertura	59
2.6.2.		Pruebas de significancia.....	59
	2.6.2.1.	Prueba t-Student	61
	2.6.2.2.	Prueba F de Fisher.....	61
2.6.3.		Validación.....	62
	2.6.3.1.	Selectividad	66
	2.6.3.2.	Linealidad	66
	2.6.3.3.	Sensibilidad	69
	2.6.3.4.	Límites.....	69
	2.6.3.5.	Exactitud.....	73
	2.6.3.6.	Veracidad	73
	2.6.3.7.	Precisión.....	77
	2.6.3.8.	Robustez	78
	2.6.3.9.	Aplicabilidad	80
	2.6.3.10.	Incertidumbre	81
3.		DISEÑO METODOLÓGICO.....	87
	3.1.	Variables independientes	87
	3.2.	Delimitación del campo de estudio.....	89
	3.3.	Recursos humanos disponibles	89

3.4.	Recursos materiales disponibles	90
3.4.1.	Materia prima.....	90
3.4.2.	Cristalería	90
3.4.3.	Equipo	92
3.4.4.	Reactivos	93
3.4.5.	Laboratorios.....	93
3.5.	Técnica de investigación	94
3.5.1.	Técnica cuantitativa	94
3.6.	Recolección y ordenamiento de la información	94
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procedimiento de la información.	97
3.8.	Análisis estadístico	97
4.	RESULTADOS	99
4.1.	Selectividad	99
4.2.	Linealidad	100
4.3.	Sensibilidad	100
4.4.	Límites	101
4.5.	Exactitud.....	101
4.5.1.	Precisión.....	102
4.5.2.	Veracidad.....	103
4.6.	Robustez	104
4.7.	Análisis de varianza.....	105
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	107

CONCLUSIONES..... 115

RECOMENDACIONES 117

BIBLIOGRAFÍA..... 119

APÉNDICES..... 123

ANEXOS..... 129

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Ciclos e intercambios de materia y energía entre la atmósfera, el suelo, la corteza y los seres vivos.....	4
2.	Esquema de las fases del suelo.....	5
3.	Triángulo de textura, según la clasificación USDA.....	10
4.	Capacidad de intercambio catiónico del suelo.....	16
5.	Espectro electromagnético.....	22
6.	Estructura general de una lámpara de arco.....	23
7.	Espectro de la intensidad de radiación de una lámpara de acero de deuterio (izquierda), tal como una lámpara de filamento de tungsteno (derecha).....	25
8.	Absorción por radiación.....	27
9.	Desviación de la Ley de Beer.....	31
10.	Influencia de radiación policromática sobre la Ley de Beer.....	33
11.	Celda de medición.....	42
12.	Espectrofotómetro UV-Visible, Lambda 25.....	44
13.	Distribución normal con tres desviaciones.....	58
14.	Ejemplos de hipótesis alternativas.....	60
15.	Diagrama de flujo para la validación de métodos analíticos.....	63
16.	Establecer rango lineal.....	68
17.	Curva de calibración.....	68
18.	Respuesta en función de la concentración.....	70
19.	Exactitud, veracidad y precisión.....	74
20.	Diagrama de Ishikawa.....	83

21.	Tipos de error.....	84
22.	Pasos para la determinación de la incertidumbre.....	85
23.	Incertidumbre de la medición.....	86
24.	Diagrama de flujo, método fosfato ácido de calcio hidratado.....	95
25.	Diagrama de flujo, método agua caliente.....	96

TABLAS

I.	Clasificación de partículas según su tamaño.....	7
II.	Propiedades de los suelos según su color.....	11
III.	Propiedades de los suelos según su diámetro de poro	13
IV.	Longitud de onda con relación al color.....	24
V.	Concentración de uso de azometina.....	49
VI.	Preparación de las soluciones estándar.....	54
VII.	Parámetro a evaluar en la validación de métodos.....	65
VIII.	LOD en función de LMP.....	71
IX.	LOQ en función de LMP.....	72
X.	Recursos humanos	90
XI.	Cristalería disponible.....	91
XII.	Resultados selectividad.....	99
XIII.	Resultados linealidad.....	100
XIV.	Resultados de sensibilidad.....	101
XV.	Resultados de LC, LOD y LOQ.....	101
XVI.	Precisión según repetibilidad.....	102
XVII.	Precisión según reproducibilidad.....	102
XVIII.	Veracidad según sesgo.....	103
XIX.	Veracidad según recuperación.....	103
XX.	Resultados de robustez.....	104
XXI.	Análisis de varianza.....	105

LISTADO DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
B	Boro
cm³	Centímetros cúbicos
Σ	Error alfa
B	Error beta
Std	Estándar
°C	Grados centígrados
G	Gramos
LPM	Límite máximo permitido
LMR	Límite máximo residual
L	Litros
M	Media
M	Metro
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
Nm	Nanómetro
Ppm	Partes por millón
UV	Ultravioleta
W	Watts

GLOSARIO

Absorción	Operación unitaria que consiste en la separación de uno o más componentes de una mezcla gaseosa con ayuda de un solvente líquido con el cual forma solución. Este proceso implica una difusión molecular turbulenta o una transferencia de masa del soluto A a través del gas B, que no se difunde y está en reposo, hacia un líquido C, también en reposo.
Adsorción	Proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material, en contraposición a la absorción que es un fenómeno de volumen. Es decir, es un proceso en el cual, por ejemplo, un contaminante soluble es eliminado del agua mediante el contacto con una superficie sólida.
Aforar	Calcular la capacidad de una cosa, especialmente de un recipiente.
Alcalinidad	Capacidad del agua para neutralizar ácido o aceptar protones.
Alícuota	Volumen de líquido que corresponde a una fracción conocida de un volumen más grande.

Anhidros	Sustancia sólida que ha perdido toda el agua de cristalización. Se aplica principalmente a sales.
Aplicabilidad	Cuando un método de análisis puede utilizarse satisfactoriamente para los analitos, matrices y concentraciones previstas.
Coloides	Sustancia dispersa en un medio de dispersión continuo, no forma una auténtica disolución, aunque presenta cierta homogeneidad. Un coloide se caracteriza por la velocidad lenta de difusión de sus partículas y por mostrar el camino seguido por un rayo luminoso cuando penetra en su interior. Suele tener carga negativa, si se consigue neutralizar se produce una floculación.
Cromatografía	Conjunto de técnicas de separación de los componentes de una mezcla en una disolución, basada en las diferentes velocidades con las que se mueven los componentes de una mezcla a través de una sustancia o fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser una sustancia sólida o líquida y la fase móvil líquida o gaseosa.
Cuantificar	Expresar numéricamente una magnitud.
Distribución gaussiana	También conocida como distribución normal, se utiliza para estimar los errores en observaciones enormes. En el que la campana en forma de curva,

se utiliza para representar la distribución de la función de probabilidad.

Ebullición

Cambio de estado de líquido a gas que se produce a una temperatura determinada o en toda la masa del líquido, se dice que el líquido hierve. Esto sucede porque, al aumentar la temperatura, las partículas del líquido adquieren más energía cinética, llega un momento en que todas son capaces de romper las fuerzas de unión del estado líquido y pasan al estado gaseoso.

Edafología

Ciencia que estudia el origen y las propiedades fisicoquímicas de los suelos y la interacción suelo – agua – planta.

Elemento lipofílico

Comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por los lípidos. En una disolución o coloide, las partículas lipófilas tienden a acercarse y mantener contacto con los lípidos.

Espectrofotometría

Medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda; es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y bioquímicas.

Límites

El valor de la concentración que en caso de estar por arriba o por debajo de la misma da lugar a la decisión

de que la concentración o cantidad del analito presente en el material analizado es superior o inferior a la contenida en el material testigo.

Linealidad

Capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta instrumental que sea proporcional a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

Lixiviación

Proceso mediante el que las sustancias disueltas son arrastradas por el agua a través de las diversas capas de suelo.

Medio acuoso

Que se encuentra disuelto en agua.

Metamorfosis

Transformación que experimentan determinados animales en su desarrollo biológico y que afecta no solo a su forma sino también a sus funciones y su modo de vida; es típica de los poliquetos, equinodermos, insectos, crustáceos y anfibios.

Micronutrientes

Sustancias que el organismo de los seres vivos necesitan en pequeñas dosis.

Nódulos

Concreción contenida en algunas rocas o que se ha formado en el fondo del mar.

Poliatómicos	También conocido como ion molecular, es un ion compuesto por dos o más átomos covalentes enlazados o de un complejo metálico que puede considerarse como una sola unidad, en el contexto de química de ácidos y bases o en la formación de sales.
Poliétileno	Polímero preparado a partir de etileno.
Precisión	Se refiere a la dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud. Cuanto menor es la dispersión mayor la precisión.
Radiación	Emisión y propagación de la energía que se transmite por el espacio sin necesidad de transporte material. Una radiación se propaga en forma de ondas definidas por la frecuencia, la longitud de onda, la intensidad y la energía.
Robustez	Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método.
Selectividad	Grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes.

Sensibilidad	Cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición.
Tóxico	Sustancia que es venenosa o que puede causar trastornos o la muerte a consecuencia de las lesiones debidas a un efecto químico.
Tubo polínico	Prolongación en forma de tubo que emiten los granos de polen luego de aterrizar en los estigmas de las flores y que actúa como un transporte de los gametos masculinos desde el grano del polen hasta el óvulo.
Veracidad	Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado.

RESUMEN

Teniendo como objetivo principal el comparar dos métodos analíticos por espectrofotometría visible para extraer boro en suelos, se realizó una serie de análisis en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Especiales (Analab, Anacafé). Los métodos a comparar fueron “determinación de boro en agua caliente, usando calentamiento con microondas” al cual se le determinó método uno, y “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)”, al cual se le determinó método dos, para simplificar su identificación a lo largo del informe.

El método uno consistió en extraer boro del suelo por medio de una solución extractora compuesta por cloruro de bario. Aunque el nombre del método indica que se realiza con agua caliente, esto fue modificado por los autores del método, pues especificaron que funciona mejor con cloruro de bario. A las muestras de suelo se les agrega la solución extractora y una pequeña cantidad de carbón activado para ser ingresadas al microondas, en el que se realizará la extracción.

En el método uno se indica que las muestras deben ingresarse al microondas en bolsas de polipropileno. En este paso se realizó la primera variación del método, pues el microondas que se encuentra en Anacafé para realizar extracciones tiene tubos de polipropileno (libres de boro) en los cuales se puede realizar la extracción sin ninguna complicación.

Al tener completo el tiempo de extracción (5 min de calentamiento más 30 min de enfriamiento en el microondas) se procedió a filtrar las muestras. De

este filtrado se tomó una alícuota para ser analizada en el espectrofotómetro. Es recomendable que tanto las soluciones extractoras como las soluciones para la lectura en el espectrofotómetro sean preparadas meticulosamente, pues las concentraciones son tan bajas que por pequeño que sea el exceso o deficiencia causará un impacto significativo en los resultados.

Se debe agregar la cantidad exacta que indica el método de las soluciones para lectura y respetar el tiempo de reacción (reacción colorimétrica) que indica el método. Al realizar las lecturas en el espectrofotómetro, se debe tener especial cuidado con las celdas para lectura, pues deben ser lavadas con ácidos especiales para evitar contaminantes que causen interferencias en los resultados.

El método dos es el que se utiliza actualmente en el Analab, consiste en agregar una solución extractora preparada con fosfato ácido de calcio hidratado, se deben agitar las muestras por treinta minutos y se realiza el filtrado de la misma manera que para el método uno. La diferencia entre ambos métodos radica principalmente en la solución extractora y el tiempo de reacción (reacción colorimétrica) que tienen con las soluciones para lectura.

Por medio de los análisis realizados se obtuvieron una serie de resultados, a los cuales se les aplicaron los parámetros de validación: selectividad, linealidad, sensibilidad, límites, precisión, veracidad, robustez y aplicabilidad, con la finalidad de determinar cuál de los dos métodos presenta la mejor opción técnica para su utilización en dicho laboratorio. Se realizó una comparación entre los parámetros obtenidos para cada uno de los métodos, resultando que el método uno es el que presenta la mejor opción, puesto que es el que presenta el menor coeficiente de variación en los parámetros de validación: recuperación, repetibilidad y reproducibilidad.

OBJETIVOS

General

Validar y comparar dos métodos analíticos por espectrofotometría visible para la extracción de boro del suelo, por medio de los parámetros de análisis estadístico.

Específicos

1. Determinar para el método “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)” los parámetros de validación: selectividad, linealidad, sensibilidad, límites, precisión, veracidad, robustez y aplicabilidad.
2. Determinar para el método “determinación de boro en agua caliente, usando calentamiento con microondas” los parámetros de validación: selectividad, linealidad, sensibilidad, límites, precisión, veracidad, robustez y aplicabilidad
3. Comparar ambos métodos según los parámetros de validación definidos.
4. Determinar, según los datos obtenidos, el método que presenta la mejor opción técnica para su utilización en el laboratorio.

Hipótesis

Hipótesis científica

Los métodos utilizados pueden variar con base en la solución extractora utilizada, la concentración y calidad del boro extraído del suelo.

Hipótesis estadística

- Hipótesis nula

Se puede demostrar, por medio de la validación, que los métodos “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)”, y “determinación de boro en agua caliente usando calentamiento con microondas”, para la extracción de boro del suelo, no difieren estadísticamente en la expresión de resultados y en la factibilidad técnica.

$$\mu_0 = \mu_1$$

- Hipótesis alternativa

Se puede demostrar, por medio de la validación, que los métodos “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)”, y “determinación de boro en agua caliente usando calentamiento con microondas”, para la extracción de boro del suelo, difieren estadísticamente en la expresión de resultados y en la factibilidad técnica.

$$\mu_0 \neq \mu_1$$

INTRODUCCIÓN

Para realizar una investigación acerca de validación de métodos analíticos, es necesario saber con exactitud ¿qué es validar?, ¿por qué se va a validar?, ¿para qué se va a validar?, y ¿cómo se va a validar? Para efectos de esta investigación, se busca validar dos métodos para la extracción de boro del suelo. El primero es el método que actualmente se utiliza en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Especiales, el cual lleva por nombre “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible) y el segundo es el denominado “determinación de boro en agua caliente usando calentamiento con microondas”.

Por experiencia se sabe que la validación analítica es necesaria para generar confianza en los resultados obtenidos con determinado método, el cual, a su vez, es reproducible. La validación tiene generalmente como objetivo comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente. En caso de tratarse de un método normalizado-modificado, para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo. En ocasiones, lo que se busca a través de una validación es demostrar que un método es equivalente a otro.

El objetivo de la validación y la verificación es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así como demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados entregados.

1. ANTECEDENTES

En el Laboratorio de Suelos, Plantas y Especiales (Analab) no existe ningún estudio previo realizado sobre la comparación de métodos para la extracción de boro en suelos. Actualmente, en Analab se utiliza el método “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)”, el cual consiste en agregar determinada cantidad de solución extractora a una muestra de suelo, se agita y se filtra según lo indicado en la metodología. Se toma una alícuota del filtrado y se realiza una comparación gráfica entre la absorbancia en función de la concentración, en partes por millón, tanto para las soluciones estándar como para las muestras de suelo que se requieren analizar.

En Analab se utiliza el método con ortofosfato diácido de calcio monohidratado porque del extracto que se obtiene de la muestra de suelo se pueden analizar dos elementos, boro y azufre. En otros países, el método de referencia consiste en extraer el boro con cloruro de bario, el cual requiere un horno microondas adaptado para colocar las muestras de suelo con la solución extractora.

Al ser el boro un elemento muy inestable, es preciso contar con un método que presente el menor error en el momento de la determinación de la cantidad de dicho elemento presente en el suelo. Es por esta razón que se necesita hacer un análisis estadístico, para poder así, por medio de la validación, determinar cuál es el método indicado que satisface las necesidades del laboratorio, para realizar dicho análisis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Suelo

Desde el punto de vista científico, el suelo constituye el objeto de estudio de la edafología, la cual lo define como "ente natural organizado e independiente, con unos constituyentes, propiedades y génesis que son el resultado de la actuación de una serie de factores activos (clima, organismos, relieve y tiempo) sobre un material pasivo (la roca madre)".¹ El suelo forma un sistema abierto a la atmósfera y la corteza que almacena de forma temporal los recursos necesarios para los seres vivos (ver figura 1).

La definición de suelo que se considera bastante completa por las conclusiones que de ella pueden obtenerse es: "Suelo es una delgada capa sobre la corteza terrestre de material que proviene de la desintegración y/o alteración física y/o química de las rocas y de los residuos de las actividades de los seres vivos que sobre ella se asientan".²

Existen tres tipos de roca que conforman la corteza de la tierra:

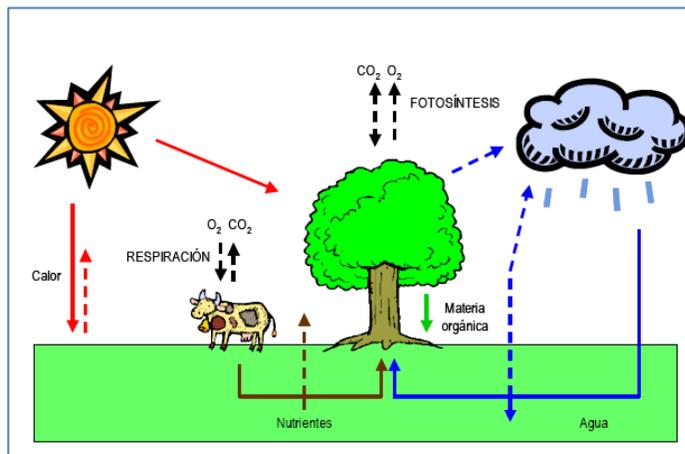
- La roca ígnea que es material de lava solidificada, se clasifica de acuerdo con las dos bases siguientes: la química (mineralógica) y la textural.
- La roca sedimentaria que es el resultado de la acción del clima sobre las rocas ya existentes. El material sedimentario se divide en dos clases: materia mineral disuelta, que es precipitada por agentes inorgánicos u

¹ FARRERA, Renne. *Parámetros fisiológicos del café*. p. 4.

² Op Cit. p. 5.

orgánicos, y fragmentos sólidos o sedimentos, los cuales se acumulan para formar una roca.

Figura 1. **Ciclos e intercambios de materia y energía entre la atmósfera, el suelo, la corteza y los seres vivos**



Fuente: PARRA, Antonio. *Los suelos y la fertilización del olivar cultivado en zonas calcáreas*.
<http://goo.gl/iYFYDM>. Consulta: 18 de septiembre de 2013.

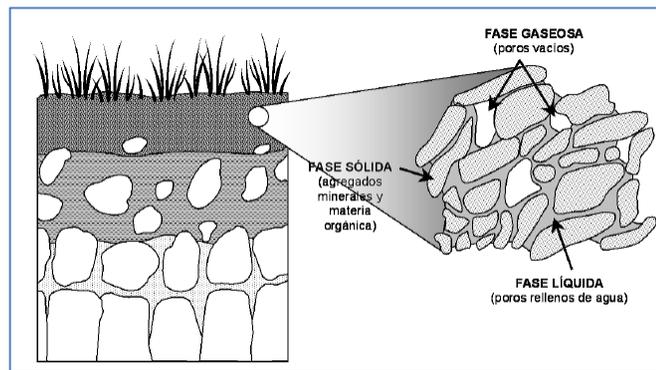
- La roca metamórfica que originalmente fue roca sedimentaria o ígnea pero que fue modificada por la temperatura, la presión y fluidos químicos activos.

El metamorfismo se caracteriza por el desarrollo de texturas y minerales nuevos, o ambos, y estos son, por lo regular, tan distintos a los originales, que es frecuentemente difícil determinar la naturaleza de la roca original.

Si se considera al suelo como un sistema disperso, este está constituido por tres fases: sólida, líquida y gaseosa.

En volumen, la fase sólida ocupa aproximadamente el 50 % del total, mientras que las fases gaseosa y líquida se reparten el resto del espacio disponible.

Figura 2. **Esquema de las fases del suelo**



Fuente: VAN RAIJ, Bernardo. *Análisis químico para la evaluación de fertilidad de suelos tropicales*. p. 235.

2.1.1. **La fase sólida**

Está formada por los productos de desintegración de las rocas y por nuevos minerales formados por síntesis en la parte inorgánica de la desintegración. La fase sólida representa la fase más estable del suelo y, por lo tanto, es la más representativa y la más ampliamente estudiada. Es una fase muy heterogénea, formada por constituyentes inorgánicos y orgánicos.

La disposición y acomodación de las partículas de la fase sólida del suelo determina una serie de características físicas del suelo, como:

- Estructura
- Porosidad
- Permeabilidad
- Densidad

2.1.2. La fase líquida

Está constituida principalmente por agua que puede llevar disueltas sustancias, dando lugar a la solución del suelo. El agua del suelo transporta en disolución nutrientes, sales solubles, compuestos orgánicos solubles y contaminantes, así como materia en suspensión y permite su absorción por las raíces. Desde el punto de vista de la fertilidad física, la humedad del suelo controla su consistencia, penetrabilidad por las raíces, temperatura, entre otros. De esta forma, el adecuado manejo de suelo requiere un conocimiento de la dinámica del agua en el suelo.

2.1.3. La fase gaseosa

La fase gaseosa se localiza en los poros del suelo, el oxígeno es esencial para los procesos aerobios que tienen lugar en el suelo. Por esta razón, es importante mantener los suelos cultivados con un buen nivel de aireación. Como promedio, la fase gaseosa ocupa aproximadamente un 25 % del volumen del suelo. Una proporción inferior al 10 % se considera perjudicial.

La fase gaseosa es formada por la atmósfera del suelo. Es necesaria una relación determinada entre las fases, líquida y gaseosa, para que se alcance una formación óptima del suelo.

2.1.4. Composición y propiedades del suelo

Los suelos se componen de partículas minerales, materia orgánica y aire en proporciones variables. Cada suelo presenta unas propiedades físicas, químicas y biológicas definidas, las cuales determinan, a su vez, sus cualidades agrícolas.

2.1.4.1. Propiedades físicas

Suelen ser de carácter permanente o difícil de modificar. Las propiedades físicas del suelo que tienen mayor incidencia en el uso de los suelos son:

- Textura

Las partículas que constituyen la tierra fina de un suelo se pueden agrupar en tres fracciones: arena, limo y arcilla. La clasificación internacional que se ha hecho del tamaño de estas partículas es la siguiente:

Tabla I. **Clasificación de partículas según su tamaño**

Partículas	Límite del diámetro
Arena gruesa	2.00 - 0.20 mm
Arena fina	0.20 – 0.02 mm
Limo	0.02 – 0.002 mm
Arcilla	< 0.002 mm

Fuente: VAN RAIJ, Bernardo. *Análisis químico para la evaluación de fertilidad de suelos tropicales*. p. 236.

Según la cantidad que tenga un suelo de cada una de estas partículas, presentará diferentes características y recibirá distinto nombre. Las fracciones arena y limo, en relación al gran tamaño de partícula, presentan una escasa superficie específica (superficie por unidad de masa) y, en consecuencia, son muy poco activas físicoquímicamente y apenas contribuyen a aquellas propiedades del suelo que están ligadas a la superficie de la interfase sólido-líquido.

Existe un triángulo de texturas (ver figura 3) con el cual se presentan todas las combinaciones de posibles partículas y todos los nombres que estas combinaciones de partículas reciben. Según este triángulo, un suelo que tenga una cantidad de 25 % de arcilla, 20 % de limo, y 55 % de arena, tendrá una clase textural llamada franco arcillo arenosa. Un suelo con 55 % de arcilla, 75 % de limo, 20 % de arena, tendrá una clase textural franco limosa. Uno con 60 % de arcilla, 20 % de limo y 20 % de arena será un suelo arcilloso.

