

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología



Validación del sistema de diluciones de un
filtro solar físico de dióxido de titanio

Tesis de licenciatura

Color Aparicio Víctor Manuel

Morelia Michoacán, Junio 2010

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología



Validación del sistema de diluciones de un filtro solar físico de dióxido de titanio

Tesis presentada por el Pasante de Químico Farmacobiología Víctor
Manuel Color Aparicio con el fin de obtener el título de Licenciatura en
Químico Farmacobiólogo

Asesor: M.C. Gabino Estévez Delgado
Co-asesor: D.C. Joaquín Estévez Delgado
Revisores: Q.F.B Lorena Cabrera Navarro.
M.C. Álvaro Rodríguez Barrón.
Ing. Químico Jorge Pavel Victoria Tafoya.
Q.F.B. Lillian Bribiesca Rodríguez.

Morelia Michoacán, Junio 2010

DICTADURA Y AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a dios y a todas las personas que de alguna manera, han hecho posible la realización de esta tesis, mediante su apoyo moral y colaboración. De manera especial a las siguientes personas:

A mi fantástica y única familia integrada por mi padre, Antonio, mi madre, Jovita y mi hermano Raymundo, ya que con su apoyo he podido llevar a cabo el desarrollo de esta tesis, para ellos con mucho amor y cariño.

A mis abuelos y a toda mi familia, que me han apoyado en la realización de esta tesis, también de manera especial a mi tía Guadalupe color.

A mis amigos y compañeros, a los cuales agradezco su apoyo y haberme brindado su amistad.

Al laboratorio de biofísica del instituto de física y matemáticas por haberme permitido llevar a cabo las mediciones de esta tesis en sus instalaciones.

Al instituto de investigaciones químico-biológicas y al laboratorio del doctor Rosalio Mercado de la facultad de Químico Farmacobiología por prestarme material para la preparación de las diluciones.

A mi compañera Yuritzi Viridiana Torres Equihua por su amistad y su ayuda en la preparación de las diluciones.

A la maestra, Lorena Cabrera y Ilián Bribiesca por su apoyo con la materia prima y materiales para llevar a cabo la realización de la parte experimental.

De manera especial a mi asesor y maestro Gabino Estévez Delgado por aceptarme en su grupo de tesis y que me a apoyado de manera incondicional en la realización de la tesis.

AL Dc. Joaquín Esteves Delgado por su colaboración en la revisión de la tesis.

A mis revisores por su tiempo dedicado a la revisión de mi tesis, su apoyo y consejos para mejorar la redacción de la misma.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de hidalgo por darme la oportunidad de formar parte de su matrícula y poder estudiar una carrera profesional.

A la facultad de químico Farmacobiología por permitirme formarme en la carrera de Químico Farmacobiólogo.

Con mucho amor y cariño para mi familia

Y en memoria de mi gran amigo

“Giovanni Gonzáles Rivera”

ABREVIATURAS

AMC.- Comité de métodos analíticos.

AOAC.- Asociación de comunidades analíticas.

CENAM.- Centro nacional de metrología.

CV.- Coeficiente de variación.

DEM.- Dosis eritematosa mínima.

ECM.- Error Cuadrático Medio.

EMA.- Entidad Mexicana de Acreditación.

ET.- Error total.

EURACHEM. – Foro europeo para discutir control de calidad en química analítica.

FPS.- Factor de protección solar.

GUM.- Guía para la expresión de incertidumbre de medida.

ID.- Índice de Desviación.

IPD.- Índice de Pigmentación Inmediata.

ISO.- Organización internacional de normalización.

IUPAC.- Unión internacional de química pura y aplicada.

LoD.- Límite de detección.

LoQ.- Límite de cuantificación.

MR.- Material de Referencia.

MRC.- Material de Referencia Certificado.

OAA.- Organismo de Acreditación Argentino.

ONARC.- Órgano de acreditación de la republica de cuba.

PFA.- Factor de Protección UVA.

PIV.- Puntuación del Índice de Varianza.

PPD.- Índice de Pigmentación Tardía.

RUV.- Radicación ultravioleta.

SD.- Desviación estándar.

SDr.- Desviación estándar de repetibilidad.

UV.- Ultravioleta.

UVA.- Radiación ultravioleta A.

UVB.- Radiación ultravioleta B.

UVC.- Radiación ultravioleta C.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.12.1 Procedimiento sugerido para estimar la veracidad-----	24
Tabla 2.1.12.2 Procedimiento sugerido para calcular la precisión-----	26
Tabla 2.1.12.4 Procedimiento sugerido para evaluar la selectividad-----	29
Tabla 2.1.12.5 Procedimiento sugerido para evaluar la robustez-----	30
Tabla 2.1.12.6 Procedimiento sugerido para determinar LoQ-----	31
Tabla 2.1.12.7.1 Procedimiento sugerido para determinar el LoD en mediciones cuantitativas-----	32
Tabla 2.1.12.7.2 Procedimiento sugerido para determinar el LoD en mediciones cualitativas-----	32
Tabla 2.1.12.8.1 Procedimiento sugerido para determinar la linealidad e intervalo de medición-----	33
Tabla 2.1.12.8.2 Procedimiento sugerido para elaborar las diluciones en la prueba de linealidad-----	34
Tabla 4.1.1.1 Relación entre la concentración real y la absorbancia obtenida a 320 nm-----	66
Tabla 4.1.1.2 Coeficiente de correlación de la gráfica de linealidad a 320 nm-----	67
Tabla 4.1.1.3 Residuos a 320 nm-----	67
Tabla 4.1.2.1 Relación entre la concentración real y la absorbancia obtenida a 632,8 nm-----	68
Tabla 4.1.2.2 Coeficiente de correlación de la gráfica de linealidad a 632,8 nm-----	69
Tabla 4.1.2.3 Residuos a 632,8 nm-----	70
Tabla 4.2.1.1 Sensibilidad a 320 nm-----	71
Tabla 4.2.2.1 Sensibilidad a 632,8 nm-----	72
Tabla 4.3.1.1 Porcentaje de recuperación a 320 nm-----	73
Tabla 4.3.2.1 Porcentaje de recuperación a 632,8 nm-----	73
Tabla 4.4.1.1 Estadística descriptiva para la precisión a 320 nm-----	74
Tabla 4.4.2.1 Estadística descriptiva para la precisión a 632,8 nm-----	76
Tabla 4.5.1.1 Veracidad del sistema de diluciones a 320 nm-----	80
Tabla 4.5.2.1 Veracidad del sistema de diluciones a 632,8 nm-----	80
Tabla 4.6.1.1 Resultados positivos y negativos a 320 nm-----	82

Tabla 4.6.2.1 Resultados positivos y negativos a 632,8 nm-----	83
Tabla 4.7.1.1 Relación del sesgo con respecto a la concentración real a 320 nm-----	84
Tabla 4.7.2.1 Relación del sesgo con respecto a la concentración real a 632,8 nm-----	84
Tabla 4.8.1.1 Estadística Descriptiva de la temperatura a 320 nm-----	85
Tabla 4.8.1.2 Estadística descriptiva de la humedad a 320n nm-----	86
Tabla 4.8.2.1 Estadística descriptiva de la temperatura a 632,8 nm-----	86
Tabla 4.8.2.2 Estadística descriptiva de la humedad a 632,8 nm-----	86
Tabla 4.9.1 Determinación de la incertidumbre de medición a 320 nm-----	89
Tabla 4.9.2 Determinación de la incertidumbre de medición a 632,8 nm-----	89
Tabla 4.10.1 Resumen de los parámetros de validación-----	90
Tabla A.3.1 Valor del $C\alpha$ con el nivel de significación elegido-----	104
Tabla A.3.2 Formulas empleadas para calcular el valor del $K(n)$ -----	104

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

Figura 2.1.1 Representación de la molécula de dióxido de titanio en su forma anatasa-----	14
Figura 2.1.2 Representación de la molécula de dióxido de titanio en su forma rutilo-----	14
figura 2.1.3 Representación de la molécula de dióxido de titanio en su forma brookita-----	14
Figura 2.1.12.9 Diagrama sugerido para la estimación de la incertidumbre de medición-----	37
Figura 3.4 Procedimiento para la preparación de las diluciones-----	58
Figura 3.5 Procedimiento para llevar a cabo la medición de las diluciones-----	61
Gráfica 4.1.1.1 Intervalo de trabajo a 320 nm-----	66
Gráfica 4.1.1.2 Intervalo lineal a 320 nm-----	67
Gráfica 4.1.1.3 Residuos a 320 nm-----	68
Gráfica 4.1.2.1 Intervalo de trabajo a 632,8 nm-----	69
Gráfica 4.1.2.2 Intervalo lineal a 632,8 nm-----	69
Gráfica 4.1.2.3 Residuos a 632,8 nm-----	70
Gráfica 4.4.1.1 Precisión a la concentración de 0,2717 mg/ml a 320 nm-----	74
Gráfica 4.4.1.2 Precisión a la concentración de 0,0108 mg/ml a 320 nm-----	75
Gráfica 4.4.1.3 Precisión a la concentración de 0,0026 mg/ml a 320 nm-----	75
Gráfica 4.4.1.4 Precisión a la concentración de 0,0007 mg/ml a 320 nm-----	76
Gráfica 4.4.2.1 Precisión a la concentración de 0,2718 mg/ml a 632,8 nm-----	77
Gráfica 4.4.2.2 Precisión a la concentración de 0,0106 mg/ml a 632,8 nm-----	77
Gráfica 4.4.2.3 Precisión a la concentración de 0,0022 mg/ml a 632,8 nm-----	78
Gráfica 4.4.2.4 Precisión a la concentración de 0,0013 mg/ml a 632,8 nm-----	78
Gráfica 4.5.1 Porcentaje de recuperación y error relativo a 320 y 632,8 nm-----	81
Gráfica 4.7.1 Límite de cuantificación a 320 y 632,8 nm-----	84
Gráfica 4.8.1 Comportamiento de la humedad relativa durante la medición a 320 y 632,8 nm-----	87
Gráfica 4.8.2 Comportamiento de la temperatura durante la medición a 320 y 632,8 nm-----	87
Gráfica A.4.1 Estudio de estabilidad para la dilución 2 a 320 nm-----	105

Gráfica A.4.2 Estudio de estabilidad para la dilución 3 a 320 nm-----	106
Gráfica A.4.3 Estudio de estabilidad para la dilución 4 a 320 nm-----	106
Gráfica A.4.4 Estudio de estabilidad para la dilución 5 a 320 nm-----	107
Gráfica A.4.5 Estudio de estabilidad para la dilución 2 a 632,8 nm-----	107
Gráfica A.4.6 Estudio de estabilidad para la dilución 3 a 632,8 nm-----	108
Gráfica A.4.7 Estudio de estabilidad para la dilución 4 a 632,8 nm-----	108
Gráfica A.4.8 Estudio de estabilidad para la dilución 5 a 632,8 nm-----	109

ÍNDICE
CAPÍTULO I:**PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

1.1 Planteamiento del problema-----	1
1.2 Planteamiento de la hipótesis-----	2
1.3 Variables-----	3
1.3.1 Variables dependientes-----	3
1.3.2 Variables independientes-----	4
1.4 Objetivos-----	4
1.4.1 Objetivo general-----	4
1.4.2 Objetivos específicos-----	4
1.5 Delimitación del tema-----	5

CAPÍTULO II:**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

2.1 Marco teórico-----	7
2.1.1 Espectrofotometría-----	8
2.1.1.1 Ley de Lambert-Beer-Bouguer-----	9
2.1.2 Radiación solar, filtro solar y dióxido de titanio-----	11
2.1.3 Validación de métodos-----	15
2.1.4 Objetivo de la validación-----	15
2.1.5 ¿Cuándo, por qué y quién realiza la validación de un método?-----	15
2.1.6 Técnicas de validación-----	17
2.1.7 Etapas de una validación-----	18
2.1.8 Tipos de validación-----	19
2.1.9 Tipos de validación en base a métodos cuantitativos, semi-cuantitativos y cualitativos-----	19
2.1.10 Métodos normalizados, normalizados modificados y no normalizados -----	20
2.1.11 Proceso de validación-----	21
2.1.12 Parámetros de validación-----	23
2.1.12.1 Veracidad-----	23
2.1.12.2 Precisión-----	25

2.1.12.3 Sensibilidad-----	27
2.1.12.4 Selectividad o especificidad-----	28
2.1.12.5 Robustez-----	29
2.1.12.6 Límite de cuantificación (LoQ) -----	30
2.1.12.7 Límite de detección (LoD) -----	31
2.1.12.8 Linealidad e intervalo de medición-----	32
2.1.12.9 Incertidumbre-----	35
2.1.12.9.1 Relación de incertidumbre con otros parámetros-----	38
2.1.12.9.2 Determinación de la incertidumbre de medición-----	38
2.1.12.9.3 Determinación de la incertidumbre para Espectrofotómetros-----	44
2.1.12.10 Recuperación-----	46
2.1.12.11 Parámetros adicionales-----	46
2.1.13 Otros tipos de validación-----	47
2.1.13.1 Validación prospectiva-----	47
2.1.13.2 Validación concurrente-----	47
2.1.13.3 Validación retrospectiva-----	48
2.1.13.4 Validación a escala de laboratorio y a escala piloto-----	48
2.1.14 Reglas para utilizar métodos validados-----	49
2.2 Marco jurídico-----	50
2.2.1 Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006-----	51
2.3 Marco histórico-----	52
2.3.1 Evolución en la elaboración de guías de validación-----	53
2.3.2 Estudios relacionados con los filtros solares y la respuesta frente a la radiación ultravioleta-----	53
2.3.2.1 Protección ultravioleta proporcionada por los textiles: Estudio de la Influencia de las variables más significativas y aplicación de productos para su mejora-----	53
2.3.2.2 Efecto de la radiación ultravioleta (RUV) sobre los procesos de estrés oxidativo e inmunosupresión cutánea. Efecto protector de los filtros Solares-----	54
2.3.2.3 Fotopreención y fotoprotección-----	54

2.3.2.4 Absorción ultravioleta de los protectores solares para prescripción en México-----	55
---	----

CAPÍTULO III:**MATERIAL Y MÉTODOS**

3.1 Métodos y procedimientos-----	57
3.2 Reactivos-----	57
3.3 Material e instrumentos-----	57
3.4 Preparación de diluciones-----	58
3.5 Procedimiento de medición-----	61
3.6 Análisis estadístico-----	63

CAPÍTULO IV:**PRESENTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

4.1 Linealidad e intervalo de medición-----	66
4.1.1 Linealidad e intervalo de medición a la longitud de onda de 320 nm-----	66
4.1.2 Linealidad e intervalo de medición a la longitud de onda de 632,8 nm-----	68
4.1.3 Interpretación de resultados para la linealidad e intervalo de Medición.-----	70
4.2 Sensibilidad-----	71
4.2.1 Sensibilidad a la longitud de onda de 320 nm-----	71
4.2.2 Sensibilidad a la longitud de onda de 632,8 nm-----	72
4.2.3 Interpretación de los resultados para la sensibilidad-----	72
4.3 Recuperación-----	73
4.3.1 Recuperación a la longitud de onda de 320 nm-----	73
4.3.2 Recuperación a la longitud de onda de 632,8 nm-----	73
4.3.3 Interpretación de los resultados para la recuperación-----	73
4.4 Precisión-----	74
4.4.1 Precisión a la longitud de onda de 320 nm-----	74
4.4.2 Precisión a la longitud de onda de 632,8 nm-----	76
4.4.3 Interpretación de los resultados para la precisión-----	78
4.5 Veracidad-----	80

4.5.1 Veracidad a la longitud de onda de 320 nm-----	80
4.5.2 Veracidad a la longitud de onda de 632,8 nm-----	80
4.5.3 Interpretación de los resultados para la veracidad-----	81
4.6 Límite de detección (LoD) -----	82
4.6.1 LoD a la longitud de onda de 320 nm-----	82
4.6.2 LoD a la longitud de onda de 632,8 nm-----	83
4.6.3 Interpretación de los resultados para el LoD-----	83
4.7 Límite de cuantificación (LoQ) -----	84
4.7.1 LoQ a la longitud de onda de 320 nm-----	84
4.7.2 LoQ a la longitud de onda de 632,8 nm-----	84
4.7.3 Interpretación de los resultados para el LoQ-----	85
4.8 Robustez-----	85
4.8.1 Robustez a la longitud de onda de 320 nm-----	85
4.8.2 Robustez a la longitud de onda de 632,8 nm-----	86
4.8.3 Interpretación de los resultados para la robustez-----	88
4.9 Incertidumbre de medición-----	88
4.10 Conclusiones-----	90
CAPÍTULO V:	
TRABAJO A FUTURO	
5.1 Estudios propuestos que se pudieran derivar de esta investigación-----	93
GLOSARIO-----	94
ANEXOS	
A.1 Análisis de Varianza (ANOVA) -----	100
A.2 Sesgo-----	102
A.3 Prueba de Kolmogorov-Smirnov.-----	103
A.4 Estabilidad y consistencia de las diluciones-----	104
REFERENCIAS-----	111

RESUMEN

Introducción: Debido a la mayor incidencia en las últimas décadas de la radiación ultravioleta, RUV, sobre la superficie terrestre, que provoca ciertas patologías en la piel humana, surge la necesidad de estudiar los filtros solares, entre ellos, un filtro físico con principio activo de dióxido de titanio, a diferentes concentraciones, para establecer el intervalo de mejor comportamiento frente a esta radiación.

Planteamiento de la hipótesis: “Se puede obtener mediante el estudio de la validación, para las diferentes diluciones partiendo de una muestra primaria, el mejor comportamiento que permita llevar a cabo un estudio optimizando recursos, sin tener que usar la muestra primaria.”

Objetivo general: llevar a cabo la validación del sistema de diluciones cumpliendo los requisitos que nos marca la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006.

Materiales y métodos: El método utilizado fue el inferencial, y el procedimiento experimental consiste en la preparación de cinco diluciones del filtro de dióxido de titanio a diferentes concentraciones, las cuales se midieron por una técnica espectrofotométrica a las longitudes de onda de 320 nm y 632,8 nm.

Presentación e interpretación de resultados: Se obtiene una linealidad para el sistema de diluciones en el intervalo 0,2717 - 0,0007 mg/ml, la mayor recuperación, precisión y veracidad se encuentra en la concentración de 0,2717 mg/ml y en menor grado en la concentración de 0,0136 mg/ml, se demostró que no existe diferencia significativa entre la precisión a las dos longitudes de onda, el sistema es robusto dentro de las condiciones en las cuales se llevó la medición.

Conclusiones: se llevó a cabo la validación por medio del conocimiento científico y principios teóricos, estableciendo las mejores características en cuanto a exactitud, robustez, linealidad, sensibilidad, incertidumbre, que nos permiten establecer una validación a diferentes concentraciones.

Palabras clave: Validación, parámetros de validación, filtro solar, dióxido de titanio, radiación ultravioleta, incertidumbre.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

En el presente trabajo nosotros realizaremos la validación de un filtro solar físico, dióxido de titanio, y lo estudiaremos a diferentes concentraciones, mismo que permitirá el análisis del mejor comportamiento a los rayos ultravioleta en el intervalo que requiere mejores características de exactitud e incertidumbre. La validación de dicho filtro, dadas las características de respuesta a los fotones, es de tipo espectrofotométrico.

1.1 Planteamiento del problema.

El sol es una fuente natural de radiación electromagnética que se caracteriza por su frecuencia y su longitud de onda, en ella podemos encontrar ondas de radio, microondas, infrarrojos, luz visible, luz ultravioleta, rayos X, rayos gamma..., que en su conjunto conforman el espectro electromagnético. De todo el espectro solar sólo la luz visible, los infrarrojos y una parte de la radiación ultravioleta, RUV, alcanzan la superficie terrestre siendo los restantes detenidos por la capa de ozono.¹

A pesar de los enormes beneficios que nos proporciona el sol, un abuso en la exposición a la luz solar nos trae ciertos riesgos para nuestra piel, causándonos desde un eritema hasta una alteración celular como los carcinomas y lesiones precancerosas. La radiación ultravioleta, que tiene un rango de longitud de onda de 100 a 400 nm, constituye el principal responsable de las lesiones que se pueden presentar en nuestra piel, y como su energía es inversamente proporcional a su longitud de onda se puede clasificar en tres bandas energéticas: UVC (200-290nm), UVB (290-320nm) y UVA (320-400nm). La radiación UVC es completamente absorbida por el oxígeno y el ozono de la atmósfera, por lo que no llega a la superficie terrestre, la radiación UVB es parcialmente absorbida por la capa de ozono, llegando a la superficie terrestre un 5% de la radiación emitida por el sol y la radiación UVA es muy poco absorbida por la capa de ozono, llegando a la superficie terrestre hasta un 95% de la radiación emitida por el sol. Los efectos biológicos que estos producen son muy diversos; la radiación UVC es eritematogénica, mutagénica y carcinogénica para el ser humano, la radiación UVB en sobreexposición causa quemaduras, envejecimiento prematuro de la piel, cáncer de piel,

fotosensibilidad, inmunosupresión, daños en el ADN de las células, entre otras y la radiación UVA es responsable de la reacción de pigmentación de la piel y de muchos otros efectos como son fotoenvejecimiento de la piel y la fotosensibilidad. Estos daños van a depender de la longitud de onda de los rayos UV, su penetración en la piel y el tiempo de exposición solar.^{1, 2}

Como resultado de los riesgos mencionados, además de que en las últimas décadas existe un aumento de las enfermedades asociadas a la exposición a los rayos solares y a las recomendaciones de los expertos en dermatología de protegerse de cantidades excesivas de luz ultravioleta, surge la necesidad de encontrar una manera de poder evitar estas radiaciones, y en respuesta a esta necesidad se desarrollan una serie de productos entre ellos los filtros solares físicos que actúan reflejando la radiación incidente.^{1, 2, 3}

Las características principales buscadas en un filtro solar, por parte del consumidor, son: la eficacia, la estética y lo accesible del costo.⁴

Por otro lado, para poder cumplir con los requisitos que busca el usuario, es necesario desarrollar procedimientos que evalúen características particulares de los filtros solares, de manera que se conozca más acerca de su exactitud, eficacia, incertidumbre y otros parámetros que nos muestren el comportamiento frente a la radiación ultravioleta.

Esto genera la necesidad de poder validar las muestras de un filtro físico, dióxido de titanio, utilizando para su estudio diluciones a diferentes concentraciones que nos permitan determinar su comportamiento frente a la RUV y que nos den una perspectiva de su estabilidad.

1.2 Planteamiento de la hipótesis.

La RUV es responsable de enfermedades asociadas a la piel, principalmente, por exposición prologada a la luz solar, las cuales han venido en aumento en las últimas décadas convirtiéndose en un problema de salud. Una respuesta ante esta problemática fue la creación de filtros solares que protegen contra la RUV, que actúan, absorbiendo la

radiación como lo hacen los filtros químicos o reflejándola como hacen los filtros físicos.

Para una adecuada aplicación de los filtros solares es necesario conocer sus características particulares, como su estabilidad y el intervalo que presenta una mejor exactitud, linealidad e incertidumbre a la radiación incidente. Por lo tanto, se diseña este estudio para validar las diluciones de un filtro solar físico de dióxido de titanio que nos muestre el comportamiento que se puede presentar. En torno a esto, construimos nuestra *hipótesis* de trabajo:

“Se puede obtener mediante el estudio de la validación, para las diferentes diluciones partiendo de una muestra primaria, el mejor comportamiento que permita llevar a cabo un estudio optimizando recursos, sin tener que usar la muestra primaria.”

1.3 Variables.

Al establecer una hipótesis es necesario describir aquellas variables que ejercen influencia sobre la hipótesis de trabajo, de manera que se puedan reconocer las variables de las cuales depende el desempeño de la hipótesis, como también las que tienen un comportamiento de manera independiente. Y para lo cual se clasificarán como variables dependientes e independientes en el desempeño de la hipótesis.

1.3.1 Variables dependientes.

- Concentración de las diluciones.
- Instrumento de medición.
- Grado de pureza del dióxido de titanio.
- Agua destilada.
- Tiempo de medición.
- Longitud de onda.
- Tipos de celdas de cuarzo.

1.3.2 Variables independientes.

- Incertidumbre de la balanza analítica.
- Incertidumbre de los matraces.
- Tipo de agitador magnético.
- Tipo de micropipeta y pipetas.

1.4 Objetivos.

Los objetivos nos ayudan a percibir los alcances o las limitaciones de la investigación, y nos permiten profundizar sobre la intención buscada en el desarrollo experimental. Ellos son importantes para cumplir con la hipótesis de trabajo, a fin de realizar un enfoque que permita desglosar de manera efectiva nuestra investigación, clasificándolos en objetivos específicos y objetivos generales.

1.4.1 objetivo general.

- Llevar a cabo la validación de las diluciones del filtro solar físico de dióxido de titanio.

1.4.2 objetivos específicos.

- Cumplir con los requisitos establecidos en la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006.
- Establecer el valor de los parámetros de validación.
- Evaluar si las muestras empleadas son adecuadas para el estudio.
- Juzgar si la metodología empleada es útil para el estudio.
- Determinar la estabilidad de las muestras en un lapso de tiempo corto.

1.5 Delimitación del tema.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biofísica del Instituto de Física y Matemáticas, durante los meses de Diciembre del 2009 a Enero del 2010 donde se analizaron cinco diluciones de un filtro solar, con principio activo de dióxido de titanio a diferentes concentraciones, en el cual las mediciones duraron 2 meses y la preparación de la dilución se llevo en un promedio de dos horas, el tiempo de análisis de datos tuvo un tiempo aproximado de 2 meses.

Con el planteamiento del problema, partiendo de una premisa inicial de la existencia de un mejor comportamiento para las diluciones, se pudo establecer la hipótesis, que es sometida a la experimentación y la validación adecuada, tomando en cuenta las diferentes variables que influyen para su evaluación. En el próximo capítulo abordaremos diferentes aspectos teóricos alrededor de la hipótesis como son: los principales requisitos que marca la norma y los organismos de normalización, las definiciones y procedimientos, que son sugeridos para realizar una validación, así como el análisis de estudios relacionados con nuestro tema, mismos que permitirán la utilización de un lenguaje formal en el análisis e interpretación del estudio realizado.

CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El propósito de este capítulo es presentar una base teórica que permita disertar al momento de interpretar una validación, así como la forma más apropiada del análisis de los resultados. Desde luego para entender e interpretar adecuadamente, se requiere construir una base teórica que incluya jurisprudencia de las normas que giran en torno a los métodos de validación y una revisión de estudios que anteceden a esta investigación.

Para poder cumplir con esta tarea, este capítulo se divide en tres partes fundamentales que están estrechamente ligadas como lo es: el marco teórico o conceptual, marco jurídico y marco histórico, los cuales se describirán a continuación.

El marco teórico será el primero a describir, en el se hablara de los principios teóricos que involucra un proceso de validación y algunas características del dióxido de titanio, en el marco jurídico se mencionaran los requisitos que se marcan en la norma para llevar a cabo una validación y en el marco histórico estableceremos una relación con investigaciones anteriores que nos aproximen a la resolución de nuestro problema planteado.

El poder revisar los conceptos teóricos, las normas existentes y trabajos anteriores al nuestro nos permite crear una base teórica que nos ayudará a realizar una mejor interpretación de los resultados obtenidos y la solución de problemas que se presenten durante el desarrollo del experimento.

2.1 MARCO TEÓRICO

En el marco teórico se establecerán los principales conceptos y metodologías sugeridas por las diferentes referencias revisadas, que nos permitirán entender lo que significa hacer una validación. Se revisaran los criterios que se marcan para los diferentes parámetros de validación que se tendrán que calcular.

Comenzaremos por dar una descripción de la espectrofotometría, así como de la radiación solar y del dióxido de titanio como filtro solar, revisando algunas de sus propiedades y características generales. Posteriormente pasaremos a definir el término “validación” que es el término más importante que se debe conocer, para después establecer los objetivos y posteriormente dar la solución a las interrogantes; ¿Cuándo? ¿Por qué? y ¿Quién realiza un proceso de validación?

Enseguida se describirán las técnicas para llevar a cabo una validación y se mencionaran los tipos de validación que existen así como las etapas que involucra un proceso de validación.

Inherente a esto se describirá la forma en que se realiza el procedimiento de validación con el cálculo de los parámetros de desempeño del método a los cuales se les describirán sus principios fundamentales y el procedimiento que cada parámetro requiere para poder realizar su determinación, así como los criterios que se toman en cuenta para considerar que el valor del parámetro es aceptado y cumple con el proceso de validación.

2.1.1 Espectrofotometría.

Las técnicas espectroscópicas se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. A través de esta interacción, las moléculas pueden pasar de un estado energético a otro estado energético distinto, de un estado de más baja energía, estado fundamental, a un estado de mayor energía, estado excitado, absorbiendo una cantidad de energía radiante igual a la diferencia energética existente entre los dos niveles. Debido a la existencia de diferentes tipos de energía las moléculas pueden interaccionar con radiaciones electromagnéticas de un rango muy amplio de longitudes de onda, dando lugar a distintos tipos de espectroscopias según las diferentes regiones.^{5, 6}

El espectro se define como la representación gráfica o fotográfica de la distribución de intensidades de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia, en función de la longitud de onda de dicha radiación. Los espectros son debidos a transiciones entre estados de energía característicos de la materia, y pueden ser de emisión, que se obtiene excitando adecuadamente la materia para que emita radiación electromagnética y de absorción, obtenidos sometiendo a la materia a una radiación electromagnética continua y representando la proporción de radiación absorbida por la misma en función de la frecuencia o longitud de onda.⁶

La espectrofotometría se refiere a los métodos cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la cantidad de energía que es absorbida por una muestra que contiene una especie absorbente, que comparándola con la cantidad de energía absorbida por otra muestra de concentración conocida, tomando como referencia una solución la cual no contiene la sustancia que absorbe radiación, es decir, es la diferencia de intensidad transmitida cuando un haz luminoso atraviesa un blanco de disolvente puro, con respecto a la intensidad transmitida cuando el haz pasa a través de la muestra. Dependiendo de la radiación utilizada se divide en: absorción visible, ultravioleta, infrarroja, entre otras, y se clasifican en métodos espectroscópicos moleculares y atómicos.^{5, 6, 7, 8}

Estos métodos espectrofotométricos se basan en la medición de dos parámetros, *Absorbancia* y *transmitancia*, los cuales mencionaremos a continuación:

La *transmitancia* es la relación entre la intensidad de radiación transmitida por una muestra y la intensidad de radiación que incide sobre la muestra, medidos ambos en la misma posición del espectro, es decir, la transmitancia indica la cantidad de radiación que no es absorbida. Si la transmitancia es alta, la absorbancia es baja, en virtud de que la especie absorbente no tiene afinidad por ese tipo de radiación. La escala de la transmitancia se expresa comúnmente como porcentaje de 0 a 100%.^{7,8}

La ***absorbancia*** es el logaritmo en base diez del recíproco de la transmitancia. En el que el disolvente puro es el material de referencia. La especie absorbente demuestra capacidad de absorber dicha radiación, en cuyo caso la absorbancia tiene un valor alto y la transmitancia es pequeña. La escala de absorbancia es de cero o infinito.^{7,8}

La medida de la absorbancia se lleva a cabo con la ayuda de un espectrofotómetro, que en esencia consta de un monocromador, prismas o red de difracción, que controla la longitud de onda de la radiación que se hace incidir sobre la muestra. La absorbancia de la muestra se compara con la de una referencia que consta estrictamente de disolvente.⁹

2.1.1.1 Ley de Lambert-Beer-Bouguer

Esta ley nos muestra la relación que existe entre la absorbancia y la concentración, pero además toma en cuenta la longitud de la celda atravesada por la muestra, el tipo de disolvente y también la longitud de onda del haz incidente. La aplicación de esta ley es de mucha utilidad ya que midiendo la absorbancia de una muestra a una longitud de onda típica de absorción para una especie dada, se puede conocer rápidamente su concentración exacta sin alterar las propiedades de la muestra, de hecho son muchos los métodos modernos que se basan en medidas espectroscópicas.⁵

Esta ley establece que la fracción de luz incidente absorbida por una sustancia absorbente es proporcional al número de moléculas que interaccionan con la radiación en su recorrido. Para esta ley, la transmitancia decrece exponencialmente y la

absorbancia aumenta linealmente a medida que se incrementa la concentración o el camino óptico atravesado por la radiación.¹⁰

Debido a esto, esta ley se puede expresar por medio de la siguiente fórmula^{5,9}:

$$A = \epsilon bc$$

Donde:

A: es la absorbancia.

