

**Procedimiento para la validación de los métodos de ensayo físico-químicos en el
análisis de matrices acuosas**

**Procedure for the validation of physical-chemical test methods in the analysis of
aqueous matrices**

Alejandro Céspedes Martínez¹

María de los Ángeles Arada Pérez²

Waldo Osmidel Ávila Garcés³

Resumen

Para llevar a cabo una determinación química es necesario el empleo de métodos de ensayo debidamente validados, estableciendo la trazabilidad de los resultados de la medición. De manera general los estudios relacionados con este tema se refieren a la relación de los fundamentos teórico-metodológicos que sustentan la validación de un método de ensayo por una parte y ofrecen ejemplos prácticos para la estimación de la incertidumbre asociada a los resultados, por otra; sin que logren establecer una adecuada correlación entre el proceso de validación y el proceso de estimación de incertidumbre. La presente investigación tiene como objetivo el desarrollo e implementación de un procedimiento sencillo y eficaz para la validación interna de los métodos de ensayo físico-químicos en matrices acuosas, que integre dentro de cada una de sus etapas, el proceso de estimación de incertidumbre. El procedimiento se propone como herramienta educativa dentro del campo de validación de los métodos de ensayo físico-químicos en la Química Analítica para estudiantes de Licenciatura en Química. Se ofrece también como

¹ Licenciado en Química. Empresa Nacional de Análisis y Servicios Técnicos, Cuba. E-mail: ale@ltu.giat.cu. ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-8929-0076>.

² Licenciado en Química. Doctor en Ciencias Químicas. Universidad de Oriente, Cuba. E-mail: mayarada@uo.edu.cu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9262-2066>.

³ Licenciado en Química. Máster en Química. Universidad de Las Tunas, Cuba. E-mail: waldyenet@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8033-8639>.



alternativa sustentable y ecológica, pues tiene como resultado principal el ahorro de materias primas y la reducción de residuales al ambiente.

Palabras clave: validación de métodos de ensayo, aseguramiento de la calidad de los resultados.

Abstract

To perform a chemical determination, it is necessary to use properly validated test methods, establishing traceability of measurement results. Studies related to this topic focus on the relationship between the theoretical and methodological foundations that support the validation of a test method and offer practical examples for estimating the uncertainty associated with the results, without establishing an adequate correlation between the validation process and the uncertainty estimation process. The present research aims to develop and implement a simple and effective procedure for the internal validation of physical-chemical test methods in aqueous matrices, which integrates the uncertainty estimation process into each of its stages. The procedure is proposed as an educational tool in the field of validation of physical-chemical test methods in Analytical Chemistry for undergraduate students in Chemistry. It's also offered as a sustainable and ecological alternative, as its main results are the saving of raw materials and the reduction of environmental waste.

Keywords: validation of test methods, quality assurance of results.

Introducción

El proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que pueden atribuirse razonablemente a una magnitud, se conoce como medición (Oficina Nacional de Normalización [ONN], 2020). Muchas decisiones importantes se basan en el resultado de una medición. Si el resultado proviene de una medición química se utiliza, por ejemplo, para conocer

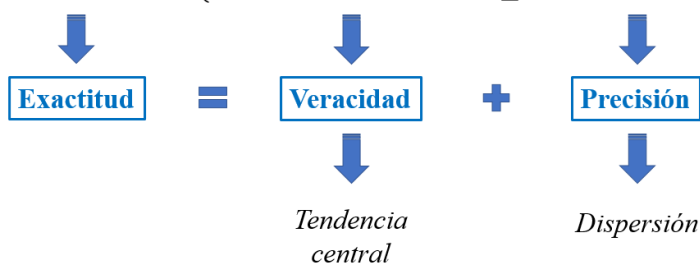
el estado de los ecosistemas mediante la evaluación del impacto ambiental a través del estudio del efecto de las acciones antropogénicas sobre los ecosistemas, verificar materiales contra especificaciones o límites legales, diseñar y desarrollar nuevos materiales y medicamentos, entre otros (De Bièvre, 2012; Camero y Huamaní, 2013).