Por otro lado, los suelos que poseen una composición equilibrada de arena, limo y arcilla se conocen como suelos francos (una composición equilibrada no quiere decir un reparto equitativo entre las tres fracciones).

- Estructura

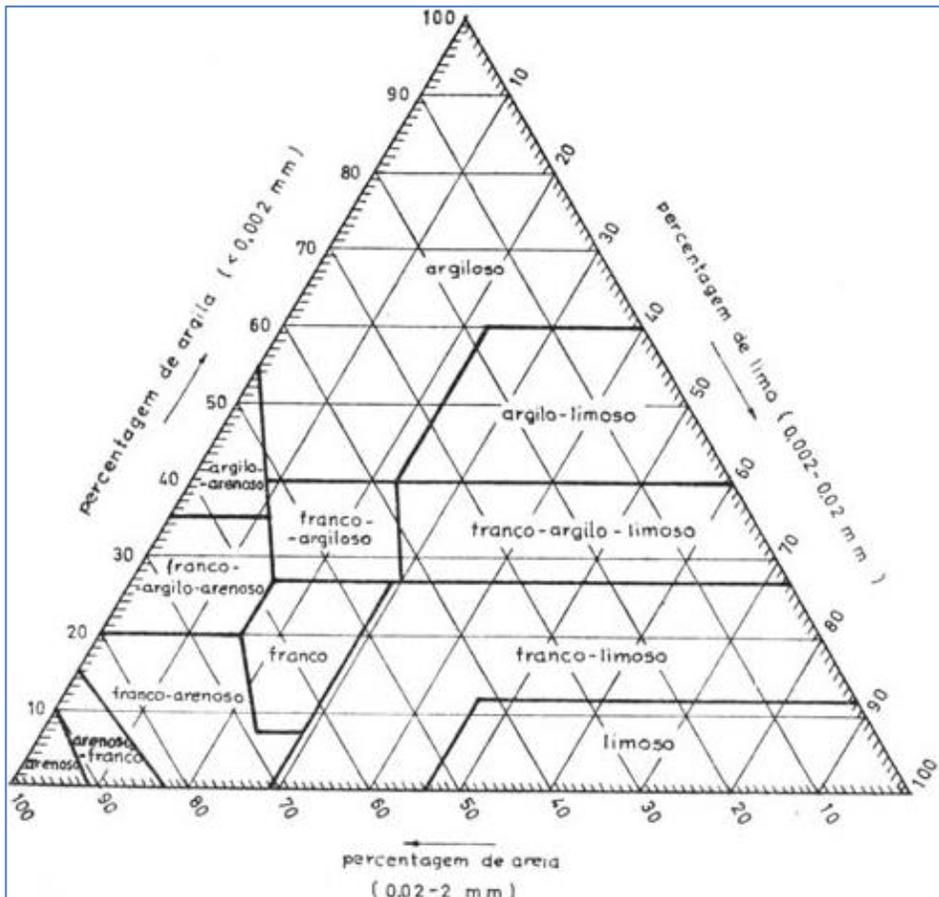
Es la ordenación de las partículas minerales individuales del suelo (arena, limo y arcilla) en unidades de mayor tamaño, denominadas agregados. Las partículas individuales que forman los agregados se mantienen unidas entre sí, de forma más o menos estable, gracias a la acción de agentes agregantes. Los principales agentes agregantes del suelo son la materia orgánica y los óxidos de hierro.

- Según la forma de los agregados, se distinguen los siguientes:
 - Laminar: agregados de forma aplanada dispuestos horizontalmente.
 - En bloques: agregados poliédricos equidimensionales.
 - Prismáticas: agregados en forma de prismas dispuestos verticalmente.
 - Columnar: parecida a la prismática, pero los prismas tienen sus cúpulas redondeada.
 - Granular: agregados en forma de esferas imperfectas de pequeño tamaño.

- Según el tamaño de los agregados, la estructura puede ser:
 - Fina
 - Media
 - Gruesa

- Según el grado de desarrollo, la estructura puede ser:
 - Fuerte
 - Moderada
 - Débil
 - Sin estructura

Figura 3. **Triángulo de textura, según la clasificación USDA**



Fuente: VAN RAIJ, Bernardo. *Análisis químico para la evaluación de fertilidad de suelos tropicales*. p. 237.

El grado de desarrollo de la estructura y la coherencia de los agregados depende del tipo de partículas presentes y de las fuerzas de atracción o repulsión que tengan lugar. El empaquetamiento es un proceso físico que tiene lugar entre partículas en las que las fuerzas de atracción/repulsión son despreciables por la ausencia de carga eléctrica, como ocurre entre los granos de arena. En los suelos arenosos pueden existir fuerzas de cohesión entre las

partículas debido a la tensión superficial de la película de agua adsorbida en la superficie de los granos, lo que provoca una cierta capacidad de unión.

- Color

Es una propiedad de los suelos que se debe principalmente a su composición mineralógica, contenido de materia orgánica y condiciones de aireación. El color claro del suelo puede estar dado, tanto por la presencia de minerales claros, como de sales, carbonatos y sulfatos, estos suelos indican un deficiente nivel de fertilidad; por lo tanto requieren de enmiendas orgánicas o químicas.

Tabla II. **Propiedades de los suelos según su color**

Color	Propiedades del suelo
Oscuro o negro	Normalmente se debe a la presencia de materia orgánica, de forma que cuanto más oscuro es el horizonte superficial más contenido en materia orgánica se le supone. Si el color oscuro se restringe a nódulos y películas se le atribuye a los compuestos de hierro y, sobre todo, del manganeso. Manifiesta condiciones nutricionales aceptables para sostener un cultivo.
Claro o blanco	Normalmente se debe a los carbonatos de calcio y magnesio o al yeso u otras sales más solubles.
Pardo amarillento	Se debe a la presencia de óxidos de hierro hidratados, FeO(OH) (goethita), y unidos a la arcilla y a la materia orgánica.

Continuación de la tabla II.

Color rojo	El color rojo aparece en el suelo como consecuencia de la alteración de minerales de arcilla. El color rojo indica un buen drenaje del suelo, lo que permite la existencia de condiciones oxidantes para formar los óxidos.
Grises y abigarrados	Se debe a la presencia de compuestos ferrosos y férricos.
Gris o verdoso azulado	Son debido a la baja o ninguna oxidación del hierro y al predominio de condiciones reductantes (falta de aireación), como en suelos encharcados o mal drenados.
Violeta	Indica la presencia de determinados minerales, como el yeso.

Fuente: VAN RAIJ, Bernardo. *Análisis químico para la evaluación de fertilidad de suelos tropicales*. p. 238.

- Porosidad o espacio poroso

Se refiere a la cantidad de espacios que hay entre el material sólido de un suelo. Estos espacios son ocupados por el aire y por el agua, en un suelo ideal, el 25% del volumen total estaría ocupado por aire y otro 25 % estaría ocupado por agua, por lo que su espacio poroso sería del 50 %.

La porosidad es un parámetro importante porque de él depende el comportamiento del suelo frente a las fases líquida y gaseosa, y por lo tanto, vital para la actividad biológica que pueda soportar. Los poros grandes y medianos (macroporos) abundan en suelos arenosos y sueltos y en suelos con

estructura granular. Son ocupados por aire y sirven para la infiltración, permiten la rápida circulación de aire y agua.

Los poros finos y muy finos se encuentran en suelos de texturas medias y finas, y los microporos, en suelos arcillosos. La circulación de agua y aire en los poros finos y microporos es lenta. La cantidad de poros grandes, medianos y finos es más importante que la cantidad total de espacios (porosidad total).

- **Consistencia**

Es el comportamiento que adopta el suelo frente a las presiones mecánicas. Se considera como una combinación entre las propiedades del suelo, que dependen de la humedad y la atracción de las partículas.

Tabla III. **Propiedades de los suelos según su diámetro de poro**

Diámetro de poro	Tipo	Propiedades
> 30 mm	Macroporos	Permiten el movimiento libre de fluidos. El agua de lluvia se pierde por gravedad fácilmente y no puede ser aprovechada por las plantas.
30 – 10 mm	Mesoporos	Retienen el agua que pueden utilizar las plantas (agua útil).
10 – 0,2 mm	Microporos	Retienen el agua con mucha fuerza, de manera que no puede ser utilizada por las plantas.

Fuente: VAN RAIJ, Bernardo. *Análisis químico para la evaluación de fertilidad de suelos tropicales*. p. 236.

- Profundidad efectiva

Se refiere al espesor del suelo que las raíces de las plantas pueden explorar libremente, sin ninguna dificultad. Los factores que pueden limitar la profundidad efectiva son:

- Presencia de roca
- Capas endurecidas
- Piedras y gravas en forma de capas
- Aguas subterráneas (nivel freático)
- Capas con alta concentración de sales, entre otros.

2.1.4.2. Características mineralógicas

La composición física, mineral y química del material parental (formado por los agentes atmosféricos a partir de la roca madre) juega un papel decisivo en la formación del suelo, en sus características físicoquímicas y en su fertilidad natural (capacidad de abastecimiento de nutrientes o reserva mineral). Durante los procesos de formación del suelo se generan nuevos minerales a partir de los minerales primarios, del material parental: feldespatos, micas, anfíboles y piroxenos. Estos nuevos minerales son las arcillas que corresponden al material coloidal mineral del suelo, de menos de 0,002 mm de diámetro.

2.1.4.3. Características químicas

Por sus propiedades químicas pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Reacción del suelo

Este término se usa para indicar el grado de acidez o alcalinidad del suelo que se expresa por el pH. Esta propiedad determina la solubilidad de los elementos y las posibilidades de crecimiento de las plantas. A mayor presencia de hidrógeno en un suelo, mayor será su acidez; por lo tanto, la solubilidad de algunos nutrientes será menor. Rara vez excede el valor de pH 10. Así, condiciones de alcalinidad muy fuerte ocurren en suelos de climas áridos o semiáridos, donde hay presencia de carbonatos y bicarbonatos de sodio.

- Presencia de carbonatos y sulfatos

Los carbonatos de calcio y magnesio pertenecen a las formas minerales de calcita y en menor cantidad de dolomita o magnesita. También, en las áreas secas se puede encontrar en el suelo acumulaciones de sulfato de calcio, es decir yeso, que por lo general están asociadas con los carbonatos de calcio/magnesio.

La presencia de pequeñas cantidades (<3 %) de carbonatos de calcio/magnesio o de yeso en el suelo es beneficiosa, porque el calcio y el magnesio mejoran la agregación del suelo, estabilizan la estructura y aumentan la proporción de poros grandes.

- Materia orgánica

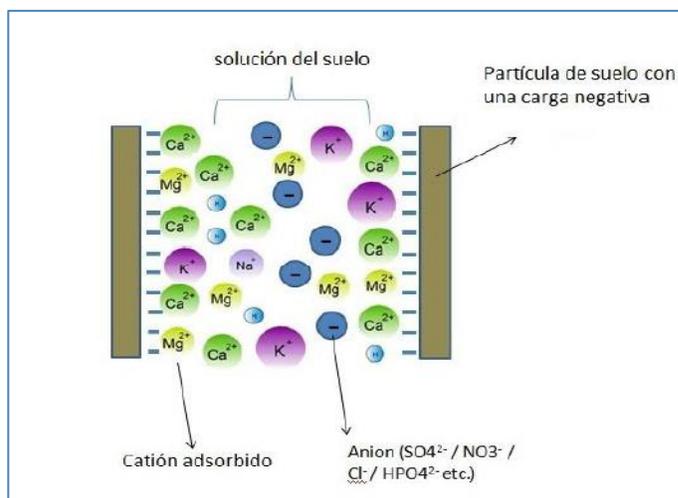
Está formada por los restos de animales y vegetales. Sobre este material actúan una infinidad de microorganismos que lo descomponen y lo transforman en otras materias. Este modifica las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos y tiene un efecto positivo sobre la estructura del suelo, en la

formación de agregados estables, el aumento de la capacidad de retención de agua, la mejora del intercambio de gases y la mejora del drenaje.

- Capacidad de intercambio catiónico

El material coloidal del suelo inorgánico (arcillas) y orgánico (humus), presenta una superficie con carga eléctrica negativa que permite el almacenamiento e intercambio de iones de carga positiva o cationes. El intercambio catiónico es una de las propiedades físicoquímicas del suelo, más importantes. Es una reacción química reversible, esto es, que los cationes pueden entrar y salir del complejo de intercambio a la solución del suelo, lo cual significa que los cationes retenidos en la superficie de los coloides minerales y orgánicas pueden ser reversiblemente reemplazados por aquellos de la solución del suelo.

Figura 4. **Capacidad e intercambio catiónico del suelo**



Fuente: VAN RAIJ, Bernardo. *Análisis químico para la evaluación de fertilidad de suelos tropicales*. p. 237.

- **Contaminación de suelos**

Desde siempre, el suelo ha sido utilizado para depositar los residuos, incluyendo los que han sido removidos del aire y de la tierra. En los últimos años, la mayor parte de los esfuerzos en cuanto a la protección ambiental se han enfocado a limpiar el aire y el agua, así como en evitar que se sigan contaminando, porque su relación con los problemas de salud en la población es más directa.

En algunas ocasiones, la contaminación es el resultado de la aplicación directa de plaguicidas o fertilizantes en la tierra o puede deberse al almacenamiento, manejo o disposición inadecuados de sustancias tóxicas. Por otra parte, los residuos provenientes de fuentes industriales pueden poner en peligro la salud humana y el ambiente; por ejemplo, la filtración provocada por el derrame de sustancias químicas puede provocar la contaminación del suelo y del agua subterránea.

2.2. Boro

Entre los micronutrientes esenciales para las plantas, el boro es uno de los más importantes, al cual se han atribuido varias funciones como su relación en el transporte de azúcares (donde este elemento es esencial), desarrollo de los meristemas y paredes celulares.

El boro es el único microelemento no metálico que tiene una valencia constante de +3 y un radio iónico muy pequeño. Es estrictamente un elemento litofílico, sus minerales de alta temperatura son principalmente los borosilicatos y boratos anhidros y sus minerales de baja temperatura, son los boratos hidratados.

En relación con otros microelementos, el boro presenta algunas peculiaridades, como que en el suelo siempre se encuentra combinado con el oxígeno, comportándose, por tanto, como anión (borato) en todas las reacciones. El anión borato presenta una alta movilidad, lo cual permite que se pierda fácilmente por lixiviación.

Existe en el suelo como ácido bórico (H_3BO_3), sin carga eléctrica. Es móvil en el suelo pero está asociado con las arcillas y la materia orgánica. La extracción de boro realmente disponible en el suelo es difícil de determinar químicamente, cuanto más seco está el suelo, menor es la disponibilidad de boro.

El boro se encuentra en el suelo en cuatro estados:

- Formando parte de la estructura cristalina de los minerales
- Adsorbido o retenido por los coloides del suelo
- Como anión en la solución del suelo
- Asociado a la materia orgánica

Los requerimientos de boro por los cultivos varían con la especie, también varía su tolerancia a niveles excesivos y su capacidad para absorber el elemento desde el suelo. En los suelos ácidos, el aprovechamiento del boro se incrementa con el pH, porcentaje de materia orgánica, calcio intercambiable y contenido de arcilla. El fenómeno de lixiviación de boro, suele ser un factor que afecta negativamente la disponibilidad de este elemento.

Los tipos de suelos donde frecuentemente se presentan deficiencias de boro son:

- Suelos aluviales (*fluvents*)
- Suelos podsólicos (*spodosoles*)
- Regosoles (*udipsaments*)
- Suelos *low himic-gleys* (*haplaquepts*)
- Suelos arenosos lixiviados
- Suelos salinos, alcalinos y calcáreos
- Suelos con bajo contenido de materia orgánica

2.2.1. Funciones en la planta

- Esencial en la germinación de los granos de polen.
- Desarrollo del tubo polínico (y por lo tanto la floración).
- Formación de las paredes celulares.
- Forma complejos azúcar/boro asociados con la translocación de azúcares.
- Importante en la formación de proteínas.

La alta precipitación pluvial y el clima seco reducen la disponibilidad de boro. Este elemento debe ser utilizado cuidadosamente, ya que la línea de división entre cantidades deficientes y tóxicas es muy pequeña. Las prácticas de manejo que pueden generar, intensificar o atenuar la deficiencia de boro son:

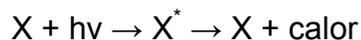
- El sobrecalentamiento de suelos ácidos desarrolla frecuentemente deficiencias agudas de boro.
- La aplicación de abonos orgánicos puede incrementar la disponibilidad de boro.

El boro es esencial en la germinación de los granos de polen y en el crecimiento del tubo polínico; en la formación de las paredes celulares y en la formación de proteínas. La deficiencia de boro, por lo general, atrofia la planta desde el punto de su crecimiento y el nacimiento de hojas nuevas. Esto indica que el boro no es translocado en la planta. Su disponibilidad se reduce por la alta pluviosidad y el lixiviado. El clima seco también puede desencadenar su deficiencia en forma temporal. Los síntomas tienden a desaparecer una vez que el suelo es humedecido de nuevo.

2.3. Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible

La espectrofotometría de absorción en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético es, posiblemente, la más utilizada en la práctica del análisis cuantitativo de todas las técnicas espectroscópicas. Asimismo, puede resultar de utilidad como técnica auxiliar para la determinación de estructuras de especies químicas.

Se basa en la absorción de radiación ultravioleta y visible por el analito, como consecuencia de esto se origina un estado activado que posteriormente elimina su exceso de energía en forma de calor, en un proceso que esquemáticamente puede representarse así:



La cantidad de calor disipado es muy pequeño, por lo que el método tiene la ventaja de originar un trastorno mínimo en el sistema que se estudia.

Normalmente se utiliza la denominación de colorimetría cuando se trabaja en la región visible del espectro electromagnético y se emplean aparatos que

utilizan filtros (en sentido estricto, un colorímetro es un instrumento que compara el color de una sustancia con el de una disolución de referencia usando el ojo humano como detector, si bien, en la práctica, esta denominación suele aplicarse a muchos fotómetros de filtro con sistemas de detección eléctricos) para seleccionar la radiación utilizada.

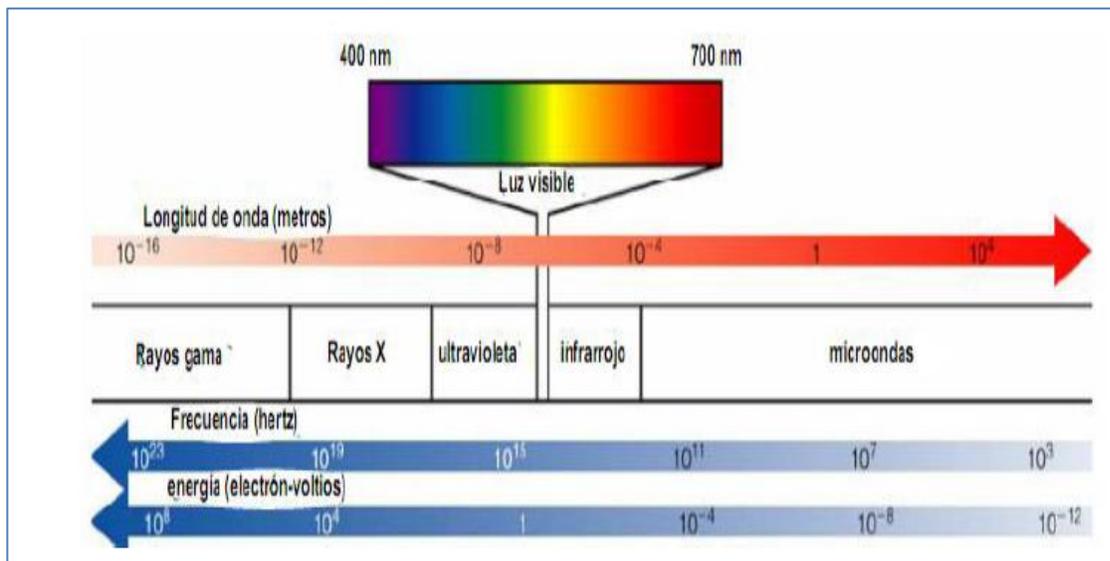
Por otra parte, el término espectrofotometría suele aplicarse cuando la radiación utilizada se extiende a las regiones ultravioletas e infrarrojas y, además, se utilizan monocromadores en lugar de filtros, así como sistema de detección más sensible, como tubos fotomultiplicadores.

En cuanto a la región ultravioleta, hay que indicar que la zona de mayor interés en la práctica analítica ordinaria es la denominada como ultravioleta próxima (longitud de onda entre 200 y 400 nm), pues la ultravioleta lejana o ultravioleta vacía (de 10 a 200 nm) presenta el inconveniente de que el oxígeno atmosférico absorbe en esa región, siendo necesario eliminarlo del instrumento de medida. Debido a ello, la espectrofotometría en esa región espectral no se ha desarrollado suficientemente.

2.3.1. Espectro electromagnético

Este abarca un intervalo muy amplio de energías (frecuencias) y, por lo tanto, de longitudes de onda.

Figura 5. Espectro electromagnético

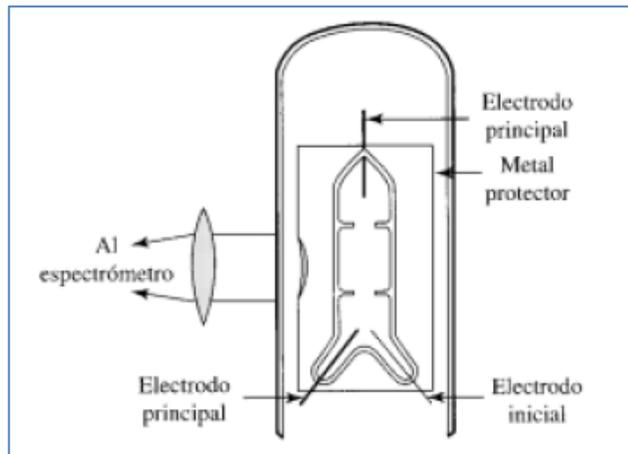


Fuente: AZNÁREZ, Alduán; BONILLA, Polo y MARÍN, José. *Nuevos métodos de determinación de boro por espectrofotometría de absorción UV-Visible y por fluorescencia molecular, previa extracción con 2-metil-2,4-pentanodiol. Aplicación al análisis de material vegetal.* p. 515.

2.3.1.1. Región ultravioleta (de 190 a 320 nm)

En esta región se utilizan lámparas de deuterio, xenón y de mercurio. Para espectrometría de absorción, una lámpara de arco rellena de deuterio produce un espectro continuo con algunas líneas de emisión superpuestas. La intensidad de emisión es adecuada para llevar a cabo espectrometría de absorción en el intervalo de 190 a aproximadamente 320 nm (las longitudes de onda más cortas no se utilizan en este trabajo, ya que absorben por sí mismas en este intervalo).

Figura 6. **Estructura general de una lámpara de arco**



Fuente: AZNÁREZ, Alduán; BONILLA, Polo y MARÍN, José. *Nuevos métodos de determinación de boro por espectrofotometría de absorción UV-Visible y por fluorescencia molecular, previa extracción con 2-metil-2,4-pentanodiol. Aplicación al análisis de material vegetal.* p. 516.

2.3.1.2. **Región visible (de 320 a 750 nm)**

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 lo 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 nm.