ε: es la absortividad molar, una medida de la radiación absorbida que es un valor constante para cada sustancia a cada longitud de onda.

b: es la longitud total recorrida por el haz en la muestra que depende del espesor de las celdas y que generalmente estas celdas tienen 1 cm de longitud.

c: es la concentración molar de la muestra.

Si se opera, por tanto, a una longitud de onda dada y con un celda de un determinado espesor, *b*, la absorbancia, *A*, medible directamente, es proporcional a la concentración molar de la muestra, *c*, lo que constituye el fundamento del análisis espectrofotométrico cuantitativo.⁹

Sin embargo, existen distintos factores que afectan al cumplimiento de la ley, especialmente a concentraciones elevadas, donde a mayor concentración mayor es el grado de desviación de la linealidad, debido a que la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye, hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de la carga de las moléculas vecinas, esta interacción a su vez, puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación a una determinada longitud de onda. Otros factores que exceptúan la aplicación de la ley pueden ser: la interacción entre el soluto y la radiación, la utilización de radiación no monocromática, la falta de uniformidad de la muestra o especie absorbente, desviaciones químicas, como cuando un analito se disocia, se asocia o reacciona con un disolvente para dar lugar a un producto con un espectro de absorción diferente al del analito, entre otras.^{6, 8, 9, 11}

Las desviaciones reales a la ley ocurren únicamente en soluciones de alta concentración, donde el índice de refracción cambia con la concentración. El límite máximo para que no ocurran desviaciones a esta ley es aproximadamente a la concentración de 10^{-2}

molar, mientras que el mínimo de detección es alrededor de la concentración de 10^{-7} molar.^{8,9}

2.1.2 Radiación solar, filtros solares y dióxido de titanio.

La radiación electromagnética es una forma de energía natural que se propaga a través del espacio, emitida por sustancias en estado excitado, es decir, es un flujo de partículas de energía llamadas fotones, donde la energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de radiación. Al atravesar la materia, la radiación puede interactuar con partículas que tengan una carga eléctrica o momento magnético, produciéndose una transferencia de energía entre la radiación y la materia.^{6,12}

Toda onda electromagnética está formada por un campo eléctrico y un campo magnético, perpendiculares entre sí, propagándose en cualquier medio, aun en el vacío donde alcanza una velocidad aproximada de 300,00 Km/s, y que se caracteriza por su longitud de onda, que es la distancia entre dos valles o crestas, su frecuencia, que es el número de ciclos que pasan por un punto en unidad de tiempo, su amplitud, que se define como la distancia que separa el pico de la cresta o valle, de la base. La variación de estos parámetros da origen a los diferentes tipos de radiaciones electromagnéticas que existen. De las cuales se compone la radiación solar que incide sobre la superficie de la tierra.¹²

La luz solar a pesar de que es indispensable para la vida, en determinadas circunstancias puede provocar efectos adversos indeseados y perjudiciales para nuestra piel. La consecuencia más severa del daño producido por la radiación solar es el cáncer de piel y la inmunosupresión. Cambios menos severos, reflejo del fotoenvejecimiento cutáneo, son la presencia de arrugas, quemaduras solares, descamaciones, sequedad de la piel y anomalías en la pigmentación cutánea como la hiper y la hipopigmentación.^{1,3}

De manera natural nuestro cuerpo se protege de la radiación por medio de los llamados *filtros naturales* entre los que se encuentran: la queratina y los lípidos de la superficie de la epidermis que actúan como una barrera física, que mediante un fenómeno de reflexión impiden que un porcentaje importante de la RUV incida sobre las células de la

epidermis. La melanina está considerada como el factor de protección fisiológico, más importante y realiza su acción absorbiendo la radiación entre los 300 y los 1200 nm.³

A pesar de la acción de estos filtros naturales, sigue llegando RUV a las estructuras de la piel causando las alteraciones como el cáncer de piel, entre otras, este problema ha venido en aumento en las últimas décadas debido a condiciones como una sobreexposición a la radiación solar y la destrucción de la capa de ozono. En consecuencia a lo anterior, surgen productos o preparados destinados a la protección de la piel contra la radiación electromagnética especialmente contra los rayos UV llamados filtros solares.¹

El término filtro solar se usa para abarcar lociones bronceadoras, protectores solares y pantallas solares. Estos filtros son preparados que se aplican sobre la piel con el fin de reducir los efectos de la radiación solar u otras fuentes de radiación UV, y para ello, los filtros solares presentan un factor de protección solar (FPS), que indica la energía mínima necesaria para que la RUV produzca eritema. Los filtros solares actúan fundamentalmente de dos formas, desviando la radiación o absorbiéndola. Atendiendo a su composición se les clasifica en dos grupos: filtros físicos y filtros químicos.^{1, 3, 13}

Los filtros químicos son moléculas que absorben los fotones de la radiación solar alterando su estructura molecular. Cada molécula presenta un espectro de absorción óptimo. Son transparentes, no manchan la ropa y necesitan una capa de aplicación de menor grosor lo que los hace cosmetológicamente más aceptables y más difundidos en el mercado. Algunas sustancias empleadas en estos filtros son: ácido para-amino-benzoico, salicilatos, ácido cinámico, alcanfor, benzofenonas, entre otras.¹

Los filtros físicos actúan desviando la radiación solar formando una barrera opaca que actúa a modo de pequeños espejos, tienen un espectro de acción más amplio de manera que proporcionan mejor protección frente a los rayos UVA, UVB, luz visible e infrarrojos. Pueden manchar la ropa y necesitan una capa de aplicación más gruesa. Las sustancias que comúnmente se emplean en su elaboración son el óxido de zinc y dióxido de titanio.¹

El dióxido de titanio es un producto utilizado, aparte de protector solar, como pigmento, relleno en comprimidos vitamínicos, catalizador y en la producción de materiales cerámicos. Se presenta en la naturaleza en tres formas cristalográficas: anatasa, estructura octahédrica, rutilo, estructura tetragonal, y brookita, estructura ortorómbica. En la anatasa el ángulo Ti-O-Ti es de 180° y en los otros dos de 90° .¹⁴

Tiene gran importancia como pigmento blanco por sus propiedades de dispersión, su estabilidad química y su no toxicidad¹⁴. Aunque, una desventaja es que las partículas de dióxido de titanio tienen una tendencia a la aglomeración con la luz solar, y este efecto reduce su eficacia como agente de apantallamiento de RUV aumentando su blancura sobre la piel, opacidad. La aglomeración también da como resultado la disgregación de emulsiones que contienen tales partículas, y afecta adversamente, su estabilidad durante almacenamiento prolongado. Una forma de minimizar la reducción de su eficacia producida por la luz, es revestir las partículas de dióxido de titanio con compuestos como estearato de aluminio y óxido de aluminio¹³.

El dióxido de titanio es una de las sustancias químicas más blancas que existen: refleja prácticamente toda la radiación visible que le llega e incluso la ultravioleta, absorbiendo la región UVB y dispersando el rango de UVA, y cuanto menor sea el tamaño de la partícula menor será la dispersión de la radiación. Es de las sustancias con un índice de refracción más alto, y por la misma razón es opaco. El dióxido de titanio es anfotérico, muy estable químicamente y no es atacado por la mayoría de los agentes orgánicos e inorgánicos. Se disuelve en ácido sulfúrico concentrado y en ácido hidrofúrico.^{14, 15}

Debido a que el dióxido de titanio no es soluble en agua, hace de su filtro un buen protector de la radiación ultravioleta que se puede utilizar no solamente en las playas, sino también en deportes y otras actividades que se practiquen bajo la luz solar, en donde el sudor no afecta las propiedades del principio activo, lo cual lo hace un filtro a prueba de agua.

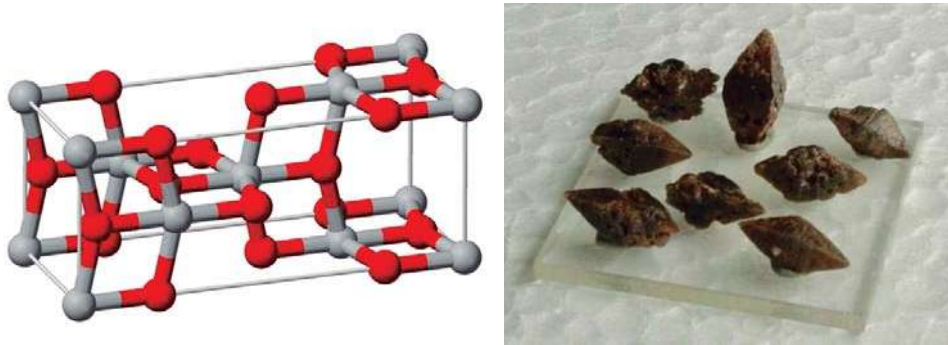


Figura 2.1.1 Representación de la molécula del dióxido de titanio en su forma cristalográfica natural, de estructura octahédrica, anatasa.

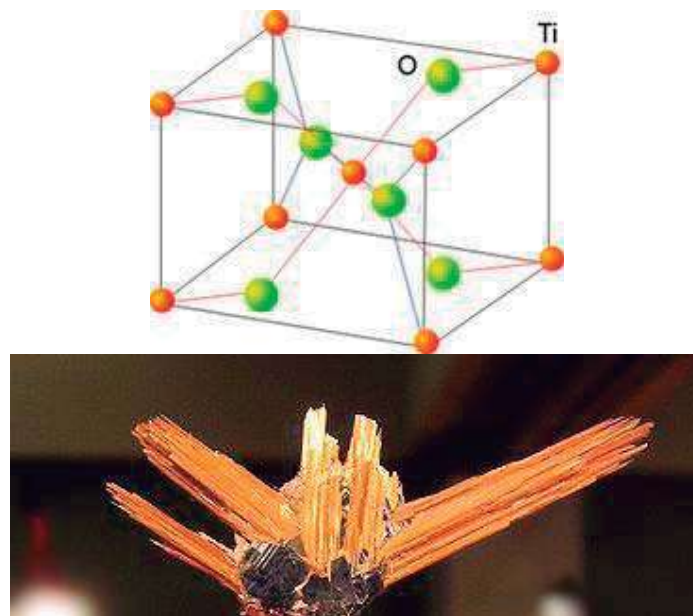


Figura 2.1.2 Representación de la molécula de dióxido de titanio en su forma cristalográfica natural, de estructura tetragonal, rutilo.



Figura 2.1.3 Representación de la molécula de dióxido de titanio en su forma cristalográfica natural, de estructura ortorómbica, brookita.

2.1.3 Validación de métodos.

El término validación de un método, se refiere a la confirmación mediante un examen y establecimiento de evidencia documental de que un método analítico cumple con los requisitos para su utilización o aplicación, dando un alto grado de seguridad así como de resultados precisos y exactos.^{16, 17, 18}

En términos estrictos, la validación debe referirse a un sistema analítico y no a un método analítico, debido a que el sistema analítico incluye un protocolo de método definido, un rango de concentración definido para el analito y un tipo específico de material de prueba. También, en la actualidad no existe una sola fuente o autoridad reconocida a nivel internacional respecto a la validación de métodos de ensayo y aunque hay avances aún no existe acuerdo unánime entre las diferentes disciplinas respecto a la interpretación de algunos términos relacionados con el proceso de validación y a la aplicación de los mismos.^{19, 20}

Por lo anterior, debido a que los documentos revisados utilizan el término método y no el de sistema analítico, nosotros utilizaremos el término que se maneja de acuerdo a los artículos revisados así como las definiciones que se manejan en los mismos.

2.1.4 Objetivo de una validación.

El objetivo primordial de una validación es demostrar que un método se puede utilizar para un cierto tipo de analito en una matriz determinada, usando la instrumentación apropiada, con un tratamiento de muestra específico, en un laboratorio equipado y con personal capacitado.^{18, 22}

2.1.5 ¿Cuándo, por qué y quién realiza la validación de un método?

La validación de un método es un requisito importante dentro de los análisis analíticos, sin embargo, la comprensión de su importancia, del porque y cuando debe hacerse aun son deficientes para algunos químicos analistas.¹⁶

La validación de un método se realiza para verificar que los parámetros de desempeño de un método son adecuados para el fin propuesto. En consecuencia la validación de un método se realiza cuando^{16, 18, 21, 22}:

- Se desarrolla un método nuevo que se quiere implementar como método de rutina en un laboratorio o simplemente para verificar que el método nuevo es adecuado para el fin propuesto.
- Cuando un método es usado en un laboratorio diferente con instrumentos y analistas diferentes y se quiere ver que el cambio de alguna de estas condiciones no afecta el desempeño del método.
- Se cambian condiciones o se incorporan mejoras que pueden hacer más eficiente o más deficiente al método.
- Se quiere ver la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, un método normalizado y uno nuevo con el fin de validar el método nuevo.
- El control de calidad indica que el método está cambiando con el tiempo.

La validación es importante realizarla porque^{18, 19, 21, 22}:

- Se tiene que demostrar que el método es útil para el uso propuesto conociendo sus características, capacidades y limitaciones del mismo.
- Se debe garantizar la viabilidad del método si no hay ensayos colectivos ya que estos suelen ser muy costosos.
- Es importante garantizar que se utilizan correctamente los métodos validados.
- La norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 requiere que se validen los métodos.
- Y también cuando alguna medición es importante, costo, salud, ya que virtualmente cualquier aspecto de la sociedad se respalda de algún modo por una medida analítica y es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que es correcto, lo cual en muchas ocasiones influye en la toma de decisiones con base en las mediciones o resultados.

Una vez conocido el por qué y cuándo se debe hacer una validación, es importante mencionar quien es el responsable de llevar a cabo el proceso de la misma. Si un laboratorio utiliza o pretende utilizar un método, inmediatamente se hace responsable de asegurar que el método se encuentre validado adecuadamente, y si es necesario llevar a cabo un trabajo adicional para complementar los datos ya existentes. Cuando se utiliza

un método que ha sido publicado por un organismo de normalización el laboratorio necesita establecer los datos de desempeño para su propio uso.¹⁶

2.1.6 Técnicas de validación.

Una validación se lleva a cabo para conocer el nivel de desempeño de un método y por lo tanto es útil elegir una técnica apropiada para la validación, en la nota 2 del apartado 5.4.5.2 de la norma NMX-17025 se sugieren 5 técnicas que se pueden utilizar para realizar la validación, estas no son obligatorias o exclusivas, sin embargo sirven como una guía inicial para poder realizar una validación de un método. Las técnicas de validación que menciona la norma son las siguientes²³:

- Calibración usando patrones de referencia o materiales de referencia. El uso de patrones de referencia constituye el mejor punto de partida para llevar a cabo una calibración, pero esta acción no contribuye a validar un método. Sin embargo, si el resultado de la calibración es comparado con un patrón o material de referencia y existe igualdad entre los resultados, entonces la validación del método pudiera conseguirse.
- Comparación de resultados alcanzados con otros métodos. Cuando los resultados de dos o más métodos coinciden, considerando su incertidumbre y usando patrones de referencia, se demuestra que los principios teóricos y de desempeño individual son consistentes entre sí, de modo que prácticamente se garantiza la validez de los métodos comparados.
- Comparaciones entre laboratorios. Cuando los resultados de varios laboratorios coinciden, considerando su incertidumbre, y estos fueron obtenidos por medio de métodos distintos usando patrones de referencia, la validez de los métodos queda completamente garantizada. Sin embargo, si los resultados fueron obtenidos con un método común la garantía de validez podría ser limitada.
- Evaluación sistemática de los factores que tienen influencia en los resultados. Si un método se desarrolla incorrectamente puede tener errores sistemáticos que pueden causar en el resultado un efecto mayor al producido por factores de influencia evaluados. Por ello, la garantía de esta técnica para validar métodos es limitada.

- Evaluación de la incertidumbre de los resultados con base en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y de la experiencia práctica. En muchas ocasiones el desarrollo de métodos alternos para validar métodos resulta ser muy caro y complicado. Adicionalmente la comparación entre laboratorios no siempre es posible debido a la disponibilidad de patrones adecuados, altos costos, entre otros. Por ello, la validación de métodos se respalda mediante esta técnica empleando exhaustivamente argumentos científicos ampliamente descritos y desarrollados, análisis de resultados de experimentos, evaluaciones, caracterizaciones y en general, datos que permiten determinar la validez del método. La garantía que ofrece esta técnica resulta ser limitada, pues los posibles errores sistemáticos del método pueden no estar considerados en la evaluación de incertidumbre. Este tipo de técnica requiere una profunda y exhaustiva documentación.

2.1.7 Etapas de una validación.

Para poder llevar a cabo el proceso de una validación es necesario conocer las etapas que abarca, las cuales mencionaremos de manera breve ^{24, 25}:

- Primero se establecen las condiciones, requisitos y el alcance de la validación a cumplir, ya sea para los parámetros de validación en forma individual o conjunta. En el caso más sencillo ya fueron establecidas por el cliente del laboratorio o por alguna instancia oficial. En caso contrario, deben ser definidos por el responsable del ensayo de manera confiable y segura.
- Una vez definidos los requisitos a cumplir se lleva a cabo la determinación de los parámetros de validación.
- Finalmente se realiza una evaluación de los resultados obtenidos de los parámetros validados comparados con los requisitos establecidos previamente.

2.1.8 Tipos de validación.

Como hemos visto, en un proceso de validación existen diversas técnicas, así como diferentes etapas, ahora es necesario comentar también que existen diferentes tipos de validación, las cuales mencionaremos a continuación ^{22, 26}:

- **Validación total.** Este tipo de validación se realiza cuando se desarrollan métodos nuevos, métodos no normalizados o cuando un método normalizado sufre modificaciones mayores. En este tipo de validación se calculan los parámetros siguientes: **Recuperación, Límite de detección, Límite de cuantificación, Intervalo lineal y de trabajo, Reproducibilidad, Repetibilidad, Sesgo, Incertidumbre, Sensibilidad, Selectividad, Robustez.**
- **Validación parcial.** También llamada verificación y se debe de realizar para ver que los métodos normalizados cumplen con las características de desempeño en las condiciones del laboratorio. También se debe de realizar cada vez que se realice un cambio menor en algún método normalizado. Aquí es necesario evaluar los siguientes parámetros: **Recuperación, Límite de detección, Límite de cuantificación, Intervalo lineal y de trabajo, Reproducibilidad, Repetibilidad, Sesgo, Incertidumbre.** Si el laboratorio considera que alguno de los parámetros para la verificación no aplica en función al método seleccionado, esta decisión debe ser justificada técnicamente.

2.1.9 Tipos de validación en base a métodos cuantitativos, semi-cuantitativos y cualitativos.

Aparte de los tipos de validación mencionados anteriormente, existen otros tipos en base al tipo de ensayo que se quiere validar y por lo tanto los clasificaremos de la siguiente manera²⁷:

- **Validación de métodos cuantitativos.** En este tipo de validación es necesario calcular los siguientes parámetros: **Sensibilidad, Especificidad, Selectividad; Interferencias, Límite de detección, Rango y Linealidad, Incertidumbre, Exactitud: Veracidad, Precisión.**
- **Validación de métodos semi-cuantitativos.** Se encuentra entre lo cualitativo y lo cuantitativo y nos ofrece una cuantificación con incertidumbre importante donde

los resultados se terminan agrupando en clases: positivo (+++), positivo débil (+), zona gris (+/-), negativo (-).

- **Validación de métodos cualitativos.** En este tipo de validación se asegura la presencia de uno o más analitos en un muestra considerando sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Son métodos de análisis cuya respuesta es de forma binaria, presencia/ausencia, si/no, positivo/negativo, de un analito detectado ya sea de forma directa o indirecta en una muestra dada con respecto a un nivel de concentración. Los parámetros a determinar serán los siguientes: **Probabilidad de falsos positivos y negativos, Sensibilidad, Especificidad, Selectividad: interferencias, Límite de corte (cut-off), Incertidumbre o región de error.**

2.1.10 Métodos normalizados, normalizados modificados y no normalizados.

La elección del tipo de validación estará en función del método, así como de las características del mismo, por lo tanto es importante mencionar los tipos de métodos que se pueden encontrar cuando se quiere realizar una validación ^{20, 24, 26:}

- **Métodos normalizados.** Estos son métodos desarrollados o publicados por un organismo de normalización reconocido ya sea internacional, regional o nacional u otro organismo reconocido, ejemplos; ISO, AOAC, IUPAC, cuyos métodos son generalmente aceptados por sectores técnicos y que están publicados en normas oficiales. Estos tipos de métodos se deben ejecutar tal y como se establece en su certificado.
- **Método normalizado modificado.** En este método se han hecho cambios que pueden tener repercusión sobre la calidad de los resultados, por ejemplo, cambio en la metodología de extracción, cambio en la matriz, extensión del rango, equipamiento nuevo, entre otros.
- **Método no normalizado y desarrollado por el laboratorio.** Un método no normalizado es un método analítico desarrollado por un tercero que ha sido adaptado por el laboratorio. Un método desarrollado es un método elaborado por el laboratorio o sacado de la bibliografía pero sin datos del rendimiento del

método. Estos métodos no se encuentran en normas u otras colecciones de métodos.

2.1.11 Proceso de validación:

Como se ha mencionado anteriormente la validación comprueba la aptitud de los métodos y refleja las condiciones reales de la aplicación de los mismos²⁶. La validación dependerá del tipo de aplicación que se le dará al método así como de los cambios realizados a este, y de esta manera será la amplitud y exigencia de la validación. Es muy importante mencionar que las mediciones analíticas se deben realizar usando métodos que han sido probados para asegurar que se ajustan al propósito del uso²⁸. Existen diversos cambios que puede sufrir un método establecido; tenemos cambios mayores que involucran cambio de equipo, mantenimiento, entre otros, en donde se tiene que repetir completamente la validación y cambios menores como las modificaciones del tamaño de muestra, cambios del analista, sustitución de reactivos, entre otros, en donde se debe hacer una verificación o validación parcial^{26,29}.

En base a esto y como ya se ha mencionado anteriormente la validación dependerá del tipo de método empleado²⁹:

- Métodos no normalizados.
- Métodos modificados por el laboratorio.
- Métodos normalizados que se aplicarán en un alcance diferente al previsto en la norma de referencia.

Se requiere realizar una validación cuando se adapta un método existente, realizando cambios menores o mayores de tal manera que sea adecuado a su nueva aplicación, en donde el nivel de revalidación aumenta conforme la magnitud de los cambios realizados o cuando se desarrolla un método nuevo basado en las propiedades conocidas de un analito^{16,20}. Esto involucra un manejo de más trabajo y al menos inicialmente un cierto grado de duda de si el método final será exitoso. Las limitaciones financieras pueden imponer que el desarrollo de un método, que satisface una necesidad analítica en particular, no sea económicamente viable; en tal caso debe tomarse una decisión ya sea de bajar la exigencia de la necesidad analítica a un nivel mas asequible, o bien, de

retomar, la justificación del análisis¹⁶. Un método desarrollado debe de estar adecuadamente validado para demostrar que se cumplen con los criterios de aceptación adecuados para el propósito de aplicación, también deben de estar documentados y autorizados antes de su uso. Una vez que el método esta en uso, el laboratorio debe verificar su desempeño contra los parámetros de validación, para demostrar que sigue dominando el ensayo y lo realiza correctamente²⁰.

Es peligroso asumir que sólo por que un método está normalizado uno tiene la garantía de que esa validación será adecuada²¹. Por eso, para métodos normalizados el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la confirmación del método, llamado también *validación parcial o verificación*, para demostrar que cumple las especificaciones del mismo y cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente tomando en consideración sus propias instalaciones, equipos y personal²².

Durante el procedimiento de una validación no es posible determinar exactamente en donde termina el desarrollo del método y donde empieza la validación. Por lo general muchos de los parámetros de desempeño del método que están asociados a su validación son evaluados, por lo menos, aproximadamente como parte del desarrollo del método.¹⁶

La validación de un método se limita al ámbito de su aplicación, esto es, el método aplicado a una clase particular de material de prueba. Si existe una variación sustancial en los tipos de matriz dentro de la clase definida, puede existir una fuente adicional de variación debido al efecto de matriz dentro de la clase. Es evidente de que si el método se utiliza posteriormente con materiales no pertenecientes a la clase definida, esto es, fuera del ámbito de la validación, el sistema analítico no puede considerarse validado, por que se introduce un error adicional de magnitud desconocida en el proceso de medición.¹⁹

También es importante para los analistas tener en cuenta el modo en que varía el rendimiento de un método en función de la concentración del analito. En la mayoría de los casos, la dispersión de los resultados aumenta claramente con la concentración y la recuperación puede diferir sustancialmente a altas y bajas concentraciones. Por tanto la

incertidumbre de la medición asociada a los resultados a menudo depende de estos dos factores y de otros factores dependientes de la concentración. No obstante cuando el rendimiento del método es de interés, a concentraciones sustancialmente diferentes, es importante comprobar la supuesta relación entre rendimiento y concentración del analito. Esto suele hacerse comprobando el rendimiento en los extremos del rango probable, o a unos pocos niveles seleccionados.¹⁹

Una vez definidos los requisitos para llevar a cabo la validación se prosigue con la evaluación de los parámetros de desempeño.

2.1.12 Parámetros de validación.

Un parámetro de desempeño o parámetro de validación de un método analítico se le considera como las características cuantificables de un método que indican el grado de calidad del mismo, que necesitan ser evaluadas y que corresponden a: *Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Incertidumbre, Selectividad, Especificidad, Sensibilidad, Robustez, Precisión, Linealidad e Intervalo de medición, Veracidad* y otras características relacionadas con los resultados obtenidos, los cuales escribiremos a continuación.^{17, 20, 30}

2.1.12.1 Veracidad.

El término *veracidad*, en muchas ocasiones llamado *exactitud*; aunque la *exactitud* se considera como la suma de dos conceptos: *Veracidad y Precisión*³¹, se refiere al grado de coincidencia entre el valor de la media obtenida de una serie de resultados de una prueba y un valor de referencia, la veracidad generalmente se expresa en términos de sesgo, cuanto menor sea el sesgo existe mayor veracidad, este parámetro se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático^{19, 24}. Al hablar de error sistemático nos referimos al error debido a una alteración que se mantiene durante un periodo de tiempo determinado, y que se expresa en forma de una media aritmética que resulta de un número finito de mediciones del mismo mensurando bajo condiciones de repetibilidad, menos el valor verdadero del mensurando, donde los resultados se desvían en un solo sentido, ya sea por debajo o por encima del valor correcto, siendo errores positivos y

otros negativos, la suma de todos ellos se conoce como error sistemático total o sesgo de la medición^{16, 26, 32}.

Existen diferentes guías que sugieren el procedimiento para evaluar la veracidad de un método, pero de manera general todas coinciden en usar materiales de referencia certificados, preferentemente con matriz semejante a la de la muestra. Solo en el caso de no existir un material adecuado se puede realizar un ensayo de recuperación.²¹

A continuación se mencionara el procedimiento de veracidad que se encuentra en la “Guía para la validación de métodos y temas relacionados” de EURACHEM, CENAM, así como en la “Guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico” del CENAM, EMA. La base técnica del presente trabajo considera los procedimientos sugeridos por las dos guías mencionadas anteriormente.

Tabla 2.1.12.1 Procedimiento sugerido para evaluar la veracidad.¹⁶

Analizar	Réplicas	Cálculos	Comentarios
a) El blanco reactivo y el MR usando el método candidato.	10	Al valor medio del analito en el MR, restarle el valor medio del blanco. Comparar con el valor verdadero o verdadero aceptado, del MR. Da una medida del sesgo del método.	Sujeto a la incertidumbre de que el blanco es un blanco verdadero y de la caracterización del MR.
b) El blanco reactivo y el MR/material de prueba usando el método candidato y un método independiente (preferentemente un método primario).	10	Al valor medio del analito en el MR/material de prueba, restarle el valor medio del blanco. Comparar con mediciones similares realizadas con un método independiente/método primario. Da una medida del sesgo del método relativo al método independiente/primario.	El método independiente puede tener sesgo por sí mismo, de aquí, no se tiene una medida absoluta de la exactitud El método primario idealmente no tiene sesgo por lo que es una mejor medida de la exactitud.

La guía del CENAM, EMA menciona que la veracidad se puede estimar a partir del porcentaje de error relativo o mediante el porcentaje de recuperación utilizando materiales de referencia certificados, calibradores o muestras de valor conocido. En ambos procedimientos la muestra se somete a examen un mínimo de 10 veces, de los cuales se obtiene la media, coeficiente de variación (CV) y se utilizan las siguientes fórmulas²⁶:

$$\% \text{ de recuperación} = [\text{valor obtenido} / \text{valor de referencia}] \times 100.$$

$$\% \text{ de error relativo} = [(\text{valor real} - \text{valor de medición}) / \text{valor real}] \times 100.$$

Entre menor sea el porcentaje de error relativo mayor será la veracidad del método, en el porcentaje de recuperación a mayor porcentaje mayor cantidad del analito recuperado y viceversa²⁶. Cuando hablamos de recuperación nos referimos a la porción o cantidad del analito presente o adicionada a una muestra que se cuantifica efectivamente por el método empleado como indicativo de la eficiencia de este método para detectar cierto analito y que se expresa en forma de porcentaje de recuperación^{16, 18}.

También esta guía menciona que se puede alcanzar la veracidad mediante estudios de comparación de métodos.²⁶

2.1.12.2 Precisión.

Este parámetro se refiere al grado de concordancia o conformidad entre los resultados de una serie de mediciones individuales utilizando una muestra homogénea o de diluciones a partir de la misma bajo condiciones establecidas, es decir, se refiere a la dispersión de una serie de mediciones alrededor de su valor central que puede ser expresado en términos de varianza (S^2), desviación estándar (SD) o coeficiente de variación (CV)^{16, 17, 20}. La precisión se relaciona con el error aleatorio el cual es el resultado vinculado con factores que sufren pequeñas variaciones durante la medición, no es controlable y que en mediciones repetidas, varía de forma impredecible^{16, 32}. La precisión depende de las condiciones en que se obtienen los resultados, siendo mucho mejor cuando los resultados se obtienen en un mismo día dentro de un mismo laboratorio que cuando se obtienen por diferentes laboratorios³¹.

La precisión puede ser considerada a tres niveles: *repetibilidad*, *reproducibilidad* y *precisión intermedia*.^{16, 17, 20}

Precisión intermedia. Se refiere a un análisis realizado para expresar la variación de los resultados de un método de análisis o ensayo donde los resultados son obtenidos bajo las siguientes condiciones; diferentes días, diferentes analistas, en diferentes equipos, con la misma muestra homogénea, y en el mismo laboratorio.^{16, 21, 30}

Repetibilidad. Es la proximidad o grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando donde los resultados se obtienen con el mismo método o procedimiento de medición, sobre objetos de prueba idénticos, en el

mismo laboratorio, usando el mismo equipo, bajo las mismas condiciones y en intervalos de tiempos cortos.^{16, 18, 20}

Reproducibilidad. Se define como el grado o proximidad de correspondencia entre resultados de la misma magnitud sujeta a medición donde los resultados son obtenidos con el mismo método, sobre una muestra idéntica, por diferentes analistas, en diferente laboratorio, usando diferentes equipos, a la cual la podemos expresar cuantitativamente en términos de dispersión de los resultados.^{16, 18, 28}

Tanto la *reproducibilidad* como la *repetibilidad* dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito¹⁶. La determinación de la reproducibilidad es posible solamente cuando otros laboratorios cercanos utilizan el método de ensayo y es posible una “comparación interlaboratorios” o cuando se realiza un ensayo de intercomparación²⁵.