Para llevar a cabo una medición, es necesario realizar una descripción de la magnitud compatible con el uso previsto del resultado esperado, establecer un procedimiento y un sistema de medida calibrado conforme con una metodología que incluya las condiciones bajo las cuales se medirá (Ávila, 2018; Ávila et al., 2018). El resultado de la medición contiene, por tanto, información relevante sobre el conjunto de valores de una magnitud y se expresa, generalmente, como un valor medido y una indicación de la incertidumbre asociada al mismo (ONN, 2020). La figura 1 muestra la relación que existe entre diferentes conceptos que constituyen indicadores de calidad de un resultado de medida.

Figura 1

Información relevante asociada al resultado de una medición.

Resultado de medida = (Valor de la medición ± Incertidumbre) u/m



Nota. El resultado de una medición se expresa como el valor de la medición y la incertidumbre asociada a este. Fuente: Elaboración propia.

Cuando las decisiones se basan en resultados de mediciones en el campo de la Química Analítica, es importante tener una indicación de su calidad, es decir, en qué medida se puede confiar en ellos para el propósito en cuestión (Hechavarría, 2016; Ávila et al., 2018). Es un requisito formal, con frecuencia legislativo, que los laboratorios que realizan mediciones

introduzcan acciones para asegurar su calidad. Tales acciones incluyen el uso de métodos de ensayo debidamente validados, estableciendo la trazabilidad de los resultados de la medición (Ellison et al., 2000). Teniendo en cuenta que no existe un modelo único para llevar a cabo una validación y que los parámetros a evaluar cambian de acuerdo con los requisitos legales de diferentes organizaciones y de requerimientos analíticos particulares; es recomendable seguir una guía general, en conformidad con pautas aceptadas internacionalmente (Weitzel, 2014).

En este sentido, la norma NC-ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, establece que

el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma y debe tener y aplicar procedimientos para la determinación de la incertidumbre asociada a la medición (ONN, 2017).

Esta norma constituye un referente internacional para la competencia de un laboratorio, pero concibe la estimación de incertidumbre como un proceso independiente a la validación del método de ensayo. Esto también se refleja en la norma NC-TS 368:2010 Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos, que establece los aspectos a tener en cuenta para la validación de métodos químicos de ensayo para alimentos y ofrece además un ejemplo práctico para la validación de un método de ensayo mediante evaluación de los diferentes parámetros de desempeño que la norma establece (ONN, 2010). Sin embargo, en lo referente a la incertidumbre de medida concibe el proceso de estimación de forma independiente al proceso de validación.

Como complemento de lo señalado en la norma NC ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, el Órgano Nacional de

Acreditación de la República de Cuba (ONARC) establece la Política de Incertidumbre de la Medición con el objetivo de precisar y establecer las prácticas a seguir en cuanto a la evaluación y el uso de la incertidumbre (ONARC, 2016). Por tanto, tampoco integra la estimación de la incertidumbre dentro del proceso de validación.

Las investigaciones en los últimos diez años mantienen esta tendencia. Entre ellas destaca los estudios realizados por Hechavarría (2016), en los que enfoca la estimación de la incertidumbre desde el ciclo de medición, pero no lo concibe como parte del proceso de validación (Hechavarría y Arada, 2017). Más recientemente, Ávila (2018), propone un procedimiento que reproduce las condiciones rutinarias en la que se desempeña un método de ensayo y utiliza parámetros de desempeño objeto de estudio durante una validación, pero no integra la estimación de incertidumbre al proceso de validación del método (Ávila et al., 2018).

De manera general los estudios relacionados con este tema se refieren a la relación de los fundamentos teórico-metodológicos que sustentan la validación de un método de ensayo por una parte y ofrecen ejemplos prácticos para la estimación de la incertidumbre asociada a los resultados, por otra; sin que logren establecer una adecuada correlación entre el proceso de validación y el proceso de estimación de incertidumbre.

Lo anterior pone de manifiesto una contradicción externa entre los aspectos que fundamentan la incertidumbre de medida como propiedad del resultado de una medición y el modo en que se realizan ambos procesos en la práctica cotidiana de los laboratorios. Por lo que es necesario disponer de un procedimiento técnico para la validación de los Métodos de Ensayo Físico-Químicos en el análisis de matrices acuosas, que logre una adecuada correlación en todas sus etapas respecto a la estimación de incertidumbre asociada a los resultados de la medición.