Tabla IV. **Longitud de onda con relación al color**

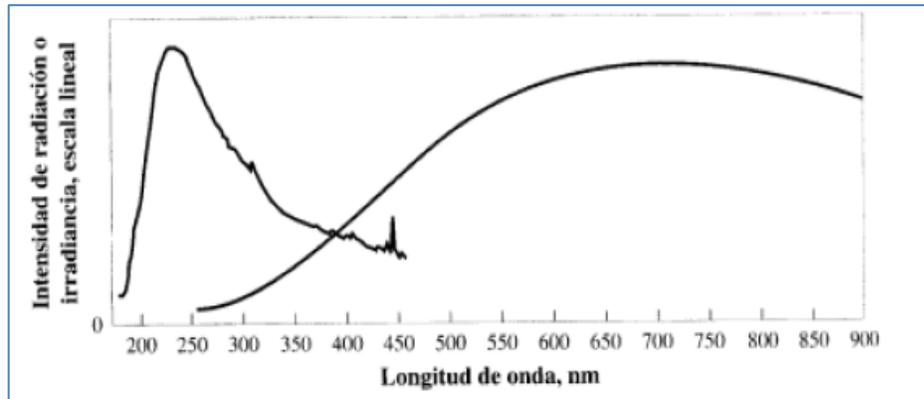
Intervalo de longitudes de onda (nm)	Color de la luz absorbida	Color complementario transmitido
400 – 435	Violeta	Amarillo – verdoso
435 – 480	Azul	Amarillo
480 – 490	Azul – verde	Anaranjado
490 – 500	Verde – azul	Rojo
500 – 560	Verde	Púrpura
560 – 580	Amarillo – verdoso	Anaranjado
580 – 595	Amarillo	Azul
595 – 650	Anaranjado	Azul – verdoso
650 – 750	Rojo	Verde – azul

Fuente: MARTÍNEZ, Andrea. *Validación de métodos analíticos por espectrofotometría para determinar sulfatos, cianuros y cromo hexavalente en aguas, suelos y lixiviados.*

<http://goo.gl/IVBShz> Consulta: 4 de octubre del 2013.

Esta región utiliza lámparas de filamentos de tungsteno. La fuente común elegida para espectrometría de absorción en la región visible es una lámpara incandescente. Su espectro de radiación es un espectro continuo, de intervalo del ultravioleta al infrarrojo cercano.

Figura 7. **Espectro de la intensidad de radiación de una lámpara de acero de deuterio (izquierda), tal como una lámpara de filamento de tungsteno (derecha)**



Fuente: Perkin Elmer. *Perkin Elmer instruments*. <http://goo.gl/r03s87>. Consulta: 23 de septiembre de 2013.

2.3.2. Transmitancia y absorbancia

Se define la transmitancia T , como la fracción de radiación incidente que consigue atravesar la muestra. Varía de 0 a 1 y puede expresarse también en porcentaje:

$$T = \frac{P}{P_0}; T = \frac{P}{P_0} * 100$$

En donde P representa la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra y P_0 representa la cantidad de luz que incidió sobre ella. 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 y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

Un parámetro de mayor utilidad práctica es la absorbancia A, definida como:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P}$$

Obsérvese que cuando no hay absorción de radiación, $P = P_0$ y entonces, $A = 0$, mientras que si se absorbe el 99 %, sólo se transmite el 1 %, con lo que $A = 2$. Para una capa de disolución absorbente de espesor infinitamente pequeño, db (ver figura 8), la disminución de la potencia radiante, dP , es proporcional a la propia potencia incidente, P , a la concentración de la especie absorbente, C , y al espesor, db :

$$dp = -k P C db$$

Donde k es una constante de proporcionalidad. Reagrupando la ecuación anterior e integrando, se obtiene:

$$\begin{aligned}\frac{dp}{P} &= -kC db \\ \int_{P_0}^P \frac{dp}{P} &= - \int_0^b k C db \\ \ln\left(\frac{P}{P_0}\right) &= -k C b = 2,3 \log\left(\frac{P}{P_0}\right) \\ \log\left(\frac{P}{P_0}\right) &= -\log T = A = \epsilon b C\end{aligned}$$

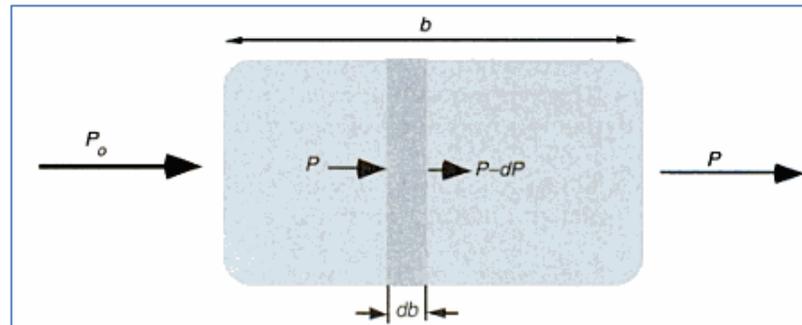
La siguiente expresión se denomina Ley de Beer.

$$A = \epsilon b C$$

Es fundamental en análisis cuantitativo al relacionar la absorbancia con la concentración. La constante k recibe el nombre de absorptividad molar, cuando la concentración se expresa en moles por litro y el cambio óptico, b , en centímetros. La absorptividad es una propiedad característica de la sustancia absorbente y depende de la longitud de onda. Por ello, para aplicar la Ley de Beer debe seleccionarse una determinada longitud de onda. Para este propósito se utiliza el espectro de absorción, siendo este una gráfica que indica la variación de la absorbancia, o de la absorptividad, con la longitud de onda.

Cuando un haz de radiación monocromática de una determinada longitud de onda atraviesa una capa de disolución conteniendo una especie absorbente, la potencia (energía por unidad de tiempo y unidad de área) del haz incidente P_0 se atenúa, disminuyendo hasta P .

Figura 8. **Absorción por radiación**



Fuente: Perkin Elmer. *Perkin Elmer instruments*. <http://goo.gl/r03s87>. Consulta: 23 de septiembre de 2013.

2.3.2.1. Tipos de absorción

Los tipos de absorción son los siguientes:

- Absorción de radiación

Cuando la radiación atraviesa una capa de un sólido, un líquido o un gas, ciertas frecuencias pueden eliminarse selectivamente por absorción, un proceso en el que la energía electromagnética se transfiere a los átomos, iones o moléculas que componen la muestra. La absorción provoca que estas partículas pasen de su estado normal a temperatura ambiente, o estado fundamental, a uno o más estados excitados de energía superior.

De acuerdo con la teoría cuántica, los átomos, moléculas o iones solo tienen un número limitado de niveles de energía discretos; de modo que para que se produzca la absorción de la radiación, la energía de los fotones excitadores debe coincidir exactamente con la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de las especies absorbentes.

Como estas diferencias de energía son características para cada especie, el estudio de frecuencias de la radiación absorbida proporciona un medio para caracterizar los componentes de una muestra.

- Absorción molecular

Los espectros de absorción de las moléculas poliatómicas, especialmente en estado condensado, son considerablemente más complejos que los espectros atómicos, ya que el número de estados de energía de las moléculas es generalmente enorme si se compara con el de los átomos aislados.

La energía, asociada a las bandas de una molécula, está formada por tres componentes:

- Energía electrónica (proviene de los estados energéticos de sus distintos electrones enlazantes).
 - Energía vibracional (energía total asociada al elevado número de vibraciones interatómicas presente en las especies moleculares).
 - Energía rotacional (debido a distintos movimientos rotacionales dentro de la molécula).
- Absorción por los compuestos orgánicos

La absorción de la radiación ultravioleta y visible por las moléculas orgánicas se debe a la excitación de dos tipos de electrones: los electrones compartidos por varios átomos y que participan directamente en los enlaces, y los electrones externos no compartidos que se localizan principalmente en los átomos de oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno.

La longitud de onda en la que absorbe una molécula orgánica va a depender de la fuerza con la que se sujeten sus electrones. Los que se comparten en enlaces sencillos, como los de carbono-carbono o carbono-hidrógeno, están unidos con tal fuerza que solo es posible la absorción con fotones más energéticos que los UV normales. Los electrones que participan en enlaces dobles y triples se sujetan con menos fuerza y, por lo tanto, es más fácil excitarlos. Por esta razón, las especies con enlaces insaturados suelen absorber en la región UV.

Los grupos funcionales orgánicos insaturados que absorben en la región UV y visible se conocen como cromóforos. La posición del doble enlace y su absorptividad dependerá del disolvente y de otros detalles estructurales de la molécula.

- Absorción por especies inorgánicas

En general, los iones y complejos de los elementos de las dos primeras series de transición absorben bandas amplias de radiación visible, por lo menos en uno de sus estados de oxidación y, por consiguiente, son coloreados. A parte de estas especies, hay muchos compuestos inorgánicos que absorben en la región UV y visible. Entre estos figuran los iones de nitrato, nitrito y cromato que exhiben una absorción característica en la región UV y visible.

- Absorción por transferencia de carga

Este tipo de absorción es especialmente importante en el análisis cuantitativo, debido a que las absorptividades molares son particularmente grandes y se logra una sensibilidad alta. Muchos complejos orgánicos e inorgánicos exhiben este tipo de absorción, de ahí que se les conozca como complejos de transferencia de carga.

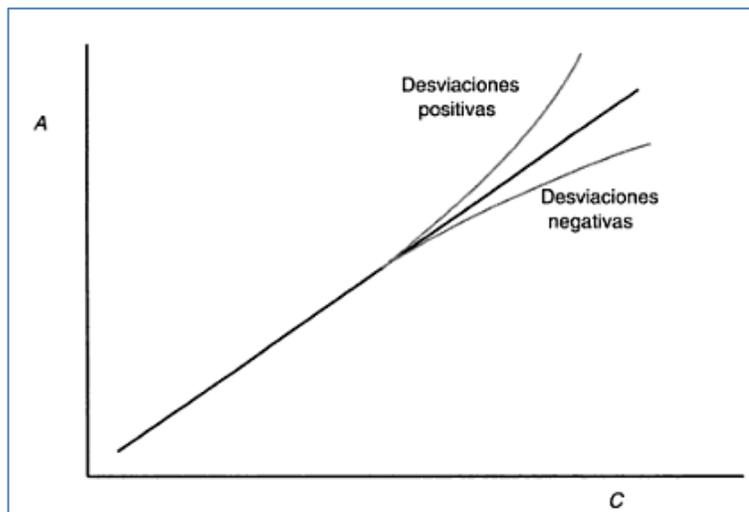
2.3.3. Desviaciones de la Ley de Beer

La proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración únicamente se cumple para disoluciones muy diluidas, observándose desviaciones más o menos acusadas al aumentar la concentración.

Las desviaciones de la Ley de Beer pueden clasificarse de la forma siguiente:

- Desviaciones reales
- Desviaciones experimentales

Figura 9. **Desviación de la Ley de Beer**



Fuente: Perkin Elmer. *Perkin Elmer instruments*. <http://goo.gl/r03s87>. Consulta: 23 de septiembre de 2013.

2.3.3.1. **Desviaciones reales**

En la deducción de la Ley de Beer que se hizo anteriormente no se ha considerado que la absortividad depende del índice de refracción, n , según la expresión:

$$\epsilon_{absortividad} = \epsilon \frac{n}{(n^2 + 2)^2}$$

Como, a su vez, el índice de refracción varía con la concentración, la absortividad no es rigurosamente constante para cualquier concentración, provocando desviaciones negativas. De todas formas, en la práctica, para concentraciones inferiores a 10^{-3} M puede prescindirse de la influencia de este factor, al ser el índice de refracción esencialmente constante.

2.3.3.2. Desviaciones instrumentales

Las fluctuaciones producidas en la corriente eléctrica, la inestabilidad de algunas fuentes de radiación o la respuesta no lineal del detector pueden originar el funcionamiento incorrecto de un determinado aparato. Además de estos, pueden considerarse los siguientes factores de tipo instrumental como causas de desviaciones de la Ley de Beer:

- Uso de radiación monocromática

La deducción de la Ley de Beer se hizo sobre la base de utilizar radiación monocromática, lo cual, en sentido estricto, nunca se cumple, pues en la práctica todos los dispositivos seleccionan una banda más o menos ancha en torno a una determinada longitud de onda. La influencia de la radiación policromática sobre la Ley de Beer puede mostrarse del siguiente modo: suponiendo un haz formado por las longitudes de onda λ_1 y λ_2 (banda M en la figura 10 a).

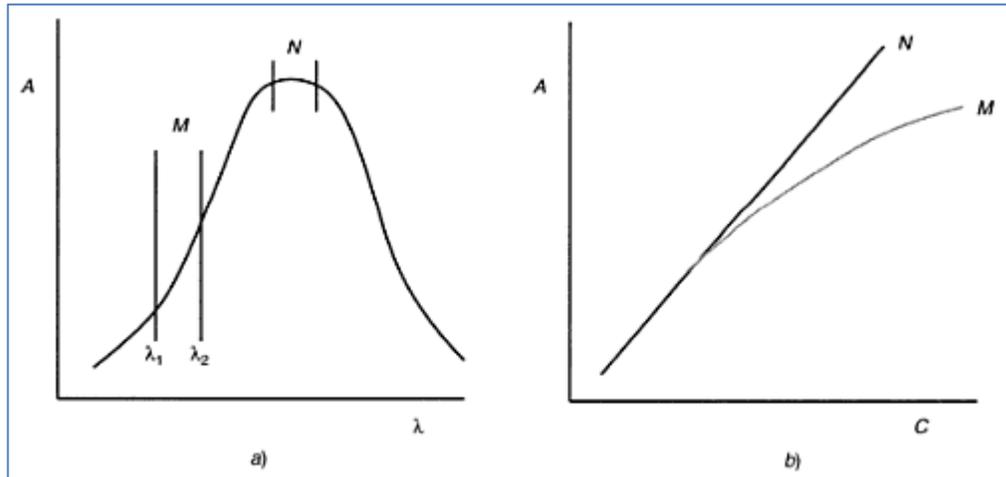
Aplicando la Ley de Beer a cada una de ellas, se tiene:

$$A_1 = \log \frac{P_{01}}{P_1} = \epsilon_1 b C; P_1 = P_{01} 10^{-\epsilon_1 b C}$$

$$A_2 = \log \frac{P_{02}}{P_2} = \epsilon_2 b C; P_2 = P_{02} 10^{-\epsilon_2 b C}$$

Si se igualan A_1 y A_2 las ecuaciones se simplifican a la Ley de Beer.

Figura 10. **Influencia de radiación policromática sobre la Ley de Beer**



Fuente: Perkin Elmer. *Perkin Elmer instruments*. <http://goo.gl/r03s87>. Consulta: 23 de septiembre de 2013.

- Presencia de radiación parásita

El haz de radiación que sale de un monocromador suele estar contaminado con pequeñas cantidades de radiación parásita o dispersada, originada por reflexión de los distintos componentes ópticos, dispersión por partículas de polvo atmosférico, entre otros. Por otra parte, la propia muestra puede originar dispersiones.

Con frecuencia, la radiación dispersada tiene una longitud de onda diferente respecto a la radiación principal, pudiendo además, en ocasiones, llegar al detector sin haber atravesado la muestra.

- Errores de lectura

Los errores indeterminados en la lectura de la transmitancia o absorbancia son errores que potencialmente siempre están presentes y es necesario tenerlos en cuenta. En ocasiones, pequeños errores en la lectura de la transmitancia o de la absorbancia puede ocasionar errores grandes en la concentración, cuando se opera en los extremos de la escala.

2.3.3.3. Desviaciones químicas

Se incluyen en este apartado toda una serie de desviaciones aparentes de la Ley de Beer producidas como consecuencia de procesos químicos en los que participan las especies absorbentes.

- Influencia del equilibrio

Cuando la sustancia problema interviene o forma parte de un sistema en equilibrio con otras especies, el desplazamiento del equilibrio implica una modificación en la concentración y, en consecuencia, en la absorbancia. Algunas situaciones que pueden producirse son las siguientes:

- Dimerización
 - Ácido- base
 - Complejos
- Influencia del disolvente

Como consecuencia de las interacciones soluto-disolvente, se originan con frecuencia desplazamientos espectrales, ensanchamientos de bandas y

otros fenómenos que pueden provocar desviaciones en la Ley de Beer. En este sentido, no es posible hacer predicciones de forma general.

Únicamente mencionar algunos términos relacionados con los desplazamientos espectrales: desplazamiento batocrómico, o desplazamiento hacia el rojo, consiste en un desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores (este efecto suele producirse en disolventes de alta constante eléctrica). Desplazamiento hipsocrómico, o desplazamiento hacia el azul, es el desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas.

- Influencia de la temperatura

La temperatura puede influir modificando el equilibrio químico de algunos sistemas, así como, en ocasiones, dar lugar a desplazamientos batocrómicos. De todas formas, la temperatura no suele ser un factor a considerar en la mayor parte de los sistemas absorbentes sencillos.

- Presencia de impurezas en los reactivos

Muchos métodos espectrofotométricos son lo suficientemente sensibles como para detectar cantidades a nivel de trazas, por lo que la presencia de impurezas absorbentes en los mismos reactivos pueden originar errores considerables. Debido a ello, en la práctica analítica ordinaria, las medidas espectrofotométricas se llevan a cabo frente a un blanco constituido por la propia célula, el disolvente y los reactivos. En este sentido, interesa que la absorbancia del blanco sea pequeña, pues si es grande, un pequeño error en su medida puede implicar un gran error relativo en el resultado final.

- Interacciones entre especies absorbentes

Cuando en una disolución existen varias especies absorbentes, la Ley de Beer se cumple para cada una de ellas si todas actúan independientemente. Sin embargo, la interacción entre ellas puede producir alteraciones en la distribución de cargas, como consecuencia, puede modificarse la energía requerida para la absorción y provocar variaciones en la posición, forma y altura de las bandas de absorción. Por otra parte, estas alteraciones en la distribución de cargas también pueden ser originadas por la presencia de sales inertes, con el consiguiente aumento de la fuerza iónica de la disolución.

- Interacciones soluto-radiación electromagnética

Aunque en sentido estricto no son factores de tipo químico, también deben considerarse otros tipos de interacción entre la radiación la materia, distintos de los que intervienen en el proceso de absorción. Así, la posible emisión de resonancia y la presencia de fenómenos fluorescentes y fosforescentes pueden originar desviaciones aparentes en la Ley de Beer.

2.3.3.4. Errores personales

En este sentido, los mayores errores suelen cometerse por el uso inadecuado de las cubetas de absorción. Resultan de utilidad las recomendaciones siguientes.

Es necesario asegurarse de que las cubetas están perfectamente limpias, no rayadas y exentas de huellas o adherencias en las paredes por las que ha de pasar la radiación. Las cubetas de vidrio y cuarzo pueden limpiarse con ácido nítrico o con agua regia en frío, pero no con mezcla crómica.

Una vez limpias, las cubetas deben enjuagarse con agua destilada y con varias porciones de la disolución a medir. No deben secarse interiormente, mientras que el exterior debe secarse con papel suave, comprobando, además, que, una vez llena con la disolución problema, no contiene burbujas de aire. Aunque se debe trabajar con cubetas idénticas para la muestra y la referencia (blanco), es buena práctica utilizar siempre la misma disolución en cada una de ellas.

2.3.4. Análisis cuantitativo

La espectrofotometría UV y visible es una de las herramientas más poderosas y útiles para el análisis cuantitativo. Las principales características de este método son: amplia aplicación en sistemas orgánicos y bioquímicos; sensibilidad razonable, límites de detección relativamente altos; selectividad moderada a alta; exactitud y precisión razonables, así como rapidez y conveniencia.

2.3.5. Análisis cualitativo

La espectroscopia UV y visible tiene pocas aplicaciones en el análisis cualitativo, debido a que los espectros de muchos compuestos en solución se componen de una o, a lo sumo, unas cuantas bandas anchas y en las que no se aprecia la estructura fina indispensable para la identificación precisa de un compuesto.

Aun así, la posición espectral de una banda de absorción puede dar cierta información sobre las características estructurales de una molécula o indicar si esta posee o no determinados grupos funcionales; como los grupos fenilo, nitrilo o dobles enlaces conjugados. Los espectros de absorción en la región UV y

visible se han catalogado para compararlos con el espectro de absorción de un compuesto puro ya conocido.

Normalmente, en el análisis cualitativo solo se utiliza la espectroscopia de absorción UV y visible para confirmar la identidad de un compuesto que se ha analizado con una técnica cualitativa más poderosa.

2.3.6. Errores asociados a los métodos espectrofotométricos

En general, una medida espectrofotométrica comprende tres pasos: ajuste de 0 % de transmitancia, ajuste del 100 % de transmitancia y la medida del porcentaje de transmitancia de la muestra. Los ruidos que se producen en cada uno de estos pasos se combinan para producir una incertidumbre neta en la medida o valor final de la transmitancia de la muestra.

Cualquier incertidumbre en la medida de la transmitancia produce una incertidumbre en la medida de la absorbancia y, por lo tanto, también en la medida de la concentración de la muestra. La magnitud del error relativo en la concentración, $\Delta C/C$, por la incertidumbre en la medida de la transmitancia puede deducirse de la Ley de Beer, se conoce como error relativo analítico por unidad de error instrumental o error relativo analítico por unidad de error fotométrico y se designa por $(\Delta C/C)/\Delta T$.

Tomando la expresión de la Ley de Beer:

$$A = \log I_0/I = \epsilon bC = -\log T = -0,4343 \ln T$$

Derivando parcialmente con respecto a C y T manteniendo constantes b y ϵ :

$$\delta (-0,4343 \ln T)_{b,\varepsilon} = \delta (\varepsilon b C)_{b,\varepsilon}$$

$$-0,4343 \delta T/T = \varepsilon b \delta C$$

Tomando incrementos finitos: $-0,4343 \Delta T/T = \varepsilon b \Delta C$

Dividiendo el término de la izquierda de la ecuación anterior entre $-\log T$ y el derecho entre $\varepsilon b C$ se obtiene que el error relativo analítico es:

$$\Delta C/C = -0,4343 \delta T / -T \cdot \log T \rightarrow \Delta C/C = 0,4343 \Delta T / T \log T$$

Donde δT es el error fotométrico, entonces:

$$(\Delta C/C) / \Delta T = 0,4343 / T \cdot \log T$$

O error analítico en concentración por unidad de error fotométrico o instrumental.

A partir de esta última relación, se construye la curva del error o curva de Crawford, graficando el valor absoluto de $(\Delta C/C)/\Delta T$ contra T , tomando transmitancia entre cero y uno.

Esta gráfica indica que el error depende en forma compleja de la medida de la transmitancia. Para valores muy bajos o muy altos de transmitancia, el error en la concentración crece exponencialmente; mientras que para valores intermedios el error permanece aproximadamente constante, presentándose un mínimo error en la concentración para la transmitancia correspondiente a 0,368 o 36,8 %T. El valor mínimo se obtiene mediante la segunda derivada de la Ley de Beer con respecto a C y T , cuando esta es igual a cero; esto es, derivando nuevamente la ecuación anterior e igualando a cero:

$$\delta((\Delta C/C) / \Delta T) / \delta C = \delta(0.4343 / T * 0.4343 \ln T) = 0$$

$$\delta(1/(T * \ln T)) / \delta T = (-\delta T \ln T) - (T \delta T / T) / (T * \ln T)^2 = 0 = -\delta T (\ln T + 1) = 0$$

$$\ln T = -1$$

T = 0,368 que corresponde a una A = 0,4343, con un $\Delta C/C$ mínimo de 2,73 % para un ΔT de 1 %.

Se observa entonces la importancia de la calibración del instrumento y de minimizar los errores en la medida de la transmitancia para obtener medidas confiables de la concentración de una sustancia cuando se utilizan medidas espectrofotométricas.