Tabla 2.1.12.2 Procedimiento sugerido para evaluar la precisión.¹⁶

Analizar	Réplicas	Qué calcular a partir de los datos.	Comentarios
Patrones, MR o blanco de muestra fortificados a varias concentraciones en el intervalo de trabajo.			
a) Mismo analista, equipo y laboratorio, en un periodo de tiempo cortó.	10	Determinar la desviación estándar (<i>SD</i>) a cada concentración.	Determinar la desviación estándar de repetibilidad (<i>SDr</i>) a cada concentración.
b) Diferente analista y equipo, mismo laboratorio, periodo de tiempo prolongado.	10	Determinar la desviación estándar (<i>SD</i>) a cada concentración.	Determinar la desviación estándar de reproducibilidad (<i>SDR</i>) dentro del laboratorio a cada concentración.
c) Diferente analista, equipo y laboratorios, en periodos de tiempo prolongado.	10	Determinar la desviación estándar (<i>SD</i>) a cada concentración.	Determinar la desviación estándar de reproducibilidad (<i>SDR</i>) entre laboratorios a cada concentración. Requiere un estudio de colaboración.

La guía CENAM, EMA señala que se puede realizar la precisión de un método analizando muestras control, muestras de pacientes, en el caso del laboratorio clínico, o muestras de valor conocido o no, analizando por lo menos 20 veces en forma continua,

llamado intraserial o intracorrída o 20 veces en el transcurso del día, 24 h, llamado intradía, de resultar conveniente. También se pueden utilizar valores obtenidos uno cada día de la misma muestra de un paciente o bien obtenidos de una curva de un programa de control de calidad interno 20 días diferentes y del mismo lote, ya sea interserial o intercorrída. En ambos casos se debe calcular la media, *SD* y el coeficiente de variación expresado en porcentaje (*CV%*).²⁶

Los criterios de aceptación para el caso de muestras control serán de acuerdo a lo especificado por el fabricante o mediante los siguientes criterios:

Para la precisión intraserial o intradía, la *SD* obtenida debe ser igual o menor a 1/4 del error total permitido esto es ²⁶;

$$SD \text{ intraserial o } SD \text{ intradía} \leq 0,25 ET \text{ (error total permitido).}$$

De manera similar para la precisión interserial, la *SD* debe ser de 1/3 o menor del error total, esto es ²⁶;

$$SD \text{ interserial} \leq 0,33 ET \text{ (error total permitido).}$$

Los errores aleatorios y sistemáticos pueden ocurrir independientemente unos de otros y surgir en diferentes etapas del procedimiento. El error aleatorio es más fácil de detectar que el sistemático, el segundo no se puede apreciar con una sola repetición de mediciones, y a menos que se conozca de antemano el valor verdadero del mensurando, podrían existir errores sistemáticos muy graves, que pasen inadvertidos si no se aplican sistemas de control de calidad interno o se participa en programas de ensayos de aptitud.²⁶

Dentro de los métodos espectrofotométricos se establece un *CV* como límite de 3,00% para la precisión de repetibilidad y reproducibilidad.³³

2.1.12.3 Sensibilidad.

El término sensibilidad se refiere a la capacidad o habilidad de un método de detectar cambios en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo o señal de entrada, refiriéndose a la pendiente de la curva de calibración, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración de la analito^{18, 19, 27}. Cuando se ha establecido que la respuesta es lineal con respecto a la concentración se ha determinado la intercepción de

la curva de respuesta, la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en fórmulas de cuantificación. La sensibilidad algunas veces se usa para referirse al límite de detección pero este uso no se acepta generalmente¹⁶.

2.1.12.4 Selectividad o especificidad.

Al hablar de selectividad o especificidad nos referimos a la habilidad o capacidad de un procedimiento analítico para determinar exactamente y específicamente, un analito de interés en presencia de varias interferencias en una matriz de muestra, de acuerdo al procedimiento dado y es aplicable a métodos en los que dos o mas componentes son separados y cuantificados en una matriz completa.^{16, 24, 30}

El término *interferencia* se refiere a una especie química con propiedades físico-químicas similares a las del analito, que produce disturbios en la señal de medida y que puede provocar un error sistemático, ya sea, constante o proporcional, es decir, dependiente de la concentración del analito en la muestra, en la determinación de un analito de una magnitud relativa igual o superior a un valor establecido. Se pueden dar dos casos: la presencia de interferencias que puedan dar una respuesta analítica que no se difiera de la respuesta del analito y la presencia de interferencias que afecten la señal del analito.^{24, 34, 35}

De manera general dentro de un procedimiento analítico podemos tener interferencias debidas a los reactivos utilizados, instrumentos de medición, efecto de la matriz, interferencias debidas a otros analitos presentes en la muestra, que es, la que en el proceso de validación toma mayor importancia, entre otros.³⁵

Cabe mencionar que la señal producida en la etapa de medición o cualquier propiedad medida, es debida únicamente al analito y no a la presencia de algo químico o físicamente similar, o al resultado de una coincidencia. Las interferencias presentes pueden arrojar falsos positivos o falsos negativos.¹⁸

Es importante considera que el analito puede existir en la muestra en mas de una forma, tal como: ligado o desligado, inorgánico u orgánometálico, o en diferentes estados de oxidación. De aquí que la selectividad de un método se pueda investigar estudiando su capacidad al medir el analito comparado con otros métodos o técnicas independientes.¹⁸

En presencia de una sustancia interferente, la respuesta instrumental medida para una muestra específica mediante un procedimiento analítico determinado puede expresarse como³⁵:

$$r_{A,I} = r_0 + K_A (C_A + K_{A,I} C_I).$$

Donde:

$r_{A,I}$: respuesta instrumental medida para una muestra específica.

$K_{A,I} = K_I / K_A$ es el coeficiente de selectividad del analito A con respecto de la sustancia interferente I, el inverso de este valor se denomina índice de selectividad.

C_A : es la concentración del analito.

C_I : es la concentración de la sustancia interferente.

K_A y K_I : son las sensibilidades parciales del analito y de la interferencia respectivamente, es decir, las respectivas pendientes de las funciones del calibrado.

r_0 : es la respuesta instrumental que se obtendría si en la muestra no estuvieran presentes ni el analito ni la interferencia.

Tabla 2.1.12.4 Procedimiento sugerido para evaluar la selectividad.¹⁶			
Qué hacer	Réplicas	Calcular/Determinar	Comentarios
Analizar muestras y MR mediante un método candidato y otros métodos independientes.	1	Usar los resultados de las técnicas confirmatorias para asegurar la capacidad del método, para confirmar la identidad del analito y la capacidad para medirlo libre de otras interferencias.	Decidir que tanta evidencia de soporte se requiere razonablemente para dar suficiente confiabilidad.
Analice muestras que contengan varias interferencias sospechadas en presencia del analito de interés.	1	Examine el efecto de las interferencias-¿la presencia de las interferencias incrementa o inhibe la detección o cuantificación del mensurando?	Si la detección o la cuantificación se inhiben por las interferencias, se requerirá un desarrollo complementario del método.

2.1.12.5 Robustez.

La robustez es un estudio realizado para medir o evaluar la capacidad o resistencia de los resultados de un método de permanecer inalterados por pequeñas variaciones intencionadas, en los parámetros del mismo método y nos permite obtener información acerca de su confiabilidad durante su uso normal^{16, 19}. En otras palabras nos permite identificar aquellas variables o factores que provocarán cambios significativos y que

deberían ser controladas más estrictamente, los ensayos de robustez generalmente se aplican para investigar los efectos sobre la precisión y la veracidad ²¹.

Los factores que se pueden analizar para estudiar la robustez pueden ser: cambios de instrumento, operario o marca de reactivo, concentración de un reactivo, PH de la solución, temperatura de una reacción, tiempo transcurrido hasta la finalización de un proceso, entre otros¹⁹. Modificaciones pequeñas a estas condiciones deben afectar poco o nada al resultado del análisis²⁵.

Un método es más robusto entre menos dependan los resultados del ensayo de una modificación de las condiciones anteriores. Un aspecto importante de la robustez es la estabilidad de todas las muestras, estándares y reactivos, tanto en el almacenamiento como durante las condiciones de ensayo. Los parámetros a probar pueden ser²⁵:

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

Tabla 2.1.12.5 Procedimiento sugerido para evaluar la robustez.¹⁶			
Analizar	Réplicas	Calcular	Comentarios
Identificar las variables que pueden tener efecto significativo en el desempeño del método. Establecer experimentos (analizando MR, muestras de composición conocida o MRC), para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente.	Analizar una vez cada serie de condiciones experimentales.	Determinar el efecto de cada cambio de condiciones sobre la media. Clasificar las variables en orden de mayor a menor efecto sobre el desempeño del método.	Diseñar el control de calidad para controlar las variables críticas. Concentrarse en estas variables para mejorar el método.

2.1.12.6 Límite de Cuantificación (LoQ).

Se refiere a la mínima concentración de un analito presente en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con un nivel de precisión, exactitud e incertidumbre aceptable. El límite de cuantificación se calcula mediante la siguiente fórmula^{16, 17, 18}:

$$L_Q = K_Q \sigma_Q$$

Donde:

L_Q : es el límite de cuantificación.

σ_Q : es la desviación estándar en ese punto.

K_Q : es el multiplicador cuyo recíproco es igual a la desviación estándar relativa seleccionada y cuantificada. El valor de K_Q propuesto por la IUPAC es de 10^1 .

Cabe mencionar que el límite de cuantificación es un valor indicativo y por lo tanto no deberá usarse en la toma de decisiones.¹⁶

Tabla 2.1.12.6 Procedimiento sugerido para determinar el LoQ.¹⁶	
Qué analizar	Qué calcular a partir de los datos
a) 10 blancos de muestra independientes medidos una vez cada uno.	Desviación estándar de la muestra (SD) de los blancos de muestra. Expresar LoD como la concentración del analito correspondiente a los valores del blanco de muestra más: i)5 SD, ii)6 SD, iii)10 SD
Obtener un blanco de muestra verdadero puede ser difícil.	
b) Fortificar alícuotas de un blanco de muestra a varias concentraciones del analito cercanas al LoD. Medir, una vez cada una, 10 réplicas independientes a cada nivel de concentración.	Calcular la desviación estándar (SD) de los valores del analito a cada concentración. Graficar SD contra concentración y asignar un valor al LoQ por inspección. Expresar LoQ como la concentración mínima del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de incertidumbre.
Normalmente LoQ forma parte del estudio para determinar el intervalo de trabajo. Éste no deberá determinarse por extrapolación debajo de la concentración más baja del blanco fortificado.	
Si las mediciones se realizan bajo condiciones de repetibilidad, también se obtiene una medida de la precisión de repetibilidad a esta concentración.	

2.1.12.7 Límite de detección (LoD).

Se refiere a la menor concentración de un analito presente en una muestra que se va a analizar y que puede ser detectado e identificado utilizando una técnica apropiada pero no necesariamente tiene que ser cuantificada con un valor exacto y que se calcula utilizando la siguiente fórmula lineal^{16, 17}:

$$x_l = x_{bl} + k s_{bl}$$

Donde:

x_{bl} : es la media de las mediciones del blanco.

s_{bl} : la desviación estándar de las mediciones del blanco.

k : es un factor numérico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado¹⁶.

Tabla 2.1.12.7.1 Procedimiento sugerido para determinar el LoD en mediciones cuantitativas. ¹⁶	
Qué analizar	Qué calcular a partir de los datos
a) 10 blancos de muestra independientes medidos una vez cada uno, ó b) 10 blancos de muestra independientes fortificadas a la menor concentración aceptable, medidos una vez cada uno.	Desviación estándar de la muestra (SD) de a) valores de los blancos de muestra o b) valores de los blancos de muestras fortificadas. Expresar LoD como la concentración del analito correspondiente a: a) el valor promedio de los blancos de muestra + 3 SD o b) 0 + 3 SD.
Esta propuesta supone que una señal de más de 3 SD arriba del valor del blanco de muestra podría surgir del blanco en mucho menos que 1% de las veces y por tanto es probable que dicha señal sea el resultado de otro efecto, tal como el mensurando. La propuesta a) es útil sólo cuando el blanco de muestra da una desviación estándar diferente de cero. Obtener un blanco “verdadero” puede ser difícil.	
c) 10 blancos de muestra independientes fortificados a la concentración más baja aceptable, medidos una vez cada uno.	Desviación estándar de la muestra (SD) de los valores de los blancos de muestra fortificados. Expresar LoD como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra + 4,65 SD, derivado de la prueba de hipótesis,
La concentración más baja aceptable se toma como la mínima concentración a la cual se puede alcanzar un grado aceptable de incertidumbre. Supone una práctica normal de evaluar la muestra y el blanco por separado y corregir por el blanco mediante la sustracción de la concentración del analito correspondiente a la señal del blanco, de la concentración correspondiente a la señal de la muestra. Si las mediciones se realizan bajo condiciones de repetibilidad, esto también da una medida de la precisión de repetibilidad.	

Tabla 2.1.12.7.2 Procedimiento sugerido para determinar el LoD en mediciones cualitativas. ¹⁶	
Qué analizar	Qué calcular a partir de los datos
Blancos de muestra con adición del analito en una gama de niveles de concentración. A cada nivel de concentración, será necesario medir aproximadamente 10 réplicas independientes. La medición de las réplicas a los diferentes niveles debe ser aleatoria.	Deberá construirse una curva de respuesta de % de resultados positivos, o negativos, contra la concentración a partir de la cual será posible determinar mediante inspección la concentración del umbral a la cual la prueba no es confiable.

2.1.12.8 Linealidad e intervalo de medición.

El término linealidad se refiere a la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra dentro de un intervalo dado, es decir, es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual

los resultados obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito.^{16, 17, 28}

Cuando se habla del intervalo o rango de medición se refiere a la amplitud entre las concentraciones mayor y menor donde se puede identificar un analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad mediante el método empleado y donde se aplicara el mismo, es decir, donde las concentraciones del analito ofrecen resultados proporcionales a su concentración y puede considerarse validado.^{16, 17, 26}

Tabla 2.1.12.8.1 Procedimiento sugerido para evaluar la linealidad.¹⁶

Análisis	Réplicas	Qué calcular a partir de los datos	Comentarios
1. Blanco más MR o blancos de muestra fortificados a varias concentraciones. Se necesitan al menos 6 concentraciones, más el blanco.	1	Grafique la respuesta de medición, eje y, contra la concentración del mensurando, eje x. Visualmente examinar para identificar el intervalo lineal aproximado y los límites superior e inferior del intervalo de trabajo. Entonces vaya a 2	Idealmente las diferentes concentraciones deberán prepararse independientemente, y no de alícuotas de la misma solución madre. Esto dará una confirmación visual si el intervalo de trabajo es lineal o no.
2. MR o blancos de muestra fortificados al menos de 6 diferentes concentraciones dentro del intervalo lineal.	3	Graficar la respuesta de medición, eje y, contra la concentración del mensurando, eje x. Visualmente examine para identificar valores aberrantes, “outliers,” los cuales pueden no estar reflejados en la regresión. Calcular el coeficiente apropiado de regresión. Calcular y graficar los valores residuales, diferencia entre el valor verdadero de “y” y el valor predicho por la línea recta, para cada valor de “x”. La distribución aleatoria alrededor de la línea recta confirma la linealidad. Tendencias sistemáticas indican no linealidad. Entonces vaya a 3.	Esta etapa es necesaria para probar un intervalo de trabajo que se piensa que es lineal y si se pretende usar un solo punto de calibración. Es inseguro retirar los puntos aberrantes sin verificar primero mediante el uso de determinaciones adicionales a concentraciones cercanas. Si la varianza de las réplicas es proporcional a la concentración, entonces utilice un cálculo de regresión ponderada en lugar de una regresión no ponderada. En ciertas circunstancias puede ser mejor tratar de ajustar los datos a una curva no lineal. Las funciones mayores que las cuadráticas por lo general no se recomienda.
3. Repita el procedimiento para LoQ (b)		Repita el procedimiento para LoQ. LoQ forma efectivamente el extremo inferior del intervalo de trabajo.	Trabajar con concentraciones sucesivas más bajas hasta que la exactitud y la precisión sean inaceptables.

La guía de CENAM, EMA dice:

El experimento de linealidad involucra una serie de muestras de concentración conocida o una serie de diluciones conocidas de muestras altamente concentradas. Las mediciones de los valores de las pruebas reportadas son comparadas con los valores asignados o los valores de dilución. La linealidad es obtenida al trazar la mejor línea recta que toque la mayor cantidad de puntos.²⁶

Para realizar la evaluación de la linealidad, se deben preparar disoluciones patrón en 5 niveles de concentración, aun cuando se puede hacer con 4 como mínimo. En el caso que se desee hacerse con más de 5 niveles, no existe restricción alguna. El número de réplicas se considera como mínimo 3 por cada dilución, si se desea obtener más réplicas de las marcadas no existe restricción.²⁶

Tabla 2.1.12.8.2 Procedimiento sugerido para preparar las diluciones.²⁶

Número de dilución	Proporción en volumen de la muestra 1.	Proporción en volumen de la muestra 2.
1	Usar sin diluir	0
2	3	1
3	2	2
4	1	3
5	0	Usar sin diluir

Se construye una gráfica de la media aritmética de las diluciones en función de la concentración y se calcula la ecuación de la recta para los puntos dados, así como el coeficiente de correlación. La gráfica resultante deberá ser lineal, con un coeficiente de correlación de por lo menos del 0,99 el cual permite estimar la relación entre dos propiedades y de esta manera, si los puntos experimentales siguen una función lineal. Es útil también obtener la pendiente, la ordenada al origen y el sesgo para cada dilución. El porcentaje de error se puede calcular dividiendo el sesgo entre el valor teórico y el resultado es multiplicado por 100.²⁶

También es importante mencionar el intervalo de trabajo, que generalmente es más amplio que el intervalo lineal y puede establecerse durante la evaluación del intervalo lineal. El intervalo de trabajo se refiere al intervalo de valores de concentración en las disoluciones que se miden realmente y no a la concentración en la muestra original.¹⁸

2.1.12.9 Incertidumbre.

La incertidumbre es un parámetro, asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando.^{16, 21}

La incertidumbre se encuentra sujeta a factores que influyen en el proceso de medición y que para garantizar un cálculo adecuado de incertidumbre se debe controlar estos factores, entre ellos podemos mencionar los siguientes^{16, 32}:

- La precisión total del método en un periodo de tiempo largo.
- El instrumento de medición.
- El sesgo y su incertidumbre, incluyendo la incertidumbre estadística asociada a las mediciones del sesgo y la incertidumbre del material de referencia o del método.
- Magnitudes influyentes.
- El método de cálculo.

Pero aun controlando estos elementos es inevitable que se presenten algunas fuentes de errores. Por lo tanto el resultado de una medición depende de la acción de un gran número de factores que varían durante el proceso de medición de forma incontrolable.³²

El poder determinar el valor de la incertidumbre en una medición se podría decir que nos brinda ciertas ventajas, entre ellas podemos mencionar.³²

- Nos permite tomar decisiones.
- Nos da mas sentido al resultado de una medición.
- Aumenta el conocimiento sobre el método usado.
- Nos informa sobre el resultado de trabajo en un laboratorio.

A pesar de lo antes mencionado, es sabio decir, que ninguna medición es exacta por lo que siempre se presenta la inexactitud y las falsas mediciones³². Esto es debido a que al poner a prueba un modelo estadístico hipotético, forzosamente se utilizan pruebas imperfectas¹⁹. Existen diferentes incertidumbres que contribuyen a la incertidumbre final, las cuales mencionaremos a continuación:

Incertidumbre típica o estándar. Esta se refiere a la incertidumbre del resultado de una medición expresada como una *SD*.¹⁶

Incertidumbre típica combinada o estándar combinada. Es la incertidumbre estándar del resultado de una medición, cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de un cierto número de otras magnitudes de un modelo de medición¹⁶.

Incertidumbre expandida. Es la cantidad que define un intervalo del resultado de una medición que puede esperarse que abarque un fragmento grande de la distribución de valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando y que se calcula mediante la siguiente fórmula^{16, 32}.

$$U = k u_c$$

Donde:

U : incertidumbre.

k : factor de cobertura.

u_c : incertidumbre estándar combinada.

La guía del CENAM, EMA, nos dice la política de incertidumbre de la EMA en el punto 5.3.2.2, la cual establece:

Como consecuencia del uso de la incertidumbre se deberá estimar de acuerdo a cualquiera de los siguientes casos²⁶:

- Cuando el método de medición se haya validado dentro del laboratorio.
- Cuando existan datos provenientes de mediciones de control de calidad interno.
- Pruebas interlaboratorio para estimar los parámetros de desempeño del método de acuerdo a la NMX-5725-3-IMNC.

En la estimación de la incertidumbre se procederá de la siguiente manera según el caso²⁶:

- Se deberán considerar por lo menos la incertidumbre proveniente del material de referencia y la incertidumbre de la medición.
- Si se cuenta con la información de la incertidumbre del material de referencias se prosigue como en el caso anterior, si no, se debe considerar únicamente la incertidumbre de la medición.
- En los programas de comparación interlaboratorio, es común que se informe un valor de índice de desviación (ID) o una puntuación del índice de varianza (PIV), este dato será empleado para calcular el error cuadrático medio (ECM) que corresponde al valor de la incertidumbre de la medición.

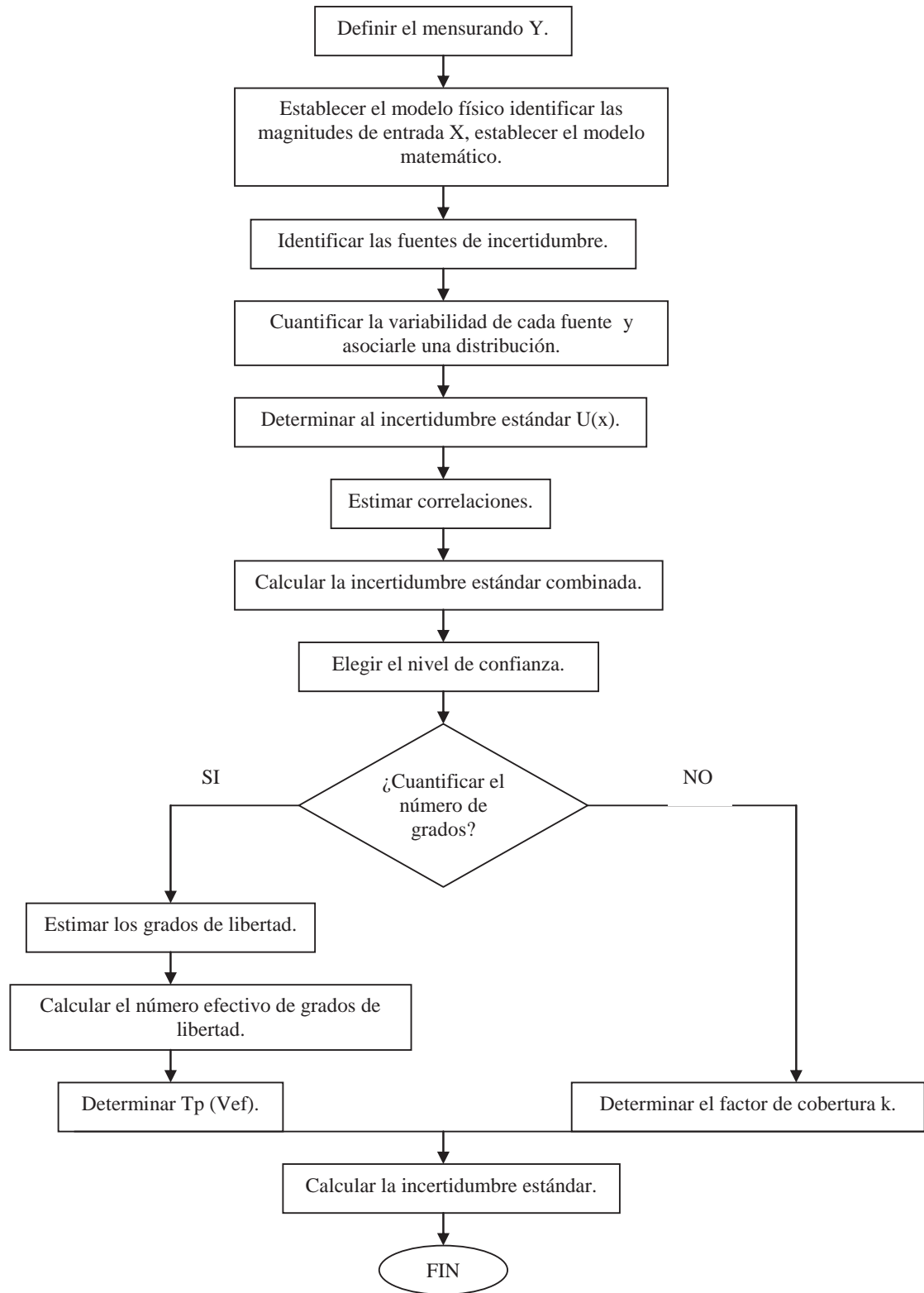


Figura 2.1.12.9 Diagrama sugerido para la estimación de la incertidumbre de medición³⁶.

2.1.12.9.1 Relación del la incertidumbre con otros parámetros.

- **Incertidumbre, veracidad y trazabilidad.**

La incertidumbre y la veracidad están muy relacionados, si no se ha verificado la veracidad de un resultado, no se puede garantizar que se hayan corregido todos los posibles errores sistemáticos del resultado y, por tanto, es imposible asegurar que el intervalo *valor estimado ± incertidumbre* contenga al valor considerado verdadero con una determinada probabilidad. Por tanto, al expresar un resultado analítico como *valor estimado ± incertidumbre*, el analista debería verificar que el *valor estimado* no tiene un error sistemático.³¹

- **Incertidumbre y precisión.**

La incertidumbre debe incluir un término asociado a la precisión del procedimiento y otro término asociado a verificar si el método tiene o no un error sistemático. Esto hace que la incertidumbre siempre sea mayor que la variabilidad de los resultados debida a la precisión. Además, como la incertidumbre incluye un término asociado a verificar la veracidad del método, es decir, a comprobar la ausencia de sesgo, el intervalo *valor estimado ± incertidumbre* incluye al valor aceptado de referencia con una cierta probabilidad.³¹

2.1.12.9.2 Determinación de la incertidumbre de medición.

Para el cálculo de la incertidumbre se tiene que tomar en cuenta la distribución de la cual provienen los datos. A continuación mencionaremos las principales distribuciones que se pueden presentar en el cálculo de la incertidumbre³⁶.

- Distribución normal. Los resultados siguen una aproximación a la distribución normal.

$$u(x_i) = U/k.$$

Donde:

$u(x_i)$: contribución a la incertidumbre de cada fuente de la variable de entrada X_i .

U : incertidumbre expandida.

k : factor de cobertura.

- Distribución rectangular. La función de densidad de probabilidad es constante dentro de un intervalo. Cuando exclusivamente hay conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada, lo más conservador es suponer una distribución de tipo rectangular.³⁶

$$x_i = \frac{(a_+ + a_-)}{2} .$$

$$u(x_i) = \frac{(a_+ - a_-)}{\sqrt{12}} \quad U(x_i) = \frac{\frac{a}{2}}{\sqrt{3}} .$$

$\frac{a}{2}$ Es el semiancho del intervalo a con:

$$a = (a_+ - a_-)$$

Donde:

x_i : es el mejor estimado de cada magnitud de entrada.

a_+ : es el límite superior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada.

a_- : es el límite inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada.

- Distribución triangular. Si además del conocimiento de los límites superior e inferior hay evidencia de que la probabilidad es más alta para valores en el centro del intervalo y se reduce hacia los límites, puede ser más adecuado basar la estimación de la incertidumbre en una distribución triangular.³⁶

$$x_i = \frac{(a_+ + a_-)}{2} .$$

$$u(x_i) = \frac{(a_+ - a_-)}{\sqrt{24}} = \frac{\frac{a}{2}}{\sqrt{6}} .$$

- Otras distribuciones. Pueden también encontrarse distribuciones como la distribución uniforme, en las cuales los extremos del intervalo presentan los valores con probabilidad máxima, típicamente cuando hay comportamientos oscilatorios subyacentes.³⁶

La estimación de la incertidumbre de medición se puede realizar siguiendo las sugerencias de varios organismos como el *Analytical Methods Comité (AMC)*, siguiendo la clasificación ISO o la clasificación de ingeniería.^{31,55}

La clasificación ISO se basa en dos tipos; tipo A y tipo B que dependen de la disponibilidad de los datos de la medición.⁵⁵

La clasificación de ingeniería se divide en dos tipos de errores: aleatorios y sistemáticos los cuales afectan directamente el resultado de los experimentos.⁵⁵

La determinación de la incertidumbre la realizaremos de acuerdo a los lineamientos de la GUM, publicados en la guía para estimar la incertidumbre del CENAM.

Incertidumbre tipo A: se obtiene de un conjunto de observaciones bajo condiciones de repetibilidad y se estima en base a la dispersión de los resultados. Al aumentar el número de repeticiones se reduce la incertidumbre por repetibilidad, pero esto involucra un aumento en el tiempo de medición.³⁶

Se determina en primera instancia la media aritmética, la desviación estándar y la desviación estándar experimental de la media de las mediciones por medio de las siguientes formulas³⁶:

$$x_i = \bar{q} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n q_j$$

Donde:

n : número de mediciones independientes.

q_j : valor de los resultados de medición.

\bar{q} : promedio de los resultados de medición.

$$s(q) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{j=1}^n (q_j - \bar{q})^2}$$

Donde:

$s(q)$.- desviación estándar de los resultados de medición.

$$u(x_i) = s(\bar{q}) = \frac{s(q)}{\sqrt{n}}$$

$$u(x_i) = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2}$$

Dónde:

$s(\bar{q})$: desviación estándar experimental de la media.

q_k : dispersión de los resultados de medición, $q_1, q_2, q_3 \dots q_n$.

También se puede utilizar la siguiente formula, si la medición se realiza por un método bien caracterizado y bajo condiciones controladas, en donde s_p se determinó de un numero distinto y grande de mediciones.³⁶

$$u(x_i) = \frac{s_p}{\sqrt{n}}$$

Donde:

s_p : desviación estándar de un solo experimento anterior.

Es importante combinar la contribución de cada fuente de incertidumbre que afecta de manera directa los fenómenos estudiados y su cálculo se puede hacer por medio de la siguiente fórmula:

$$u_i(y) = c_i \cdot u(x_i)$$

Donde:

$u_i(y)$: contribución de cada fuente a la incertidumbre combinada.

c_i .- coeficiente de sensibilidad. Describe que tan sensible es el mensurando con respecto a variaciones de la magnitud de entrada correspondiente y se puede obtener por medio de la siguiente fórmula, si se presenta una relación funcional entre la magnitud de entrada y el mensurando.³⁶

$$c_i = \left. \frac{\partial f(X_1, \dots, X_N)}{\partial X_i} \right|_{X_1=x_1 \dots X_N=x_N}$$

Si no existe una relación funcional entre la magnitud de entrada y el mensurando, el coeficiente de sensibilidad se puede obtener a través de una estimación de impacto de una variación de X_i en Y ³⁶:

$$c_i = \frac{\Delta Y}{\Delta X_i}$$

Donde:

Y: mensurando.

ΔY : variación en el mensurando.

ΔX_i : variación en la magnitud de entrada.

La incertidumbre estándar combinada se calcula a partir de la ley de la propagación de la incertidumbre, pudiendo determinarse de dos maneras; para magnitudes no correlacionadas se utiliza la siguiente fórmula³⁶:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N [c_i \cdot u(x_i)]^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial X_i} \cdot u(x_i) \right]^2}$$

Donde:

$u_c(y)$: incertidumbre estándar combinada, es una combinación de las contribuciones de todas las fuentes a la incertidumbre estándar.

Mientras que para magnitudes correlacionadas considerando las covarianzas entre las magnitudes correlacionadas se emplea la fórmula³⁶:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial X_i} \cdot u(x_i) \right]^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i \neq j}}^N \frac{\partial f}{\partial X_i} \cdot \frac{\partial f}{\partial X_j} \cdot u(x_i) \cdot u(x_j) \cdot r(X_i, X_j)}$$

Donde:

$r(X_i, X_j)$: es el factor de corrección entre las magnitudes de entrada X_i y X_j .