La presente investigación, desarrollada en los laboratorios de la Empresa Nacional de Análisis y Servicios Técnicos (ENAST), UEB Las Tunas, conjuntamente con la Universidad de Oriente, tiene como objetivo el desarrollo e implementación de un procedimiento sencillo y eficaz para la validación interna de los métodos de ensayo físico-químicos en matrices acuosas, que integre dentro de cada una de sus etapas, el proceso de estimación de incertidumbre.

El procedimiento se propone como herramienta educativa dentro del campo de validación de los métodos de ensayo físico-químicos en la Química Analítica para estudiantes de Licenciatura en Química. Se ofrece también como alternativa sustentable y ecológica ante el empleo sistemático de este procedimiento técnico por los laboratorios de ensayo de ENAST en Cuba, pues tiene como resultado principal el ahorro de materias primas y la reducción de residuales al ambiente.

Desarrollo

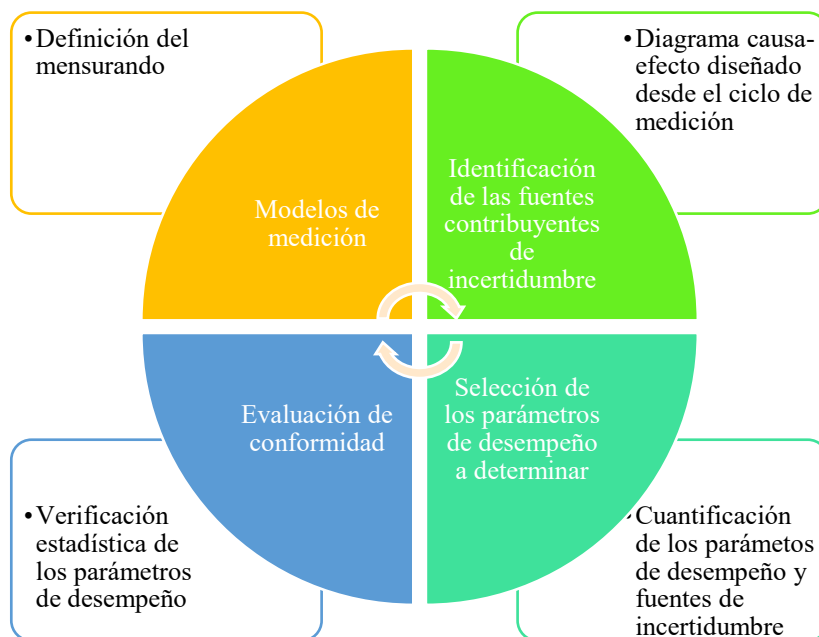
En este contexto, el resultado de una medición tiene, como propiedad, un valor de incertidumbre asociado a él. Por tanto, como contenido inherente al proceso de validación de un método de ensayo se encuentra la estimación de la incertidumbre de medida y la determinación de los parámetros de desempeño. De este modo, el proceso de estimar el valor de incertidumbre no debe concebirse independiente del proceso mediante el cual se valida la obtención del resultado.

Para contribuir a solucionar esta limitación se introdujo un procedimiento que consiste en un sistema de acciones y operaciones, que permiten la identificación y estimación de las fuentes de incertidumbre durante la evaluación de los parámetros de desempeño, dentro del proceso de validación de los métodos de análisis químico, de modo que permita evaluar la idoneidad de los

métodos de ensayo para un fin en específico. La figura 2 muestra un esquema que responde a la estructura general del procedimiento propuesto, siguiendo el ciclo metrológico de la validación.

Figura 2

Estructura general del procedimiento propuesto



Nota. Fuente: Elaboración propia.