2.4. Espectrofotómetro

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, de:

- Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
- Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas y 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. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
- Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
- Un registrador o sistema de lectura de datos.

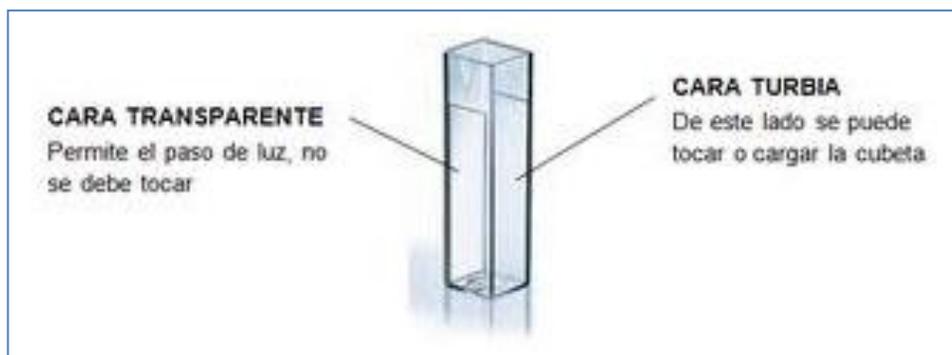
Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de doble haz (con dos celdillas para dos cubetas). Se mide primero 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, y por lo tanto la absorbancia es cero. A continuación se pone en la celdilla la cubeta con la muestra y se lee su absorbancia.

2.4.1. Uso de celdas

Cada celda tiene impreso un código de color que indica el rango en que la celda puede utilizarse. Las celdas con código azul, QS, son hechas de cuarzo y utilizadas para lecturas en el rango de UV. Para los análisis realizados en Analab, las celdas utilizadas poseen un código color verde, OS, y pueden utilizarse únicamente para mediciones en el rango de luz visible. Según datos del proveedor no es recomendable utilizar celdas de plástico.

Se debe evitar tocar las paredes ópticas, ya que podrían ocasionar depósitos de grasa o huellas dactilares, se debe utilizar guantes para su manipulación tomándola de la parte biselada. Las paredes pulidas de las celdas jamás han de tener contacto con objetos hechos de materiales duros como vidrio o metal. No se debe utilizar pinzas metálicas para el transporte de celdas y se requiere de especial cuidado al insertar la celda en el porta cubetas del equipo.

Figura 11. **Celda de medición**



Fuente: Perkin Elmer. *Perkin Elmer instruments*. <http://goo.gl/r03s87>. Consulta: 23 de septiembre de 2013.

2.4.2. Limpieza de celdas

Los tipos de celdas utilizadas en Analab son muy resistentes a los reactivos químicos. Únicamente el ácido fluorhídrico (HF) puede corroer la superficie, atacando las paredes en un breve espacio de tiempo. Esto implica que, salvo algunas excepciones, todos los solventes ácidos y básicos, incluyendo solventes orgánicos, pueden utilizarse para la limpieza de las cubetas. El procedimiento a seguir para la limpieza de las celdas, antes de realizar lecturas en el espectrofotómetro, es el siguiente:

- Lavar con suficiente agua destilada la celda
- Enjuagar la celda con la solución extractora (blanco)

Para la limpieza de las celdas después de su uso se debe seguir el procedimiento siguiente:

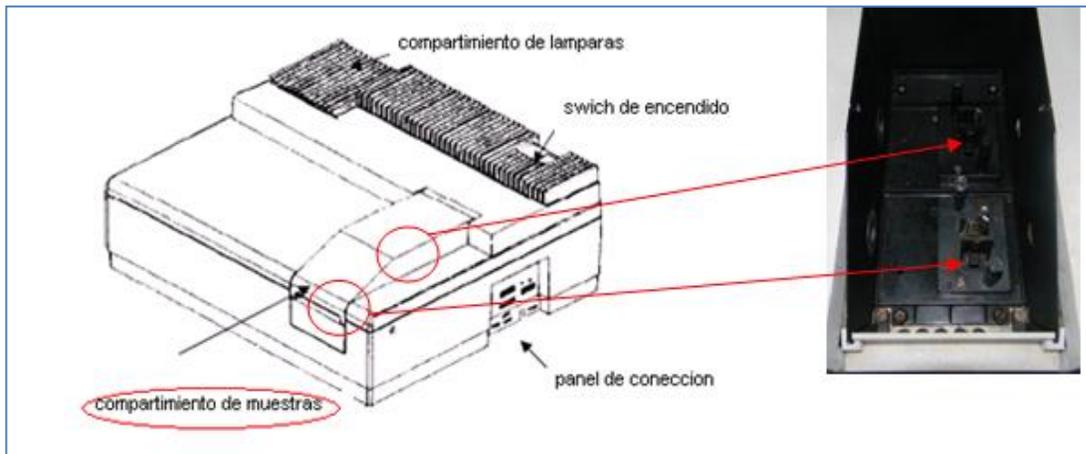
- Emplear Extran neutro al 2 % para lavar la celda y enjuagar con agua destilada, procurando remover la mayor parte de contaminantes. En el caso de análisis de fósforo, utilizar Extran exento de fosfato al 2 %.
- Con una solución de ácido clorhídrico 0,5 N lavar la celda.
- Posteriormente, con una solución de hidróxido de sodio 0,5 N lavar la celda.
- Agregar etanol al 95 %, removerlo y esperar hasta que se volatilice y se seque por completo la celda.
- Guardarla en su contenedor.

No se deben guardar las celdas al aire libre en una atmósfera corrosiva, ni dejar que las paredes pulidas estén contacto con líquidos durante períodos largos pues esto puede dar lugar a la formación de sedimentos o manchas que pueden dañarlas.

2.4.3. Espectrofotómetro UV-Visible, Lambda 25

Es un equipo de escaneo, que requiere de un computador para operar, trabaja con un rango de longitud de onda de 190 a 1100 nm, con un ancho de banda de 1 nm (fijo). La amplia gama de modos de funcionamiento proporciona resultados confiables para una serie de análisis, incluyendo mediciones cuantitativas y estudios cinéticos. Es un espectrofotómetro de doble haz, por lo tanto requiere de dos celdas para su funcionamiento.

Figura 12. **Espectrofotómetro UV-Visible, Lambda 25**



Fuente: Perkin Elmer. *Perkin Elmer instruments*. <http://goo.gl/r03s87>. Consulta: 23 de septiembre de 2013.

- **Características**

- Operación de doble haz verdadero
- Alto rendimiento, bajo la óptica de luz difusa
- Lámparas de deuterio y tungsteno-halógeno prealineadas
- Amplia gama de accesorios y consumibles
- Elección del software UV WinLab

- **Ventajas**

- Muy alta estabilidad.
- Alta precisión y reproducibilidad.
- Pasa fácilmente a todas las pruebas de rendimiento farmacopea y reglamentarios.

- Reemplazado rápidamente por un tiempo mínimo.
- Perfecto para cualquier muestra líquida.

2.5. Métodos utilizados

Los métodos que se utilizaron para el análisis en el laboratorio fueron los siguientes:

2.5.1. Determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)

El método que a continuación se describe, es el que actualmente se utiliza en el laboratorio de Suelos, Aguas y Especiales.

2.5.1.1. Preparación de reactivos para la solución extractora

- Solución ácido clorhídrico 6 normal (HCl [6N])
 - En un balón aforado de 2 L agregar 500 mL de agua desmineralizada.
 - Agregar 1 000mL de HCl concentrado.
 - Aforar con agua desmineralizada a la marca.
- Solución Superfloc 127
 - En un *beacker* de 1 L pesar 5 g de Superfloc 127.
 - Agregar aproximadamente 800 mL de agua desmineralizada.
 - Agitar la solución con agitador magnético.

- Agregar poco a poco 5 mL de metanol.
- Continuar agitando hasta que la solución esté completamente transparente.
- Aforar a 1 L con agua desmineralizada.
- Guardar en frasco de polietileno.
- Agitar antes de usar.

2.5.1.2. Preparación de la solución extractora

- En un balón de 2 L agregar aproximadamente 1 L de agua desmineralizada.
- Agregar 4,06 g de fosfato diácido de calcio hidratado ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$).
- Agregar 4 mL de HCl [6N].
- Agregar 20 mL de solución Superfloc 127.
- Aforar con agua desmineralizada y agitar manualmente.
- La solución podrá usarse cuando los reactivos estén completamente disueltos y la solución se vea transparente.

2.5.1.3. Preparación de la solución patrón madre, intermedia y soluciones estándar

- Solución patrón madre
 - Pesar 0,2865 g de ácido bórico (H_3BO_3) en la balanza analítica.
 - En un balón de 500 mL disolver en aproximadamente 100 mL de agua desmineralizada.
 - Aforar con agua desmineralizada a la marca.
 - Guardar en frasco de polietileno e identificarlo con la fecha y el nombre del analista.

- La solución debe prepararse cada seis meses.
- Solución intermedia
 - En un balón de 100 mL tomar 10 mL de la solución patrón madre.
 - Aforar con agua desmineralizada a la marca.
 - La solución debe ser preparada cada vez que se prepararen soluciones estándar y no debe almacenarse.
- Soluciones estándar
 - En los balones de 100 mL identificados como “Std 1” al “Std 7”, agregar 0, 1, 2, 6, 10, 15 y 20 mL de la solución intermedia respectivamente.
 - Aforar con la solución extractora a la marca.
 - Las soluciones deben prepararse a un máximo de tres días.

2.5.1.4. Preparación de reactivos para la lectura en el espectrofotómetro de UV-visible

- Solución *buffer masking* (pH = 5,42)
 - En un *beacker* de 2 L pesar 625 g de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$).
 - Agregar 37,5g de EDTA.
 - Agregar exactamente 1 L de agua desmineralizada.
 - Agitar la solución con un agitador magnético dentro de una campana de extracción.

- Agregar lentamente 312,5 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH).
 - Continuar agitando hasta que se vea completamente disuelto.
 - No aforar a volumen final.
 - Guardar en frasco de polietileno bajo condiciones ambientales.
 - No usar la solución por más de una semana.
-
- Solución azometina H
 - En un *beacker* de 100 mL pesar 0,9 g de azometina H.
 - Agregar 2,0 g de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$).
 - Agregar aproximadamente 50 mL de agua desmineralizada.
 - Calentar en baño maría aproximadamente 5 minutos (precaución: si la azometina se calienta demasiado se alteran sus propiedades).
 - Utilizando una varilla de agitación disolver los reactivos.
 - Transferir la solución a un balón de 200 mL. Nota: aforar el balón con agua desmineralizada, dejar enfriar la solución hasta que llegue a condiciones ambientales.
 - La solución debe ser preparada diariamente, dependiendo de la cantidad de muestras es la cantidad de azometina que se preparará, como se muestra a continuación.

Tabla V. **Concentración de uso de azometina**

Cantidad a preparar (mL)	Azometina (g)	Ácido ascórbico (g)
50	0,225	0,5
100	0,45	1
200	0,9	2
250	1,125	2,5

Fuente: Analab. *Manual de procedimiento*. p. 10

2.5.1.5. Preparación de la curva de calibración

- Tomar la gradilla rotulada como “curva boro”.
- Tomar 1 mL de cada solución estándar y verterlos en la gradilla.
- Si se va a utilizar el UV Lambda 25, el primer punto de la curva debe llevar cantidad doble, tanto de la solución estándar como de los reactivos para la lectura.
- Agregar 2 mL de la solución *buffer masking*.
- Agregar 2 mL de la solución azometina H.
- Dejar reaccionar por 20 minutos.
- Leer en el espectrofotómetro.

2.5.1.6. Preparación de las muestras

- Utilizar las bandejas “muestreo B,S suelo”.
- Tomar 10 mL de control identificado con el número 7, utilizando las cucharas de muestreo, y colocarlo en el segundo vaso de cada gradilla (tomar en cuenta que el primer vaso siempre se utiliza para el blanco).
- Tomar 10 mL de cada muestra.
- Agregar 25 mL de la solución extractora.

- Colocar tapaderas rotuladas B,S.
- Agitar las muestras por 20 minutos (no importa si se utiliza el agitador horizontal o el vertical).
- En las bandejas “filtrado B y S”, colocar papel filtro identificado en con el número 2 de diámetro 110 mm.
- Al terminar los 20 minutos, remover las tapaderas y verter la solución en la bandeja de filtrado.
- Dejar filtrando por unas horas.
- Tomar 1 mL del filtrado en las bandejas rotuladas “boro suelo”.
- Poner a reaccionar las muestras de la misma manera que se realizó con la curva.
- Leer en el espectrofotómetro.

2.5.2. Determinación de boro en agua caliente, usando calentamiento con microondas

La extracción con agua caliente bajo reflujo, propuesta por Berge y Truog en 1939, es el método más empleado para determinar la disponibilidad de boro en los suelos. Ese procedimiento ha sufrido, a lo largo de los años, algunas modificaciones, como la introducción de gotas de cloruro de calcio después de la extracción o la sustitución de agua por solución diluida de cloruro de calcio para evitar problemas de dispersión de arcilla. En el procedimiento original, las muestras son calentadas bajo reflujo, un proceso laborioso para laboratorios de rutina.

Entre las principales dificultades asociadas a este método existen la necesidad de cristalería libres de boro, de difícil obtención y alto costo, el bajo rendimiento permite cuantificar el Boro en un número pequeño de muestras por

día y la dificultad de un control preciso en el tiempo de calentamiento y enfriamiento de la suspensión suelo/solución.

La azometina H es el reactivo colorimétrico más utilizado para la determinación de boro en los suelos y el aspecto más favorable está en el medio reaccional acuoso que es más simple y más sensible comparado a otros métodos. En solución acuosa, la azometina H se disocia en el ácido-H (ácido-4-amino-5-hidroxi-2,7-naftalenodisulfónico) y aldehído salicílico, resultando en presencia de ácido bórico en el cambio de equilibrio en el sentido de la formación de azometina H, intensificando el color amarillo. Así, el ácido bórico se comporta como un catalizador de la reacción y la determinación es realizada colorimétricamente en la longitud de onda de 420 nm.

Intentando eliminar las dificultades analíticas por el método de agua caliente bajo reflujo, Abreu 1994 *et al.*, sustituyeron el agua caliente o cloruro de calcio por la solución de cloruro de bario y el calentamiento bajo reflujo por el calentamiento asistido por microondas. Con eso, fue posible eliminar interferencias en la extracción vía microondas y la determinación tanto por la espectrometría de emisión atómica en plasma (ICP-AES) como por el método colorimétrico, además de conseguir mejor control en el tiempo de ebullición.

Para cuantificar el boro por medio de esta metodología es necesaria la adición de carbono activado durante el proceso de extracción, para prevenir la interferencia del color amarillo producido por la materia orgánica del suelo removida por el agua caliente.

2.5.2.1. Preparación de la solución extractora

Disolver 1,25 g de cloruro de bario en 1 L de agua desmineralizada. Para almacenar esta solución durante algunos meses, adicionar 5 gotas de tolueno.

2.5.2.2. Procedimiento para la preparación de muestras

- Tomar 10 cm³ de suelo en bolsas de polipropileno.
- Adicionar 20 mL de solución extractora de cloruro de bario.
- Solamente para la determinación por espectrofotometría, adicionar 0,5 cm³ de carbón activado.
- Preparar un blanco de reactivo (sin suelo), adicionando 20 mL de la solución de cloruro de bario y 0,5 cm³ de carbón activado.
- Sellar las bolsas.
- Hacer un pequeño agujero en la parte superior de la bolsa con la ayuda de un clip.
- Colgar las bolsas en la plataforma usando clips. Distribuirlos de manera uniforme en un círculo y en la dirección del radio de la placa del horno microondas.
- Colocar la plataforma conteniendo siempre 14 bolsas en el horno, en estas 14 muestras siempre debe haber una muestra control y una muestra blanco. Si se tiene menos de 14 muestras, llenar las bolsas restantes con agua.
- Programar el horno microondas para 4 minutos con una potencia máxima de 700 W y para 5 minutos con una potencia máxima de 490 W.
- Enfriar la solución por 30 minutos y filtrar inmediatamente utilizando papel filtro.

2.5.2.3. Preparación de soluciones para la determinación de boro por espectrofotometría por el método de azometina H

- Solución tampón: disolver 250 g de acetato de amonio y 15 g de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) en 400 mL de agua desmineralizada, agregar, lentamente, 125 mL de ácido acético glacial.
- Solución de azometina H: disolver 0,9 g de azometina H y 2 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua desmineralizada. Esta solución puede ser preparada semanalmente y guardada en refrigeración.
- Solución patrón madre: disolver 5,7178 g de ácido bórico (reactivo de grado analítico y secado a 105 °C por 5 horas) en agua desmineralizada y completar a volumen de 1 L.
- Solución intermedia I: transferir una alícuota de 4 mL de la solución patrón madre y diluir a 100 mL con la solución extractora. Tiempo de almacenamiento máximo: 1 semana.
- Solución intermedia II: transferir una alícuota de 10 mL de la solución intermedia I y diluir a 100 mL con solución extractora, preparar diariamente.
- Soluciones estándar para la curva de calibración: transferir los volúmenes indicados en la tabla VI de la solución intermedia II para balones aforados de 100 mL y aforar con la solución extractora.

Tabla VI. **Preparación de las soluciones estándar**

Solución estándar	Volumen de solución intermedia II (mL)	Concentración de boro	
		En el extracto (mg/L)	En el suelo (mg/dm ³)
1	0	0,00	0,00
2	2	0,08	0,16
3	4	0,16	0,32
4	6	0,24	0,48
5	8	0,32	0,64
6	10	0,40	0,80

Fuente: Perkin Elmer. *Perkin Elmer instruments*. <http://goo.gl/r03s87>. Consulta: 23 de septiembre de 2013.

2.5.2.4. Procedimiento para la lectura en el espectrofotómetro

- Transferir una alícuota de 4 mL de la solución de prueba blanco, de los extractos de suelo y de cada solución estándar, para tubos de ensayo.
- Agregar 1 mL de la solución tampón y homogeneizar.
- Agregar 1 mL de la solución de azometina H y agitar vigorosamente.
- Dejar en reposo en un lugar oscuro por 30 minutos.
- Proceder a las lecturas, ingresando las soluciones estándar en primer lugar, para una longitud de onda de 420 nm.
- Hacer el gráfico de la curva de calibración, correlacionando los resultados de las lecturas de la absorbancia con las concentraciones de boro en el suelo. Es necesario construir una curva para verificar que el ajuste de los puntos es satisfactorio.
- Proceder a la lectura de los blancos y de las muestras de la misma manera que se realizó para los estándares.

2.6. Validación de métodos analíticos

Un método analítico es una forma de obtener resultados a partir del análisis químico de muestras. Antes de ser usado, es necesario comprobar que dicho método cumple unos determinados requisitos que dependerán de la aplicación que se le quiere dar.

2.6.1. Estadística básica

Para los fines de una validación, se utilizan normalmente ciertas mediciones estadísticas, que ayudan a establecer si el método se encuentra dentro de un parámetro aceptable, normalmente se determina lo siguiente:

2.6.1.1. Media

Conocida también como media aritmética o promedio, es la cantidad total de la variable (muestra o medida) distribuida a partes iguales entre cada observación. En términos matemáticos, es igual a la suma de todos sus valores dividida entre el número de sumandos:

$$X = \frac{\sum xi}{n}$$

Donde

xi = valor de una lectura

n = número de lecturas

2.6.1.2. Desviación estándar (σ , S)

Es el promedio de separación de los valores obtenidos (lecturas) respecto del promedio.

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

Donde

x_i = valor de una lectura

X = promedio de la totalidad de lecturas

n = número de lecturas

2.6.1.3. Coeficiente de variación (CV)

Es la desviación estándar dividida por la media. También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje:

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

Donde

S = desviación estándar de las lecturas

X = promedio de la totalidad de lecturas

2.6.1.4. Varianza

Es una medida de dispersión definida como el cuadrado de la desviación estándar.

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

Donde

x_i = valor de una lectura

X = promedio de la totalidad de lecturas

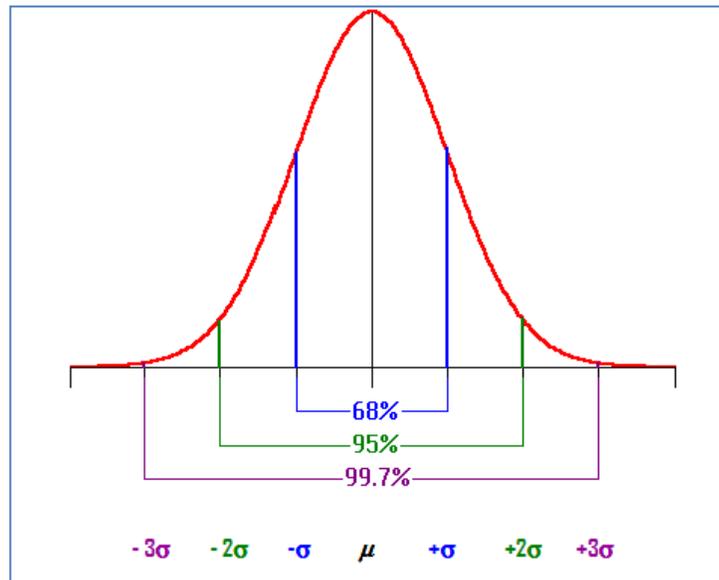
n = número de lecturas

2.6.1.5. Distribución normal

Conocida también como distribución gaussiana, la distribución de una variable normal está completamente determinada por dos parámetros, su media y su desviación estándar, denotadas generalmente por μ y σ .

La distribución normal se caracteriza por tener una única moda, que coincide con su media y su mediana. Su expresión gráfica es una curva normal, cuya forma es similar a los histogramas con forma de campana, es conocida como campana de Gauss, es simétrica respecto a su media y asintótica al eje de abscisas, esto hace que cualquier valor entre $-\Phi$ y Φ sea teóricamente posible. El área total bajo la curva es, por tanto, igual a 1. Para este tipo de variables existe una probabilidad de un 50 % de observar un dato mayor que la media, y un 50 % de observar un dato menor.

Figura 13. **Distribución normal con tres desviaciones**



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos*. p.10.

- La probabilidad de que X_0 se ubique en el intervalo comprendido entre $\mu \pm \sigma$ es aproximadamente 0,687 o 68,27 %.
- La probabilidad de que X_0 se ubique en el intervalo comprendido entre $\mu \pm 2\sigma$ es aproximadamente 0,9545 o 95,45 %.
- La probabilidad de que X_0 se ubique en el intervalo comprendido entre $\mu \pm 3\sigma$ es aproximadamente 0,9973 o 99,73 %.

2.6.1.6. Nivel de significancia (Alfa, σ)

Es el nivel de significación utilizado para calcular el nivel de confianza. El nivel de confianza es igual a 100 % ($1 - \sigma$), es decir, un alfa (σ) de 0,05 indica un nivel de confianza de 95 %.

2.6.1.7. Factor de cobertura

Número mayor que uno, por lo que una combinación de incertidumbre en la medición estándar se multiplica a obtener una incertidumbre expandida de medida. Un factor de cobertura suele ser simbolizado k .