Nota. Se utiliza u_c para referirse a la incertidumbre estándar combinada en lugar de $u_c(y)$ en el cálculo de la incertidumbre expandida.

Para calcular las covarianzas se emplea la formula siguiente³⁶:

$$u(q, w) = \frac{1}{n(n-1)} \cdot \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q}) \cdot (w_k - \bar{w})$$

Donde:

$u(q, w)$: covarianza de las variables aleatorias independientes.

q, w : variables aleatorias independientes.

\bar{q} : media aritmética de los resultados de medición q .

\bar{w} : media aritmética de los resultados de medición w .

q_k : resultados de medición $q_1, q_2, q_3, \dots, q_k$.

w_k : resultados de medición $w_1, w_2, w_3, \dots, w_k$.

El cálculo de la incertidumbre expandida es mediante la siguiente fórmula³⁶:

$$U = k \cdot u_c$$

Donde:

U : incertidumbre expandida.

u_c : incertidumbre estándar combinada.

k : factor de cobertura.

Incertidumbre tipo B.- se utiliza información externa u obtenida por experiencia, que puede provenir de certificados de calibración, manuales, normas, entre otras. La determinación de los grados de libertad es en base al criterio del técnico o persona encargada del cálculo de la incertidumbre.³⁶

En ocasiones es más conveniente utilizar incertidumbres relativas que facilitan el cálculo de la incertidumbre combinada, utilizando incertidumbres combinadas relativas³⁶:

$$u_{c,rel}(y) = \frac{u_c(y)}{y} = \sqrt{\sum_{i=1}^N [p_i \cdot u_{rel}(x_i)]^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[p_i \cdot \frac{u(x_i)}{x_i} \right]^2}$$

Donde:

p_i : son los coeficientes de sensibilidad.

$u_{c,rel}(y)$: incertidumbre combinada relativa.

$u_{rel}(x_i)$: incertidumbre estándar relativa.

En el caso donde los coeficientes de sensibilidad son 1 y la incertidumbre combinada relativa es la suma geométrica de las incertidumbres relativas de las magnitudes de entrada, se determina la incertidumbre combinada relativa por la fórmula³⁶:

$$u_{c,rel}(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N [u_{rel}(x_i)]^2}$$

Cuando existen magnitudes de entrada relacionadas con más de una fuente de incertidumbre, se calcula la incertidumbre total relacionada con cada magnitud de entrada, por la suma geométrica de las incertidumbres individuales³⁶:

$$u(x_i) = \sqrt{\sum_{j=1}^{M_i} [u_j(x_i)]^2}$$

Donde:

$u_j(x_i)$: es la incertidumbre estándar de la fuente de incertidumbre número j de las M_i fuentes relacionadas con la magnitud de entrada X_i .

Si se está interesado en el efecto particular de cada una de las fuentes en la incertidumbre combinada se emplea la siguiente ecuación³⁶:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \sum_{j=1}^{M_i} [u_j(x_i)]^2}$$

2.1.12.9.3 Determinación de la incertidumbre para espectrofotómetros.

El espectrofotómetro es un instrumento diseñado para medir la energía radiante o flujo radiante que es transmitida, reflejada o absorbida por un material traslucido, como una función de la longitud de onda de dicha energía o flujo. Un espectrofotómetro cuenta con diferentes áreas, dentro de las cuales se puede mencionar, el área de lámparas, monocromador, de muestras y de detección.³⁷

En el uso de métodos de análisis espectrofotométricos la calibración permite validar la funcionalidad del instrumento y la capacidad de proveer resultados confiables. La calibración consiste en realizar un conjunto de operaciones que tienen como finalidad determinar la magnitud de los errores que comete el instrumento al realizar las mediciones, dichos errores son obtenidos al comparar los resultados de cada medición con los valores de certificados de un material de referencia, tomando en cuenta que las mediciones sean realizadas bajo las mismas o similares condiciones y empleando la misma metodología.³⁷

Las variaciones que el instrumento presenta pueden deberse a la distribución espectral de las fuentes, la respuesta espectral de los detectores y a las propiedades espectrales de las rejillas, rendijas, espejos, prismas, entre otros, es conveniente que en la caracterización del instrumento sean incluidos todos aquellos factores que afecten el resultado de una medición, considerando para ello los parámetros y pruebas que son susceptibles de ser cuantificados dependiendo de las características del instrumento y del empleo de materiales de referencia específicos y apropiados para cada prueba. La cuantificación de los errores y la incertidumbre de la escala fotométrica y la escala de longitud de onda resultan ser primordiales en la calibración de un espectrofotómetro. Para determinar el cálculo de la incertidumbre se realizan pruebas al espectrofotómetro como son: escala fotométrica, luz extraviada, ruido fotométrico, límite de resolución, estabilidad fotométrica, línea base corregida, estabilidad y reproducibilidad fotométrica y de la longitud de onda, ancho de banda espectral y velocidad de barrido.^{37,38}

Definición del mensurando: las magnitudes sujetas a medición pueden ser por ejemplo, la transmitancia espectral o la longitud de onda.³⁷

Procedimiento: se toma como referencia al aire con el fin de trazar una línea base o una línea de referencia al cien por ciento de transmitancia, 100 % T o cero absorbancia, para posteriormente introducir el material de referencia de densidad neutra y tomar la lectura en el intervalo espectral deseado a longitudes de onda especificadas.³⁷

Magnitudes de influencia: existen variables que pueden afectar el resultado de calibración de los materiales de referencia, entre estas tenemos, la temperatura, humedad relativa, luz extraviada, ruido fotométrico, estabilidad, línea base y la velocidad de barrido.³⁷

Evaluación de la incertidumbre: se calcula la incertidumbre tipo A por medio de observaciones repetidas, se obtiene el error de medición de la diferencia del promedio de las mediciones y el valor verdadero del material de referencia.³⁷

$$\text{Error} = \text{media de las mediciones} - \text{valor del material de referencia.}$$

Se calcula la incertidumbre tipo B basada en información disponible sobre la variabilidad de los materiales de referencia. Posteriormente se calcula la incertidumbre

estándar combinada y se determina el valor de la incertidumbre estándar expandida empleando el factor de cobertura.³⁷

2.1.12.10 Recuperación.

La recuperación se refiere a la proporción o cantidad del analito presente o adicionada a una muestra, que se cuantifica efectivamente por el método empleado como indicativo de la eficiencia de este método para detectar cierto analito y que se expresa como coeficiente de la cantidad medida del analito y el contenido de la muestra.^{16, 18, 21, 26}

El porcentaje de recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra y puede calcularse por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = [\text{valor obtenido} / \text{valor de referencia}] \times 100$$

Para calcular la recuperación se agregan a la muestra antes del tratamiento cantidades sucesivas del analito y se determinan contra su calibración base. Las cantidades encontradas se grafican contra las agregadas, en el caso ideal, se obtiene un 100%. En caso de que la matriz introduzca muchas variaciones debe utilizarse en lugar de una calibración con la matriz de la muestra, el método del agregado patrón, el cual consiste en agregar concentraciones sucesivas de analito a la muestra. Al graficar el aumento de la señal contra la cantidad adicionada se obtiene una función de calibración, a partir de la cual puede obtenerse la cantidad de analito presente en la muestra original. Para mantener el error lo más pequeño posible, las cantidades añadidas deben ser tales que no sobrepasen el intervalo de trabajo.²⁵

2.1.12.11 Parámetros adicionales.

Además de los parámetros antes mencionados, se ha sugerido en varias ocasiones que hay otras mediciones igualmente importantes debido a su duración y complejidad y al almacenamiento prolongado de las muestras, los controles y los patrones biológicos. Esas medidas son las siguientes³⁹:

- **Prueba de principio/final.** Determina si los parámetros de las primeras muestras analizadas en una prueba de gran magnitud coinciden con los de las

muestras ulteriores, porque se han preparado en un momento diferente en comparación con los testigos, ver glosario para definiciones.

- ***Estabilidad de congelación-descongelación.*** Utiliza muestras y testigos que se han congelado y descongelado repetidamente para determinar posibles efectos del almacenamiento en el congelador sobre los resultados de la prueba.
- ***Precisión de lote a lote.*** Mide la precisión de una prueba con diferentes lotes de líneas celulares, de suero o de otros componentes muy variables de la prueba. Esta es una prueba muy importante en la precisión de las pruebas de potencia.

2.1.13 Otros tipos de validación.

En ciertas ocasiones es recomendable realizar otros tipos de validación, como por ejemplo, en la fabricación de medicamentos la validación debe complementarse antes de la distribución y venta de medicamentos, validación prospectiva. Pero en circunstancias excepcionales cuando esto no sea posible, será necesario validar los procesos durante la producción habitual, validación concurrente. Asimismo deberán validarse los procesos utilizados durante cierto tiempo, validación retrospectiva.⁴⁰

2.1.13.1 Validación prospectiva.

Es una validación conducida antes de la distribución de un producto nuevo, o producto hecho bajo un proceso de fabricación revisado, donde las revisiones pueden afectar las características del producto. La validación prospectiva es requerida, particularmente para aquellos productos que han sido introducidos en los últimos 7 a 8 años, o para aquellos en los cuales se han hecho cambios de fabricación.⁴¹

2.1.13.2 Validación concurrente.

La validación concurrente está basada en los datos recogidos durante la ejecución efectiva de un proceso que ya se ha implementado en una planta de producción. En esta situación, los datos de validación se reúnen durante varios ciclos del proceso continuo y

se evalúan para determinar si éste es válido. Se debe redactar un protocolo para definir la información que ha de recogerse y evaluarse. Este método puede ser adecuado para los fabricantes que llevan mucho tiempo establecidos y que tienen un proceso de fabricación bien controlado.³⁹

2.1.13.3 Validación retrospectiva.

Si un producto se ha venido produciendo por largo tiempo pero no se ha validado de conformidad con un protocolo prospectivo, en algunos casos puede efectuarse una validación retrospectiva cuando la validación concurrente no constituye una opción realista. Es posible examinar y analizar evaluaciones del producto y de los procesos de fabricación y de prueba para demostrar la uniformidad e integridad de los procedimientos y procesos. Generalmente esta forma de validación no se acepta por varios motivos: la falta de protocolos de validación suele indicar falta de documentación, y con frecuencia los datos corresponden únicamente a la indicación de aprobado o rechazado, lo que no permite efectuar análisis estadístico basado en datos numéricos. Además, el análisis retrospectivo sólo se puede practicar con un sistema, equipo o proceso que no se halla sometido a ninguna revisión, reparación o modificación.

Es posible analizar retrospectivamente los valores de referencia y testigos de muchas pruebas cuando están bien documentados los números de lote y cualquier cambio que afecte a los parámetros de prueba, los operadores o el equipo. Si se cuenta con datos suficientes, se puede practicar la validación retrospectiva de una valoración analítica.³⁹

2.1.13.4 Validación a escala de laboratorio y a escala piloto.

La validación de ciertos procesos de producción no siempre puede efectuarse en la planta de producción. Estos estudios de validación se realizan en laboratorio a una escala más reducida que procura reproducir el proceso industrial. La escala piloto es una escala intermedia que a veces se usa para determinar la validez de procesos nuevos o modificaciones, antes de emprender las operaciones a escala industrial. Para que los estudios de validación a escala de laboratorio y a escala piloto puedan aceptarse como prueba de validez del proceso a escala industrial, es preciso demostrar que se han hecho cálculos a escala menor de todos los parámetros críticos del proceso: tiempos,

temperaturas, cantidades, dimensiones de las columnas, velocidades de flujo, presiones, etc.³⁹

2.1.14 Reglas para utilizar métodos validados.

Por último cuando un método ya se encuentre validado, ya sea un método desarrollado por otro laboratorio, un método publicado o un método de referencia y se quiere implementar, se deben considerar dos aspectos¹⁶:

- ¿La validación existente es adecuada para el fin propuesto o se necesita una validación adicional?
- Si la validación existente es adecuada, ¿el laboratorio es capaz de alcanzar el nivel de desempeño que el método requiere? ¿él o los analistas son suficientemente competentes? ¿son adecuadas las instalaciones y los equipos?

Es muy importante ver el nivel de desempeño que el analista puede alcanzar con el método que lo que otros analistas hayan alcanzado en el pasado.

Cuando se usan métodos validados se recomienda que se sigan las siguientes reglas para asegurar que se ha alcanzado un desempeño aceptable^{16, 21}:

- El analista debe familiarizarse completamente con el método antes de usarlo por primera vez, un experto debe explicar el método y supervisarlo hasta que lo domine.
- Conocer la teoría del método.
- Conocer la estabilidad de los reactivos.
- Evaluar cuantas muestras es conveniente procesar al mismo tiempo, es mejor analizar pocas muestras de manera correcta que analizar muchas y tener que repetir casi todas.
- Asegurarse de que todas las cosas para el método están disponibles antes de comenzar el trabajo.
- En el uso cotidiano es necesario aplicar controles específicos al método para verificar que continua bajo control, es decir, que se esta desempeñando de acuerdo a lo esperado.

2.2 MARCO JURÍDICO

Para poder llevar a cabo un proceso de validación es necesario conocer las principales leyes o normas que regulan este proceso de manera que se este relacionado con el contenido para la realización de una validación.

En el marco jurídico se verán los requisitos que se deben de cumplir para llevar a cabo un proceso de validación establecidos por organismos de normalización así como de organismos relacionados.

Se revisará la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 para determinar los requisitos a cumplir que esta norma indica así como sus recomendaciones para la validación de un proceso analítico.

Es muy importante cumplir con las especificaciones que se marcan en una norma acerca de una validación ya que si se quiere normalizar el proceso es necesario demostrar que se realizó de acuerdo a lo indicado en la norma.

2.2.1 Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006.

Normalmente los organismos de acreditación establecen los requisitos indicados en las normas de referencia y además suelen agregar requerimientos propios. Por ejemplo la guía de validación de métodos de ensayo del OAA establece los criterios de dicho organismo con respecto al grado de validación requerido para los métodos, en función de sus características ²⁴. Así mismo el órgano de acreditación de la república de cuba (ONARC) editó en diciembre de 2007 una nueva versión de una política de incertidumbre dirigida a los laboratorios de ensayo y de calibración acreditada o solicitante de la acreditación ³².

Algunos organismos tienen sus bases en la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006, la cual pide que se cumplan los siguientes requisitos en los apartados 5.4.2 y 5.4.5:

5.4.2 Selección de métodos: el laboratorio de calibración o de prueba debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos antes de utilizarlos para los ensayos o calibraciones usando preferentemente métodos publicados en normas. En caso de que el método normalizado cambie se debe repetir la confirmación.^{22, 23, 24}

5.4.5 Validación de métodos ^{18, 22}:

- 5.4.5.1 la validación es la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto.
- 5.4.5.2 el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto.
- 5.4.5.3 el intervalo y la exactitud de los valores que se puede obtener de los métodos validados, por ejemplo, la incertidumbre, límite de detección, selectividad, linealidad, repetibilidad y/o reproducibilidad, sensibilidad, deben ser relevantes con las necesidades de los clientes.

El laboratorio debe de registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto.²⁸

2.3 MARCO HISTÓRICO

Para poder determinar que metodología se empleará así como que parámetros se encuentran establecidos, es necesario revisar los avances que se han tenido en el estudio del tema en cuestión, mismo que describiremos en este marco.

En este marco describiremos en primera instancia, el avance que se ha tenido en la elaboración de guías que permitan a los laboratorios y organismos poder llevar a cabo un proceso de validación.

Posteriormente se revisarán los estudios que se relacionan con el nuestro y que han obtenido resultados objetivos que puedan servirnos en el desarrollo de nuestra investigación, esto con el fin de no repetir estudios ya realizados y con los cuales estableceremos un punto de partida para nuestra investigación.

La importancia del marco histórico radica en que nos ofrece el conocimiento de estudios anteriores que nos ayuden a tener una mejor interpretación sobre el tema que se está estudiando, a partir de los cuales establecemos nuestro punto de partida para llevar a cabo el planteamiento de la hipótesis y de nuestro desarrollo experimental.

2.3.1 Evolución en la elaboración de guías de validación.

La necesidad de poder demostrar que un sistema analítico funciona adecuadamente ha hecho que desde el pasado instituciones como la ISO, IUPAC y AOAC INTERNATIONAL cooperaran en la elaboración de protocolos o directivas sobre la realización e interpretación de estudios de eficiencia de métodos, sobre ensayos de aptitud y control interno de calidad en laboratorios de química analítica y sobre el uso de datos de recuperación en las mediciones analíticas.¹⁹

La IUPAC se ha encargado ahora del grupo de trabajo para elaborar protocolos/directrices para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio, las cuales ofrecen recomendaciones mínimas sobre los procedimientos a seguir para garantizar una validación adecuada de los métodos analíticos.¹⁹

2.3.2 Estudios relacionados con los filtros solares y la respuesta frente a la radiación ultravioleta.

Existen estudios que se han realizado tratando de encontrar la mejor respuesta frente a la RUV por medio del cálculo del factor de protección solar utilizando métodos *in vivo* e *in vitro* que se describirán a continuación:

2.3.2.1 Protección ultravioleta proporcionada por los textiles: estudio de la influencia de las variables más significativas y aplicación de productos específicos para su mejora.

El método *in vivo* requiere un número considerado de personas que se someten a ensayo, una por cada determinación individual del factor de protección de una crema. Se basa en aplicar sobre un área en la espalda de cada individuo, una capa de crema de espesor determinado. Esta área y un área adyacente de piel no protegida se irradian con una lámpara estándar de espectro similar al de la luz solar. El FPS se determina dividiendo el tiempo que se necesita para que se produzca un enrojecimiento en la piel protegida por el tiempo que se necesita para que se produzca el enrojecimiento en la piel no protegida. Para una medida fiable del factor de protección *in vivo* se requiere un número suficientemente representativo de individuos que se sometan al ensayo, debido

a que el FPS depende mucho del tipo de piel de cada individuo. También se requiere personal especializado que pueda determinar visualmente el momento en el que la piel se ha enrojecido sin introducir un error considerable. Estos factores inciden negativamente en la rapidez, reproducibilidad y objetividad del método.²

La técnica *in Vitro* se basa en la medida de la transmisión de la RUV a través de la crema, que se cuantifica mediante un espectrofotómetro debidamente adaptado. La técnica no requiere personas que se sometan al ensayo y la medida se puede realizar fácilmente y en pocos segundos. La objetividad y reproducibilidad del método es mucho mayor, ya que el resultado no depende de la observación visual del experto, ni del tipo de piel de cada individuo.²

2.3.2.2 Efecto de la RUV sobre los procesos de estrés oxidativo e inmunodepresión cutánea. Efecto protector de los filtros solares.

El propósito de este estudio fue determinar la capacidad de protección real de un filtro solar, frente a las afectaciones adicionales al eritema que produce la RUV. El procedimiento consistió en someter a ratas *hairless*, bajo condiciones controladas, a diferentes intensidades de radiación UV.³

La conclusión a la que llegaron estos investigadores con este trabajo fue la siguiente: Los animales irradiados en presencia del filtro muestran menores afectaciones que los irradiados sin filtro, asumiendo que ambos grupos de animales han absorbido la misma cantidad de energía UV. Pero, en cualquier caso, es evidente que algunos de los ingredientes de la fórmula fotoprotectora ensayada pueden inducir cambios significativos en los sistemas de defensa anti-radicales³.

2.3.2.3 Fotopreención y fotoprotección.

Medición *in vivo*⁴².

- Índice de pigmentación inmediata (IPD). Es transitorio, por oxidación de la melanina medida en fototipos de piel III, IV, V.
- Índice de pigmentación tardía (PPD). Se mide 2 a 4 horas post exposición UVA, en fototipos II, III y IV, por oxidación de la melanina, dosis mayores IPD, más estable que IPD.

- Factor de protección UVA (PFA). Eritema o pigmentación 16 a 24 hrs., fototipos I-IV, PFD similar a PPD.
- IPD, PPD, PFA. Factor de protección medido por relación entre umbral de piel protegida y umbral de piel no protegida.

Medición *in Vitro* ⁴².

- Longitud de onda crítica: longitud de onda bajo la cual se observa un 90 % de absorbancia de un fotoprotector, 290 a 400 nm, mínimo 370 nm.

2.3.2.4 Absorción ultravioleta de los protectores solares para prescripción en México.

La finalidad del estudio fue cuantificar *in vitro* la absorción de RUV en un grupo de protectores solares y analizar su relación con el factor de protección solar citado en su etiqueta. El procedimiento consistió en aplicar 2 mg de cada uno de los productos sobre placas de cuarzo de 1cm² y se expuso a la RUV de amplio espectro originada por un simulador solar de xenón para cuantificar el espectro de absorbancia mediante un espectrofotómetro. ⁵⁷

La conclusión obtenida fue que no se encontró relación entre el FPS expuesto en la etiqueta y la RUV absorbida, por lo tanto sería inadecuado asumir que mientras mayor sea el FPS mejor protección ofrecen estos productos. ⁵⁷

La validación es un procedimiento importante que se debe implementar en todos los laboratorios para asegurar que se está trabajando con un nivel adecuado de seguridad, además de que es un requisito que se tiene que cumplir según lo que se indica en la norma NMX-EC-17025.IMNC-2006. En este capítulo se abordó la parte teórica que existe en torno a la validación de métodos, y nos dio una perspectiva sobre los estudios que se han llevado a cabo relacionados con nuestra investigación. Ahora, una vez revisado la base teórica que involucra un proceso de validación, es necesario revisar el método utilizado y la metodología a seguir durante el desarrollo de este experimento, temática que abordaremos en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS

El propósito de este capítulo es revisar el procedimiento y los métodos utilizados durante el desarrollo del experimento, para ello se tendrán que describir de manera detallada los procedimientos seguidos.

Iniciaremos este capítulo describiendo el método empleado, siguiendo con los materiales y equipos utilizados durante la parte de experimentación. Posteriormente se mostrará la forma de preparación de las diluciones en forma esquemática, dando una explicación de cada paso a seguir y mostrando la cantidad empleada y los cálculos realizados al elaborar las diluciones. También se mostrará la forma de realizar las mediciones de las diluciones de manera esquemática, dando una explicación detallada del procedimiento utilizado.

Para poder realizar un experimento es necesario establecer una metodología adecuada, que nos muestre de manera apropiada los pasos a seguir durante la parte experimental. La importancia de la metodología es fundamental en la obtención de resultados fidedignos, ya que si la metodología no está bien definida, es posible cometer errores durante la parte experimental que se verán reflejados en los resultados obtenidos y que nos conducirán a conclusiones incorrectas que no demostrarán la hipótesis planteada inicialmente.

3.1 Métodos y procedimientos.

El experimento consiste en preparar 5 diluciones a diferentes concentraciones de un filtro solar con dióxido de titanio al 10%, de las cuales se mide su absorbancia en un espectrofotómetro a las longitudes de onda de 320 nm y 632,8 nm, y de estas diluciones se calcularon los parámetros necesarios para llevar a cabo la validación y evaluar el desempeño que tiene el sistema de diluciones empleadas.

El método utilizado fue el inferencial el cual se define como aquel cuya metodología se basa en el uso de inferencias estadísticas para determinar la elección del mejor resultado mediante pruebas de hipótesis o toma de decisiones.

3.2 Reactivos.

- Filtro solar FPS 100 de pantalla con dióxido de titanio al 10% en base de hidrogel.
- Agua destilada.

3.3 Materiales e instrumentos.

- Espectrofotómetro CARY 50 Conc. marca Varian, con un ancho de banda espectral de 2 nm, de un solo haz, con una rapidez de 125 datos/segundo y una resolución en absorbancia: 0,0001 y en transmitancia: 0,001, resolución en la longitud de onda: 0,15.
- Celda de cuarzo para CARY UV, part number: 6610000800, rectangular 10 mm marca Varian.
- Balanza analítica.
- 1 Pipeta manual de 10 ml.
- 5 Matraces aforados de 10 ml.
- 5 Matraces Erlenmeyer de 10 ml.
- Agitador magnético.
- Micropipeta de 500 microlitos.

3.4 Preparación de las diluciones.

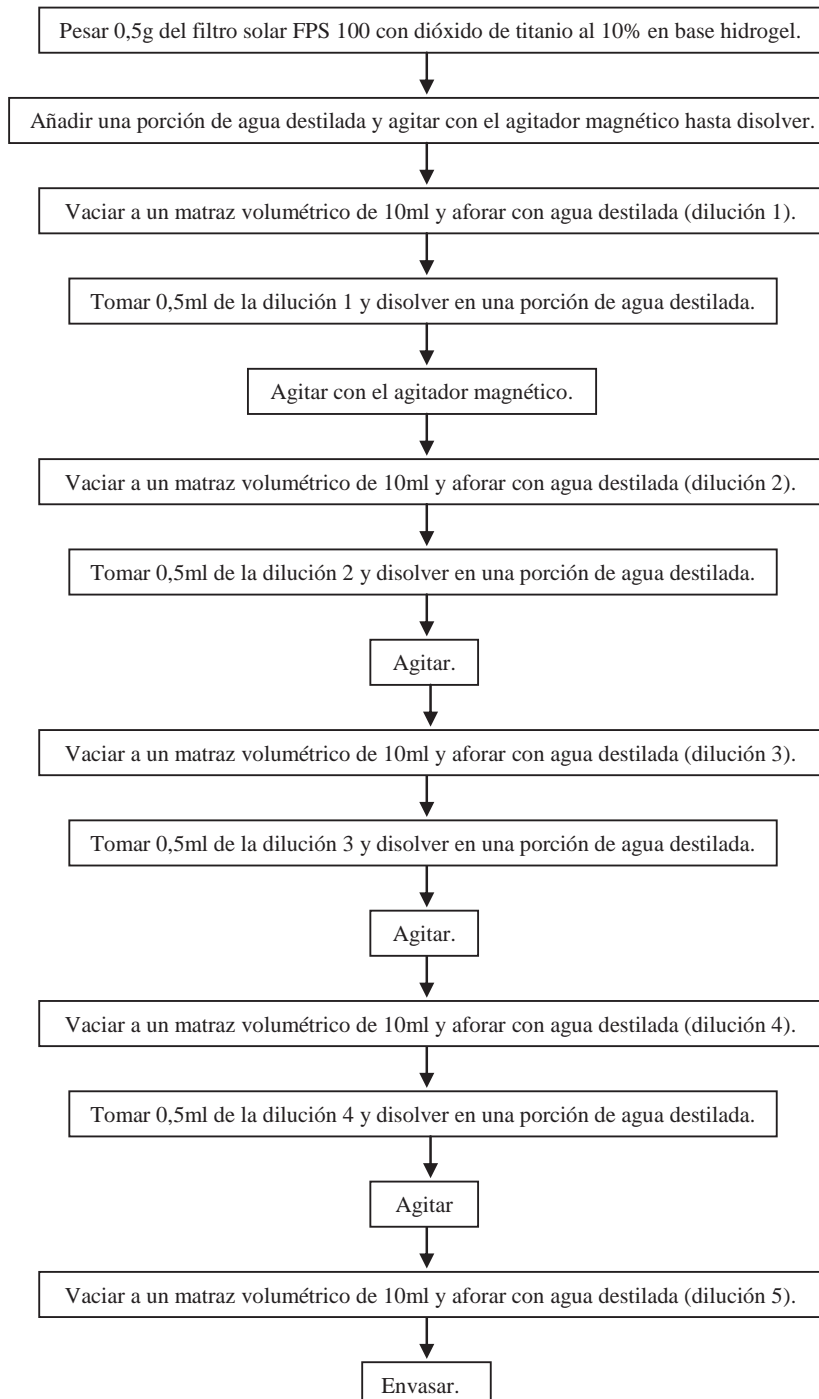


Figura 3.4 Procedimiento para la preparación de las diluciones, ver texto para mas detalles.

El proceso de preparación de las 5 diluciones con dióxido de titanio a diferentes concentraciones es como se describe a continuación:

1. En un matraz erlenmeyer de 10 ml pesar en una balanza analítica 0,5 gramos de la muestra (filtro solar FPS 100 con dióxido de titanio al 10% en base hidrogel).
2. Añadir una porción de agua destilada al matraz con la muestra y agitar con la ayuda de un agitador magnético hasta que la solución quede completamente homogénea, sin la presencia de grumos.
3. Posteriormente vaciar el contenido del matraz con la solución, a un matraz volumétrico de 10 ml y se lleva al aforo con agua destilada (dilución 1).
4. De la dilución 1 tomar una alícuota de 0,5 ml con micropipeta y pasar a otro matraz, agregar una porción de agua destilada y se agita con la ayuda de un agitador magnético hasta homogenizar completamente la solución, puede que no se lleve a cabo una completa homogenización ya que esta dilución presenta turbidez.
5. Una vez homogenizada la solución vaciar a un matraz volumétrico de 10 ml y aforar con agua destilada (dilución 2).
6. De la dilución 2 tomar una alícuota de 0,5ml con micropipeta y pasar a otro matraz, agregar una porción de agua destilada y agitar, si se observa una completa homogenización se puede agitar de forma manual, pero si se tienen dudas de la presencia de grumos, agitar con el agitador magnético.
7. Posteriormente pasar la solución a un matraz volumétrico de 10ml y aforar con agua destilada (dilución 3).
8. De igual manera, de la dilución 3 tomar una alícuota de 0,5ml con micropipeta y pasar a otro matraz, agregar una porción de agua y agitar, si se observa una completa homogenización se puede agitar de forma manual, pero si se tienen dudas de la presencia de grumos, agitar con el agitador magnético.
9. En seguida, pasar la solución a un matraz volumétrico de 10 ml y aforar con agua destilada (dilución 4).
10. De igual manera, de la dilución 4 se tomar una alícuota de 0,5 ml con micropipeta y pasar a un matraz, agregar una porción de agua destilada y agitar, si se observa una completa homogenización se puede agitar de forma manual, pero si se tienen dudas de la presencia de grumos, agitar con el agitador magnético.

11. Terminado el paso anterior, pasar la dilución a un matraz volumétrico de 10 ml y aforar con agua destilada (dilución 5).
12. Las cinco diluciones preparadas se almacenan inmediatamente después de ser elaboradas en frascos ámbar, debido a que son sensibles al efecto de la luz.

Los cálculos para hacer las diluciones así como sus concentraciones correspondientes se muestran a continuación.

Dilución 1:

$$(10\text{g de dióxido de titanio} / 100\text{g de crema}) (0,5\text{g de muestra} / 10\text{ ml}) = 0,005\text{g} = 5\text{mg}.$$

Dilución 2:

$$(0,005\text{g})(0,5\text{ml de dilución 1} / 10\text{ml de agua destilada}) = 0,000025\text{g} = 0,25\text{mg}.$$

Dilución 3:

$$(0,00025\text{g})(0,5\text{ml de dilución 2} / 10\text{ml de agua destilada}) = 0,0000125\text{g} = 0,0125\text{mg}.$$

Dilución 4:

$$(0,0000125\text{g})(0,5\text{ml de dilución 3} / 10\text{ml de agua destilada}) = 0,000000625\text{g} = 0,000625\text{mg}.$$

Dilución 5:

$$0,000000625\text{g} (0,5\text{ml de dilución 4} / 10\text{ml de agua destilada}) = 0,00000003125 = 0,000003125\text{mg}.$$

Notas importante del procedimiento para preparar las diluciones: Es importante mencionar que es difícil obtener el peso exacto marcado en los cálculos al momento de pesar la muestra en una balanza analítica, por lo tanto se recomienda corregir los cálculos con el peso neto de la muestra. Se utilizó una micropipeta manual, por lo tanto se usa la técnica de pipeteo para micropipetas manuales empleando las puntas apropiadas para la micropipeta. La preparación de las diluciones se realiza en condiciones de humedad y temperatura ambientales.