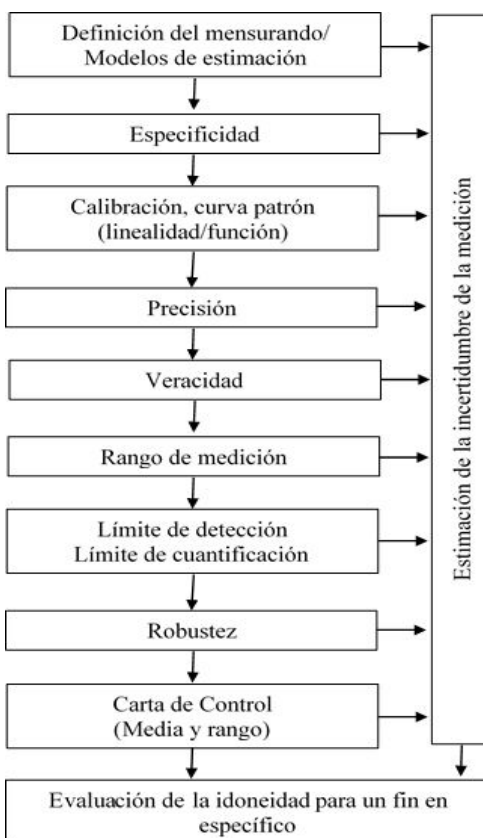
El nuevo procedimiento para la validación de métodos de ensayo físico – químicos en muestras de agua, responde a la estructura general que se muestra en la figura 3 y de forma general se distingue por los siguientes rasgos analíticos:

- Reproduce las condiciones rutinarias de trabajo dentro de un laboratorio de análisis físico-químico.
- Incluye todas las fuentes de incertidumbre determinadas desde el ciclo de medición, mediante un análisis de causa efecto, teniendo en cuenta las contribuciones de las fuentes de incertidumbre debidas a los errores tanto aleatorios como sistemáticos.

- Evalúa la incertidumbre estándar mediante análisis estadístico de serie de observaciones repetidas y otros medios durante la determinación de los parámetros de validación interna del método.

Figura 3.

Estructura general del procedimiento propuesto



Nota. Fuente: Elaboración propia.

- Divide el rango cuantitativo de la determinación en intervalos de concentración para cada uno de los cuales se estima la Incertidumbre de medida.
- Incluye la verificación de los estimados de incertidumbre mediante Materiales de Referencia como alternativa ante la ausencia de resultados de participación en un Ensayo de Aptitud.

- Establece un sistema dinámico de análisis de datos mediante el software Microsoft Excel, el cual permite la trazabilidad de los resultados en todas las etapas del proceso de validación.

- Permite la intercambiabilidad de resultados entre los diferentes laboratorios a escala nacional e internacional, puesto que su diseño y ejecución se fundamenta en las recomendaciones técnicas de las normativas vigentes tanto nacionales como internacionales en este campo.

Resultados y discusión

Para evaluar la idoneidad de los métodos de ensayo físico-químicos en el análisis de matrices acuosas, empleando el procedimiento propuesto, se tomó como caso de estudio la determinación de la concentración de iones fosfato (PO_4^{3-}) disueltos en aguas limpias y residuales. A través de esta especie química puede analizarse la presencia del fósforo como elemento esencial para la vida. Su concentración en los cuerpos de aguas superficiales puede tanto limitar el crecimiento y desarrollo de la vida, como provocar una explosión de esta, proceso que se conoce como eutrofización.

Definición del mensurando/Modelo de estimación

Mensurando

Concentración de iones fosfato, expresada en mg/L, en muestras de aguas limpias y residuales.

Modelo físico de medición

Esta determinación se fundamenta en la relación que existe entre la concentración de iones fosfato disueltos en una muestra de agua y la absorbancia a 690 nm, del producto de la reducción con cloruro de estaño (II) del ácido molibdofosfórico formado a partir del fosfato presente en la muestra: $c(\text{PO}_4^{3-}) \Rightarrow f(\text{Abs}_{\text{muestra}})$.

Modelo matemático de la determinación

El resultado de la determinación se obtiene a partir de mediciones repetidas e independientes del mensurando: $c(PO_4^{3-}) = \overline{c_i(PO_4^{3-})}$. Se expresa como el valor medio de estas mediciones.

La incertidumbre del resultado del proceso de ensayo (U) se expresa como incertidumbre expandida: $U = k \times u_c(\overline{c(PO_4^{3-})})$, con un factor de cobertura $k = 2$ para un 95% de nivel de confianza.