2.6.2. Pruebas de significancia

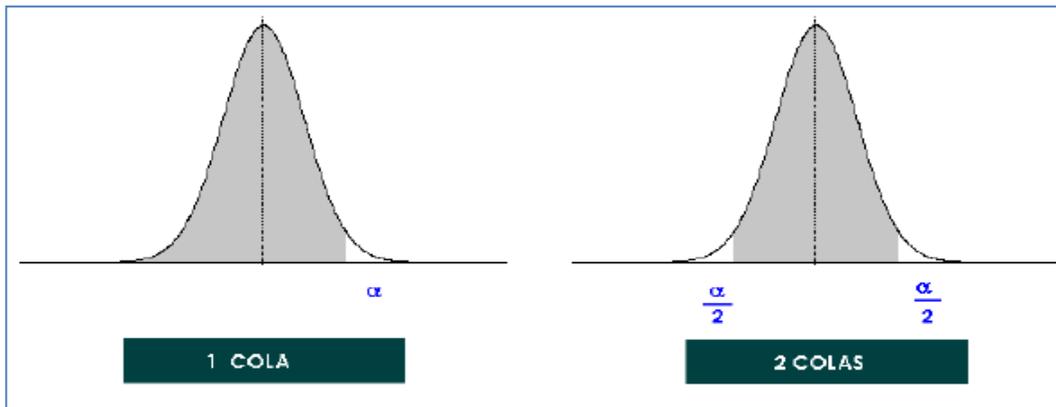
Es frecuente utilizar pruebas de significancia estadísticas durante el proceso de validación de los métodos analíticos, en este sentido se aplican comúnmente las siguientes:

- Prueba t- Student para identificar errores sistemáticos (sesgo)
- Prueba F-Fisher para identificar errores aleatorios (precisiones)

Al hacer una prueba de significancia, se comprueba la veracidad de una hipótesis experimental, llamada hipótesis alternativa (H_1 , si hay diferencia), con respecto a la hipótesis nula (H_0 , no hay diferencia).

Es la hipótesis alternativa la que determina el número de colas. Si la hipótesis alternativa contiene la frase “mayor que” o “menor que”, la prueba es de una cola. Si la hipótesis alternativa contiene la frase “no es igual que”, la prueba es de dos colas.

Figura 14. Ejemplos de hipótesis alternativas



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p.15

- “La media es igual al valor dado” ($H_0: \mu = x_0$) versus “la media no es igual al valor dado” ($H_1: \mu \neq x_0$) \Rightarrow dos colas
- “La media es igual al valor dado” ($H_0: \mu = x_0$) versus “la media es menor que el valor dado” ($H_1: \mu < x_0$) \Rightarrow una cola
- “La media es igual al valor dado” ($H_0: \mu = x_0$) versus “la media es mayor que el valor dado” ($H_1: \mu > x_0$) \Rightarrow una cola

Una forma práctica de decidir es respondiendo a dos preguntas:

- t – Test
 - ¿Son las medias iguales? Dos colas
 - ¿Son las medias diferentes? Una cola

- F-Test
 - ¿Son las varianzas diferentes? Dos-colas
 - ¿Es la varianza 1 mayor que la varianza 2? Una-cola

2.6.2.1. Prueba t-Student

Esta prueba permite comparar las medias de dos grupo de datos y determinar si entre estos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas.

En la prueba t, se procede a determinar el valor t de Student calculado, obtenido de la experiencia analítica, y este valor posteriormente se compara con el llamado valor crítico. Este valor crítico se obtiene de la tabla de t-Student para un determinado porcentaje de confiabilidad (normalmente se utiliza el 95 % de confianza, es decir, un valor σ de 0,05). Si no existen diferencias significativas entre 2 grupos, el t calculado debería ser inferior al t crítico (o conocido también como t de tabla).

$$t_{calc} = \frac{|X1 - X2|}{\sqrt{\frac{S1^2(n1-1) + S2^2(n2-1)}{n1+n2-2} * \left(\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2}\right)}}$$

2.6.2.2. Prueba F de Fisher

Prueba en la que el estadístico utilizado sigue una distribución F si la hipótesis nula no puede ser rechazada. En estadística aplicada se prueban muchas hipótesis mediante el test F, entre ellas: la hipótesis nula, H_0 , de que las medias de múltiples poblaciones normalmente distribuidas y con la misma

desviación estándar son iguales. Esta es, quizás, la más conocida de las hipótesis verificadas mediante el test F y el problema más simple del análisis de varianza. También, la hipótesis de que las desviaciones estándar de dos poblaciones normalmente distribuidas son iguales.

2.6.3. Validación

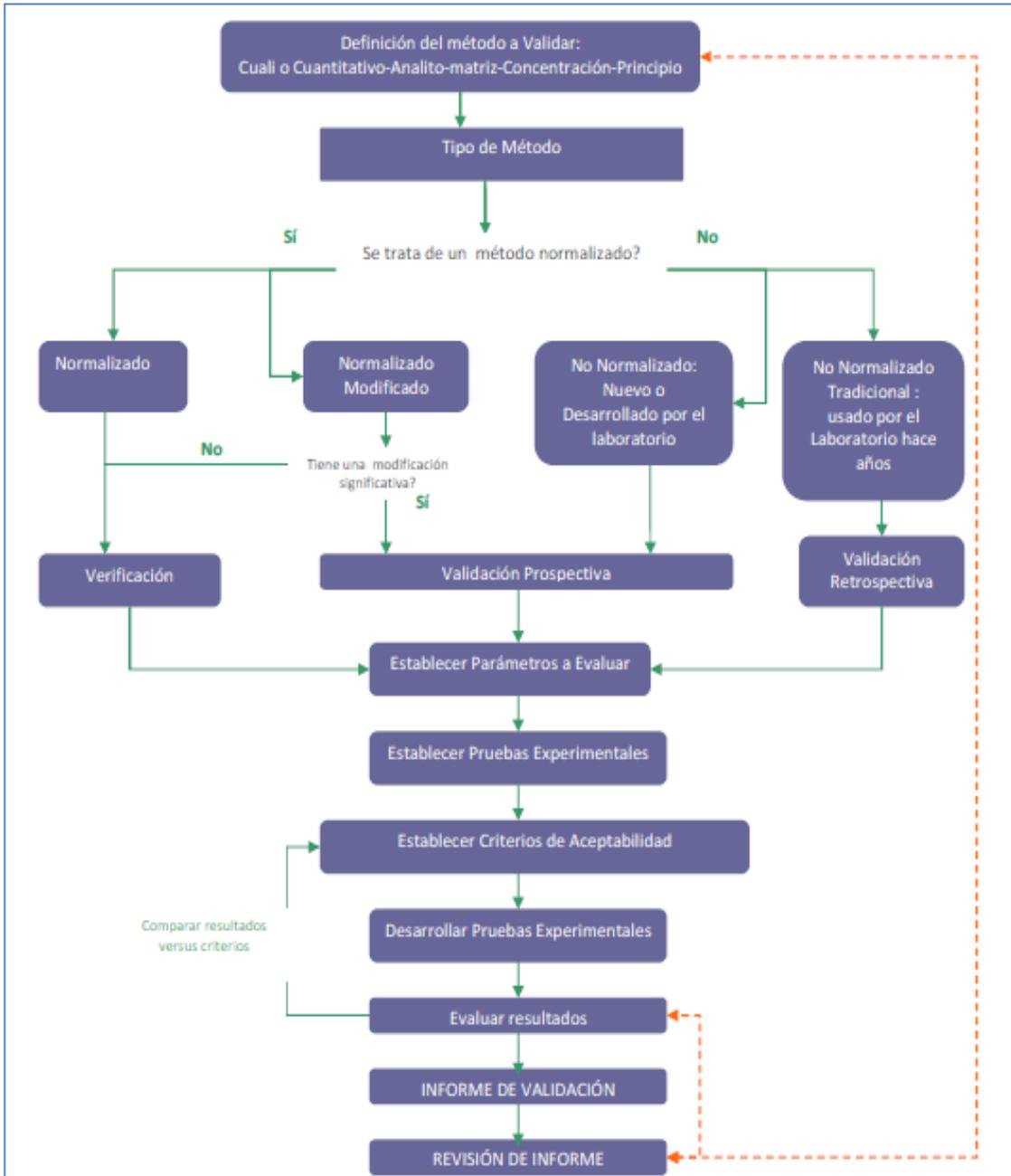
Es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos (ver figura 15). En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que, la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable.

Es importante que el laboratorio tenga claridad, antes de iniciar la validación, sobre cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación. Es esencial, entonces, conocer el método a validar y su aplicabilidad, es decir, el analito, su concentración (nivel, LMP, LMR, entre otros) y la matriz (o matrices) en las cuales se desea utilizar.

En general, se establece que el laboratorio debe validar:

- Métodos no normalizados: corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
- Método normalizado con una modificación significativa.

Figura 15. Diagrama de flujo para la validación de métodos analíticos



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p.18.

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una validación retrospectiva. Es decir, con base en los datos experimentales que el laboratorio dispone, para lo cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, se efectuará un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, los cuales pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, entre otros. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación y evaluar si los resultados obtenidos para los fines son aceptables.

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes), se debe realizar una validación prospectiva, generando a través de análisis datos experimentales. En algunos casos se puede realizar lo que se conoce como validación menor o verificación cuando se trate de:

- Métodos normalizados.
- Métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto. Ejemplo: uso en otra matriz.
- Ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados. Ejemplo: uso en otros analítos.

Cuando se trate de métodos previamente validados que hayan sufrido alguna alteración significativa, deben volver a evaluarse. Estas variaciones pueden ser cambio de equipo; cambio de componentes de equipo como columnas o detectores; cambio analista; cambio de la matriz que contiene la muestra o de nivel de concentración del analito de interés, entre otros.

En relación a los parámetros de validación o verificación, estos deberán determinarse de acuerdo al tipo de método. Para este fin la tabla VII puede ser utilizada como guía.

Tabla VII. **Parámetros a evaluar en la validación de métodos**

Parámetro a evaluar	Características	Método cualitativo	Método cuantitativo		
			Normalizado	Modificado	Nuevo
Selectividad	Identificación analito, interferencia de matriz	Sí	No	Sí	Sí
Linealidad	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
Sensibilidad	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
Límites	Crítico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o No	Sí	Sí
Precisión	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Veracidad	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o No	Sí o No	Sí
Robustez	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
Aplicabilidad	-----	Sí	Sí	Sí	Sí

Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p.17.

2.6.3.1. Selectividad

Es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes.

Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés. La prueba de selectividad puede diseñarse de acuerdo al método, en el caso de cromatografía, la resolución entrega información sobre la selectividad del método; en el caso de espectrofotometría, el espectro de absorción o un espectro de masas entrega información al respecto, en especial cuando es comparado en presencia de una interferencia.

Una prueba de selectividad comúnmente utilizada consiste en analizar un mínimo de tres testigos reactivos, tres blancos de matriz y tres muestras o estándares de concentración conocida del analito de interés. Se deben comparar las lecturas (señales de medición) obtenidas para cada caso, y observar si existen variaciones entre los testigos reactivos, blancos de matrices y estándares o muestras con analito. Si se encuentran diferencias significativas deberán ser identificadas y en lo posible eliminadas.

2.6.3.2. Linealidad

Es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio. Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante un gráfico de concentración contra respuesta, que se conoce como función respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Esta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y

los patrones de trabajo limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido, se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al LMP o al valor de interés.

El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 4 valores). Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal (ver figura 16). Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la curva de trabajo o curva de calibración (ver figura 17). Graficar los datos de concentración de los estándares de calibración estimados (X) contra la lectura observada (Y).

Evaluar los estimadores de regresión lineal del gráfico: la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r ó γ) y el punto de corte (intercepto) con el eje de las Y (L_0).

$$Y = X \times m + L_0$$

En general, el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación. El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son -1 y 1. El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con una pendiente positiva. Cuando $r = 0$, no existe correlación alguna, independencia total de los valores X e Y.

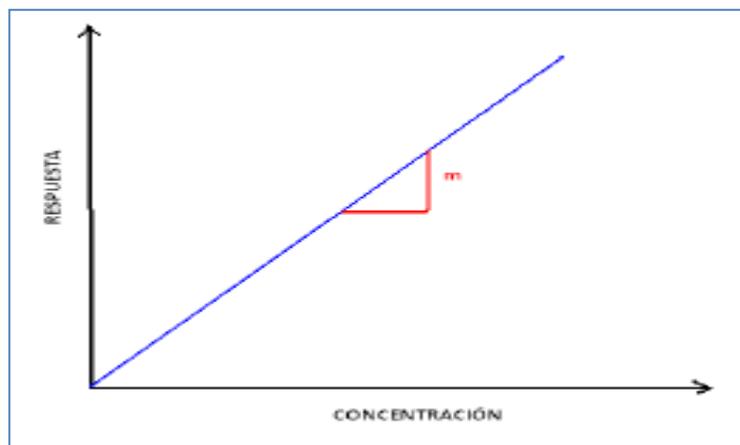
En la práctica, si r tiene un valor cercano a uno significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración, es recomendable que el coeficiente de correlación sea mayor o igual a 0,999, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0,99.

Figura 16. **Establecer rango lineal**



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p.20

Figura 17. **Curva de calibración**



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p.20

2.6.3.3. Sensibilidad

Es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. En una regresión lineal, la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración. Se calcula como:

$$m = \frac{\sum X_j Y_j - (\sum X_j \sum Y_j / n)}{\sum X_j^2 - ((\sum X_j)^2 / n)}$$

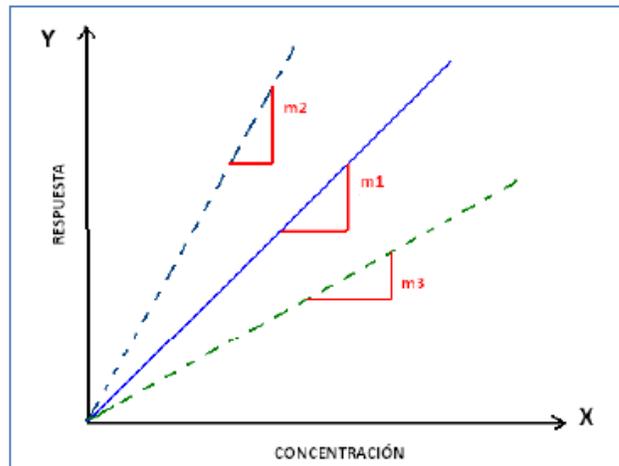
El valor de sensibilidad obtenido (m) debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración en base a la lectura. En la figura 18, se observa que mientras más próxima al eje de las ordenadas esté la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas (m_2). En el caso de (m_3) grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura.

Se dice que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. En el tiempo, se visualiza cómo se comporta el instrumento.

2.6.3.4. Límites

Se debe tener en consideración los siguientes parámetros: valor crítico (LC), límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Figura 18. **Respuesta en función de la concentración**



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p. 22.

- Valor crítico (LC)

El valor de la concentración que en caso de superarse da lugar, para una probabilidad de error α , a la decisión de que la concentración presente en el material analizado es superior a la contenida en el material testigo. Se recomienda para su cálculo al menos seis mediciones de blanco matriz.

$$LC = t(1 - \alpha; v) \times S_0 \text{ si } t(0,05, \Phi) \rightarrow 1,645 \quad LC = 1,645 \times S_0$$

Donde

t = t - Student

1- α = probabilidad b

v = grados de libertad

S₀ = desviación estándar de las lecturas del blanco matriz o testigo reactivo

Un resultado inferior al LC que determine la decisión “no detectado” no deberá interpretarse como demostración de que el analito está ausente. No se recomienda notificar tal resultado como “cero” o como < LOD. Deberá hacerse constar en todo los casos el valor estimado y su incertidumbre.

- Límite de detección (LOD)

Cantidad real del analito presente en el material objeto de análisis que llevará, con una probabilidad (1-β), a la conclusión de que la cantidad del analito es mayor en el material analizado que en el material testigo. Se recomienda para su cálculo al menos seis mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco.

$$\text{LOD} = 2 t_{(1-\alpha; v)} \times S_0 \quad \text{Si: } t(0,05, \infty) \longrightarrow 1,645 \quad \text{LOD} = 3,29 \times S_0$$

LOD = 3,29S₀, cuando la incertidumbre del valor medio (esperado) del material testigo es insignificante, α = β = 0,05 y el valor estimado tiene una distribución normal con una varianza constante conocida. Un criterio de aceptación adecuado es LC < LOD < LMP.

Tabla VIII. **LOD en función de LMP**

		LOD	
LMP	> 0,1 ppm	< 1/10 LMP	
	< 0,1 ppm		< 1/5 LMP

Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p. 24.

- Límite de cuantificación (LOQ)

Una característica del funcionamiento del método que suele expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) generalmente de 10 % (o 6 %). El LOQ se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$LOQ = 10 S_o$$

Se recomienda para su cálculo al menos seis mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco.

En este caso, el LOQ es exactamente 3,04 veces el límite de detección, dada la normalidad y $\alpha = \beta = 0,05$. En el LOQ es posible lograr una identificación positiva con un nivel de confianza razonable. Un criterio de aceptación adecuado es $LC < LOD \ll LOQ < LMP$.

Tabla IX. **LOQ en función de LMP**

		LOD	
LMP	> 0.1 ppm	< 1/5 LMP	
	< 0.1 ppm		< 2/5 LMP

Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos*. p. 24.

2.6.3.5. Exactitud

Se aplica a un conjunto de resultados de un ensayo y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo. Cuando se aplica a un método de ensayo, el término exactitud se refiere a una combinación de veracidad y precisión. En la figura 19 se representa un esquema de tiro al blanco, ampliamente utilizado para ejemplificar esto, los puntos u orificios equivaldrían a los resultados analíticos y el círculo rojo al centro, el rango en el cual se espera este el valor de referencia.

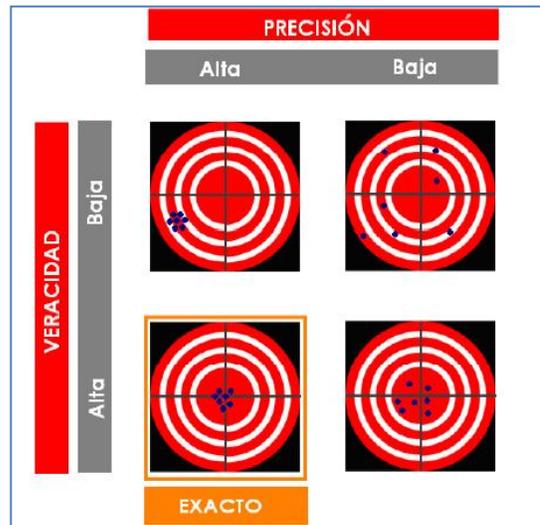
2.6.3.6. Veracidad

Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

- Sesgo

La diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica, el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio. Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado, material control, material ensayo de aptitud. Para este fin se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido.

Figura 19. Exactitud, veracidad y precisión



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p. 24.

Entre más veraz y preciso sea un resultado analítico, es más exacto. Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método.

$$s = X - X_a$$

Donde

s= sesgo

X = lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

X_a = valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

Para evaluar el sesgo, se debe realizar la prueba t, en la cual el $t_{\text{obs}} < t_{\text{crit}}$:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(X_a - X)}{S \times \sqrt{n}}$$

Donde

t_{calc} = t observado o calculado

X_a = valor esperado o valor certificado en concentración

X = promedio de valores leídos u observados en concentración

S = desviación estándar

n = número de lecturas o valores observados

Buscar t - Student teórico en el anexo 1 de este trabajo de graduación para grados de libertad (ν) y el porcentaje de seguridad deseado ($1-\sigma$) para un error σ . Usualmente se trabaja con un valor de 0,05.

- Recuperación (R)

Es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación esta intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra.

Se recomienda realizar al menos 6 mediciones de cada uno, en lo posible en tres niveles. Se debe considerar, al elegir estos niveles, el rango de la curva de calibración del método, el LOD y el LMP establecido. De manera que los niveles seleccionados permitan entregar la mejor información posible respecto a

la capacidad de recuperación del método, en cuanto a estos valores críticos. Se calcula de la siguiente manera:

$$R = \left(\frac{C_e - C_o}{C_a} \right)$$

Donde

R= recuperación

C_e = concentración de analito de la muestra enriquecida

C_o = concentración de analito medida en la muestra sin adicionar

C_a = concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida

Se puede igualmente expresar en porcentaje de recuperación (%R): se calcula de la siguiente manera:

$$\%R = (R) * 100$$

En caso de evaluar la recuperación, se deberá realizar prueba t, en la cual el $t_{calc} < t_{crit}$:

$$t_{calc} = \frac{(100 - \%R)}{S \times \sqrt{n}}$$

Donde

t_{calc}= t observado o calculado

R= recuperación

S= desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación

n= número de lecturas o valores observados

Buscar t-Student teórico en el anexo 1 de este trabajo de graduación para grados de libertad (ν) y el porcentaje de seguridad deseado ($1-\sigma$) para un error σ de 0,05, es decir con un 95 % de confianza. Si el $t_{\text{calc}} > t_{\text{crit}}$ (hay diferencia estadísticamente significativa), los resultados reportados deberán ser corregidos. Si el $t_{\text{calc}} \leq t_{\text{crit}}$ (no hay diferencia estadísticamente significativa), no es necesario ninguna corrección.

2.6.3.7. Precisión

Podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados.

- Repetibilidad

Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en elementos de análisis idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.

Se puede determinar registrando al menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y en corto intervalo de tiempo) de un analito en un material de referencia. Calcular la desviación estándar (S_r) y el porcentaje de coeficiente de variación (CVr%).

- **Reproducibilidad**

Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítems idénticos de análisis en condiciones diferentes, ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros. Para determinar la precisión de la reproducibilidad intralaboratorio (R_i) (es decir, la precisión dentro de un laboratorio), se sugiere realizar 3 mediciones de un material de referencia (MRC o material control) una vez por cada semana o el comportamiento de la curva de calibración en 3 días distintos.

También, se puede determinar registrando a lo menos 10 mediciones en días distintos o en un mismo día, cambiando al menos una condición analítica (ejemplo: operador, aparato, reactivos y largo intervalo de tiempo) de un analito en un material de referencia. Calcular la desviación estándar (SR_i) y el porcentaje de coeficiente de variación ($CVR_i\%$).

2.6.3.8. 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 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

Para esta determinación se aplica el test de Youden y Steiner para la evaluación de la robustez de un método químico analítico. Este procedimiento permite evaluar el efecto de siete variables con solo ocho análisis de una muestra. Para proceder a realizar el estudio de robustez, se deben identificar aquellos factores del método que posiblemente afectarían los resultados finales obtenidos.

Estos factores están presentes habitualmente en el método (ejemplo: temperatura, composición de fase móvil o soluciones reactivas, pH de solución, tamaño de celda espectrofotométrica, flujo gas, *carrier*, *split*, entre otros). Para estudiar la robustez, se procede a exponer a cada factor a un estudio de variable, es decir, se expone a una variación respecto de la establecida en el método, cada variable se estudia mediante un valor alto (A, B,...,G) y otro bajo (a,b,...,g). Una vez establecidos estos valores se diseñan ocho pruebas de ensayo.

Los factores a estudiar no deben ser necesariamente siete, puede considerarse un número menor de variables. Esto no afectará el balance del diseño del experimento, pero es importante considerar que siempre se deben llevar a cabo las ocho pruebas de ensayo indicado. Los resultados de la experiencia analítica obtenidos con las variaciones realizadas en estas 8 pruebas se representan con las letras s hasta la z.

2.6.3.9. Aplicabilidad

Se utiliza este término cuando un método de análisis puede utilizarse satisfactoriamente para los analitos, matrices y concentraciones previstas. La declaración de aplicabilidad (o ámbito de aplicación), además de una declaración del margen de funcionamiento satisfactorio para cada factor, puede incluir también advertencias acerca de la interferencia conocida de otros analitos o de la inaplicabilidad a determinadas matrices y situaciones.

Es decir, la aplicabilidad consiste en una declaración de las especificaciones del rendimiento del método que se entrega en el informe de validación y que normalmente incluye la siguiente información:

- La identidad de la sustancia analizada.
- El intervalo de concentraciones cubierto por la validación.
- Una especificación de la gama de las matrices del material de prueba cubierto por la validación.
- La aplicación prevista y de sus requisitos de incertidumbre críticos.