3.5 Procedimiento de medición.

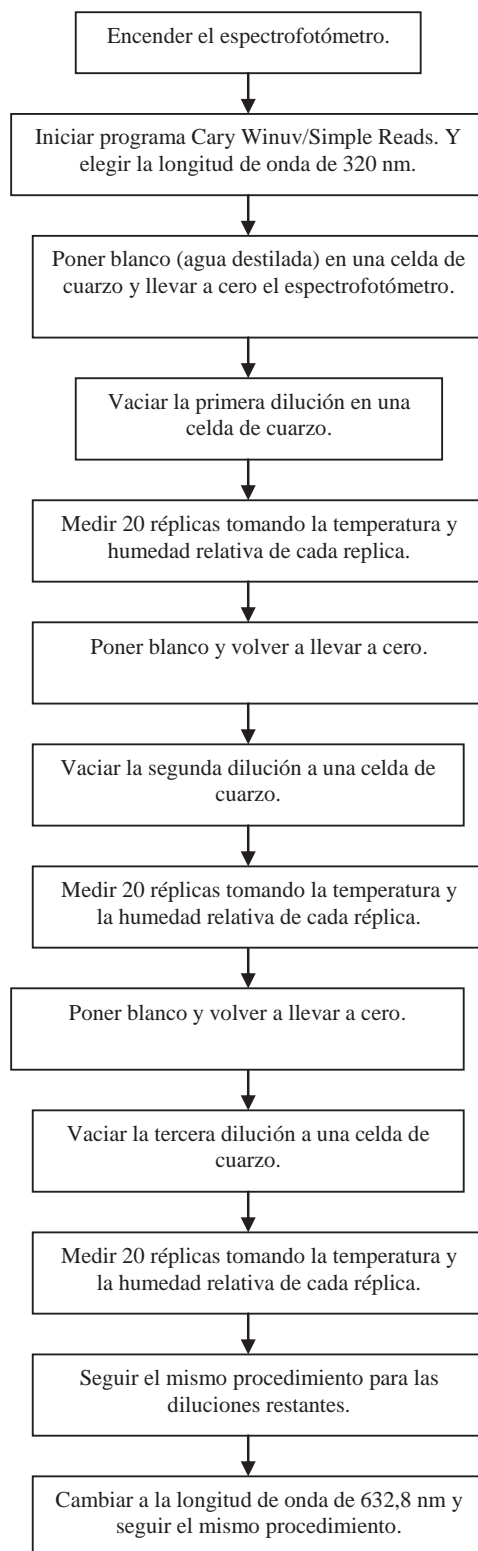


Figura 3.5 Procedimiento para llevar a cabo la medición de las diluciones, ver texto para mas detalles.

Una vez preparadas las diluciones se lleva a cabo la medición de las mismas mediante el procedimiento siguiente.

1. Verificar que el espectrofotómetro este calibrado, si es así, se prosigue a encenderlo dando un lapso mínimo de tiempo de 20 minutos para poder medir, en el caso de que el espectrofotómetro no se encuentre calibrado, se realiza la calibración del mismo utilizando materiales de referencia certificados de valor conocido o siguiendo los pasos de calibración que marca el fabricante (es importante la calibración para determinar la incertidumbre del instrumento de medición).
2. Iniciar el programa Cary Winuv y abrir la opción simple reads en donde se elige la longitud de onda de 320 nm.
3. En una celda de cuarzo limpia poner el blanco, el cual se introduce en el compartimiento de la muestra del espectrofotómetro y se lleva a cero en absorbancia. Se toma la temperatura y la humedad relativa.
4. Vaciar la primera dilución, previamente agitada, en una celda de cuarzo limpia e introducirla en el compartimiento de la muestra del espectrofotómetro.
5. Medir 20 réplicas de la absorbancia de esta dilución de manera continua tomando la temperatura y la humedad relativa en cada replica.
6. Sacar la celda y regresar el contenido a su frasco correspondiente.
7. Volver a introducir el blanco y llevar nuevamente a cero la absorbancia.
8. Vaciar la siguiente dilución en otra celda de cuarzo limpia e introducirla en el espectrofotómetro.
9. Medir de igual manera 20 réplicas en absorbancia de la dilución de manera continua y de la misma forma tomar la temperatura y la humedad relativa de cada réplica.
10. Sacar la celda y regresar el contenido a su frasco correspondiente.
11. De esta forma proseguir para las 3 diluciones restantes repitiendo los pasos 7, 8, 9 y 10.
12. Una vez terminado el procedimiento anterior cambiar de longitud de onda a 632,8 nm con la finalidad de observar el comportamiento fuera de rango UV.
13. Siguiendo el mismo procedimiento, realizar los mismos pasos que para la longitud de onda anterior.

14. Una vez terminado el proceso guardar las diluciones y se apaga el instrumento de medición.

Notas importantes del procedimiento de medición: Es muy importante que las celdas sean de cuarzo, debido a que el cuarzo a diferencia del vidrio o plástico, permite el paso de la radiación UV-VIS y que las diluciones se agiten antes de vaciarse a las celdas. Las celdas se deben llenar completamente con cada dilución y se deben de limpiar antes de introducirlas al instrumento con papel especial que no cause ralladuras. También es importante que las celdas se encuentren limpias, sin ralladuras o manchas, que puedan causar medidas incorrectas por pérdidas de reflexión y dispersión de la radiación. El proceso sugerido para el lavado de las celdas consiste en preparar una solución de HCL al 1%, la cual se introduce en la celda y se deja en reposo por 5 minutos y luego se enjuaga con agua destilada y se deja secar. El lavado de las celdas se debe hacer cada vez que se cambie de dilución o blanco. El espectrofotómetro utilizado tiene el programa CARY Winuv en caso de que no se cuente con este programa, se puede utilizar uno alternativo siempre y cuando no se modifique la técnica y los parámetros medidos.

3.6 Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos de las mediciones, se someterán a un análisis estadístico que nos permitirán la determinación de los estadísticos necesarios para calcular los valores de los parámetros que se requieren en la validación. Para realizar un análisis estadístico se requiere determinar si las pruebas a utilizar serán paramétricas o no paramétricas.⁴³

Para el caso paramétrico se debe cumplir con las siguientes condiciones, en caso de que no se cumplan se determina que la población tiene un comportamiento no paramétrico y se realizan las pruebas adecuadas, dependiendo del comportamiento poblacional⁴³.

- Independencia muestral.
- Normalidad de la distribución.
- Homogeneidad de varianzas.

En este trabajo se realizó un estudio estadístico paramétrico, determinado a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El análisis estadístico se llevo a cabo con el programa Excel de office, obteniendo los siguientes valores y pruebas:

- La media aritmética.
- La desviación estándar.
- La varianza.
- Análisis de regresión lineal simple de Pearson.
- Se realizó un estudio de análisis de varianza para un factor, ANOVA de un factor.
- Se trabajo con un nivel de significación estadística de $\alpha = 0,05$.

El establecimiento de la metodología, nos permite identificar los métodos y procedimientos a utilizar, los cuales nos disminuyen la probabilidad de cometer errores que puedan repercutir en nuestros resultados. Esto es debido a que una vez establecida la metodología nos permite apreciar los pasos críticos que se tendrán que considerar al realizar la parte experimental.

Establecida la metodología se procede a la parte experimental, y posteriormente a la obtención de resultados, la cual se abordará en el siguiente capítulo donde se describirán e interpretarán los resultados obtenidos de la parte experimental.

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

El propósito de este capítulo, es presentar e interpretar los resultados obtenidos al llevar a cabo la evaluación de los parámetros necesarios que nos puedan llevar a una validación adecuada del sistema de diluciones.

Se comenzará por evaluar la linealidad del sistema para determinar sobre cuales diluciones se trabajará al hacer el cálculo de los demás parámetros. Posteriormente se llevará el cálculo de los siguientes parámetros de validación: *Sensibilidad, Recuperación, Precisión, Veracidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Robustez e incertidumbre*. En cada parámetro se realizará, primero una presentación de resultados a las dos longitudes de onda y después una interpretación de los resultados y gráficas obtenidas de las dos longitudes de onda, estableciendo los valores que se necesitan para poder validar el sistema de diluciones.

Posteriormente se realizará un resumen de los valores de los parámetros, y se hará una interpretación general del comportamiento de las diluciones al someterlas al proceso de validación, y determinar el grado de validación que se presenta en el sistema de diluciones de dióxido de titanio.

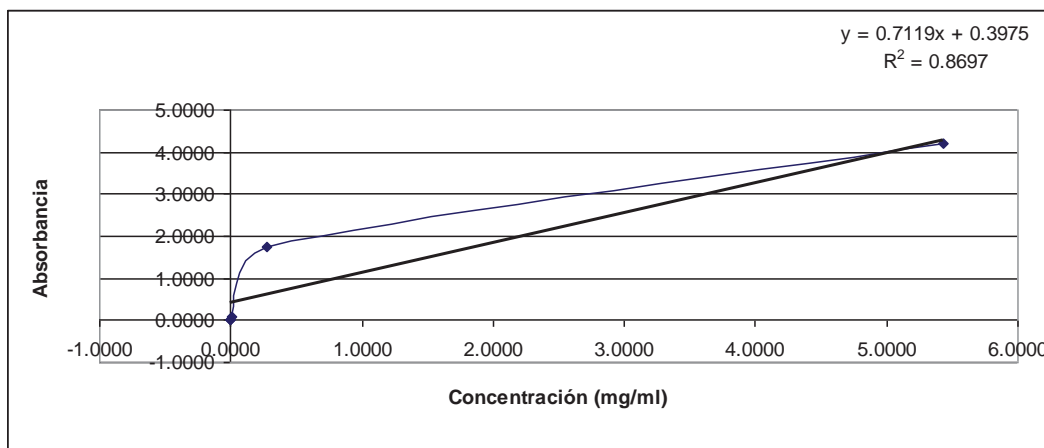
Para poder realizar una validación adecuada, es necesario poder llevar a cabo un cálculo e interpretación adecuada de los resultados de los parámetros sujetos a la validación. Debido a que los parámetros de validación son la base para poder validar un sistema, es necesario poder realizar una interpretación adecuada de los resultados obtenidos que nos lleven a una validación aceptable y confiable.

4.1 Linealidad e intervalo de medición.

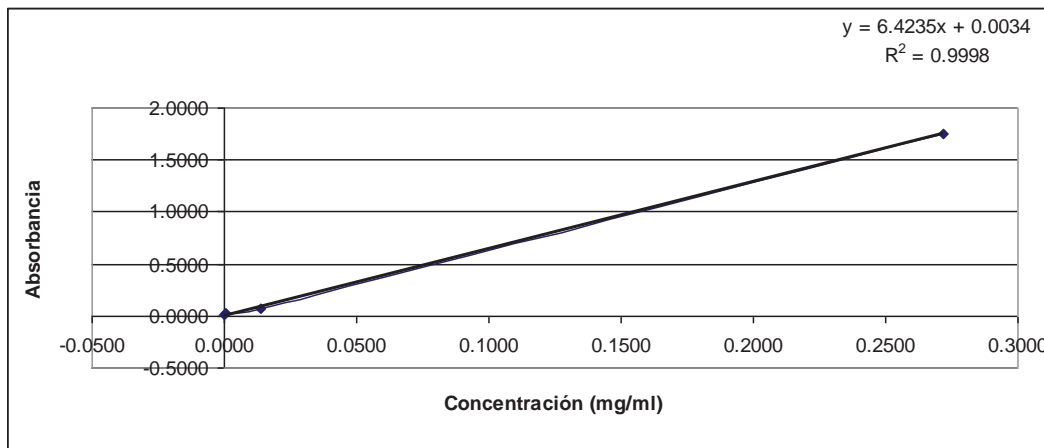
4.1.1 Linealidad e intervalo de medición a la longitud de onda de 320 nm.

Tabla 4.1.1.1 Relación entre la concentración real y la absorbancia obtenida de las mediciones a 320 nm.	
Concentración(mg/ml)*	Media aritmética(abs) a partir de 20 réplicas
5,4350	4,2097
0,2717	1,7495
0,0136	0,0727
0,0007	0,0202
0,0000	0,0082

* Estas concentraciones se basan en la resolución del instrumento de medición de cuatro cifras decimales.



Gráfica 4.1.1.1 Intervalo de trabajo. Esta gráfica muestra el comportamiento lineal que se presenta al considerar las 5 diluciones en la longitud de onda de 320 nm.



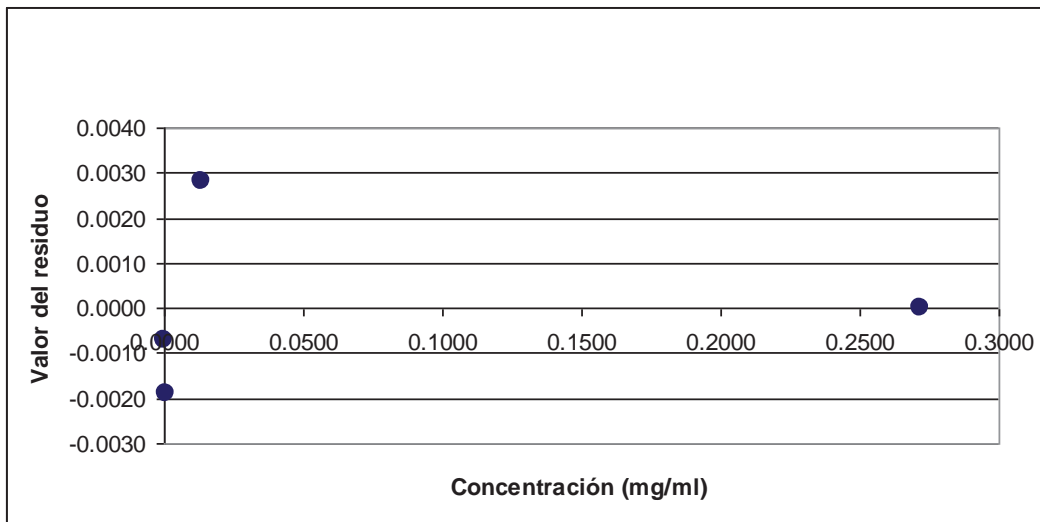
Gráfica 4.1.1.2 Intervalo lineal. Esta gráfica muestra el mejor comportamiento lineal del sistema de diluciones a la longitud de onda de 320 nm.

Tabla 4.1.1.2 Coeficiente de correlación de la grafica de linealidad que nos muestra la relación lineal entre la absorbancia y la concentración a 320 nm.

R^2	0,9998
R	0,9999

Tabla 4.1.1.3 Residuos. Esta tabla nos muestra la concentración real, la absorbancia obtenida, la concentración calculada y lo residuos a 320 nm.

Concentración real en mg/ml (T)	Absorbancia obtenida a partir de 20 réplicas	Concentración calculada en mg/ml (C)	Residuos en mg/ml (R=T-C)
0,2717	1,7495	0,2717	0,0000
0,0136	0,0727	0,0108	0,0028
0,0007	0,0202	0,0026	-0,0019
0,0000	0,0082	0,0007	-0,0007

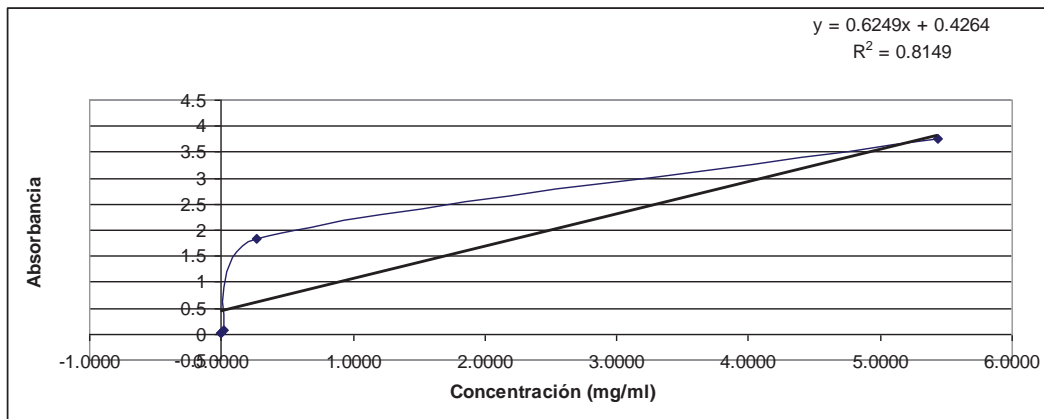


Gráfica 4.1.1.3 Residuos. Esta gráfica nos muestra el comportamiento de los residuos calculados en función de su concentración a 320 nm. Los residuos (R) se obtienen por la diferencia entre la concentración real (T) menos la calculada (C).

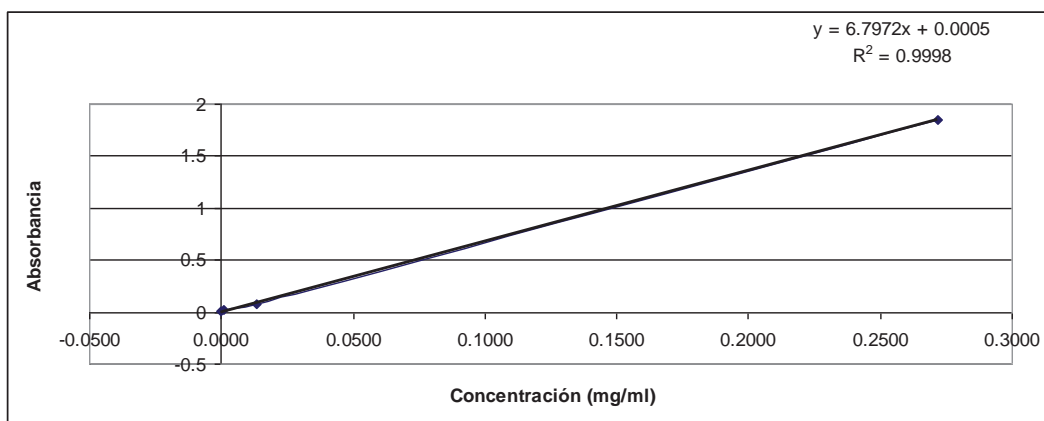
4.1.2 Linealidad e intervalo de medición a la longitud de onda de 632,8 nm.

Tabla 4.1.2.1 Relación entre la concentración real y la absorbancia obtenida de las mediciones a 632,8 nm.	
Concentración(mg/ml)*	Media aritmética(abs) a partir de 20 réplicas
5,4350	3,7609
0,2717	1,8483
0,0136	0,0728
0,0007	0,0154
0,0000	0,0096

* Estas concentraciones se basan en la resolución del instrumento de medición de cuatro cifras decimales.



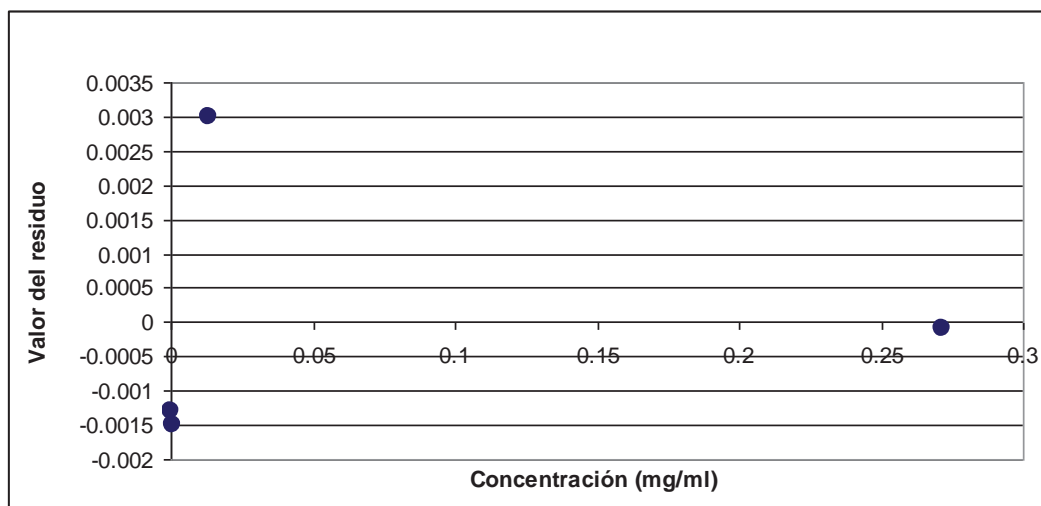
Gráfica 4.1.2.1 Intervalo de trabajo. Esta gráfica muestra el comportamiento lineal que se presenta al considerar las 5 diluciones en la longitud de onda de 632,8 nm.



4.1.2.2 Intervalo lineal. Esta gráfica muestra el mejor comportamiento lineal del sistema de diluciones a la longitud de onda de 632,8 nm.

Tabla 4.1.2.2 Coeficiente de correlación de la gráfica de linealidad, que nos muestra la relación lineal entre la absorbancia y la concentración a 632,8 nm.	
R^2	0,9998
R	0,9999

Tabla 4.1.2.3 Residuos. Esta tabla nos muestra la concentración real, la absorbancia obtenida, a concentración calculada y los residuos a 632,8 nm.			
Concentración real en mg/ml (T)	Absorbancia obtenida	Concentración calculada en mg/ml (C)	Residuos en mg/ml (R=T-C)
0,2717	1,8483	0,2718	-0,0001
0,0136	0,0728	0,0106	0,0030
0,0007	0,0154	0,0022	-0,0015
0,0000	0,0096	0,0013	-0,0013



Gráfica 4.1.2.3 Residuos. Esta gráfica nos muestra el comportamiento de los residuos calculados en función de su concentración a 632,8 nm. Los residuos (R) se obtienen por la diferencia entre la concentración real (T) menos la calculada (C).

4.1.3 Interpretación de resultados para la linealidad e intervalo de medición.

La linealidad se refiere al intervalo de concentraciones para la cual se obtiene la mejor línea recta trazable. Inicialmente, se comenzó con un intervalo de trabajo que consistió en cinco diluciones de dióxido de titanio para evaluar la linealidad.

De las mediciones obtenidas, para cada concentración se calcula su media aritmética de la absorbancia obtenida, como se muestra en las tablas 4.1.1.1 y 4.1.2.1, y se gráfica la respuesta de medición en función de su concentración, que nos muestra el comportamiento que tiene el intervalo de trabajo, gráficas 4.1.1.1 y 4.1.2.1, de estas gráficas se evalúa el rango de concentraciones donde se obtiene la mejor línea recta, gráficas 4.1.1.2 y 4.1.2.2, y se corrobora con el coeficiente de correlación, tablas 4.1.1.2

y 4.1.2.2, en el cual mientras más se aproxime a la unidad, la proporción de varianza explicada por la regresión lineal es del 100 % y podemos calcular el valor dependiente (y) a partir del independiente (x) con un buen grado de aproximación. Se asigna el rango de concentraciones para la cual el sistema de diluciones cumple con la linealidad.

Se calculan los residuos, tablas 4.1.1.3 y 4.1.2.3, que se obtuvieron por la diferencia entre la concentración real y la concentración calculada, esta última obtenida a partir de la ecuación de la recta de la gráfica de linealidad, graficada y en función de x , donde y es la concentración en mg/ml y x es la absorbancia obtenida, y se grafican en función de la concentración para observar la presencia de tendencias sistemáticas que interfieran con la linealidad del sistema, gráficas 4.1.1.3 y 4.1.2.3.

Tanto para la longitud de onda de 320 y 632,8 nm, se determinó intervalo lineal en los cuales el instrumento es capaz de realizar mediciones confiables dentro de las concentraciones de 0,2717 mg/ml a 0,0007 mg/ml, que abarca las diluciones 2, 3, 4 y 5. En este intervalo, la distribución de los residuos es de manera aleatoria y el coeficiente de correlación es aceptable cumpliendo con los criterios de aceptación que marcan algunos organismos de normalización, $r^2 \geq 0,99$. La concentración de 5, 4350 mg/ml, dilución 1-10, no contribuye a la linealidad por lo cual no se toma en cuenta, observar que el coeficiente de correlación disminuye al incluir esta dilución, y aunque inicialmente nuestro intervalo de trabajo fue de 5,4350 mg/ml a 0,0000 mg/ml, deducimos que la mejor respuesta lineal se encuentra en el rango de concentraciones de 0,2717 mg/ml a 0,0007 mg/ml, intervalo en el cual centraremos nuestro trabajo.

4.2 Sensibilidad.

4.2.1 Sensibilidad a la longitud de onda de 320 nm.

Tabla 4.2.1.1 Sensibilidad a 320 nm. Se muestra la ecuación de la línea recta de la gráfica de linealidad y el valor de la pendiente que corresponde a la sensibilidad.		
Ecuación general de la lineal recta.	Ecuación de la gráfica de linealidad.	Valor de la pendiente.
$y = mx + b$	$y = 6,4235x + 0,0034$	$m = 6,4235$
$m = pendiente.$	$y = absorbancia.$	
$b = ordenada al origen.$	$x = concentración (mg/ml).$	

4.2.2 Sensibilidad a la longitud de onda de 632,8 nanómetros.

Tabla 4.2.2.1 Sensibilidad a 632,8 nm. Se muestra la ecuación de la línea recta de la gráfica de linealidad y el valor de la pendiente que corresponde a la sensibilidad.		
Ecuación general de la lineal recta.	Ecuación de la gráfica de linealidad.	Valor de la pendiente.
$y = mx + b$ <i>m = pendiente.</i> <i>b = ordenada al origen.</i>	$y = 6,7972x + 0,0005$ <i>y = absorbancia.</i> <i>x = concentración (mg/ml).</i>	$m = 6,7972$

4.2.3 Interpretación de los resultados para sensibilidad del sistema.

La sensibilidad se refiere al cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Para obtener el valor de la sensibilidad es necesario obtener la ecuación de la recta, la cual se obtuvo de la gráfica de linealidad, y en donde la pendiente de la ecuación corresponde al valor de la sensibilidad.

La pendiente se toma como la sensibilidad debido a que se basa en el cálculo de la covarianza, la covarianza nos indica el comportamiento que se presenta entre las dos variables, concentración y absorbancia, y por lo tanto tenemos que si la pendiente es mayor que cero las dos variables aumenta a la vez, en cambio si es menor a cero una variable crece mientras la otra decrece, lo que nos da precisamente la sensibilidad de nuestro instrumento.

Para la sensibilidad a la longitud de onda de 320 nm, se obtuvo un valor de la pendiente de 6,4235, tabla 4.2.1.1, y para la longitud de onda de 632,8 nm, fue de 6,7972, tabla 4.2.2.1.

Debido a que la sensibilidad es proporcional al valor de la pendiente, podemos decir, que la mayor sensibilidad se encuentra en la longitud de onda de 632,8 nm, pero debido a que la diferencia de sensibilidad no es muy grande entre ambas longitudes, podemos decir, que ambas longitudes de onda tienen una sensibilidad similar. Al verificar mediante el porcentaje de recuperación observamos que el sistema pierde sensibilidad al disminuir la concentración.

4.3 Recuperación.

4.3.1 Recuperación a la longitud de onda de 320 nanómetros.

Tabla 4.3.1.1 Porcentaje de recuperación a 320 nm. Se muestra la concentración real y la calculada a partir de las cuales se obtuvo el porcentaje de recuperación.		
Concentración real (mg/ml)	Concentración calculada (mg/ml)	% de Recuperación
0,2717	0,2717	100,0000
0,0136	0,0108	79,4117
0,0007	0,0026	371,4286**
0,0000	0,0007	-----**

4.3.2 Recuperación a la longitud de onda de 632,8 nm.

Tabla 4.3.2.1 Porcentaje de recuperación a 632,8 nm. Se muestra la concentración real y la calculada a partir de las cuales se obtuvo el porcentaje de recuperación.		
Concentración real (mg/ml)	Concentración calculada(mg/ml)	% de Recuperación
0,2717	0,2718	100,0368
0,0136	0,0106	77,9412
0,0007	0,0022	314,2857**
0,0000	0,0013	-----**

** Estos valores no corresponden a los esperados por lo que muestran la presencia de errores a esas concentraciones.

4.3.3 Interpretación de los resultados para la recuperación.

La recuperación se refiere a la cantidad del analito presente, que se puede cuantificar efectivamente y que se expresa como el cociente de la cantidad medida del analito y el contenido de la muestra. La determinación de la recuperación se realizó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación. Para calcular el porcentaje de recuperación se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% R = [\text{valor obtenido} / \text{valor de referencia}] \times 100.$$

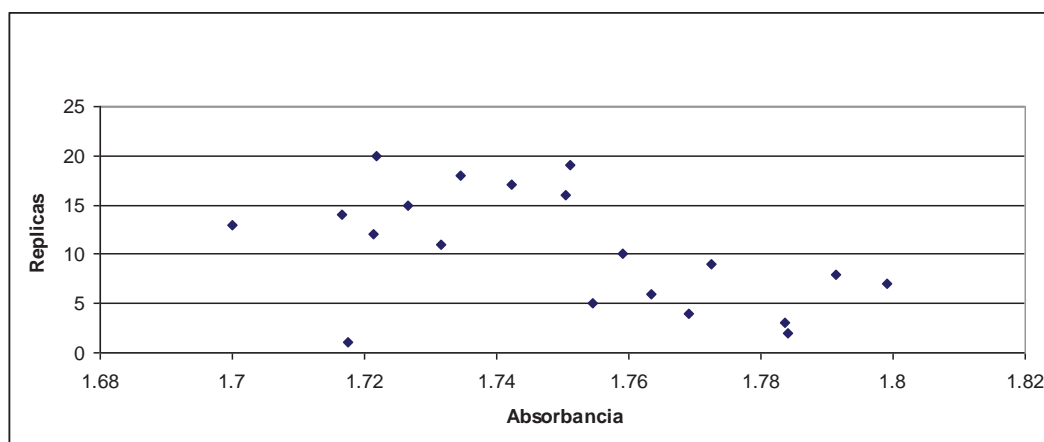
Como se puede apreciar en las tablas 4.3.1.1 y 4.3.2.1, para las dos longitudes de onda, 320 y 632,8 nm, se obtiene una recuperación del 100% en la concentración 0,2717 mg/ml, dilución 2, mientras que a la concentración de 0,0136 mg/ml, dilución 3, a la

longitud de onda de 320 nm se obtuvo una recuperación de 79,4117 y a la longitud de onda de 632,8 nm se obtiene una recuperación de 77,9412. En las diluciones restantes no se pudo recuperar nada del dióxido de titanio, por lo cual, podemos decir que la mayor recuperación se logra a la concentración 0,2717 mg/ml, dilución 2, para ambas longitudes de onda y en menor proporción a la concentración de 0,0136 mg/ml, dilución 3, es decir, la recuperación es directamente proporcional a la concentración con lo cual reafirmamos que a medida que disminuye la concentración el instrumento pierde sensibilidad de detectar cambios en las concentraciones. Este parámetro es importante debido a que nos muestra una medida tentativa de la veracidad del sistema.

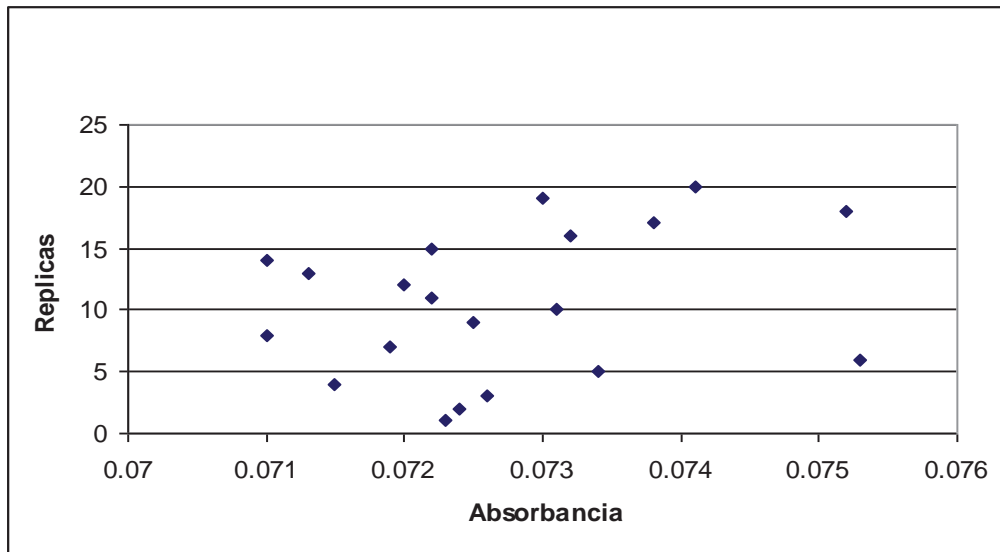
4.4 Precisión.