Modelo estadístico de la determinación

El valor del mensurando se encuentra determinado por el efecto de distintas fuentes de incertidumbre: valor de referencia del mensurando (μ), valor del efecto del conjunto de analistas sobre el valor medido (A_i), valor del efecto de la precisión del proceso de medición en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad (D_i), valor del sesgo del proceso de ensayo (δ), valor del efecto de fluctuación aleatoria de las fuentes de incertidumbre que no pueden ser controladas durante el proceso de medición (e_i). El efecto de estas fuentes puede ser representado por el siguiente modelo estadístico: $c(PO_4^{3-}) = \mu_i + A_i + D_i + \delta_i + e_i$.

En correspondencia con el modelo estadístico del resultado de ensayo la incertidumbre sobre su valor se determina como: $u_{c(PO_4^{3-})}^2 = S_A^2 + S_D^2 + u_\delta^2 + S_e^2 = S_{PI}^2 + u_\delta^2$. La estimación S_{PI}^2 y u_δ^2 se efectúa mediante un análisis de varianza una vez concluida la determinación de los parámetros de desempeño asociados a la precisión y veracidad, respectivamente.

De esta forma la incertidumbre típica combinada sobre el resultado de ensayo se estima por nivel de concentración según:

$$u_c(\overline{c(PO_4^{3-})}) = \overline{c_{ref}(PO_4^{3-})} \times \sqrt{\left(\frac{s_{PI}}{\overline{c_{ref}(PO_4^{3-})}}\right)^2 + \left(\frac{u_c(\delta)}{\overline{c_{ref}(PO_4^{3-})}}\right)^2}$$

Especificidad

Para evaluar la especificidad se realizaron determinaciones a un blanco y cinco muestras reales fortificadas con el analito a diferentes niveles de concentración. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos durante las determinaciones. Las columnas $c_i(PO_4^{3-})$ y $c_d(PO_4^{3-})$ representan respectivamente la concentración inicial y la determinada después de la fortificación, expresadas en mg/L. En cambio, las columnas Fortif. y Recup. representan las cantidades de analito añadidas y recuperadas, respectivamente. Estas se expresan en mg.

Tabla 1

Datos obtenidos durante la evaluación de la especificidad

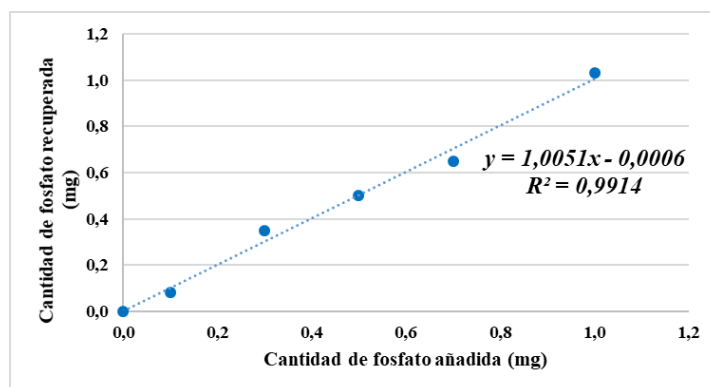
Muestra	$c_i(PO_4^{3-})$	Fortif.	$c_d(PO_4^{3-})$	Recup.
Blanco	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,7	0,1	0,8	0,1
2	1,3	0,3	1,7	0,4
3	2,1	0,5	2,6	0,5
4	2,4	0,7	3,1	0,7
5	3,1	1,0	4,1	1,0

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

Se realizó un análisis estadístico de la curva de recuperación comparando los resultados obtenidos contra valores críticos. La figura 4 muestra que la curva de recuperación (figura 4) posee valores de pendiente e intercepto significativamente cercanos a los valores ideales, lo que se confirma con pruebas estadísticas.

Figura 4

Evaluación de la especificidad



Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

El análisis de los datos anteriores arroja que el método de ensayo objeto de estudio posee una adecuada especificidad para el fin propuesto.

Calibración, curva patrón (linealidad/función)

La Curva de Calibración se obtuvo a partir de seis Soluciones Patrones preparadas de forma independiente, partiendo de un Material de Referencia. Se escogieron niveles de concentración espaciados de manera que abarcaran todo el rango de medición de interés. Cada grupo de Soluciones Patrón fue analizado por diferentes analistas, en Condiciones de Precisión Intermedia. La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en esta etapa.