En este sentido, la prueba de aplicabilidad consiste en el ámbito de aplicación del método declarado por el responsable de la validación, una vez concluida esta. En aquellos casos que se trate de un método normalizado u

oficializado, esta declaración se realiza de acuerdo a los antecedentes bibliográficos o normativos del método.

2.6.3.10. Incertidumbre

Es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando. En este sentido, es importante que para un método validado o verificado por el laboratorio se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

- Muestreo.
- Efectos de la muestra: tipo de matriz, almacenamiento, entre otros.
- Sesgos instrumentales: debidos a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas como deriva, resolución, magnitudes de influencia. Ejemplo: temperatura.
- Pureza de reactivos: materiales de referencia, preparación de estándares.
- Analista: debido a la serie de mediciones, variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales.
- Condiciones de medición: debido al certificado de calibración, en él se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor de k determinado, en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico, entre otros.
- Condiciones de medición: temperatura, humedad, entre otros.
- Otras: método (por ejemplo al interpolar en una recta), tablas (por ejemplo las constantes), pesada, alícuota, efectos computacionales, entre otros.

Generalmente, para el análisis de las fuentes de incertidumbre se utiliza el diagrama de espina de pescado u otro tipo de diseño esquemático que permita con facilidad identificar las fuentes de incertidumbre presentes durante el proceso analítico. La incertidumbre de la medición comprende, en general, muchos componentes. Algunos de estos pueden ser evaluados por tipo. Para este fin, el laboratorio deberá realizar una evaluación de las incertidumbres tipo A y B que están presentes en el método.

- Evaluación de incertidumbre tipo A

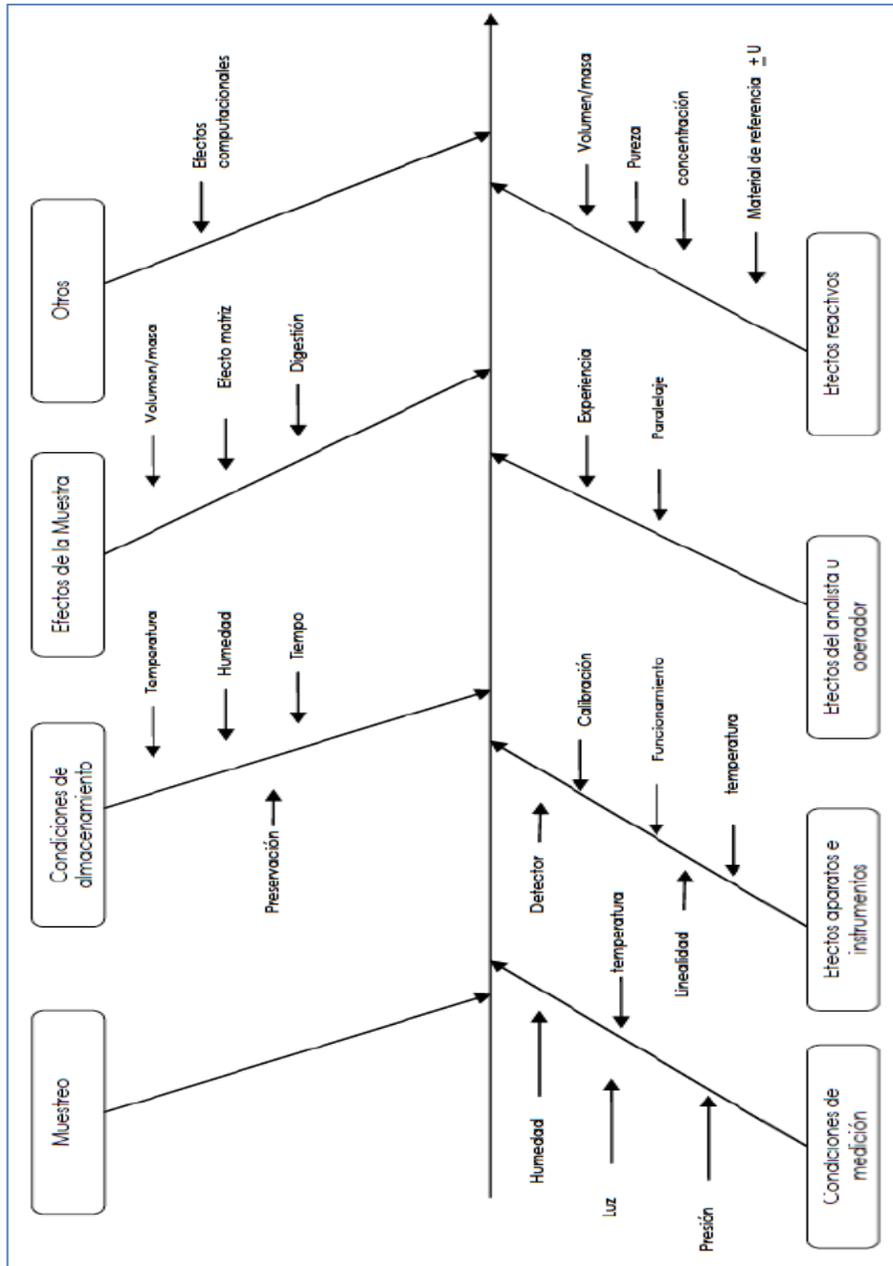
Evaluación de un componente por un análisis estadístico de los valores de mediciones obtenidos en condiciones de medición definidas. Ejemplo: realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad.

- Evaluación de incertidumbre tipo B

Evaluación de un componente incertidumbre de la medición realizada por otros medios distintos a los del tipo A.

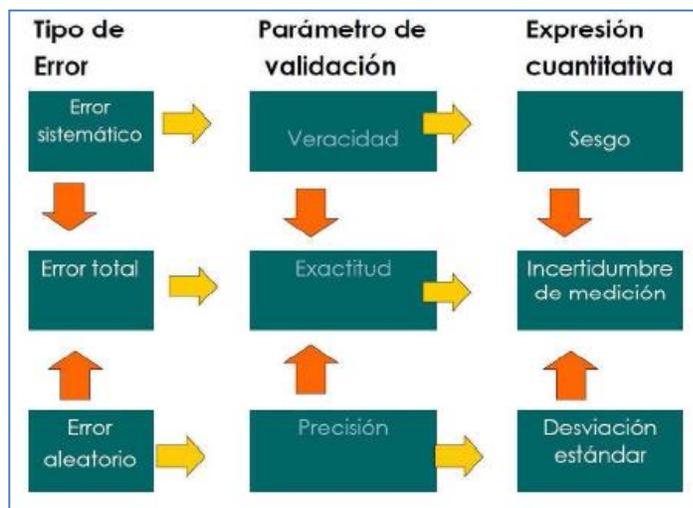
Ejemplos: La evaluación basada en la información, obtenidos a partir de un certificado de calibración, obtenidos a partir de los límites deducirse a través de personal, la experiencia, entre otros. En general, la incertidumbre está dada por los errores sistemáticos y aleatorios presentes en el ensayo analítico.

Figura 20. Diagrama de Ishikawa



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p. 50.

Figura 21. Tipos de error



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p. 51.

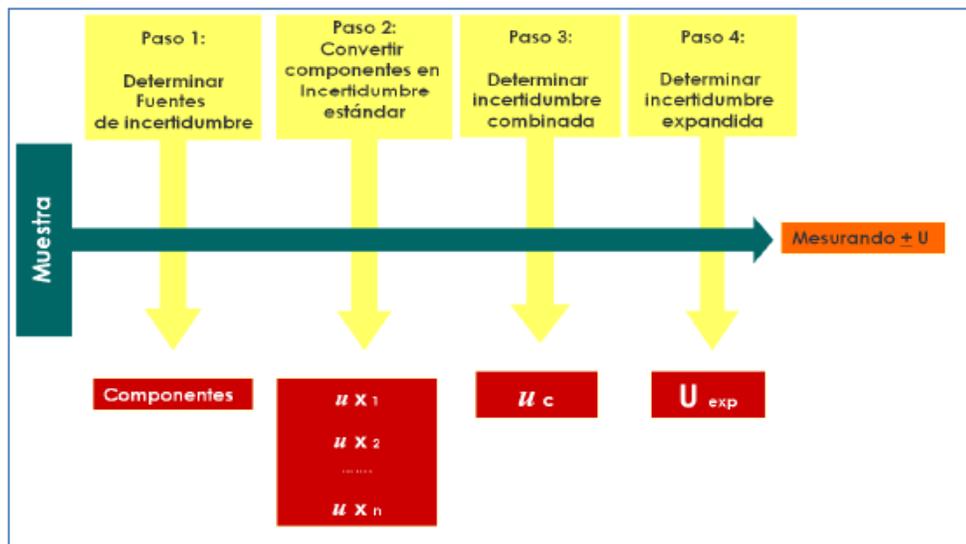
La determinación de la incertidumbre incluye generalmente 4 pasos. El primero, como se ha dicho anteriormente, corresponde a la determinación de las fuentes; el segundo consiste en expresar los componentes en una incertidumbre estándar; el tercero en combinar las diferentes incertidumbres y el cuarto paso es la determinación de la incertidumbre expandida, es decir, multiplicar la incertidumbre combinada por un factor de cobertura de $k = 2$, a fin de entregar un 95 % de confianza, y así establecer el intervalo entorno al resultado de la medición, en el cual se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores que se atribuyen razonablemente al mesurando.

Los resultados obtenidos se expresarán por ejemplo: $178 \text{ mg/L} + 14 \text{ mg/L}$, que corresponde a $178 \text{ mg/L} + (2 \times 7 \text{ mg/L})$, es decir, el resultado entregado, corresponde a un intervalo de " $a \pm 2u$ " que representa un nivel de confianza del

95 % en el cual se encontraría el valor real. En algunos casos pueden existir mayores exigencias en cuanto al valor del factor de cobertura utilizado para obtener la incertidumbre expandida, pudiéndose solicitar o requerir un $k = 3$, a fin de entregar un 99,7 % de confianza, esto generalmente se puede solicitar frente a determinados contaminantes o residuos.

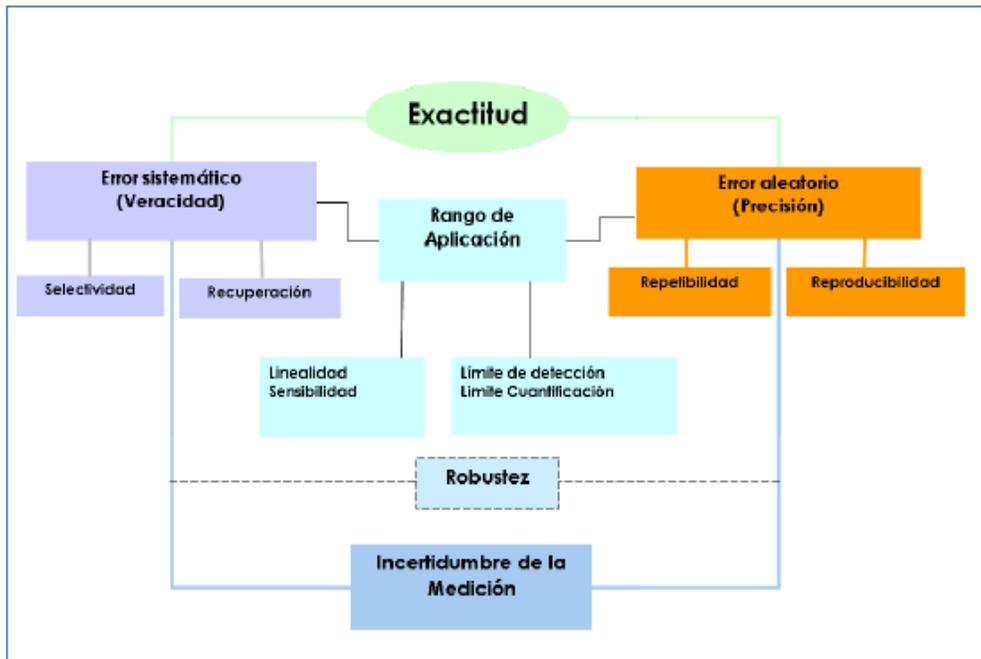
La determinación de la incertidumbre realizada por el laboratorio debe estar debidamente documentada. Para demostrar que un método analítico es adecuado para el fin previsto, el laboratorio deberá demostrar, a través de una evidencia objetiva, que el método analítico ha sido adecuadamente validado o verificado. En este sentido, el laboratorio debe demostrar que las características de desempeño del método analítico utilizado, son adecuadas para el uso destinado.

Figura 22. Pasos para la determinación de la incertidumbre



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p. 52.

Figura 23. Incertidumbre de la medición



Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p. 53.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables independientes

- Volumen

La cantidad de volumen que se toma de la muestra está relacionada directamente con el factor de dilución que se utiliza en la lectura del espectrofotómetro.

- Porcentaje de humedad

Se debe tener presente que la muestra de suelo que se analizará, debe tener un porcentaje de humedad constante, ya que este influye en la concentración de boro presente en dicho suelo.

- Tiempo de reacción

El tiempo de reacción para cada uno de los métodos es diferente y es un punto crítico en el procedimiento, puesto que si se deja reaccionar más tiempo o menos tiempo del establecido en la metodología, se alterarán los resultados.

- Tiempo de agitación

El tiempo de agitación establecido en el procedimiento “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría

visible)” es el necesario para la extracción adecuada del elemento presente en la muestra de suelo.

- Tiempo de calentamiento

El tiempo de calentamiento establecido en el procedimiento “determinación de boro en agua caliente, usando calentamiento con microondas” es el necesario para la extracción adecuada del elemento en la muestra de suelo.

- pH de la solución *buffer*

Como ya se mencionó anteriormente, el pH de la solución debe ser constante, debido a que el boro se presenta en forma de ácido bórico en suelo. Entonces, al alterar el pH de la solución también se alterará la cantidad de boro disponible presente en la misma.

- Temperatura

La temperatura a la que se preparará la azometina es esencial en el procedimiento, puesto que si la azometina se calienta demasiado, pierde sus propiedades y se dan alteraciones en los resultados.

- Concentración

La concentración es directamente proporcional a la cantidad de luz absorbida por la muestra.

3.2. Delimitación del campo de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Especiales (Analab) de la Asociación Nacional del Café (Anacafé) ubicado en la 5^a calle 0-50 de la zona 14 de la ciudad capital, Guatemala.

Dicho estudio se realizó por medio de la comparación de dos métodos analíticos para la extracción de boro del suelo. El primer método cuantifica el boro por medio de una extracción utilizando una solución extractante de fosfato ácido de calcio ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y agitación constante por un período determinado. El segundo método cuantifica el boro por medio de una extracción utilizando una solución extractante de cloruro de bario (BaCl_2) y calentamiento con microondas por un período determinado.

Dichos métodos se compararon a través de un análisis estadístico y eficaz. El estudio se realizó por medio de una muestra de suelo certificada, la cual tiene una concentración de boro de 0,27 ppm. La temperatura en el laboratorio se mantuvo en un rango promedio de 10 a 30 °C y una humedad relativa de 40 a 80 %, según la bitácora de condiciones ambientales que se encuentra dentro del área de balanzas.

3.3. Recursos humanos disponibles

Los recursos humanos disponibles para efectos de este trabajo de investigación fueron los siguientes.

Tabla X. **Recursos humanos**

Función	Responsable
Investigador	Brenda Carolina González Dorantes, estudiante de Ingeniería Química
Colaborador	Luis Rufino Mazariegos Marcial, analista de Analab.
Asesor	Ingeniera Química Carmen Elizabeth Cifuentes Castillo, egresada de la Universidad de San Carlos de Guatemala con colegiado No. 1,160

Fuente: elaboración propia.

3.4. Recursos materiales disponibles

Los recursos materiales disponibles para efectos de este trabajo de investigación fueron los siguientes.

3.4.1. Materia prima

- Suelos certificados
- Suelos, controles internos del laboratorio

3.4.2. Cristalería

En la tabla XI se presenta la cristalería y el equipo utilizado para este trabajo de investigación.

Tabla XI. **Cristalería disponible**

Cristalería	Capacidad en mililitros	Cantidad
<i>Beaker</i>	2 000	1
	100	9
	75 (libres de boro)	30
	75 (plásticos con tapadera)	60
	400	2
	600	1
	1 000	1
Balón aforado	1 000	1
	200	1
	2 000	1
	100	9
Probeta	250	2
	25	1
Varilla de agitación	-----	1
Embudo	pequeño	1
Cucharas	10	2
Dispensador	25	1
	20	1
Filtro 11 cm	-----	variable
Papel filtro de filtración lenta	-----	variable
Pipetas automáticas	1	1
	5	1
Puntas para pipetas	1	variable
	5	variable

Continuación de la tabla XII.

Pipetas volumétricas	20	1
	10	2
	15	1
	6	1
	2	2
	1	8
Celdas de cuarzo	5	2
Tubos de PVC	10	30
Bolsas de propileno	(15,5 * 25 * 0,05)	30
Clips de plástico	-----	30
Balones de polipropileno	Variado	5
Tubos de ensayo	10	30

Fuente: elaboración propia.

3.4.3. Equipo

- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Agitadores magnéticos
- Computadora
- Baño María
- Espectrofotómetro de luz ultravioleta y visible
- Cronómetro
- Agitador vortex
- Microondas con regulador de potencia

- Agitador mecánico

3.4.4. Reactivos

Todos los reactivos que a continuación se enlistan son de grado analítico; todos están previamente preparados por el fabricante.

- Agua destilada o desmineralizada
- Azometina H
- Ácido ascórbico
- Acetato de amonio
- Ácido acético
- EDTA
- Fosfato ácido de calcio
- Superfloc 127
- Ácido clorhídrico 6 N
- Ácido bórico
- Ácido clorhídrico 0,5 N
- Hidróxido de sodio 0,5 N
- Cloruro de bario

3.4.5. Laboratorios

Las pruebas se realizaron en el laboratorio de Suelos, Plantas y Especiales (Analab).

3.5. Técnica de investigación

La técnica de investigación utilizada fue la técnica cuantitativa, la cual se describe a continuación.

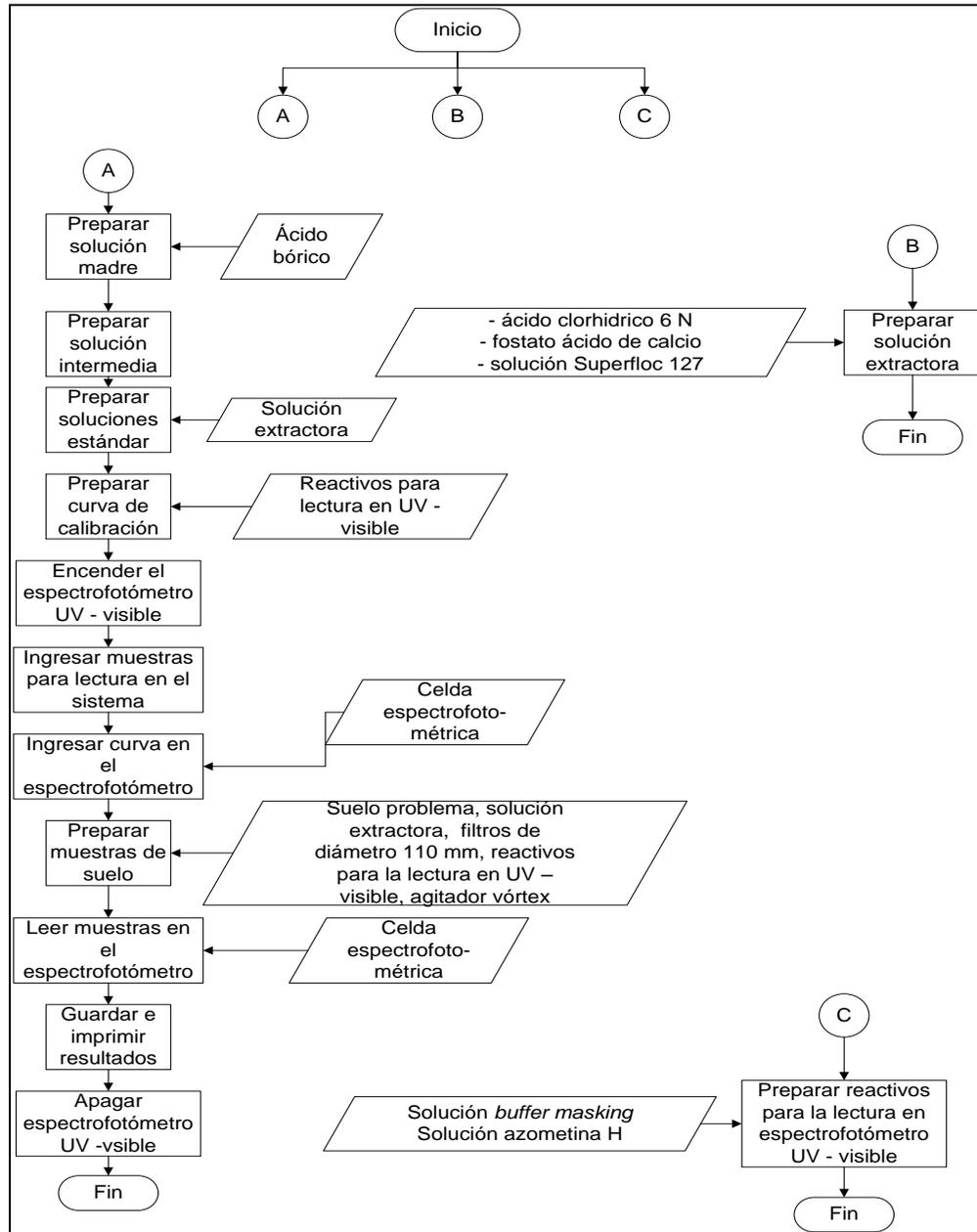
3.5.1. Técnica cuantitativa

El objetivo de una investigación cuantitativa es el de adquirir conocimientos fundamentales y elegir el modelo más adecuado que permita comprender la realidad de una manera más imparcial, ya que se recogen y analizan los datos a través de los conceptos y variables. La metodología de investigación cuantitativa se basa en el uso de técnicas estadísticas para conocer ciertos aspectos de interés sobre la población que se está estudiando. Se utilizará la técnica cuantitativa debido a que se ajusta a las necesidades que la investigación presenta. Para determinar estadísticamente cuál de los dos métodos es el que más se adecúa a las necesidades del Laboratorio, se necesitan resultados numéricos que puedan ser interpretados.