4.4.1 Precisión a la longitud de onda de 320 nm.

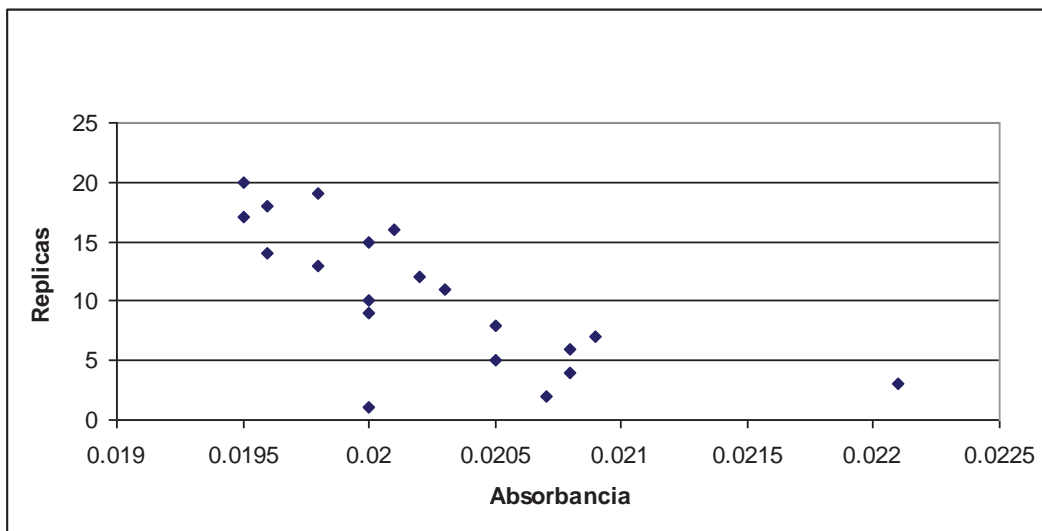
Tabla 4.4.1.1 Estadística descriptiva para la determinación de la precisión a 320 nm.				
	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5
Media (abs)	1,7495	0,0727	0,0202	0,0081
Desviación estándar (abs)	0,0281	0,0012	0,0006	0,0004
Varianza.(abs²)	0,0008	1,48842E-06	3,90816E-07	1,35158E-07
CV (%).	1,6062	1,6506	2,9703	4,9383
Límite de repetibilidad (abs).	0,0779	0,0033	0,0017	0,0011



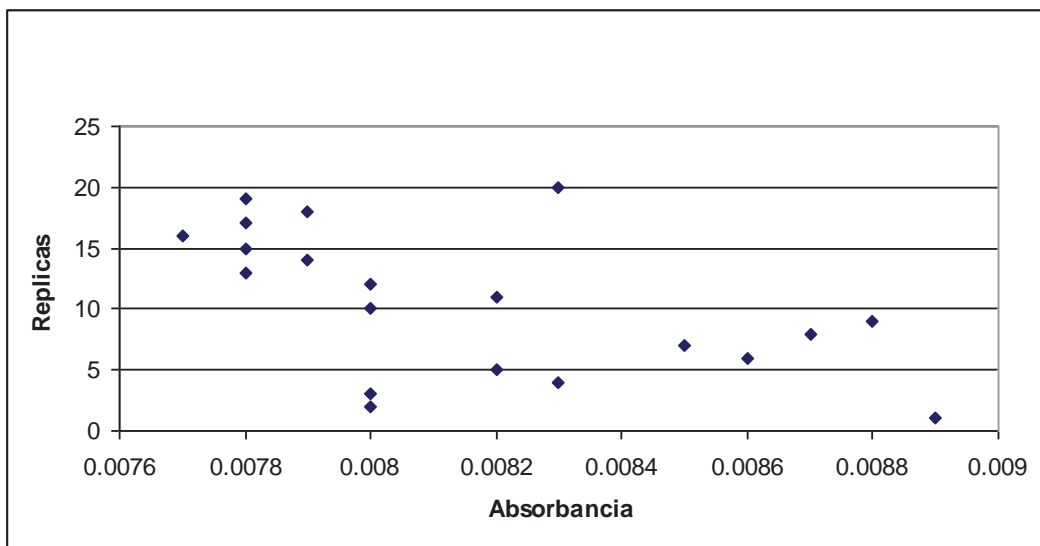
Gráfica 4.4.1.1 Precisión a la concentración de 0,2717 mg/ml, dilución 2, a 320 nm. Se muestra la dispersión que presentan los resultados de medición de la dilución 2 con forme aumentan las réplicas de las mediciones.



Gráfica 4.4.1.2 Precisión a la concentración de 0,0108 mg/ml, dilución 3, a 320 nm. Se muestra la dispersión que presentan los resultados de medición de la dilución 3 con forme aumentan las réplicas de las mediciones.



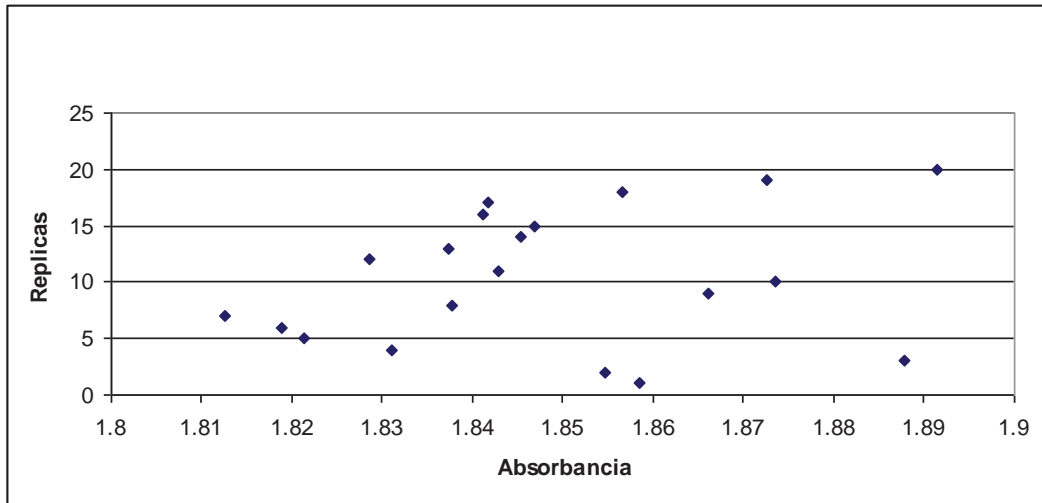
Gráfica 4.4.1.3 Precisión a la concentración de 0,0026 mg/ml, dilución 4, a 320 nm. Se muestra la dispersión que presentan los resultados de medición de la dilución 4 con forme aumentan las réplicas de las mediciones.



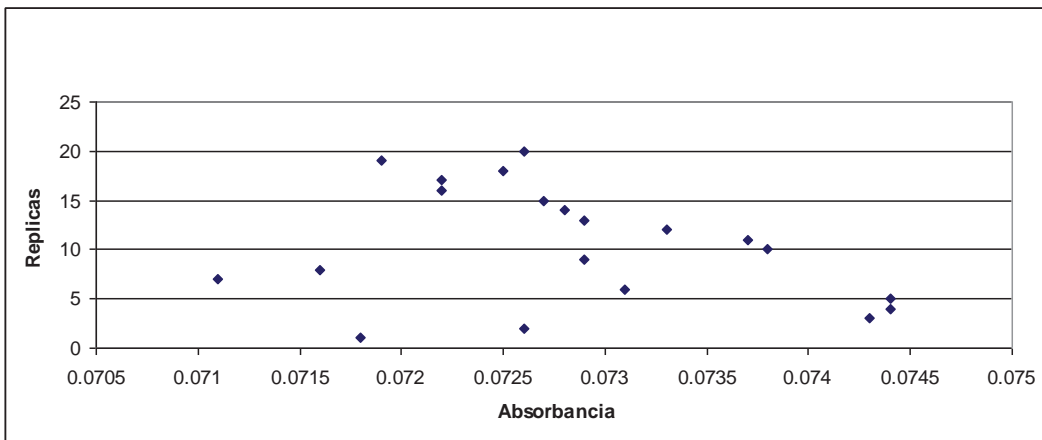
Gráfica 4.4.1.4 Precisión a la concentración de 0,0007 mg/ml, dilución 5, a 320 nm. Se muestra la dispersión que presentan los resultados de medición de la dilución 5 con forme aumentan las réplicas de las mediciones.

4.4.2 Precisión a la longitud de onda de 632,8 nm.

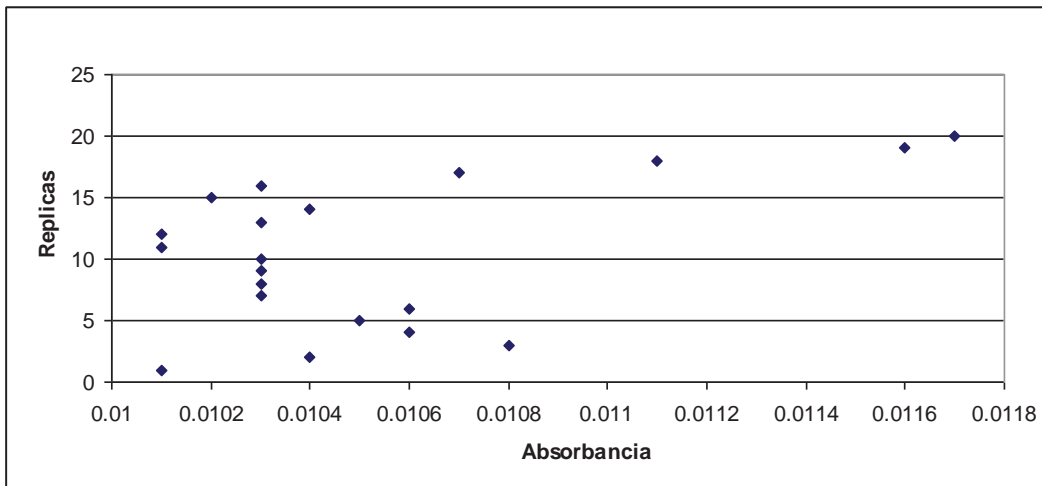
	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5
Media (abs)	1,8483	0,0728	0,0105	0,0096
Desviación estándar (abs)	0,0219	0,0009	0,0005	0,0003
Varianza(abs²)	0,000479385	0,00000087	0,000000208	0,000000073
CV (%)	1,1849	1,2363	4,7619	3,1250
Límite de repetibilidad (abs)	0,0607	0,0025	0,0014	0,0008



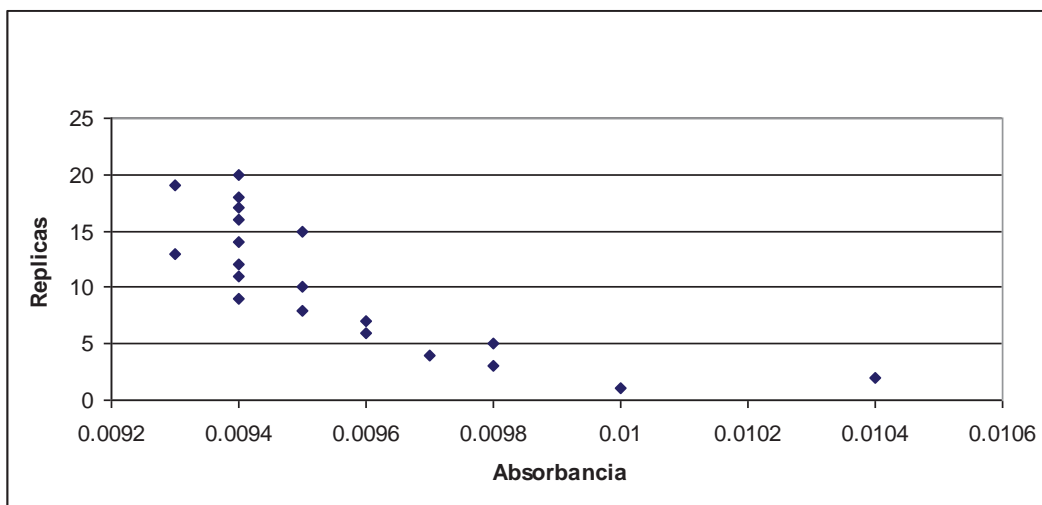
Gráfica 4.4.2.1 Precisión a la concentración de 0,2718 mg/ml, dilución 2, a 632,8 nm. Se muestra la dispersión que presentan los resultados de medición de la dilución 2 con forme aumentan las réplicas de las mediciones.



Gráfica 4.4.2.2 Precisión a la concentración de 0,0106 mg/ml, dilución 3, a 632,8 nm. Se muestra la dispersión que presentan los resultados de medición de la dilución 3 con forme aumentan las réplicas de las mediciones.



Gráfica 4.4.2.3 Precisión a la concentración de 0,0022 mg/ml, dilución 4, a 632,8 nm. Se muestra la dispersión que presentan los resultados de medición de la dilución 4 con forme aumentan las réplicas de las mediciones.



Gráfica 4.4.2.4 Precisión a la concentración de 0,0013 mg/ml, dilución 5, a 632,8 nm. Se muestra la dispersión que presentan los resultados de medición de la dilución 5 con forme aumentan las réplicas de las mediciones.

4.4.3 Interpretación de los resultados para la precisión.

La precisión se refiere al grado de concordancia de los resultados en relación a un valor central, se relaciona con la presencia de errores aleatorios y se expresa en términos de dispersión.

La precisión se realizó bajo condiciones de repetibilidad, la cual indica que las mediciones se deben realizar por el mismo analista, en el mismo equipo, en el mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto, es decir, de manera intracorrida haciendo 20 réplicas de manera seguida.

La precisión se determinó mediante el cálculo del coeficiente de variación (*CV*), tablas 4.4.1.1 y 4.4.2.1, que nos indica el grado de dispersión que presentan las mediciones, teniendo como límite un coeficiente de variación del 3 % para procedimientos espectrofotométricos. [Referencia 33]

Para la longitud de onda de 320 nm, se encuentra una precisión aceptable en las concentraciones de 0,2717 mg/ml, dilución 2, 0,0108 mg/ml, dilución 3 y 0,0026 mg/ml, dilución 4, mientras que para la concentración restante la precisión no es aceptable debido a que supera el límite establecido. Se puede observar la dispersión que se presentó en las mediciones en las gráficas 4.4.1.1, 4.4.1.2, 4.4.1.3 y 4.4.1.4.

Para la longitud de onda de 632,8 nm, se encuentra una precisión aceptable en las concentraciones 0,2718 mg/ml, dilución 2, 0,0106 mg/ml, dilución 3, mientras que para la concentración de 0,0022 mg/ml, dilución 4, y 0,0013 mg/ml, dilución 5, superan el límite establecido para procedimientos espectrofotométricos. Se puede observar la dispersión que se presentó de las mediciones en las gráficas 4.4.2.1, 4.4.2.2, 4.4.2.3 y 4.4.2.4.

Se estableció el límite de repetibilidad definido como el valor menor o igual a aquel de la diferencia absoluta entre 2 resultados de pruebas individuales bajo condiciones de repetibilidad, como no tenemos una referencia para el límite de repetibilidad, era importante poder establecerlo y asignarle un valor, tablas 4.4.1.1 y 4.4.2.1.

Podemos decir que la mejor precisión en ambas longitudes de onda, se encuentra en las concentraciones de 0,2717 y 0,0135 mg/ml, dilución 2 y 3. La prueba de ANOVA de un factor nos muestra que no existe variación significativa entre la precisión a las dos longitudes de onda, por lo que podemos decir que al disminuir la concentración existe mayor imprecisión y por lo tanto la presencia de errores aleatorios mayores.

4.5 Veracidad.

4.5.1 Veracidad a la longitud de onda de 320 nm.

Tabla 4.5.1.1 Veracidad a 320 nm. Se presenta la concentración real, la concentración calculada, de las cuales se obtiene el porcentaje de recuperación y de error relativo.

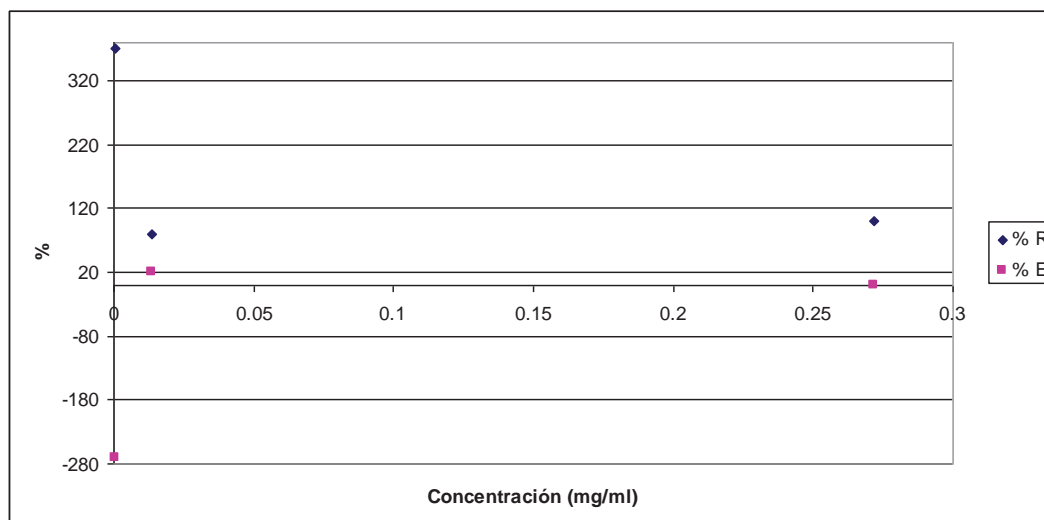
Concentración real (mg/ml)	Concentración calculada (mg/ml)	% de Recuperación	% de Error relativo
0,2717	0,2717	100,0000	0,0000
0,0136	0,0108	79,4117	20,5882
0,0007	0,0026	371,4286**	-271,4286**
0,0000	0,0007	-----**	-----**

4.5.2 Veracidad a la longitud de onda de 632,8 nm.

Tabla 4.5.2.1 Veracidad a 632,8 nm. Se presenta la concentración real, la concentración calculada, de las cuales se obtiene el porcentaje de recuperación y de error relativo.

Concentración real (mg/ml)	Concentración calculada(mg/ml)	% de Recuperación	% de Error relativo
0,2717	0,2718	100,0368	-0,0368
0,0136	0,0106	77,9412	22,0588
0,0007	0,0022	314,2857**	-214,2857**
0,0000	0,0013	-----**	-----**

** Estos valores no corresponden al los esperados por lo que muestran presencia de errores a esas concentraciones.



Gráfica 4.5.1 Porcentaje de recuperación (% R) y error relativo (% E) a 320 y 632,8 nm. En esta gráfica se muestra el comportamiento que se presenta con los porcentajes de recuperación y del error relativo para la veracidad donde los dos porcentajes son inversamente proporcionales y además se observa que existen valores que superan la escala de porcentaje lo cual nos indica de tendencias a errores.

4.5.3 Interpretación de los resultados para la veracidad.

La veracidad se refiere al grado de coincidencia entre el valor obtenido mediante las mediciones realizadas y el valor de referencia. Este parámetro se relaciona con la presencia de errores sistemáticos.

La determinación de este parámetro se realizó por medio del cálculo del porcentaje de recuperación y el porcentaje del error relativo debido a que no se cuenta con materiales de referencia. El porcentaje de recuperación es inversamente proporcional al error relativo y se obtiene de la prueba de recuperación, mientras que el error relativo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de error relativo} = [(\text{valor real} - \text{valor medido}) / \text{valor real}] \times 100$$

Revisando las tablas 4.5.1.1 y 4.5.2.1, la mayor veracidad en ambas longitudes de onda, 320 y 632,8 nm, se encuentra en la concentración de 0,2717 mg/ml, donde se obtuvo un porcentaje de recuperación del 100% y un error relativo del 0%, en la concentración de 0,01358 mg/ml a la longitud de onda de 320 nm se obtuvo un porcentaje de

recuperación de 79,4117% y un porcentaje de error relativo de 20,5582%, para la longitud de onda de 632,8 nm, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 77,9412% y un porcentaje de error relativo de 22,0588%. Para las concentraciones restantes no es posible determinar el % de recuperación y error relativo teniendo influencias sistemáticas a medida que disminuye la concentración.

La mayor veracidad para las dos longitudes de onda se encuentra en la concentración de 0,2717 mg/ml y en menor grado para la concentración de 0,01358 mg/ml, mientras que para las concentraciones restantes no se obtiene veracidad, por lo que, las concentraciones medidas no corresponden a las concentraciones teóricas. También la veracidad nos muestra el sesgo que se presenta, el sesgo aumenta entre las concentraciones 0,2717 y 0,0136 mg/ml, pero luego tiende a disminuir con las demás concentraciones. Se presenta un comportamiento similar con el porcentaje de error relativo y el porcentaje de recuperación es inversamente proporcional al error relativo, gráfica 4.5.1 Estos comportamientos nos indican que la veracidad es proporcional a la concentración.

4.6 Límite de detección (LoD).

4.6.1 Límite de detección (LoD) a la longitud de onda de 320 nm.

Concentración (mg/ml).	Réplicas	Resultados positivos (%)	Resultados negativos (%)
0,2717	10	100	0
0,0136	10	30	70
0,0007	10	0	100
0,0000	10	30	70

4.6.2 Límite de detección (LoD) a la longitud de onda de 632,8 nm.

Tabla 4.6.2.1 Resultados positivos y negativos a 632,8 nm expresados en porcentaje.

Concentración (mg/ml)	Réplicas	Resultados positivos (%)	Resultados negativos (%)
0,2717	10	100	0
0,0136	10	0	100
0,0007	10	0	100
0,0000	10	0	100

4.6.3 Interpretación de los resultados para el límite de detección (LoD).

El límite de detección se refiere a la concentración de dióxido de titanio que se puede detectar o identificar, pero que no necesariamente tiene que ser cuantificada con un valor exacto, es decir, que no debe tener necesariamente un nivel de veracidad del 100%.

El procedimiento sugerido para determinar el LoD es calcular el porcentaje de resultados positivos y negativos en base al valor real, es decir, determinar los límites dentro de los cuales los resultados obtenidos se consideran positivos o negativos.

Pero debido a que en el parámetro de exactitud se observó que a medida que disminuye la concentración disminuye la veracidad y aumenta la imprecisión, por lo tanto sería erróneo determinar el LoD por este procedimiento. Como se puede observar en las tablas 4.6.1.1 y 4.6.2.1 la respuesta de los resultados positivos y negativos es aleatoria dando un margen amplio de imprecisión en las últimas dos diluciones.

Por lo anterior se determinó el LoD en base a la recuperación, en la cual podemos observar que a la concentración de 0,0136 mg/ml se obtiene una recuperación entre 77 y 79%, y de la cual deducimos que es la concentración a la cual podemos identificar de manera confiable el dióxido de titanio por procedimientos espectrofotométricos a las longitudes de onda de 320 nm y 632,8 nm pero no necesariamente es cuantificado con un valor exacto.

4.7 Límite de cuantificación (LoQ).

4.7.1 Límite de cuantificación (LoQ) a la longitud de onda de 320 nm.

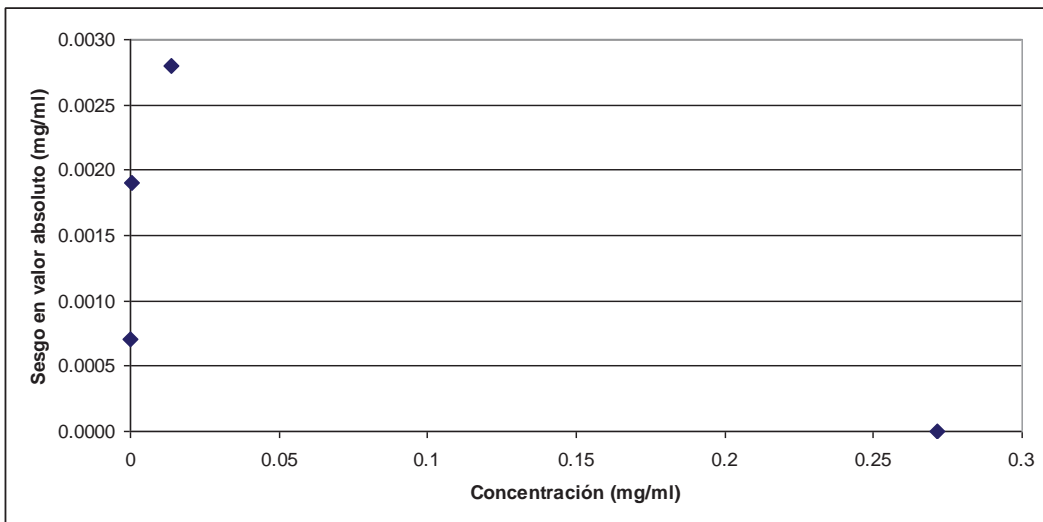
Tabla 4.7.1.1 Relación del sesgo con respecto a la concentración real a 320 nm.

Concentración(mg/ml)	Sesgo en valor absoluto (mg/ml)
0,2717	0,0000
0,0136	0,0028
0,0007	0,0019
0,0000	0,0007

4.7.2 Límite de cuantificación (LoQ) a la longitud de onda de 632,8 nm.

Tabla 4.7.2.1 Relación del sesgo con respecto a la concentración real a 632,8 nm.

Concentración(mg/ml)	Sesgo en valor absoluto (mg/ml)
0,2717	0,0001
0,0136	0,0030
0,0007	0,0015
0,0000	0,0013



Gráfica 4.7.1 Límite de cuantificación a 320 y 632,8 nm. Relación de la desviación observada entre las concentraciones verdaderas y las calculadas. Para las dos longitudes de onda se presenta un comportamiento similar.

4.7.3 Interpretación de los resultados para el límite de cuantificación (LoQ).

El límite de cuantificación se refiere a la mínima concentración del dióxido de titanio que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión, exactitud e incertidumbre. Para calcular este parámetro fue necesario hacer el cálculo de la desviación que se presenta con respecto al valor teórico para cada dilución llamado sesgo, tablas 4.7.1.1 y 4.7.2.1, que posteriormente se grafica en función de la concentración, gráficas 4.7.1. Debido a que el límite de cuantificación se encuentra relacionado con la veracidad y precisión, para determinarlo es necesario revisar el valor de estos parámetros para las distintas diluciones y observar en la gráfica la concentración en la cual se presenta una menor desviación con respecto al valor teórico.

Para ambas longitudes de onda, 320 y 632,8 nm, el límite de cuantificación se encuentra a la concentración de 0,2717 mg/ml, debido a que si se revisa las gráfica, a esta concentración se encuentra la menor desviación con respecto al valor teórico, además si se revisa el valor de los parámetros mencionados anteriormente, a esta concentración, se podrá apreciar que ambos parámetros son aceptables, por lo tanto podemos decir que a esta concentración se puede cuantificar el dióxido de titanio con un alto grado de exactitud.

4.8 Robustez.

4.8.1 Robustez a la longitud de onda de 320 nm.

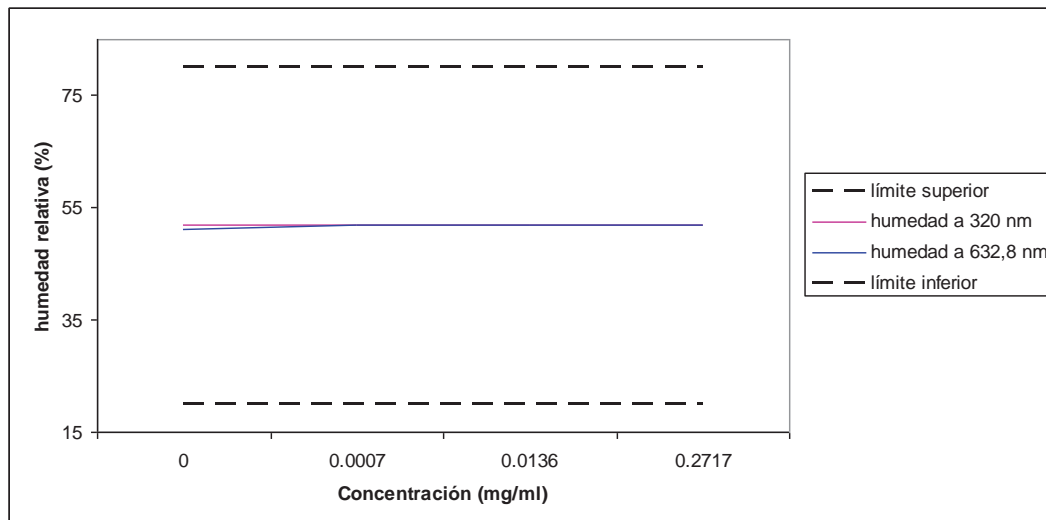
	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5
Media(°C)	20,67	20,5	20,3	20,3
Desviación estándar (°C)	0,073226951	0	3,645 E -15	3,645 E -15
Varianza(°C²)	0,005368421	0	1,3286 E -29	1,3286 E -29
N	20	20	20	20

Tabla 4.8.1.2 Estadística descriptiva e la humedad (%) a 320 nm para calcular la robustez.				
	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5
Media (%)	52	52	52	52
Desviación estándar (%)	0	0	0	0
Varianza(%²)	0	0	0	0
N	20	20	20	20

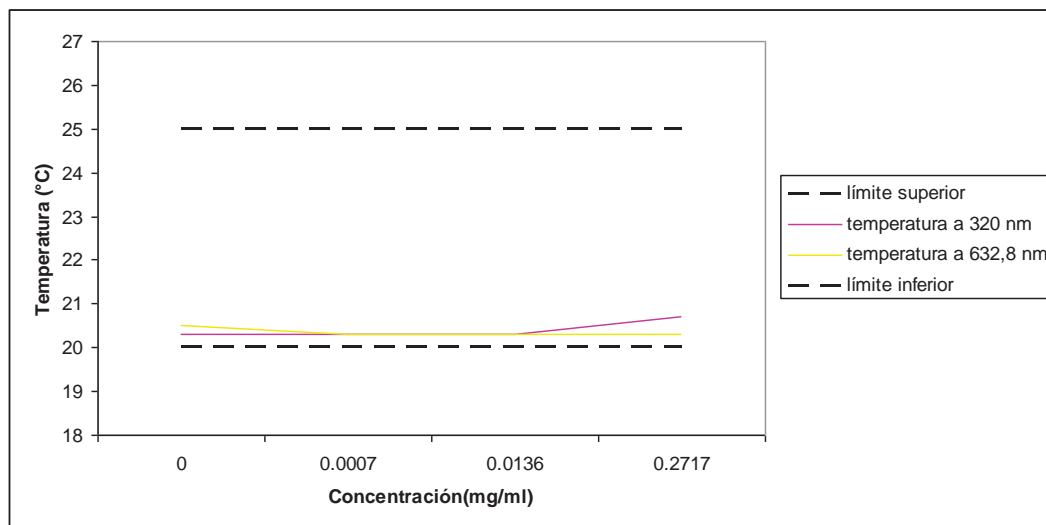
4.8.2 Robustez a la longitud de onda de 632,8 nm.

Tabla 4.8.2.1 Estadística descriptivos de la temperatura (°C) a 632,8 nm para calcular la robustez.				
	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5
Media (°C)	20,3	20,3	20,3	20,5
Desviación estándar(°C)	3,64501E -15	3,64501 E -15	3,64501 E -15	0
Varianza (°C²)	1,32861 E -29	1,32861 E -29	1,32861 E -29	0
N	20	20	20	20

Tabla 4.8.2.2 Estadística descriptivos de la humedad (%) a 632,8 nm para calcular la robustez.				
	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5
Media (%)	52	52	52	51,1
Desviación estándar (%)	0	0	0	0,30779351
Varianza (%²)	0	0	0	0,09473684
N	20	20	20	20



Gráfica 4.8.1 Comportamiento de la humedad relativa durante la medición. Esta gráfica nos muestra los límites de funcionamiento del instrumento de medición para la humedad relativa (%) en función de la concentración y el comportamiento que presento durante la medición a las longitudes de onda de 320 nm y 632,8 nm.



Gráfica 4.8.2 Comportamiento de la temperatura durante la medición. Esta gráfica nos muestra los límites del funcionamiento del instrumento de medición para la temperatura (°C) en función de la concentración y el comportamiento que presento durante la medición a las longitudes de onda de 320 nm y 632,8 nm.

4.8.3 Interpretación de los resultados para la robustez.

La robustez se refiere a la capacidad o resistencia de los resultados de una medición de permanecer inalterados frente a variaciones intencionadas, lo que nos permite obtener información acerca de su confiabilidad durante el uso normal.

Para llevar a cabo la evaluación de la robustez se tomaron medidas de la temperatura y humedad de cada réplica en cada dilución, de las cuales se sacaron sus estadísticos descriptivos necesarios para llevar un análisis de varianza (ANOVA), y determinar si la variabilidad que presentaron estas condiciones durante la medición a las dos longitudes de onda, 320 y 632,8 nm, es de manera significativa.

Para las longitudes de onda mencionadas no se encuentra variación significativa de las condiciones de medición, por lo que podemos decir que el sistema es robusto a las condiciones de medición, es decir, que los resultados no se ven afectados por los cambios en las condiciones de temperatura y humedad, que se presentaron durante la medición de las diluciones.

Como se observa en las gráficas 4.8.1 y 4.8.2 la variabilidad de las condiciones de temperatura y humedad se encuentran dentro de los límites que requiere el instrumento para un buen funcionamiento. Estos límites son: para la humedad relativa de 20 a 80 % y para la temperatura de 20 ± 2 °C. Por lo que podemos decir que se trabajó en condiciones controladas que no presentaron una variación muy marcada.

4.9 Incertidumbre de medición.

La incertidumbre se refiere a la dispersión de los valores que podrían ser atribuidos a la propiedad que se determina. Evalúa la calidad de un resultado, de manera que para tener un resultado completo, se debe poseer la información de la incertidumbre asociada a la medición del análisis.

Calculamos el valor de dos incertidumbres, una asociada a la incertidumbre del espectrofotómetro, incertidumbre del instrumento, y la otra derivada de los resultados de medición bajo condiciones de repetibilidad, incertidumbre de medición.

La incertidumbre asociada al instrumento de medición se determinó por medio de un material de referencia de valor conocido en la calibración del espectrofotómetro UV-Vis, dando una incertidumbre para la longitud de onda de 632,8 nm de 0,17 mientras que la incertidumbre a la longitud de onda de 320 nm fue de 0,010. La escala fotométrica de calibración del instrumento abarca las longitudes de onda de 440 nm a 750 nm, por tanto, la incertidumbre de la longitud de onda de 320 nm se determinó por extrapolación, debido a que se encuentra fuera de la escala de calibración.

La incertidumbre de medición se determinó por medio de condiciones de repetibilidad de las mediciones obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 4.9.1 Determinación de la incertidumbre de medición a 320 nm.

	Media aritmética (abs)	Desviación estándar (abs)	Incertidumbre	Error (mg/ml)
Dilución 2	1,749535	0,028107861		0
Dilución 3	0,0727	0,001220009		-0,00278
Dilución 4	0,020235	0,000625153		0,00196
Dilución 5	0,00816	0,000367638		0,00073

Tabla 4.9.2 Determinación de la incertidumbre de medición a 632,8 nm.

	Media aritmética (abs)	Desviación estándar (abs)	Incertidumbre	Error (mg/ml)
Dilución 2	1,8483	0,021894859		0,0001
Dilución 3	0,0728	0,000933246		-0,0029
Dilución 4	0,0105	0,000456848		0,00151
Dilución 5	0,0095	0,000270283		0,0013

Tabla 4.10.1 Resumen de los valores de los parámetros de validación		
Parámetros.	Longitud de onda de 320 nm.	Longitud de onda de 632,8 nm.
Linealidad	De 0,2717 – 0,0007mg/ml	De 0,2717 - 0,00013 mg/ml
Sensibilidad	6,4235	6,7972
Precisión	Mayor precisión en la dilución 2, 3 y 4.	Mayor precisión en la dilución 2 y 3.
Recuperación	Dilución 2 = 100,00% Dilución 3 = 79,41% Dilución 4 y 5 = -----	Dilución 2 = 100% Dilución 3 = 77,94 Dilución 4 y 5 = -----
Veracidad	Mayor veracidad a la concentración de 0,2717 mg/ml Menor veracidad a la concentración de 0,0136 mg/ml.	Mayor veracidad a la concentración de 0,2717 mg/ml. Menor veracidad a la concentración de 0,0136 mg/ml.
Límite de detección	A la concentración 0,0136 mg/ ml	A la concentración 0,0136 mg/ml.
Límite de cuantificación	A la concentración 0,2717 mg/ml.	A la concentración 0,2717 mg/ml.
Incertidumbre Instrumento Medición	0,010 Vera tabla 4.9.1	0,17 Ver tabla 4.9.2
Robustez	Sistema robusto a las condiciones de medición.	Sistema robusto a las condiciones de medición.

4.10 Conclusiones.

Se establecieron los parámetros de desempeño del sistema de diluciones del dióxido de titanio a diferentes concentraciones, en las cuales se observó que las cinco diluciones iniciales no cumplen con la linealidad, en cambio excluyendo a la primera dilución el sistema muestra una linealidad aceptable, de acuerdo con los requisitos marcados en las guías de validación revisadas.

En los parámetros de precisión y veracidad se observó que a menor concentración disminuye la veracidad y precisión, por lo tanto la exactitud es cuestionable a bajas concentraciones y aumenta la probabilidad de errores sistemáticos.

Las diluciones de concentración de 0,2717 mg/ml y 0,0136 mg/ml muestran un mejor comportamiento en el desempeño de sus parámetros, esto se observó debido a que en estas diluciones se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación, lo que nos indica que

utilizando métodos espectrofotométricos a estas concentraciones se puede trabajar con un buen grado de exactitud.

En conclusión podemos decir, que mediante la metodología empleada se cumple la hipótesis así como los objetivos planteados inicialmente, obteniendo mediante el proceso de validación, para las diferentes diluciones del filtro solar físico de dióxido de titanio, el mejor comportamiento, obteniendo en consecuencia las mejores características de exactitud, detección, cuantificación, linealidad, sensibilidad, robustez, incertidumbre, recuperación, optimizando recursos y en cumplimiento de los requisitos que marca la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 para validación de sistemas analíticos.

En este estudio se encontró que mediante procedimientos espectrofotométricos y trabajando con muestras de dióxido de titanio, a medida que disminuye la concentración, disminuyen las características de desempeño. Esta disminución del rendimiento puede ser ocasionada por la resolución del instrumento o estabilidad de las muestras.

Debido a que ahora se conocen los parámetros de desempeño que presenta el sistema de diluciones de dióxido de titanio, y se conoce la incertidumbre asociada a las mediciones realizadas, el sistema de diluciones cuenta con valores de exactitud y desempeño establecidos, por lo cual se establecen las bases para estudios que se pudieran derivar del nuestro, los cuales mencionaremos en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO V: TRABAJO A FUTURO

El propósito de este capítulo es presentar los principales trabajos que se pueden realizar para complementar esta investigación acerca de la radiación solar, especialmente la radiación ultravioleta, y sus causas sobre los seres humanos, basados en los resultados obtenidos por medio del presente trabajo.

Cuando se estudia la radiación solar, se adentra a un tema muy estudiado en la actualidad, debido a la mayor frecuencia de las patologías que causa la RUV, de manera que se buscan métodos alternos, que sean más eficaces y económicos en la determinación del comportamiento de los filtros solares.

De esta manera se llevo a cabo este estudio de validación del sistema de diluciones del filtro solar físico de dióxido de titanio, para evaluar el comportamiento y establecer el desempeño que este sistema de diluciones presenta durante su estudio ante la radiación UV.

Con la validación del sistema de diluciones de dióxido de titanio se habré la puerta a proyectos futuros que aporten un conocimiento mas completo sobre este tema. Por eso en este capítulo se establecerán los principales proyectos que se pudieran derivar de este trabajo, de manera que se tenga un estudio mas completo alrededor del tema principal.

5.1 Estudios propuestos que se pudieran derivar de esta investigación.

Con el presente trabajo se dejan los parámetros establecidos para que el sistema de diluciones de dióxido de titanio, sea una plataforma en estudios posteriores. Entre ellos se puede derivar algunos como los siguientes:

- Llevar a cabo una validación parcial de las mismas diluciones pero en condiciones de medición controladas, temperatura y humedad relativa. Se podría decir que se trabajo en condiciones controladas debido a que estas condiciones no tuvieron variaciones grandes durante la medición y en la mayoría de las veces se mantuvieron constantes, aun así es necesario verificar que esas variaciones pequeñas no afectan la respuesta de medición y en consecuencia la validación.
- Hacer un estudio de estabilidad más completo de las diluciones, que nos muestren el comportamiento que presentan estas diluciones en función del tiempo como consecuencia de la incidencia de la luz solar, de manera que se pueda estimar, el tiempo necesario para trabajar confiablemente con las diluciones antes de que se obtengan resultados incorrectos como consecuencia de la aglomeración causada por la luz y el almacenamiento.
- Se propone también realizar un estudio de validación y estabilidad en las condiciones ambientales a nivel del mar para conocer el nivel de desempeño que se puede alcanzar en estas condiciones, debido a que el mayor uso de los filtros solares se realiza en las playas.
- Debido a que se determinó los parámetros de desempeño del dióxido de titanio a diferentes concentraciones, se propone hacer estudios sometiendo a las diluciones a la radiación UV y determinar el grado de protección que se puede alcanzar, partiendo del desempeño observado por medio de la validación. Esto nos servirá para utilizar de una manera mas adecuada los principios activos como el dióxido de titanio en la elaboración de filtros solares.

GLOSARIO DE TÉRMINOS UTILIZADOS

(Basado en el vocabulario internacional de metrología)⁵⁶

Calibración: Operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación.

Condiciones de precisión intermedia: Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que pueda incluir otras condiciones que involucren variaciones.

Condiciones de repetibilidad: Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de objetos similares en un periodo de tiempo cortó.

Condiciones de reproducibilidad: Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye diferentes lugares, operadores, sistema de medida y mediciones repetidas de los mismo objetos u objetos similares.

Contribuciones a la incertidumbre: Declaración de una incertidumbre de medida y las componentes de esa incertidumbre, junto con su cálculo y combinación.

Curva de calibración: Expresión e la relación entre una indicación y el valor medido correspondiente.

Desviación estándar de repetibilidad: Es la desviación estándar obtenida a partir de un número dado de determinaciones bajo condiciones de repetibilidad, es decir, es una medida de la dispersión de la distribución de los resultados de una prueba obtenidos bajo condiciones de repetibilidad.

Eritema: Inflamación superficial de la piel, caracterizada por manchas rojas.

Error aleatorio: Componente del error de medición que, en mediciones repetidas varía de manera impredecible.

Error de medición: Diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia.

Error sistemático: Componente del error de medición que, en mediciones repetidas permanece constante o varía de manera predecible.

Especificidad: Se refiere a la capacidad de un método o un test de screening para determinar sin equivocación un analito en presencia de otros componentes que en su conjunto se localizan dentro de la muestra a analizar.

Espectrofotómetro: Es un instrumento diseñado para medir la energía radiante o flujo radiante que es transmitido, reflejado o absorbido por un material traslucido, como una función de la longitud de onda de dicha energía o flujo.

Exactitud: Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando.

Evaluación tipo A de la incertidumbre: Evaluación de una componente de la incertidumbre de medida mediante un análisis estadístico de los valores medidos obtenidos bajo condiciones de medida definidas.

Evaluación tipo B de la incertidumbre: Evaluación de una componente de la incertidumbre de medida de manera distinta a una evaluación tipo A de la incertidumbre de medida.

Factor de cobertura: Número mayor que uno por el que se multiplica una incertidumbre típica combinada para obtener una incertidumbre expandida.

Falso negativo: Resultado negativo cuando el método de referencia da un resultado positivo.

Falso positivo: Resultado positivo cuando el método de referencia da un resultado negativo.

Incertidumbre: Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza.

Incertidumbre típica o estándar: Incertidumbre de medida expresada como una desviación típica.

Incertidumbre típica combinada o estándar combinada: Incertidumbre típica obtenida a partir de las incertidumbres típicas individuales asociadas a las magnitudes de entrada de un modelo de medición.

Incertidumbre típica relativa o estándar relativa: Cociente entre la incertidumbre típica y el valor absoluto del valor medido.

Incertidumbre expandida: Producto de una incertidumbre típica combinada y un factor mayor que uno, factor de cobertura.

Incertidumbre instrumental: Componente de la incertidumbre de medida que procede del instrumento o sistema de medida utilizado.

Índice de falsos positivos: Se calcula por medio de las siguientes formulas:

Índice de falsos positivos (%)= falsos positivos X 100/total de negativos conocidos.

Índice de falsos negativos (%)=falsos negativos X 100/ total de positivos conocidos.

Interferencia: Es aquella especie química que provoca un error sistemático en la determinación de un analito.

Intervalo: Amplitud entre las concentración mayor y menor donde se puede identificar un analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad mediante el método empleado y donde se aplicara el mismo.

Instrumento de medida: Dispositivo utilizado para realizar mediciones, solo o asociado a uno o varios dispositivos suplementarios.

Límite de cuantificación (LoQ): Se refiere a la mínima concentración de una analito presente en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con un nivel de precisión, exactitud e incertidumbre aceptable.

Límite de detección: Valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia.

Límite de repetibilidad “r”: Valor menor o igual a aquel de la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales, obtenidos bajo condiciones de repetibilidad.

El límite de repetibilidad se calcula mediante la formula: $r = t_{\infty} x \sqrt{2} x \sigma_r$

Donde t_{∞} es el valor de Student en dos sentidos para $v=\infty$ a una confianza dada (el nivel de confianza normal establecido es de 95% cuyo valor es 1,96), y σ_{∞} es la desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad.

Linealidad: Capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra dentro de un intervalo dado, es decir, es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual los resultados obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito.

Magnitud: Propiedad o fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia.

Magnitud de entrada: Magnitud que debe ser medida, o magnitud cuyo valor puede obtenerse de otra manera, para calcular un valor medido de un mensurando.

Magnitud de influencia: Magnitud que, en una medición directa, no afecta a la magnitud que realmente se está midiendo, pero sí afecta a la relación entre la indicación y el resultado de medida.

Magnitud de salida: Magnitud cuyo valor medido se calcula mediante los valores de las magnitudes de entrada en un modelo de medición.

Matriz: Conjunto de elementos del mismo tipo que comparten un elemento común.

Materiales de referencia (MR): Material o sustancia en donde el valor de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos para ser utilizados en la calibración de aparatos o en la evaluación de métodos de medición, también llamados patrones de medición, pero sus valores carecen de una declaración de incertidumbre donde su trazabilidad es cuestionable y sus pruebas de significación se basan en la fidelidad observable de sus resultados.

Material de referencia certificado (MRC): Son materiales de referencia acompañados de un certificado, en el cual uno o más de los valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento o técnica de validación que establece su trazabilidad y cada valor se acompaña de su incertidumbre conocida con un nivel declarado de confianza que están sujetos a normas internacionales y pueden emplearse para estudiar simultáneamente todos los aspectos de sesgo.

Medición: Proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que pueden atribuirse razonablemente a una magnitud.

Mensurando: Magnitud que se desea medir. En química, la sustancia a analizar, el analito o el nombre de la sustancia o compuesto, se emplean algunas veces en lugar de mensurando. Esta práctica es errónea debido a que estos términos no se refieren a magnitudes.

Método de medición: Descripción genérica de la secuencia lógica de operaciones utilizadas en una medición. Pueden clasificarse en varias maneras como: método de sustitución, método diferencial, método de cero o método directo, método indirecto.

Método desarrollado por el laboratorio: Es un método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollados por el propio laboratorio.

Método no normalizado: Es un método analítico desarrollado por un tercero que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado.

Método normalizado: Es un método analítico desarrollado o publicado por un organismo de normalización sea internacional, regional o nacional u otro organismo

reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por sectores técnicos y que están publicados en normas oficiales.

Muestra blanco o testigo: Es una muestra que no va a someterse al tratamiento, y contra la que se va a comparar los resultados de las demás muestras tratadas.

Nivel de confianza: Es la probabilidad que el valor del mensurando permanezca dentro de la amplitud del rango de incertidumbre.

Parámetros de desempeño de un método analítico: Son características cuantificables de un método que indican el grado de calidad del método, que necesitan ser evaluadas y que corresponden a: límite de detección, límite de cuantificación, incertidumbre, selectividad, especificidad, sensibilidad, robustez, precisión, linealidad e intervalo de medición, veracidad y otras características relacionadas con los resultados obtenidos.

Precisión: Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Precisión intermedia: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de precisión intermedia.

Procedimiento analítico: Es la manera en que se realiza un análisis. Este describe con detalle los pasos necesarios para realizar una prueba analítica. Puede tener los siguientes conocimientos: características de la muestra, preparación de los estándares de referencia y reactivos, uso de aparatos o instrumentos, generación de la curva de calibración, uso de formulas para cálculos.

Procedimiento de medición: Descripción detallada de una medición con forma a uno o más principios de medida y a un método de medida dado, basado en un modelo de medida y que incluye los cálculos necesarios para obtener un resultado de medida.

Rango: Es el intervalo de concentraciones de un analito dentro del cual este método ofrece resultados proporcionales a su concentración y puede considerarse validado.

Recuperación: Proporción o cantidad del analito presente o adicionada a una muestra que se cuantifica efectivamente por el método, empleado como indicativo de la eficiencia de este método para detectar cierto analito y que se expresa como el cociente de la cantidad medida del analito y el contenido de la muestra.

Repetibilidad: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Reproducibilidad: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.

Residuo: Se trata de la diferencia entre una medida de una magnitud determinada y el valor promedio calculado para esa magnitud.

Resultado de medición: Conjunto de valores de una magnitud atribuidos a un mensurando acompañados de cualquier otra información relevante disponible.

Robustez: Es un estudio realizado para medir o evaluar la capacidad o resistencia de los resultados de un método de permanecer inalterados por pequeñas variaciones intencionadas (o condiciones como las ambientales y/o de operación) en los parámetros del mismo método y nos permite obtener información acerca de su confiabilidad durante su uso normal.

Selectividad: Se refiere a la habilidad o capacidad de un procedimiento analítico para determinar exactamente y específicamente un analito de interés en presencia de varias interferencias en una matriz de muestra, de acuerdo al procedimiento dado y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz completa.

Sensibilidad: Es la capacidad o habilidad de un método de detectar cambios en la respuesta de un instrumento de medición, dividido por el correspondiente cambio del estímulo o señal de entrada aludiendo a la pendiente de calibración.

Sesgo: Valor estimado de un error sistemático.

Trazabilidad: Propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida.

Validación: Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para el uso previsto.

Valor de referencia: Valor de una magnitud que sirve como base de comparación con valores de magnitudes de la misma naturaleza.

Valor verdadero de una medición: Valor de una magnitud comparable con la definición de la magnitud.

Veracidad: Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. No es una magnitud y esta inversamente relacionada con el error sistemático.

Verificación: Aportación de evidencia objetiva de que un elemento satisface los requisitos especificados.

ANEXOS

A.1 Análisis de varianza (ANOVA).

El ANOVA, análisis de varianza, es un procedimiento que nos permite identificar la variación observada entre grupos o poblaciones diferentes que pueden atribuirse a diferentes causas de interés, es decir, se puede utilizar en las situaciones en las que nos interesa analizar una respuesta cuantitativa, llamada habitualmente variable dependiente, medida bajo ciertas condiciones experimentales identificadas por una o mas variables categóricas, llamadas variables independientes.^{44, 45, 46}

Teóricamente es posible dividir la variabilidad que se estudia en dos partes: la producida por el factor en cuestión y la producida por los factores restantes que entran en juego, conocidos o no, controlables o no, que se conocen como error experimental.⁴⁷

Cuando hay una sola variable que proporciona condiciones experimentales distintas, el análisis recibe el nombre de ANOVA de un factor, unifactorial, es decir, se emplea para estudiar el efecto de un cierto factor sobre las muestras tomadas, y si se aplica a solo dos muestras coincide con el modelo de t de student, es decir, el modelo de student es un caso particular de ANOVA^{46, 48}.

En este procedimiento se establece la hipótesis nula que indica que no existe variación significativa entre los grupos o poblaciones y la hipótesis alternativa que indica que al menos una de las medias es diferente. Para ello se calcula el estadístico f que compara la variación entre los grupos con la variación dentro de los grupos. Este modelo se aplica sólo si se cumplen las siguientes suposiciones^{45, 46, 47}:

- Las varianzas de los grupos son iguales, homogeneidad de varianza,
- Distribución normal de los errores.
- Las observaciones deben ser independientes, aleatorias y provenir de una distribución normal.

Si las suposiciones no se cumplen, los resultados del análisis pueden ser inexactos.

Suponiendo que las medias de los grupos son iguales, la variación entre los grupos es comparable a la variación entre los individuos, si la primera es mucho mayor que la segunda, puede indicar que las medias en realidad no son iguales. El objetivo principal

del ANOVA es contrastar si existen diferencias entre las diferentes medias de los niveles de las variables. La variación observada en la respuesta se asume que es debida al efecto de las variables categóricas, aunque también se asume que existe cierto error aleatorio independiente que explica la variación residual. Se asume también que dicho error aleatorio sigue una distribución normal con media 0 y varianza constante.⁴⁶

Este modelo se basa en la comparación de la suma de cuadrados entre grupos y dentro de los grupos, ambas sumas son estimaciones independientes de la variabilidad global, de manera que si el cociente entre la primera y la segunda es grande, se tendrá mayor probabilidad de rechazar la hipótesis nula.

$$SCE = \sum_{j=1}^r n_j \left(\bar{X}_{.j} - \bar{X}_{..} \right)^2.$$

SCE = suma de cuadrados entre grupos.

r = número de grupos

n_j = número de individuos en cada grupo.

$\bar{X}_{.j}$ = media de cada grupo.

$\bar{X}_{..}$ = media global.

$$SCD = \sum_{j=1}^r \sum_{i=1}^{n_j} \left(X_{ij} - \bar{X}_{.j} \right)^2 = \sum_{j=1}^r \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2 - \sum_{j=1}^r n_j \bar{X}_{.j}^2.$$

SCD = suma de cuadrados dentro de grupos.

$$SCT = \sum_{j=1}^r \sum_{i=1}^{n_j} \left(X_{ij} - \bar{X}_{..} \right)^2.$$

SCT = suma de cuadrados total.

Se puede demostrar que $SCT = SCE + SCD$ es decir, la variabilidad de los datos se expresa como la suma de la variabilidad debida a los grupos o variabilidad explicada mas la variabilidad dentro de los grupos o variabilidad no explicada.

Es necesario calcular los grados de libertad de la siguiente manera:

Grados de libertad entre grupos: $r - 1$.

Grados de libertad dentro de los grupos: $n - r$.

Grados de libertad total: $n - 1$.

Para calcular los cuadrados medios se utilizan las siguientes fórmulas:

$$CME = \frac{SCE}{GLE}.$$

$$CMD = \frac{SCD}{GLD}.$$

CME = cuadrado medio entre grupos.

CMD = cuadrado medio dentro de los grupos.

El estadístico de contraste utilizado para realizar la prueba de ANOVA es el f de snedecor calculado de la siguiente manera:

$$F = \frac{CME}{CMD}.$$

Una media relativa de la variabilidad explicada por los grupos es mediante el coeficiente de determinación, el cual estará entre cero y uno, mientras más próximo este de uno, existirá más variabilidad no explicada o residual.⁴⁶

$$R^2 = \frac{SCE}{SCT}.$$

Cuando el f calculado es mayor que f crítica se rechaza la hipótesis nula planteada que indica que no existe variabilidad significativa entre los grupos y que la variabilidad existente se debe únicamente al azar⁴⁸.

A.2 Sesgo

En un método de medición primario, el valor considerado como verdadero está en términos del mismo método de medición y por lo tanto por definición se considera que no hay sesgo.⁴⁹

Cuando hablamos de sesgo nos referimos a una comparación basada en la diferencia entre el valor obtenido de un conjunto de mediciones y el valor verdadero de referencia aceptado, la cual nos caracteriza el error sistemático de un procedimiento analítico en comparación con el error aleatorio. El sesgo generalmente se obtiene de la prueba de veracidad y se hace un contraste de hipótesis para observar si existe o no, suficiente evidencia estadística para creer que no existe un error sistemático. Al sesgo lo podemos calcular por medio de la siguiente fórmula de la cual deducimos que una mayor

diferencia entre el valor verdadero y el valor de referencia nos lleva a tener un valor de sesgo mayor.^{16, 17, 28, 49}

$$\text{Sesgo} = \text{Valor obtenido} - \text{Valor verdadero.}$$

A.3 Prueba de kolmogorov-Smirnov

Se trata de un modelo no paramétrico que no depende de una distribución original específica, por lo cual se trata de distribuciones libres sin parámetros prefijados. Su aplicación es en distribuciones de tipo continuas y se considera conservadora. Su principio se basa en la diferencia de frecuencias acumuladas de las distribuciones a comparar, obteniendo una discrepancia, en valor absoluto, entre las frecuencias relativas observadas y las esperadas. Además nos proporciona un valor de probabilidad que nos indica que tanto se parece la distribución observada a la distribución esperada. Si la probabilidad es grande no habrá razones estadísticas para suponer que nuestros datos no proceden de esa distribución, en caso contrario, no es aceptable suponer ese modelo probabilístico para los datos.^{48, 53, 54}

El estadígrafo calculado es el $D_{\text{máx}}$, que nos indica la mayor diferencia, en valor absoluto, entre las frecuencias de las dos distribuciones, el cual se compara con los valores críticos obtenidos de las tablas. Este modelo tiene ventajas cuando se aplica a muestras pequeñas y nos permite construir límites de confianza para la distribución acumulada completa.⁴⁸

Criterios en la toma de decisiones⁵²:

$$D_{\text{máx}} \leq D_{\alpha} \quad \text{se acepta } H_0$$

$$D_{\text{máx}} > D_{\alpha} \quad \text{se rechaza } H_0$$

Estadígrafos utilizados⁵²:

$$D^- = \max_{1 \leq i \leq n} \left\{ \frac{i}{n} - F_0(x_i) \right\} \quad D = \max_{1 \leq i \leq n} \left\{ F_0(x_i) - \frac{i-1}{n} \right\}$$

$$D = \text{máx} \{ D^+, D^- \}.$$

Cuanto mayor sea la discrepancia entre la distribución observada y la distribución esperada mayor será el valor de $D_{\text{máx}}$.

El valor crítico se puede obtener en tablas o mediante la fórmula siguiente⁵²:

$$D_{\alpha} = \frac{c_{\alpha}}{k(n)}$$

C_{α}	A		
Modelo	0,1	0,05	0,01
General	1,224	1,358	1,628
Normal	0,819	0,895	1,035
Exponencial	0,990	1,094	1,308

Distribución a contrastar	$K(n)$
General. Parámetros conocidos	$K(n) = \sqrt{n} + 0,12 + 0,11/\sqrt{n}$
Normal	$K(n) = \sqrt{n} - 0,01 + 0,85/\sqrt{n}$
Exponencial	$K(n) = \sqrt{n} + 0,12 + 0,11/\sqrt{n}$

A.4 Estabilidad y consistencia de las diluciones.

Es de utilidad conocer la consistencia y estabilidad de las muestras en condiciones de repetibilidad. Cuando hablamos de consistencia nos referimos a la habilidad que tiene un proceso de medición de mantener constante la magnitud de sus errores aleatorios de causa común conforme pasa el tiempo. Si un proceso de medición tiene problemas de consistencia se considera que no es válido.⁴⁹

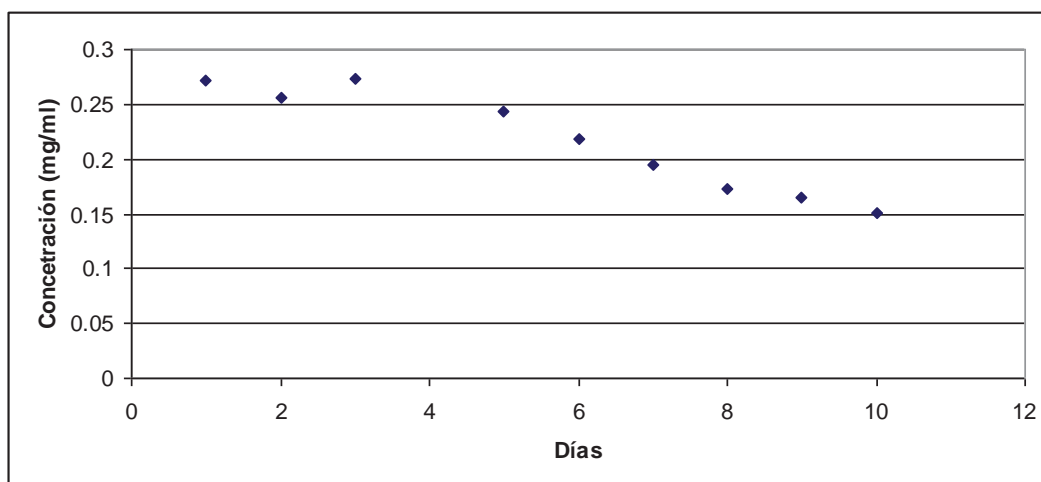
Definimos a la estabilidad como la habilidad o capacidad que tiene un proceso de medición o un principio activo de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y mantener por determinado tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones de calidad establecidas, además, provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normal.^{49, 50}

Un estudio de estabilidad se refiere a una serie de pruebas relacionadas con las características físicas, químicas, biológicas y microbiológicas de un principio activo o un producto farmacéutico, que se efectúan para obtener información sobre las condiciones en las que se deben procesar y almacenar las materias primas o los

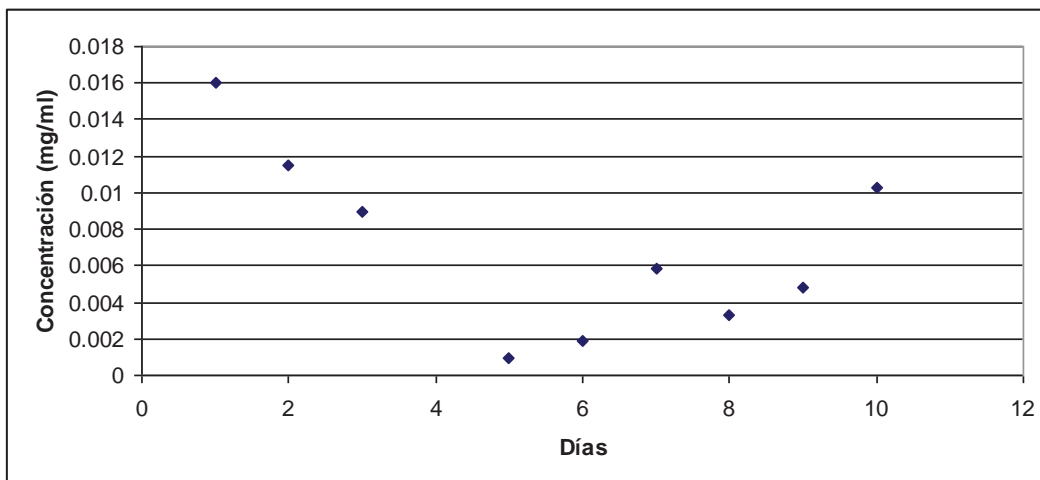
productos semielaborados y terminados, según sea el caso. Las pruebas de estabilidad también se emplean para determinar la vida útil del principio activo en su envase primario original y en condiciones de almacenamiento especificadas. Los estudios de estabilidad se deben diseñar de acuerdo a las características del principio activo, así como de las condiciones climáticas de la zona.^{50, 51}

El propósito de nuestro estudio es estimar si se presentan alteraciones causadas por la luz que incide de manera normal sobre las diluciones.