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

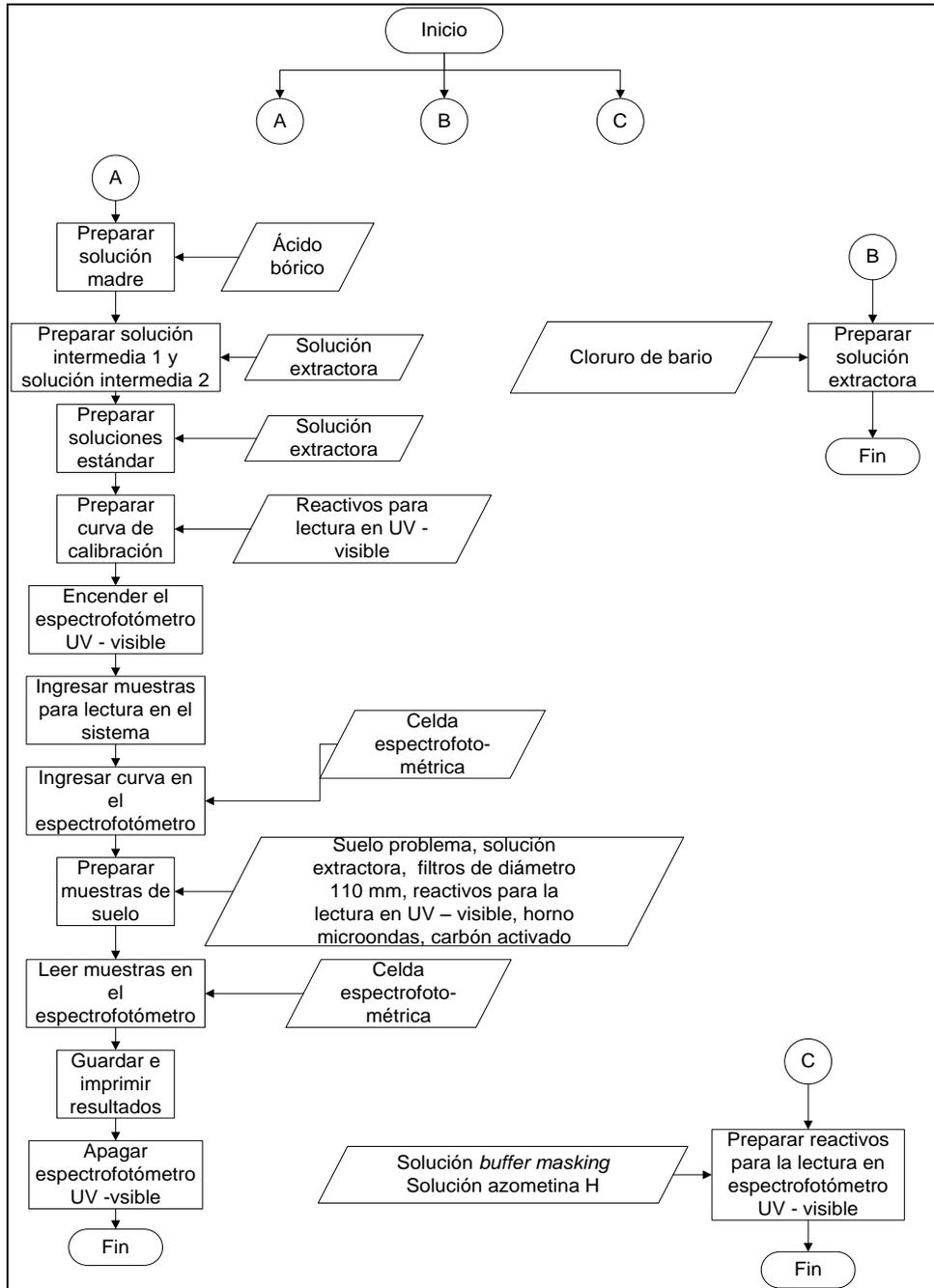
Los datos recolectados durante la fase experimental y la realización de los análisis fueron tabulados para su manejo e interpretación. A continuación se presentan los diagramas de flujo de cada uno de los métodos utilizados.

Figura 24. Diagrama de flujo, método fosfato ácido de calcio hidratado



Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Visio.

Figura 25. Diagrama de flujo, método agua caliente



Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Visio.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procedimiento de la información

La información recolectada fue tabulada, ordenada y procesada, utilizando Excel para el análisis estadístico.

3.8. Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza, también conocido como Anova, es el análisis estadístico en el cual se comparan más de dos medias entre sí. Para ese fin, se debe proceder a comparar las diferencias entre cada grupo y las observaciones realizadas. Para realizar el análisis de varianza (Anova) se utilizará el apoyo de una hoja electrónica.

4. RESULTADOS

A lo largo de esta sección se encontrarán los resultados para el método uno y el método dos. El método uno corresponde al método llamado “determinación de boro en agua caliente, usando calentamiento con microondas” y el método dos corresponde al llamado “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)”.

4.1. Selectividad

En el caso de la espectrofotometría, el espectro de absorción entrega la información de la selectividad.

Tabla XII. **Resultados selectividad**

SELECTIVIDAD			
Método 1		Método 2	
Muestra	Lectura (ppm)	Muestra	Lectura (ppm)
Blanco	-0,057	Blanco	-0,124
Blanco	-0,042	Blanco	-0,226
Blanco	0,077	Blanco	-3,356
Blanco	-0,093	Blanco	-1,419
Blanco	0,080	Blanco	0,070
Blanco	-0,105	Blanco	0,100

Fuente: elaboración propia.

Los interferentes detectados fueron:

- Contaminaciones a lo largo del proceso, podría ser desde el lavado de la cristalería, hasta el mal manejo de las celdas para lectura.
- Mala calibración de los instrumentos de medición.
- Mala preparación de las soluciones extractoras, soluciones reaccionantes o soluciones patrón.

4.2. Linealidad

Los datos para la linealidad fueron obtenidos directamente del espectrofotómetro, se hicieron tres curvas de calibración, una por cada día de ensayo.

Tabla XIII. **Resultados linealidad**

LINEALIDAD		
Método	Método 1	Método 2
Ecuación recta	$y = 1,138x$	$y = 0.7871x$
Rango lineal	[0,0000 – 0,4560] ppm	[0,0002 – 0,3055] ppm
Coefficiente de correlación	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9975$

Fuente: elaboración propia

4.3. Sensibilidad

En una regresión lineal, la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración.

Tabla XIV. **Resultados de sensibilidad**

SENSIBILIDAD	
Método	Pendiente
Método 1	1,1380
Método 2	0,7871

Fuente: elaboración propia

4.4. Límites

Se debe tener en consideración los siguientes parámetros: valor crítico (LC), límite detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Tabla XV. **Resultados de LC, LOD Y LOQ**

LÍMITES DE CONCENTRACIÓN DE BORO			
Método 1		Método 2	
Parámetro	ppm	Parámetro	ppm
LC	0,0511	LC	0,0728
LOD	0,1022	LOD	0,1456
LOQ	0,3107	LOQ	0,4425

Fuente: elaboración propia.

4.5. Exactitud

Cuando se aplica a un método de ensayo, el término exactitud se refiere a una combinación de veracidad y precisión.

4.5.1. Precisión

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla XVI. **Precisión según repetibilidad**

REPETIBILIDAD			
Parámetro	Método 1	Parámetro	Método 2
Media (ppm)	0,1752	Media (ppm)	0,7313
SD (ppm)	0,0196	SD (ppm)	0,2732
CV (ppm)	0,1120	CV (ppm)	0,3736
%CV	11,1996	%CV	37,3566

Fuente: elaboración propia.

Tabla XVII. **Precisión según reproducibilidad**

REPRODUCIBILIDAD			
Parámetro	Método 1	Parámetro	Método 2
Media (ppm)	0,1812	Media (ppm)	0,7005
SD (ppm)	0,0276	SD (ppm)	0,2635
CV (ppm)	0,1525	CV (ppm)	0,3762
%CV	15,2467	%CV	37,6221

Fuente: elaboración propia

4.5.2. Veracidad

La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

Tabla XVIII. Veracidad según sesgo

SESGO			
Parámetro	Método 1	Parámetro	Método 2
Lectura obtenida, X (ppm)	0,1518	Lectura obtenida, X (ppm)	0,7216
Sesgo,s (ppm)	-0,1182	Sesgo,s (ppm)	0,4516
t-Student, t (ppm)	0,6227	t-Student, t (ppm)	0,3320

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIX. Veracidad según recuperación

Recuperación					
Método 1			Método 2		
Concentración ppm	R	%R	Concentración ppm	R	%R
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,080	1,4735	147,3542	0,0200	0,9508	95,0833
0,160	1,1710	117,1042	0,0400	1,0821	108,2083
0,240	1,2857	128,5694	0,1200	0,9069	90,6944
0,320	1,4198	141,9792	0,2000	0,9981	99,8083
0,400	1,2816	128,1625	0,3000	0,9880	98,8000
-----	-----	-----	0,4000	1,0048	100,4833
Media de %R		110,5282	Media de %R		84,7254
Desviación estándar de %R		55,2114	Desviación estándar de %R		37,7418
t calculada		0,0778	t calculada		0,1652

Fuente: elaboración propia.

4.6. Robustez

Es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas.

Tabla XX. **Resultados de robustez**

ROBUSTEZ					
Método 1			Método 2		
(X-x)	Valor obtenido (ppm)	Criterio de aceptabilidad	(X-x)	Valor obtenido (ppm)	Criterio de aceptabilidad
$\Delta A,a$	0,3942	Sensible a cambios	$\Delta A,a$	0,0286	No sensible a cambios
$\Delta B,b$	0,2943	No sensible a cambios	$\Delta B,b$	0,2104	No sensible a cambios
$\Delta C,c$	0,1200	No sensible a cambios	$\Delta C,c$	0,3338	Sensible a cambios
$\Delta D,d$	0,2024	No sensible a cambios	$\Delta D,d$	0,0848	No sensible a cambios
$\Delta E,e$	0,0235	No sensible a cambios	$\Delta E,e$	0,0238	No sensible a cambios
$\Delta F,f$	0,1271	No sensible a cambios	$\Delta F,f$	0,1341	No sensible a cambios

Fuente: elaboración propia.

4.7. Análisis de varianza

Es el análisis estadístico en el que se comparan más de dos medias entre sí.

Tabla XXI. Análisis de varianza

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	30,0000	16,6787	0,5560	0,0103
Columna 2	30,0000	21,6476	0,7216	0,0617

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,4115	1,0000	0,4115	11,4347	0,0013	4,0069
Dentro de los grupos	2,0872	58,0000	0,0360			
Total	2,4987	59,0000				

Fuente: elaboración propia.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal del presente trabajo de investigación es determinar, por medio de parámetros estadísticos de validación, qué método presenta la mejor opción para ser utilizado en el laboratorio. A lo largo de esta sección se hará referencia al método uno y al método dos, los cuales corresponden a los métodos "determinación de boro en agua caliente, usando calentamiento con microondas" y "determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y espectrofotometría visible", respectivamente.

El primer parámetro analizado fue selectividad. Para esto se realizaron seis mediciones de la solución extractora para cada método, esta solución extractora tiene una concentración de 0 ppm de boro, sin embargo, como se observa en la tabla XII de la sección resultados, en algunas mediciones el resultado fue mayor que cero, por lo que se concluye que se tuvieron interferentes de carácter físico a lo largo del proceso. Estos interferentes podrían ser: contaminaciones a lo largo del proceso (esto abarca desde el lavado de la cristalería, hasta contaminación en las celdas para lectura), mala calibración de los instrumentos de medición; se debe tomar en cuenta que las soluciones extractoras y las soluciones patrón fueron preparadas según la metodología especificada.

El siguiente parámetro analizado fue linealidad, en la teoría se establece que, en general, el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación. Cuando se realizan métodos de laboratorio en los que se requiere de una curva de calibración para realizar las mediciones correspondientes para ambos métodos, se debe obtener una

correlación mayor o igual que 0,995. En la tabla XIII de la sección resultados se observa la ecuación de la recta, el rango lineal y el coeficiente de correlación para cada método, estos datos se obtuvieron a partir de un promedio que se realizó de las curvas de calibración efectuadas cada día de lectura.

Se observa en dicha tabla que el método uno tiene un mayor coeficiente de correlación que el método dos. Sabiendo que el coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (pates por millón de boro presente en la muestra) y la variable respuesta (absorbancia) de la curva de calibración, se puede concluir que es más aceptable el método uno. Para efectos de ambos métodos, el rango de la curva de calibración está establecido en el método, por lo cual no fue necesario que el analista estableciera el rango lineal.

Con respecto a la sensibilidad, esta se obtiene a partir de la pendiente de la curva de calibración (promedio) de cada método. Un valor mayor a uno indica que a ligeros cambios en las concentraciones (partes por millón de boro presente en la muestra) habrá grandes variaciones en los resultados (absorbancia) y para un valor menor a uno, indica que pequeños cambios en la concentración (partes por millón de boro presente en la muestra) no son significativos para la lectura (absorbancia). Se dice que un método es sensible si a grandes cambios en la concentración existen grandes cambios en los resultados, por lo tanto, se puede concluir que el método uno es sensible, puesto que en la tabla XIV de la sección resultados se observa que el resultado de la sensibilidad para el método uno es mayor que la unidad, mientras que para el método dos, el resultado de la sensibilidad es menor que la unidad.

En el caso de la determinación de los límites, en la teoría se establece que se debe tener en consideración el valor crítico (LC), el límite de detección (LOD)

y el límite de cuantificación (LOQ). El LC indica que un valor superior al mismo, presente en el material analizado, es superior a la concentración contenida en el material testigo. El LOD indica que la concentración o cantidad del analito es mayor en el material analizado que en material testigo y el LOQ es una característica del funcionamiento del método. Para determinar dichos parámetros fueron necesarias seis mediciones de la muestra blanco.

En la tabla XV de la sección resultados se pueden apreciar los límites para cada método. Dado que el criterio de aceptación es $LC < LOD \ll LOQ < LMP$, se puede concluir que el método que cumple con este criterio es el método uno, pues el LOQ es inferior que el LMP (el cual es el punto más alto de la curva de calibración, 0,4 partes por millón de boro en ambos casos), mientras que para el método dos el LOQ es mayor que el LMP, por lo tanto el LOQ no sería aceptable para el campo de aplicabilidad que le quiere dar el método.

Según el *Codex Alimentarius*, la exactitud es el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. Cuando se aplica a un método de ensayo, el término exactitud se refiere a una combinación de veracidad y precisión. La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

Cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad presenta. Para saber si el valor obtenido del sesgo es aceptable, se realizó una prueba de t – Student en la que se compararon los valores de la t – calculada (con los datos experimentales) y la t – tabla (ver anexo 1), obteniendo como resultado en ambos casos que la t - calculada es menor que la t – tabla. Por lo tanto, se puede concluir que el sesgo obtenido para ambos métodos es aceptable y su veracidad es aceptable. Sin embargo, en la tabla XVIII de la sección resultados se observa que el sesgo para el método uno es menor que para el método dos,

por lo tanto se puede decir que es más veraz y que tiene una mejor aplicación el método uno en comparación con el método dos.

Cabe mencionar que la muestra que se utilizó para la experimentación está certificada para el método con agua caliente (método uno), sin embargo, a lo largo del proceso se fueron cambiando ciertos parámetros en la metodología. La muestra certificada se tomó entonces como una referencia en ambos métodos y, a pesar de las variaciones realizadas, el método uno presenta mejores resultados que método dos.

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico. Para determinar la recuperación de ambos métodos se realizaron seis mediciones de cada punto de la curva de calibración, después de realizar un promedio entre cada una de las mediciones se procedió a determinar la recuperación de cada punto, tomando como referencia la concentración con la que cada solución estándar fue preparada. Al evaluar el porcentaje de recuperación de cada método, se debe tener en cuenta que es necesario realizar la prueba t-Student, de esta manera, si t-calculado es menor que el t-tabla, se dice que no hay diferencias significativas, por lo tanto no hay necesidad de realizar ninguna corrección al método.

Sin embargo, como se observa en la tabla XIX de la sección resultados, se tiene un mayor porcentaje de recuperación para el método uno que para el método dos. En conclusión, se puede decir que, después de evaluar los resultados de sesgo y recuperación, el método uno presenta una mayor veracidad comparado con el método dos; por lo tanto es más aplicable.

En el caso de la precisión, esta debe establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. Para determinar la repetibilidad, se efectuaron

10 mediciones de la muestra certificada sin realizar ningún cambio a lo largo del proceso, es decir, se realizaron en el mismo equipo, por el mismo analista, el mismo día y bajo las mismas condiciones ambientales. En el caso de la reproducibilidad, se realizaron 10 mediciones de la muestra certificada haciendo cambios en el proceso, para efectos de esta investigación se realizaron las mediciones en tres días diferentes, por el mismo analista, en el mismo equipo.

Como se observa en las tablas XVI y XVII de la sección resultados, se tiene un menor porcentaje de variación en ambos parámetros para el método uno que para el método dos. Por lo tanto, se puede concluir que hay una mayor precisión para el método uno y, en consecuencia, es más aplicable que el método dos. En la teoría se establece que entre más veraz y preciso sea un resultado analítico, el método es más exacto. Basándose en esta aseveración y analizando los resultados a lo largo del proceso, se puede concluir que el método uno es más exacto que el método dos.

El último parámetro analizado fue robustez, este se define como la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, de los parámetros del método. Para determinar este parámetro se utilizó el test de Youden y Steiner, el cual permite evaluar el efecto de siete variables con solo ocho análisis de muestra.

Para el método uno se utilizaron las siguientes variables: temperatura (A,a), porcentaje de humedad (B,b), equipo (C,c), analista (D,d), tiempo de reacción (E,e) y volumen (F,f). Se debe establecer un valor máximo y un valor mínimo para cada una de estas variables, por ejemplo (X,x).

Los resultados obtenidos se nombran con la letra s hasta la letra z; a partir de estos resultados se debe calcular un promedio para cada valor máximo y

mínimo de cada una de las variables. Para el criterio de aceptación de la robustez del método, se considera que la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo sea inferior a raíz cuadrada de dos multiplicada por la desviación estándar de los resultados obtenidos (s-z). En la tabla XX se observan los resultados de la robustez para ambos métodos; en el caso del método uno la variable que se muestra sensible a cambios es la temperatura, por lo cual no se recomienda alterarla a lo largo del proceso. En el caso de las variables restantes, el método no se muestra sensible a cambios.

Para el método dos se utilizaron las siguientes variables: temperatura (A,a), tiempo de agitación (B,b), tiempo de reacción (C,c), equipo (D,d), analista (E,e), y porcentaje de humedad (F,f). Se debe establecer un valor máximo y un valor mínimo para cada una de estas variables, por ejemplo (X,x).

Los resultados obtenidos se nombran con la letra s hasta la letra z; a partir de estos resultados se debe calcular un promedio para cada valor máximo y mínimo de cada una de las variables. Para el criterio de aceptación de la robustez del método, se considera que la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo sea inferior a raíz cuadrada de dos multiplicada por la desviación estándar de los resultados obtenidos (s-z). En la tabla XX se observan los resultados de la robustez para ambos métodos; en el caso del método dos la variable que se muestra sensible a cambios es el tiempo de reacción, por lo cual no se recomienda alterarlo a lo largo del proceso. En el caso de las variables restantes, el método no se muestra sensible a cambios.

Se dice que un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas, por lo tanto, se puede concluir que ambos métodos son robustos, pues de las seis variables analizadas solo una es sensible a cambios.

Según el análisis estadístico y los parámetros de validación establecidos, el método que presenta una mejor opción técnica es el método uno (agua caliente), el cual muestra como única desventaja el tiempo en la realización del método, pues es un poco más extenso que el método dos. De igual manera, se debe contar con un buen horno microondas para la realización masiva de este análisis.

CONCLUSIONES

1. Se validaron y compararon dos métodos analíticos por espectrofotometría visible para la extracción de boro del suelo, por medio de los parámetros de análisis estadístico.
2. Se evaluaron los parámetros de validación selectividad, linealidad, sensibilidad, límites, precisión, veracidad robustez y aplicabilidad para el método “determinación de boro en extractos de suelo (método con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y espectrofotometría visible)”; siendo estos aceptables para los fines previstos del método.
3. Se evaluaron los parámetros de validación selectividad, linealidad, sensibilidad, límites, precisión, veracidad robustez y aplicabilidad para el método “determinación de boro agua caliente, usando calentamiento con microondas”; siendo estos aceptables para los fines previstos del método.
4. Se compararon ambos métodos según los parámetros de validación definidos.
5. Se estableció, por medio de los parámetros de validación calculados, que el método que presenta la mejor opción técnica es el método llamado “determinación de boro agua caliente, usando calentamiento con microondas”.

RECOMENDACIONES

1. Realizar una comparación de los métodos por medio de un análisis económico, para determinar cuál es más factible para su implementación en el laboratorio.
2. Realizar la limpieza de la cristalería siguiendo el método establecido por el procedimiento del laboratorio (Analab); pues la lectura en el espectrofotómetro se ve afectada por la presencia de contaminantes.
3. Utilizar cristalería libre de boro (polietileno), pues la cristalería de vidrio presenta cierto porcentaje de boro silicatos, lo cual causa contaminación a lo largo del proceso.
4. Establecer un programa de validación para otros análisis, como materia orgánica, determinación de azufre en suelos, pH, entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

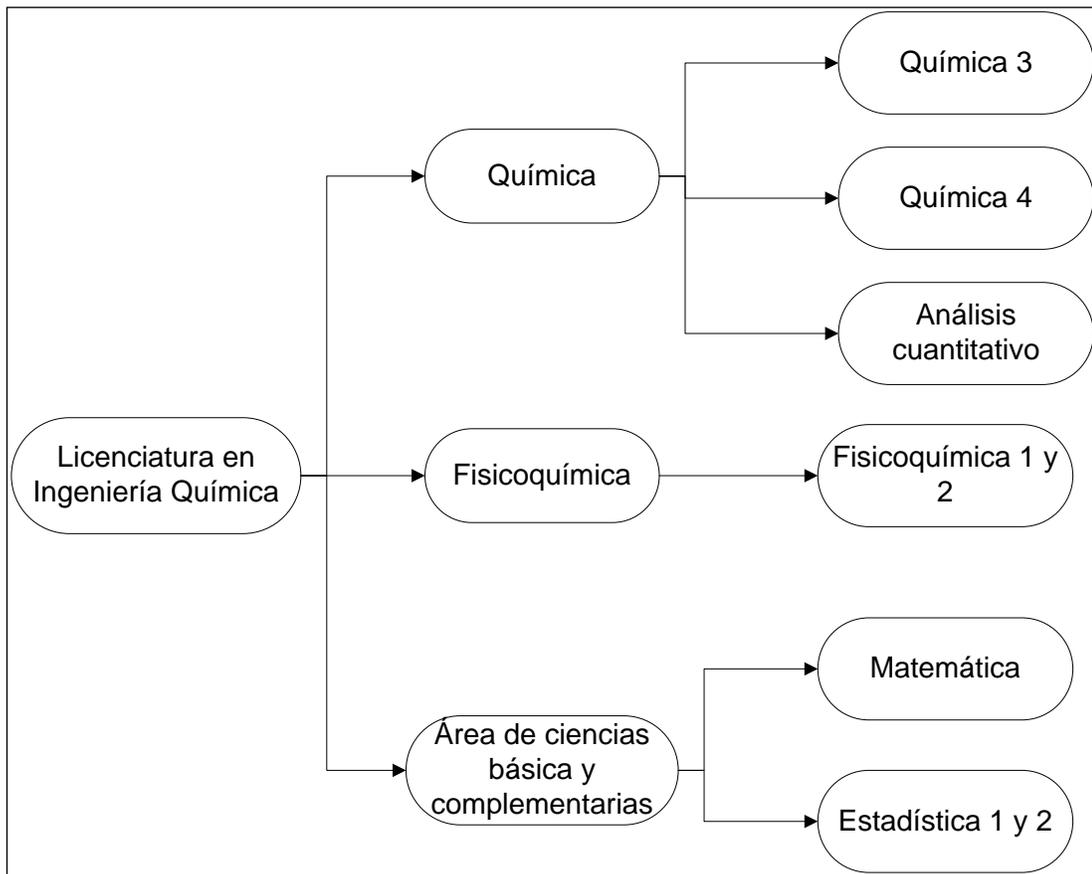
1. ADAMS, Meliton. *Fundamentos de química de suelos*. [en línea]. <<http://goo.gl/rm7PYD>>. [Consulta: 18 de septiembre de 2013].
2. Analab. Manual de procedimientos analíticos, Determinación de análisis de boro. Guatemala: Analab, 2012. 50 p.
3. AZNÁREZ, Alduán; BONILLA, Polo ; MIR MARÍN Jose. Nuevos métodos de determinación de boro por espectrofotometría de absorción UV-Visible y por fluorescencia molecular, previa extracción con 2-metil-2,4-pentanodiol. Aplicación al análisis de material 'vegetal. Zaragoza, España: Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, 1979. 518 p.
4. FARRERA PINO, Renne Eduardo. Parámetros Fisiológicos del cafeto. Trabajo de graduación de Ing. Agrónomo. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, 1987. 95 p.
5. Gavande. Introducción a la física de suelos. [en línea]. <<http://goo.gl/CEu7Dr>>. [Consulta: 20 de agosto de 2013].
6. GONZALEZ OLMEDO, Ruben. Toxicidad del boro sobre varios cultivos en diversos suelos. Trabajo de graduación de Ing. Agrónomo. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, 1990. 100 p.