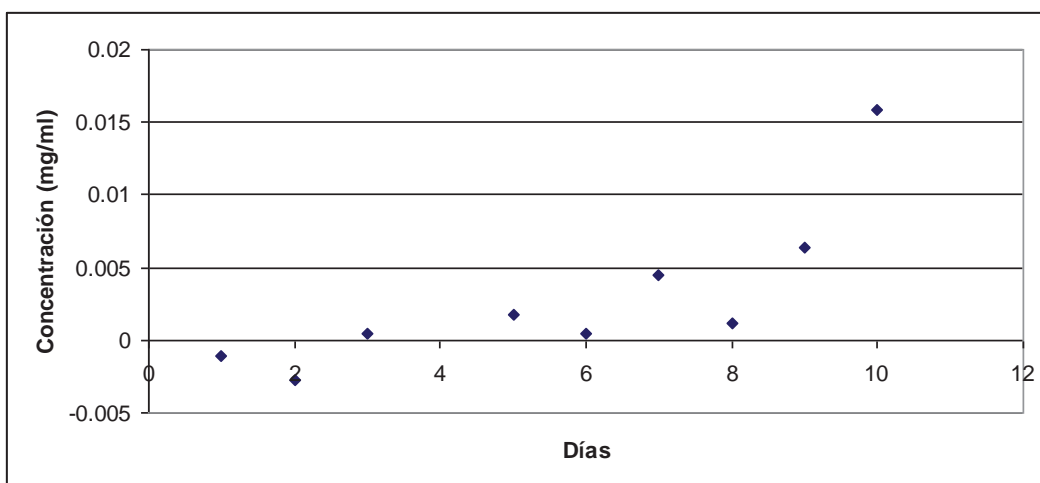
El desarrollo del estudio de estabilidad se llevo a cabo midiendo en condiciones normales las diluciones por 10 días. Las diluciones se pusieron en recipientes transparentes para que la luz le incidiera de manera normal, en las mismas condiciones a las cuales se llevo a cabo las mediciones para la validación obteniendo los siguientes resultados.



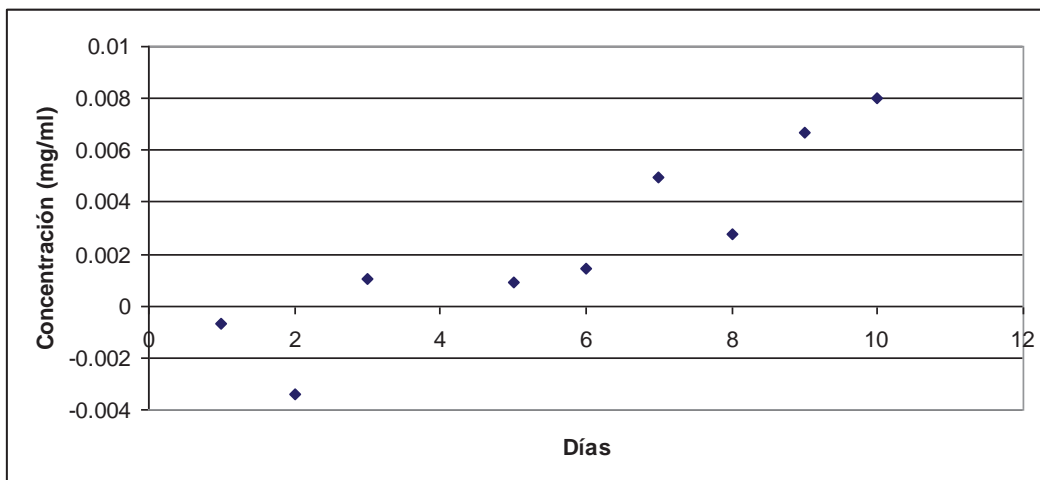
Gráfica A.4.1 Estudio de estabilidad para la dilución 2 a 320 nm. Se muestra la degradación de la concentración que se presenta en función del tiempo.



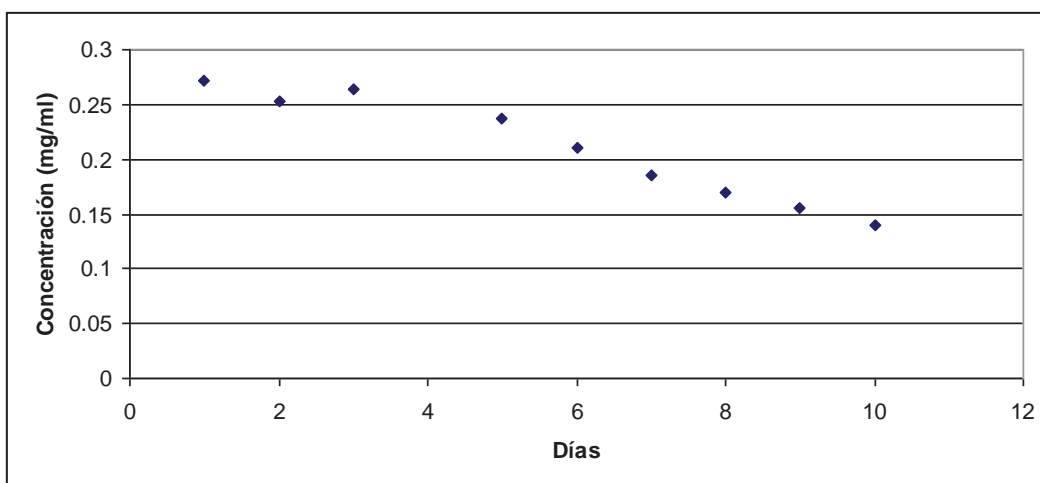
Gráfica A.4.2 Estudio de estabilidad para la dilución 3 a 320 nm. Se muestra la degradación de la concentración que se presenta en función del tiempo.



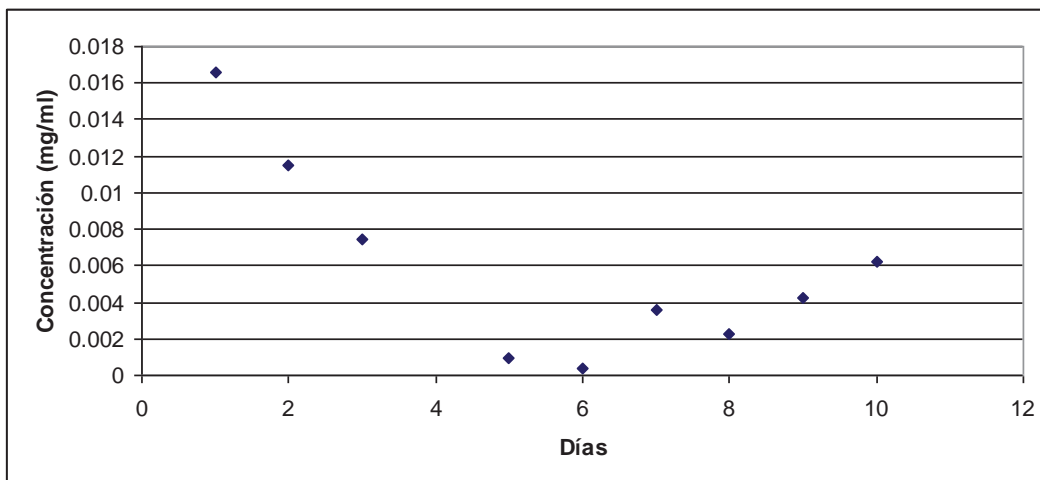
Gráfica A.4.3 Estudio de estabilidad para la dilución 4 a 320 nm. Se muestra la alteración que se presenta en la concentración por efecto de luz a través del tiempo.



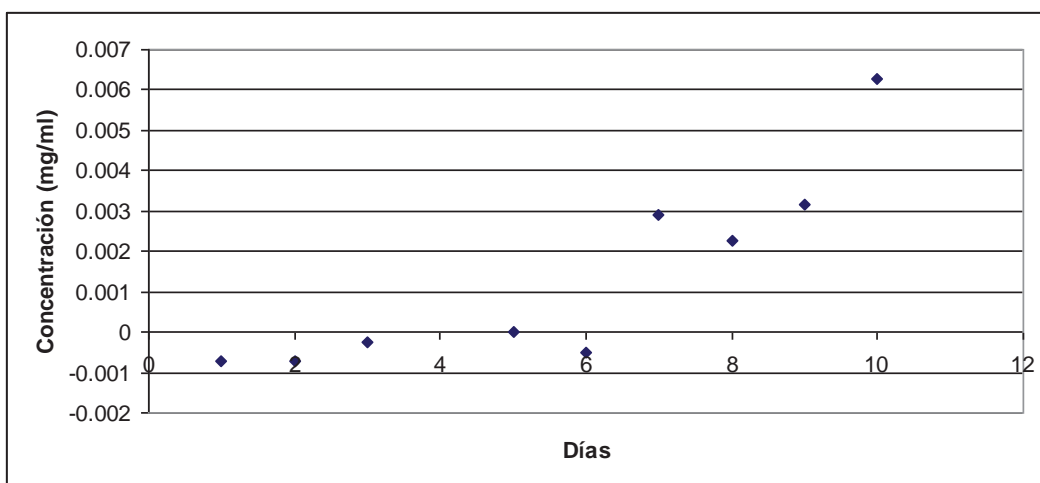
Gráfica A.4.4 Estudio de estabilidad para la dilución 5 a 320 nm. Se muestra la alteración que se presenta en la concentración por efecto de luz a través del tiempo.



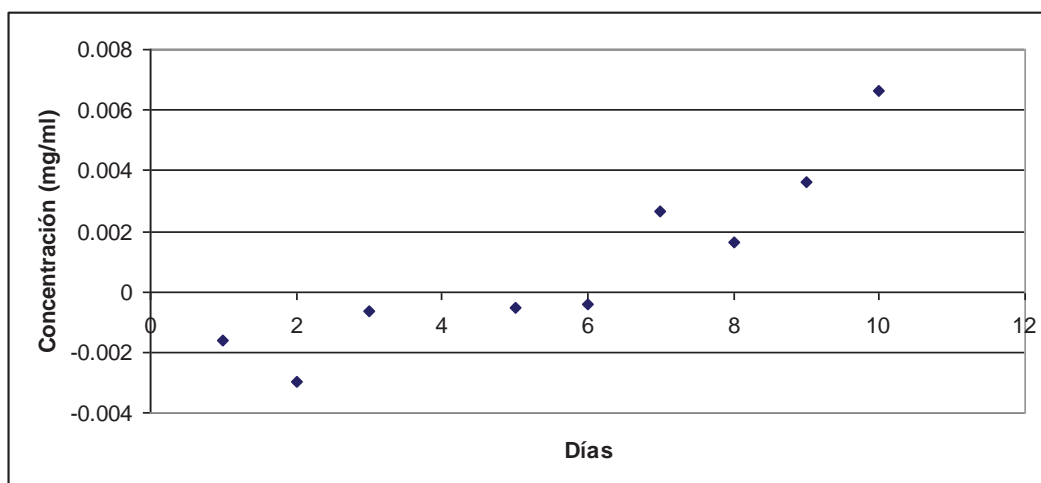
Gráfica A.4.5 Estudio de estabilidad para la dilución 2 a 632,8 nm. Se muestra la degradación en la concentración que se presenta en función del tiempo.



Gráfica A.4.6 Estudio de la estabilidad para la dilución 3 a 632,8 nm. Se muestra la degradación en la concentración que se presenta en función del tiempo.



Gráfica A.4.7 Estudio de estabilidad para la dilución 4 a 632,8 nm. Se muestra la alteración que se presenta en la concentración por efecto de luz a través del tiempo.



Gráfica A.4.8 Estudio de estabilidad para la dilución 5 a 632,8 nm. Se muestra la alteración que se presenta en la concentración por efecto de la luz a través del tiempo.

Como se puede observar en las graficas, el efecto de la luz altera las mediciones provocando mediciones inexactas a medida que el tiempo transcurre, debido que la luz solar reduce y aglomera las partículas de dióxido de titanio, por lo cual sugerimos que las mediciones se realicen en el menor tiempo posible o que las diluciones se preparen en el momento de su utilización. En las diluciones de concentración 0,2717 mg/ml y 0,0136 mg/ml, diluciones 2 y 3, se presenta una disminución de la concentración con respecto al tiempo, esto debido a que la luz aglomera las partículas de dióxido de titanio provocando que se abran espacios y exista un mayor porcentaje transmitancia.

En las últimas diluciones se presenta lo contrario, existe un ligero aumento de la concentración a través del tiempo, esto debido a que en estas diluciones las partículas se encuentran muy dispersas y al incidirles la luz existe un mayor porcentaje de transmitancia, pero a medida que la luz incide sobre las partículas provoca su aglomeración aumentando el tamaño de las partículas, lo cual ocasiona que exista una mayor absorción de la luz disminuyendo el porcentaje de transmitancia.

Cabe mencionar que las diluciones de dióxido de titanio utilizadas para la validación se prepararon en el momento en que se realizaría la medición. Aunque esta determinación nos muestra el comportamiento de las diluciones por el efecto de la luz en un tiempo de 10 días, es necesario realizar un estudio de estabilidad más completo que nos permita sustentar nuestras afirmaciones y determinar de manera más confiable el intervalo de

tiempo en el cual es posible hacer las determinaciones con un grado adecuado de exactitud. A pesar de que las mediciones de estabilidad se realizaron en diez días, tiempo de almacenamiento corto, es conveniente determinar si la aglomeración de las partículas de dióxido de titanio es debido únicamente a la radiación solar o si tiene influencia el tiempo de almacenamiento, debido a que se encontró en la literatura que existe aglomeración de estas partículas como consecuencia del almacenamiento.

REFERENCIAS

- 1.- Duro Mota E., Campillos Páez M.T, Causín Serrano S. “El sol y los filtros solares.” [En línea]. Hablemos de..., radiación solar, Vol. 13-Num.3-Marzo 2003, MEDIFAM 003; 13:159-165. Disponible en:< <http://scielo.isciii.es/pdf/medif/v13n3/hablemos1.pdf> > [Consulta: 04/02/10].
- 2.- Inés M. Algaba Joaquín. “Protección ultravioleta proporcionada por los textiles: estudio de la influencia de las variables mas significativas y aplicación de productos específicos para su mejora.” [Tesis doctoral]. Memoria de la tesis doctoral.
- 3.- Mulero Abellán Miquel. “Efecto de la Radiación ultravioleta (RUV) sobre los procesos de estrés oxidativo e inmunodepresión cutánea. Efecto protector de los filtros solares.”[Tesis doctoral]. Facultad de medicina, Universidad “Rovira I Virgili”, Reus 2004.
4. - Tanner, Paul, Robert, Irwin, Christopher y Donoughue, Margaret, Ann. “Composición de filtro solar.” [En línea]. Traducción de patente europea (España), Num. de publicación 2221411, fecha de publicación 23.05.2001. Disponible en:<http://www.espatentes.com/pdf/2221411_t3.pdf> [Consulta: 03/02/09].
- 5.- “Espectrofotometría de absorción visible-UV: Complejos de cobre $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$ y $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$.” [En línea]. Ingeniero Técnico en Químico Industrial, Experimentación en Química, Universidad de Oviedo. Disponible en:< http://156.35.33.98/QFAnalitica/trans/ExpquimDimas/PRACT_17_Espectrofotometria_vis_UV.pdf> [Consulta: 24/02/10].
- 6.-”Métodos espectroscópicos.” [En línea]. Disponible en:< <http://www.montes.upm.es/Dptos/DptoIngForestal/OperacionesBasicas/Docencia/PDF/Temas/TEMA7.pdf>> [Consulta: 03/03/10].
- 7.- Germán Roberto. “Introducción a la fotometría.” [En línea]. Staub-Químico-U. Disponible en:< <http://www.scribd.com/doc/18936014/introduccion-a-la-fotometria>> [Consulta: 08/10/09].
- 8.- Facultad de ciencias químicas. “Análisis cuantitativo de la absorción de radiación electromagnética.” [En línea]. Espectrofotometría, universidad autónoma de chihuahua. Disponible en:<<http://www.fcq.uach.mx>> [Consulta: 02/02/10]
- 9.- “Práctica de espectrofotometría UV-Visible.” [En línea]. Cumplimiento de la ley de lambert-Beer y análisis de mezclas. Disponible en: <<http://campus.usal.es/~quimfis/apoyo/Carmen/Practicas/Espectrofotometria.PDF>> [Consulta: 24/02/10].
- 10.- “Espectrofotometría”. [En línea]. Disponible en:< <http://imb.usal.es/formacion/doctorado/cursos/tecnicas/Espectrofotometr%EDa.pdf>> [Consulta: 24/02/10].
- 11.- Skoog, Holler, Nieman. “Principios de análisis instrumental.” [Libro]. Quinta edición, McGraw Hill, Pág. 325-327, España.
- 12.- Departamento de salud ocupacional y contaminación ambiental. “Exposición laboral a la RUVde origen solar.” [En línea]. Sección Radiaciones Ionizantes y no Ionizantes, Sección Elementos de Protección Personal, Gobierno de Chile, Instituto de Salud Publica de Chile, Enero 2007. Disponible en:< http://www.ispch.cl/salud_occup/hig_seg/rad_ionizantes/doc/Radiacion.pdf> [Consulta: 24/02/10].

- 13.- Elsom, Incola, Anne y Galley, Edward. "Filtros solares de dióxido de titanio." [En línea]. Traducción de patente europea, Oficina Española de Patentes y Marcas, España, N. de publicación: ES 2 057 522, Fecha de publicación 16-10-94. Disponible en: <http://www.espatentes.com/pdf/2057522_t3.pdf> [Consulta: 19/11/09].
- 14.- UNIVERSIDAD DE SEVILLA. "anexo I: uso del dióxido de titanio como catalizador." [En línea]. E.U. politécnica, máster universitario en ingeniería del agua. Disponible en: <http://prueba2.aguapedia.org/master/presencial/pfm/proyeco_fotocatalisis_solar/Anexo%20I.pdf> [Consulta: 03/02/10].
- 15.- Vitale Maria Alejandra. "Fotoprotección: conceptos básicos y actualización." [En línea]. Revista Peruana de Dermatología, Vol. 12, No 2, 2002. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/dermatologia/v12_n2/fotoproteccion.htm> [Consulta: 02/03/10].
- 16.- Guardado Pérez, Mercader Trejo. "Métodos analíticos adecuados a su propósito." [En línea]. Guía para la validación de métodos y temas relacionados, segunda edición, EURACHEM, CENAM, Querétaro noviembre de 2005, CNM-MRD-030. Disponible en: <<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/default.aspx?arch=/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>> [Consulta: 08/10/09].
- 17.- Reglamento técnico centro americano. "Productos farmacéuticos validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos." [En línea]. RTCA11.03.39:06, Anexo a la resolución No 188-2006 (CONIECO-XL), Editado por: MINECO, CONACYT, MIFIC, SIC, MEIC. Disponible en: <<http://www.comex.go.cr/acuerdos/centroamerica/Resoluciones/ANEXO%20RTCA%20188.pdf>> [Consulta: 10/11/09].
- 18.- Cortés Colín E. Roció. "Validación de métodos de medición." [En línea]. EMA, cumpliendo la misión de servir a México y a nuestros clientes. Disponible en: <<http://www.udlap.mx/Conoce/video/files/02ValidaciondeMetodosdeMedici%C3%B3n.pdf>> [Consulta: 10/11/09].
- 19.- Castellucci Federico. "Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio." [En línea]. Resolución OENO 8/2005, OIV, Paris, 20 de julio de 2005, Informe técnico. Disponible en: <http://news.reseau-concept.net/images/oiv/es/Client/Resolution_OENO_ES_2005_08.pdf> [Consulta: 20/10/09].
- 20.- Oficina de acreditación Guatemala, C.A. "Política de selección y validación de métodos de ensayo." [En línea]. OGA-GEC-016, Guatemala, 29 de enero de 2007. Disponible en: <<http://www.oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-016.pdf>> [Consulta: 10/11/09].
- 21.- Soso Ariel, Rimini Alejandro, Marbán Liliana, Fiorani Viviana. "Validación de métodos analíticos." [En línea]. AACS, BCR, IRAM. Disponible en: <http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf> [Consulta: 20/10/09].
- 22.- García Eva Rosas, Cortés Colín Roció. "Validación con base en los criterios de aplicación de la norma NMX-EC-17025-IMNC.2006 en mediciones químicas y físicas." [En línea]. Semana de la acreditación 2009. Disponible en: <http://www.ema.org.mx/descargas/ema_semac09/11_junio/12aplicacion17025_11junio.pdf> [Consulta: 10/11/09].
- 23.- Moreno Ángel. "Propuesta de documentación de validación de métodos para cumplir con la norma ISO/IEC 17025:1999." [En línea]. CENAM, Laboratorio de impedancia,

- encuentro nacional de metrología eléctrica, Querétaro, México, junio de 2005. Disponible en :< <http://www.cenam.mx/dme/pdf/EXT-Propuesta%20de%20Documentaci%C3%B3n%20de%20Validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos.pdf>> [Consulta: 10/11/09].
- 24.- Álvarez Pablo. “Requerimientos sobre validación de métodos en el marco de la acreditación de laboratorios según la norma ISO 17025.” [En línea]. Instituto nacional de tecnología industrial (INTI), ministerio de producción, secretaria de industria, comercio y de la pequeña y mediana empresa. Disponible en: <<http://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/seminario/apuntes.pdf>> [Consulta: 10/11/09].
- 25.- Organismo Argentino de Acreditación. “Guía para validación de métodos de ensayo.” [En línea]. OAA, Versión 1, Código: DC-LE-05, Fechas de entrada en vigencia: 26-09-2003. Disponible en :< <http://www.oaa.org.ar/evaluadores/DC-LE-05.pdf>> [Consulta: 24/02/10].
- 26.- Barlandas Rendón, Quintana Ponce, Lara Rodríguez, Gudiño Ramírez, Rosas García, Balderas Escamilla, Mitani Nakanishi, Pérez Urquiza. “Guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.” [En línea]. CENAM, EMA, México, abril del 2008. Disponible en: <http://www.ema.org.mx/descargas/guias_tecnicas/ensayos_clinicos/laboratoriosclinicosy00.pdf> [Consulta: 18/11/09].
- 27.- GMIGLIARINO. “Validación de métodos cualitativos “caso de aplicación.” [En línea]. Consultores. Disponible en: <<http://acnet.com/portals/75/PDFs/validacion%20de%20metodos%20cualitativos.pdf>> [Consulta: 20/10/09].
- 28.- Guerrero Postigo Hugo. “Verificación y validación de métodos.” [En línea]. Dirección técnica de acreditación, Instituto boliviano de metrología, DTA-CRI-016, 17 de julio de 2008, versión 1. Disponible en: <<http://www.ibmetro.gob.bo/pdf/acreditacion/DTA-CRI016%20V1%20VERIFICACION%20Y%20VALIDACION%20DE%20METODOS.pdf>> [Consulta: 10/11/09].
- 29.- Germán Roberto. “Validación de métodos de análisis.” [En línea]. Staub Quimic. Disponible en :< <http://www.scribd.com/doc/18950740/Validacion-de-metodos-German-Roberto-Staub>> [Consulta: 18/11/09].
- 30.- “Guía de validación de métodos analíticos”. [En línea]. Disponible en:< <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>> [Consulta: 24/09/09].
- 31.- Maroto Sánchez Alicia. “Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina.” [Tesis doctoral]. Universitat Rovira I Virgili, Facultad de Química, Tarragona, 2002.
- 32.- Moré Chang Carmen Xiomara, Gómez Monteagudo María Bárbara. “Incertidumbre de las mediciones en el laboratorio clínico.” [En línea]. Disponible en: <<http://www.sld.cu/galerias/pdf/uvs/patologiaclinica/incertidumbre.pdf>> [Consulta: 18/11/09].
- 33.- Gonzáles Hernández Rolando, Lora García Janet, Gonzáles Lavaut José Antonio, Sordo Martínez Lissette, Rivera Grau Jacqueline. “Validación retrospectiva de las Técnicas espectrofotométricas para la determinación de las prostaglandinas A2 y B2 en extractos de *Plexaura homomalla*.” [En línea]. Departamento de análisis, centro de química farmacéutica, ciudad de la habana, cuba, acta faro. Bonaerense 20(1): 25-32 (2001), 14 de noviembre de 2000. Disponible en: <http://www.latamjpharm.org/trabajos/20/1/LAJOP_20_1_1_5_XNP37UWC1E.pdf> [Consulta: 03/03/10].

- 34.- “Separaciones.” [En línea]. Química analítica cuantitativa seminario de: “separaciones”. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/depar/areas/quimica/quimica.analitica/qa_arch_matdid/arch_teorias/Temas%20teoricos/Pretratamientos/Seminario%20Separaciones.pdf> [Consulta: 04/03/10].
- 35.- Boqué Ricard. “La selectividad en análisis químico.” [En línea]. Grupo de quimiometría y cualimetría, Universidad de Rovira i Virgili (Tarragona). Disponible en: <<http://www.quimica.urv.es/quimio/general/selectividad.pdf>> [Consulta: 04/03/10].
- 36.- Wolfgang A. Schmid y Ruben J. Lazos Martínez. “Guía para estimar la incertidumbre” [en línea]. CENAM, Querétaro, México, abril de 2004. Disponible en: <<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/Default.aspx>> [Consulta: 16/02/10].
- 37.- Ruíz Orozco Arquímedes. “Estimación de la incertidumbre en espectrofotómetros UV-Vis.” [Artículo]. Publicación técnica CNM-MFO-PT-002, CENAM, Área de metrología física, división de óptica y radiometría, Querétaro, segunda impresión diciembre 2002.
- 38.- Ruíz Orozco Arquímedes. “Métodos y pruebas para la caracterización del espectrofotómetro del CENAM.” [Artículo]. Publicación técnica CNM-MFO-PT-001, CENAM, Área de metrología física, división de óptica y radiometría, Querétaro, segunda impresión diciembre 2002.
- 39.- Gillian Chaloner-Larsson, Roger Anderson, Anik Egan. “Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF).” [En línea]. Segunda parte: Validación, Programa mundial de vacunas e inmunización, Suministro y Calidad de las vacunas, Red mundial de capacitación, Organización mundial de la salud Ginebra 1998, agosto de 1998. Disponible en: <<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9811.pdf>> [Consulta: 24/02/10].
- 40.- Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. “Anexo 15 Cualificación y validación.” [En línea]. Ministerio de Sanidad y Consumo. Disponible en: <<http://www.aemps.es/actividad/sgInspeccion/docs/28-anexo15.pdf>> [Consulta: 03/03/10].
- 41.- Rodríguez Rebeca. “Validación de procesos.” [En línea]. Experto Nacional en Medicamentos, FDA. Disponible en: <<http://www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/bpm-validacion-procesos-fda.ppt#42>> [Consulta: 04/03/10].
- 42.- Rondón Lugo Antonio. “Fotoprevención y Fotoprotección.” [En línea]. Coordinador comité de bioética, Inst. Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, 11 de mayo del 2008. Disponible en: <<http://antoniorondonlugo.com/blog/?p=838>> [Consulta: 03/03/10].
- 43.- Nogal Ruiz Juan José. “Modelo experimental de *Tricomonas vaginalis*: estudios de quimiosensibilidad, patogenia e inmunomodulación.” [Tesis doctoral.] Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Parasitología.
- 44.- Molinero M. Luís, “Análisis de varianza.” [En línea]. Asociación de la sociedad española de hipertensión, Liga española para la lucha contra la hipertensión arterial, Junio 2003. Disponible en: <<http://www.seh-lelha.org/anova.htm>> [Consulta: 16/03/10].
- 45.- Young W. Forrest, Bann M. Carla. “Analysis of Variance.” [En línea]. The L.L. Thurstone, Psychometric Laboratory, University of North Carolina, Visual Statistics Project, January 2000. Disponible en: > <http://www.uv.es/visualstats/vista-frames/pdf/anova.pdf>> [Consulta: 15/04/10].

- 46.- "ANOVA un factor y Kruskal-Wallis." [En línea]. Disponible en:<http://www.uclm.es/profesorado/mdsalvador/58109/teoria/anova_un_factor-lectura.pdf> [Consulta: 15/04/10].
- 47.- "Bioestadística: Métodos y aplicaciones" [En Línea]. Disponible en:<<http://www.bioestadistica.uma.es/libro/>> [Consulta: 15/04/10].
- 48.- Renzo Azzimonti J.C. "Bioestadística aplicada a bioquímica y farmacia." [En línea]. arroi_pss@ciudad.com.ar Segunda edición. Disponible en: <<http://www.scribd.com/doc/2904463/Bioestadistica-Aplicada-a-Bioquimica-y-Farmacia>> [Consulta: 15/04/10].
- 49.- Ramírez Martínez Ricardo. "Validación de métodos." [Manual de diplomado]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Física y matemáticas, modulo V, Morelia Michoacán, Enero 2010.
- 50.- Reglamento técnico centro americano. "Productos farmacéuticos. Estudios de estabilidad de medicamentos para uso humano." [En línea]. RTCA 11.01.04:09., primera actualización, ICS 11.120.10. Disponible en:<<http://www.reglatec.go.cr/consulta/rtc-11-01-04-2009.pdf>> [Consulta: 18/04/10].
- 51.- Instituto de salud publica de chile. "Propuesta de guía para la realización de estudios de estabilidad de productos farmacéuticos." [En línea]. Gobierno de chile, ministerio de salud, departamento de control nacional. Disponible en:<http://www.ispch.cl/encabezado/doc_consulta/estabilidad.pdf> [Consulta: 14/04/10].
- 52.- "Prueba de bondad de ajuste de kolmogorov-smirnov (KS)." [En línea]. Disponible en:<http://www.ulpgc.es/hege/almacen/download/5/5015/Complemento_3_Prueba_de_Bondad_de_Ajuste_de_Kolmogorov_Smirnov.pdf> [Consulta: 14/04/10].
- 53.- Raíz Srinivasan, Sargur N. Srihari y Matthew J. Beal. "Signatura Verification Using Kolmogorov-Smirnov Statistic." [En línea]. January 9, 2005. Disponible en: <<http://www.google.com.mx/search?hl=es&ei=2WLGS-2nKZD0sgP0nNW2DQ&sa=X&oi=spell&resnum=0&ct=result&cd=1&ved=0CAUQB SgA&q=Signature+Verification+Using+Kolmogorov-Smirnov+Statistic.+pdf&spell=1>> [Consulta: 14/04/10].
- 54.- Molinero M. Luís. "Bondad de ajuste a una normal. Transformaciones. Pruebas no paramétricas." [En línea]. Julio del 2003. Disponible en:< <http://www.seh-lilha.org/pdf/noparame.pdf>> [Consulta: 14/04/10].
- 55.- H. Dieck Ronald. "Measurement Accuracy." [En línea]. 1999 by press LLC. Disponible en :< <http://www.scribd.com/doc/6938954/Measurement-Accuracy>> [Consulta: 18/04/10].
- 56.- "Vocabulario internacional de metrología- Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)." [En línea]. JCGM 200:2008. Traducción al español del VIM- 3ª. Marzo del 2009. Disponible en:<<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/default.aspx?arch=/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>> [Consulta: 08/10/09].
- 57.- Castanedo Cazarez Juan Pablo, Torres Alvarez Bertha, Araujo Andrade Cuauhtémoc, Castanedo Tardan Mari Paz y Moncada Benjamín. "Absorción ultravioleta de los protectores solares para prescripción en México." [En línea]. Gac Méd Méx Vol. 144 No. 1, 2008. Artículo original, Aceptado: 28 de septiembre de 2007. Disponible en: < http://www.anmm.org.mx/gaceta_rev/vol_144/n1/2008-144-1-35-38.pdf> [consulta: 27/04/10]