7. GRANADOS, Otoniel. Curso de edafología, Universidad Rural de Guatemala. [en línea]. <<https://goo.gl/mcvNLK>>. [Consulta: 25 de septiembre de 2013].
8. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, Lucas; GONZÁLEZ PÉREZ, Claudio. Introducción al análisis instrumental. [en línea]. <<http://goo.gl/efIOZP>>. [Consulta: 15 de agosto de 2013].
9. Instituto de Salud Pública. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “aspectos generales sobre la validación de métodos”. Santiago de Chile: ISP, 2010. 68 p.
10. Investigación cuantitativa. [en línea]. <<http://goo.gl/UiAf63>>. [Consulta: 3 de agosto de 2013].
11. JIMÉNEZ GARCÍA, Oscar Humberto. Fertilidad de suelos. Guatemala: Universidad Rafael Landívar, 1993. 125 p.
12. MARTÍNEZ CARTAJENA, Andrea Soledad. *Validación de métodos analíticos por espectrofotometría para determinar sulfatos, cianuros y cromo hexavalente en aguas, suelos y lixiviados*. Tesis de Ing. Química. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería Química, 2013. 155 p.
13. PARRA RINCÓN, Antonio. Los suelos y la fertilización del olivar cultivado en zonas calcáreas. [en línea]. <<http://goo.gl/BzMPor>>. [Consulta: 18 de septiembre de 2013].

14. PENSAMIENTO BARRIENTOS, Myra Patricia. *Validación y comparación de dos métodos para la cuantificación de hierro aminoquelado y jarabe antianémico*. Trabajo de graduación Lic. Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 2005. 110 p.
15. Perkin Elmer. *Molecular spectroscopy instrumens*. [en línea]. <<http://goo.gl/l75xXn>>. [Consulta: 23 de septiembre de 2013].
16. Universidad Nacional de Colombia. [en línea]. <<http://goo.gl/1BcdHz>>. [Consulta: 18 de enero de 2016].
17. VAN RAIJ, Bernardo. *Análisis químico para la evaluación de fertilidad de suelos tropicales*. Sao Paulo, Brasil: Instituto Agronómico, 2005. 300 p.

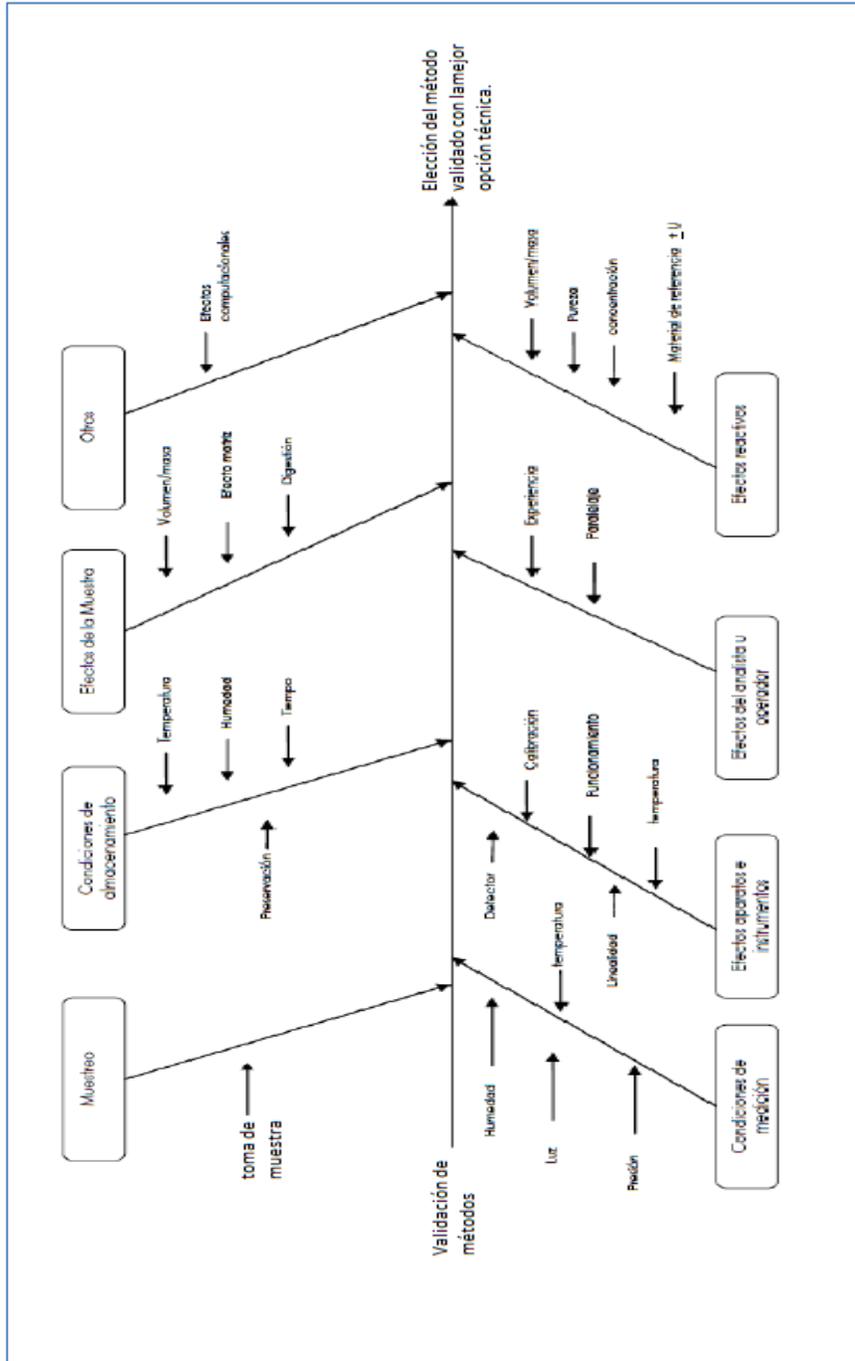
APÉNDICES

Apéndice 1. Requisitos académicos



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

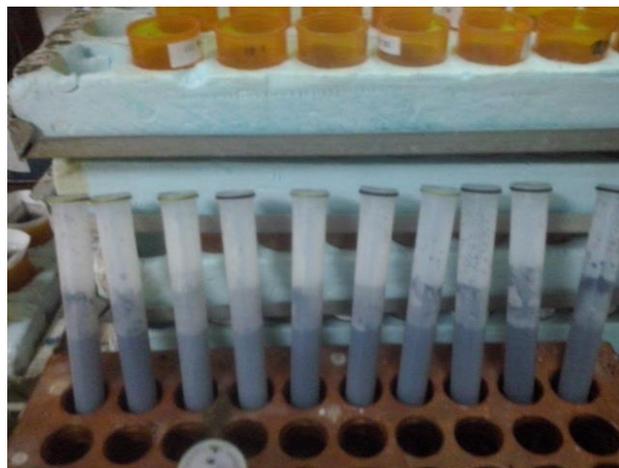
Apéndice 3. Fotos recopiladas a lo largo del experimento.

1. Filtrado de muestras



Fuente: Fotografía tomada en Analab.

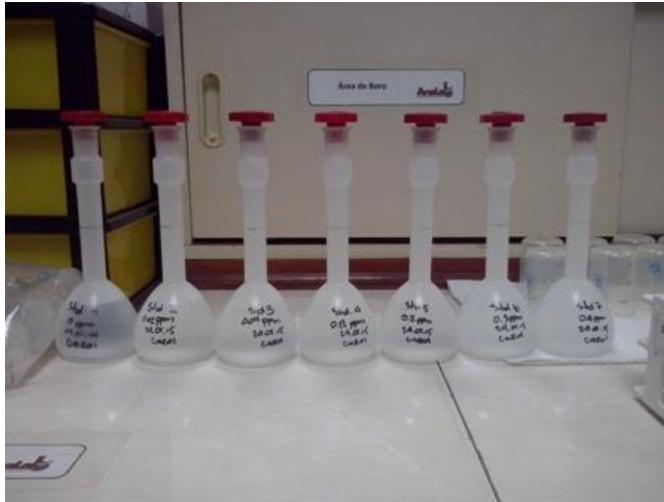
2. Método 1



Fuente: Fotografía tomada en Analab.

Continuación del apéndice 3.

3. Curva de calibración, método 2



Fuente: Fotografía tomada en Analab.

4. Pipeta automática utilizada en el proceso



Fuente: Fotografía tomada en Analab.

Continuación del apéndice 3.

5. Microondas utilizado para el método 1



Fuente: Fotografía tomada en Analab.

6. Balones de polipropileno utilizados para la determinación de ambos métodos



Fuente: Fotografía tomada en Analab.

ANEXOS

Anexo 1. **Tabla de la distribución t – Student**

2 colas		80%	90%	95%	98%	99%
α	ν	0.10	0.05	0.025	0,01	0,0015
1 cola		90%	95%	97.5%	99%	99,5%
α	ν	0.10	0.05	0.025	0,01	0,0015
1	1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

Fuente: Instituto de Salud Pública. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* p. 61.

Anexo 2. Datos calculados para análisis de resultados

1. Datos del espectrofotómetro

datos originales recopilados en los tres días de lectura						
día 1 de análisis			día 2 de análisis		día 3 de análisis	
corrida	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
1	0,1821	1,0308	0,1410	1,1028	0,1323	0,4255
2	0,1464	0,6409	0,1428	0,9507	0,0942	0,4490
3	0,1506	0,6619	0,1248	0,8045	0,1215	0,3468
4	0,1674	0,6889	0,1497	0,8841	0,1482	0,5922
5	0,1581	0,6226	0,1551	0,8192	0,1026	0,5204
6	0,1932	0,6937	0,1581	0,9415	0,1077	0,6322
7	0,1722	1,3567	0,1485	1,0252	0,0678	0,5319
8	0,1974	0,7257	0,1527	1,0420	0,1257	0,6523
9	0,1815	0,4358	0,2334	0,8205	0,1632	0,4213
10	0,2028	0,4564	0,1884	0,9322	0,1455	0,4399

Fuente: Analab.

Continuación del anexo 2.

2. Lectura de blancos para la selectividad

día de análisis	método 1	método 2
día 1	-0,139	-0,124
	-0,183	-0,226
día 2	0,2771	0,0997
	-0,342	-3,356
	0,2891	0,0697
	-0,379	-1,419
día 3	0,2367	-1,267
	-0,651	-0,194
	0,4658	-----
	-0,706	-----

Fuente: Analab.

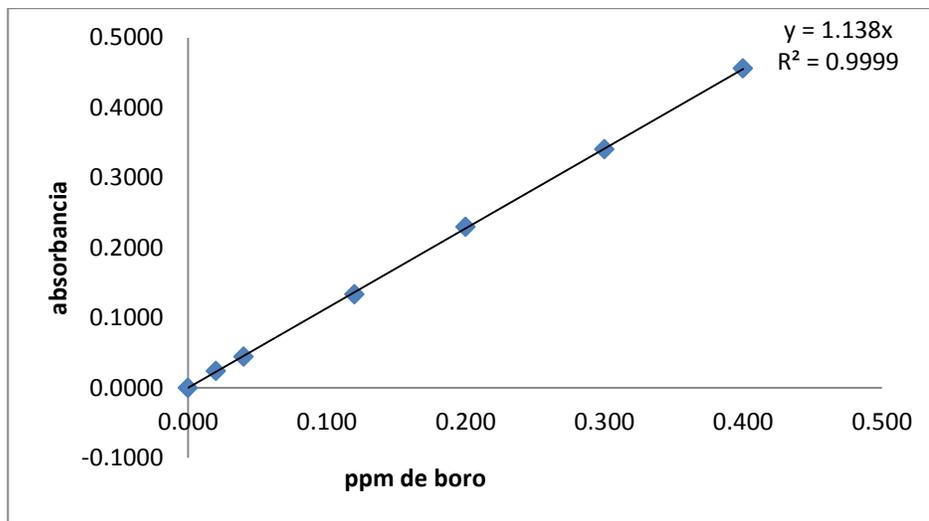
3. Datos para la determinación de linealidad, método 1

ppm	Absorbancia				Análisis estadístico		
	día 1	día 2	día 3	Promedio	S	CV	varianza
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,000	0,0000
0,020	0,0269	0,0142	0,0144	0,0185	0,0073	0,393	0,0001
0,040	0,0455	0,0318	0,0641	0,0471	0,0162	0,344	0,0003
0,120	0,1243	0,1009	0,1562	0,1271	0,0278	0,218	0,0008
0,200	0,2071	0,1793	0,2169	0,2011	0,0195	0,097	0,0004
0,300	0,3264	0,2850	0,3402	0,3172	0,0287	0,091	0,0008
0,400	0,4341	0,2997	0,4743	0,4027	0,0914	0,227	0,0084

Fuente: Analab.

Continuación del anexo 2.

4. Curva de calibración, método 1



Fuente: Analab.

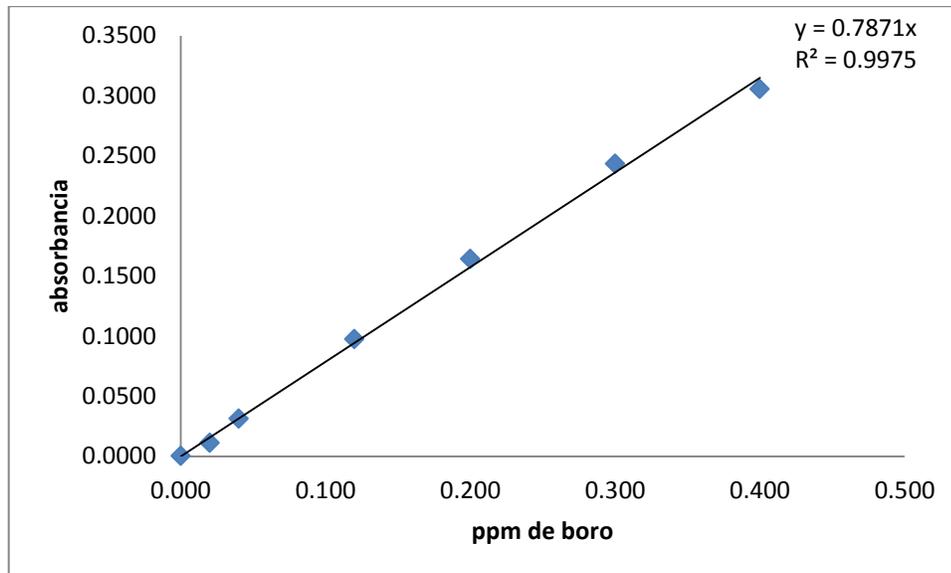
5. Datos para la determinación de linealidad, método 2

ppm	absorbancia				Análisis estadístico		
	día 1	día 2	día 3	Promedio	S	CV	varianza
0,000	0,0002	-0,0010	0,0001	-0,0002	0,0007	0,000	0,0000
0,020	0,0100	0,0080	0,0043	0,0074	0,0029	0,389	0,0000
0,040	0,0495	0,0170	0,0252	0,0306	0,0169	0,553	0,0003
0,120	0,0790	0,0619	0,0673	0,0694	0,0087	0,126	0,0001
0,200	0,1330	0,1093	0,1241	0,1221	0,0120	0,098	0,0001
0,300	0,2007	0,2085	0,1863	0,1985	0,0113	0,057	0,0001
0,400	0,2831	0,2746	0,2517	0,2698	0,0162	0,060	0,0003

Fuente: Analab.

Continuación del anexo 2.

6. Curva de calibración, método 2



Fuente: Analab.

7. Datos recabados para la determinación de la repetibilidad

REPETIBILIDAD		
corrida	Método 1	Método 2
1	0,1821	1,0308
2	0,1464	0,6409
3	0,1506	0,6619
4	0,1674	0,6889
5	0,1581	0,6226
6	0,1932	0,6937
7	0,1722	1,3567

Continuación del anexo 2.

Continuación de la figura 7.

8	0,1974	0,7257
9	0,1815	0,4358
10	0,2028	0,4564
media	0,1752	0,7313
Desv. Est.	0,019618	0,273204
Coef. Var.	0,111996	0,373566
%CV	11,19955	37,3566

Fuente: Analab.

8. Datos para la determinación del sesgo

SESGO			
Método 1		Método 2	
Media	0,3092	media	0,3301
Sesgo	0,0392	Sesgo	0,0601
Desvest	2,0366	desvest	2,1014
raiz n	5,4772	raiz n	5,4772
Tcalc	-0,0035	Tcalc	0,0052
t tabla	2,0450	t tabla	2,0450
tcalc<ttabla		tcalc<ttabla	

Fuente: Analab.

Continuación del anexo 2.

9. **Datos para la determinación de la reproducibilidad**

REPRODUCIBILIDAD			
corrida	Método 1	corrida	Método 2
día 1	0,1821	día 1	1,0308
día 1	0,1932	día 1	0,6409
día 1	0,1974	día 1	0,6619
día 1	0,2028	día 1	1,1028
día 2	0,2334	día 2	0,9507
día 2	0,1884	día 2	0,8045
día 2	0,1581	día 2	0,4255
día 3	0,1632	día 3	0,4490
día 3	0,1482	día 3	0,3468
día 3	0,1455	día 3	0,5922
media	0,1812	media	0,7005
Desv. Est.	0,0276	Desv. Est.	0,2635
Coef. Var.	0,1525	Coef. Var.	0,3762
%CV	15,2467	%CV	37,6221

Fuente: Analab.

Continuación del anexo 2.

10. **Lecturas de muestras estándar para determinar la recuperación**

método 1					
estándar 1	estándar 2	estándar 3	estándar 4	estándar 5	estándar 6
-0,0190	0,1038	0,1745	0,2766	0,4479	0,5270
0,0063	0,0982	0,1956	0,2921	0,4633	0,5131
-0,0130	0,1390	0,1986	0,3427	0,4242	0,5203
0,0037	0,2100	0,1984	0,3423	0,4331	0,5190
-0,0160	0,0688	0,1613	0,2949	0,4790	0,5213
-0,0150	0,0875	0,1958	0,3028	0,4785	0,4752

Fuente: Analab.

11. **Cálculos intermedios para la determinación de recuperación**

Método 1						
Ce	-0,0057	0,1006	0,1583	0,2625	0,3797	0,4248
Ca	0,0000	0,0800	0,1600	0,2400	0,3200	0,4000
Co	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
recuperación	0,0000	1,2573	0,9893	1,0936	1,1865	1,0620
%R	0,0000	125,7292	98,9271	109,3611	118,6510	106,2042

Fuente: Analab.

Continuación del anexo 2.

12. Resultados de la recuperación, método 1

Media	110,5282
S	55,2114
N	6,0000
t calc	0,0778
t crit	2,5710
tcalc < t crit	

Fuente: Analab.

13. Lecturas de muestras estándar para determinar la recuperación

método 2						
estándar 1	estándar 2	estándar 3	estándar 4	estándar 5	estándar 6	estándar 7
-0,0040	0,0218	0,0712	0,1087	0,1880	0,2965	0,4062
-0,0060	0,0209	0,0338	0,1071	0,2023	0,2967	0,4023
-0,0060	0,0158	0,0327	0,1075	0,1985	0,2933	0,4009
-0,0060	0,0182	0,0286	0,1099	0,2040	0,2978	0,4011
-0,0060	0,0193	0,0467	0,1118	0,2038	0,3038	0,4014
-0,0060	0,0181	0,0467	0,1080	0,2011	0,2903	0,3997

Fuente: Analab.

Continuación del anexo 2.

14. Cálculos intermedios para la determinación de recuperación

Método 2							
Ce	-0,0057	0,0190	0,0433	0,1088	0,1996	0,2964	0,4019
Ca	0,0000	0,0200	0,0400	0,1200	0,2000	0,3000	0,4000
Co	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
R	0,0000	0,9508	1,0821	0,9069	0,9981	0,9880	1,0048
%R	0,0000	95,0833	108,2083	90,6944	99,8083	98,8000	100,4833

Fuente: Analab.

15. Resultados de la recuperación, método 2

media	84,7254
S	37,7418
n	7,0000
t calc	0,1652
t crit	2,4470
tcalc < t crit	

Fuente: Analab.

16. Variables para determinación de robustez, método 1

Condición Variable			
tipo	clave	valor alto X	valor bajo x
Temperatura	A,a	30	ambiental
% de humedad	B,b	1,0590	0,8600

Continuación del anexo 2.

Continuación de la figura 16

Equipo	C,c	1,0000	2,0000
Analista	D,d	1,0000	2,0000
tiempo de reacción	E,e	30,0000	15,0000
Volumen	F,f	máximo	mínimo

Fuente: Analab.

17. Resultados de las variables para robustez, método 1

s	t	u	V	w	x	y	Z
0,0150	0,0206	-0,2518	0,0296	0,2295	0,1898	0,3692	0,6019

Fuente: Analab.

18. Análisis de las variables para robustez, método 1

Condición variable		Resultados			
valor alto X	valor bajo x	promedio X	promedio x	diferencia $\Delta(X - x)$	comparación $\Delta < \sqrt{2}DS$
A	a	-0,0466	0,3476	0,3942	sensible a cambios
B	b	0,0033	0,2976	0,2943	no sensible a cambios
C	c	0,0905	0,2105	0,1200	no sensible a cambios
D	d	0,2517	0,0493	0,2024	no sensible a cambios
E	e	0,1387	0,1622	0,0235	no sensible a cambios
F	f	0,2091	0,0820	0,1271	no sensible a cambios

Fuente: Analab.

Continuación del anexo 2.

19. **Variables para determinación de robustez, método 2**

Condición variable			
Tipo	Clave	Valor alto X	valor bajo x
Temperatura	A,a	30°C (aprox)	ambiental
Tiempo de agitación	B,b	20 minutos	15 minutos
tiempo de reacción	C,c	20 minutos	15 minutos
Equipo	D,d	antiguo (1)	nuevo (2)
Analista	E,e	1	2
% de humedad	F,f	1.059	0.719

Fuente: Analab.

20. **Resultados de las variables para robustez, método 2**

s	t	u	v	w	x	y	Z
0.2610	0.0067	0.2059	-0.255	0.2229	-0.0675	0.2536	-0.076

Fuente: Analab

Continuación del anexo 2.

21. **Análisis de las variables para robustez, método 2**

Condición variable		Resultados			
valor alto X	valor bajo x	promedio X	promedio x	diferencia $\Delta(X - x)$	comparación $\Delta < \sqrt{2}DS$
A	A	0,0547	0,0833	0,0286	no sensible a cambios
B	B	0,1741	-0,0362	0,2104	no sensible a cambios
C	C	0,2359	-0,0980	0,3338	sensible a cambios
D	D	0,1113	0,0266	0,0848	no sensible a cambios
E	E	0,0809	0,0571	0,0238	no sensible a cambios
F	F	-0,0344	0,0997	0,1341	no sensible a cambios

Fuente: Analab.