Tabla 2

Datos obtenidos durante la obtención de la Curva de Calibración

c(PO ₄ ³⁻) mg/L	Absorbancia a 690 nm						Promedio
	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 4	Analista 5	Analista 6	
0,1	0,034	0,021	0,040	0,027	0,044	0,034	0,033
0,8	0,231	0,235	0,235	0,233	0,232	0,235	0,234
1,5	0,422	0,429	0,409	0,412	0,424	0,409	0,418
2,0	0,553	0,560	0,537	0,543	0,561	0,537	0,549
3,0	0,787	0,770	0,765	0,777	0,798	0,765	0,777
4,0	1,014	1,014	0,995	1,003	1,027	1,060	1,019

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

Los datos se sometieron a un tratamiento estadístico para la determinación de errores estadísticamente significativos. La prueba de Grubb sugiere que no existen valores significativamente discrepantes para un 95 % de confianza.

Realizada la prueba de Grubb, se sometió la data experimental (tabla 2) a un análisis de varianza de clasificación doble con el objetivo de investigar si existen diferencias significativas entre los datos obtenidos por cada analista sobre cada nivel de concentración, producto de la influencia de datos discrepantes derivados de la existencia de errores sistemáticos. Se evalúa de esta forma el desempeño analítico entre analistas y la sensibilidad del método entre las diferentes soluciones patrón para investigar la influencia de la concentración como factor de variabilidad.

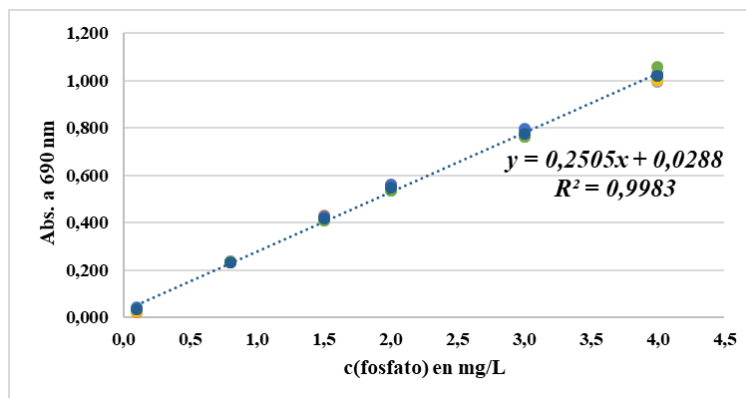
Una vez realizada la evaluación de idoneidad del conjunto de mediciones se aplicaron parámetros de control para la inferencia del grado de correlación y la estimación del modelo matemático de la curva general.

Grado de correlación entre las variables

Para cada curva en particular y curva general se cuantificó el coeficiente de correlación del modelo de regresión, determinando el tipo de correlación entre las variables. Para el caso objeto de estudio se determinó que el modelo lineal es el que mejor ajusta la distribución de datos. Se graficó además los promedios de los resultados para cada punto y se determinó la curva general que contempla todas las repeticiones (figura 5).

Figura 5

Curva de Calibración



Nota. Curva de Calibración obtenida de los valores de absorbancia promedio para cada nivel de concentración. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

Prueba de carencia de ajuste

Establecido el tipo de correlación entre las variables se comprobó la adecuación del modelo matemático de la curva general. Para ello se aplicó una prueba estadística que evalúa la relación entre el error de regresión y el error experimental.

El tratamiento estadístico arrojó que el modelo lineal ajusta adecuadamente la distribución de datos. Por tanto, se asume la curva de calibración obtenida como modelo físico de la determinación y se estima la incertidumbre asociada a este como: $u(modelo) = \sqrt{S_{\hat{y}_{ij}}^2}$, siendo $S_{\hat{y}_{ij}}^2$ el estimador de variabilidad asociado al error de regresión.

Precisión

La precisión del método de ensayo depende de los errores aleatorios. El estudio se realizó bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad interna o precisión intermedia. La precisión se expresó como desviación típica o desviación típica relativa, para cada condición.

Determinación de la repetibilidad

Para la determinación de la repetibilidad se seleccionaron tres muestras de composición diferente, pero que abarcaran todo el rango de medición del método definido como el intervalo

de concentración de la curva de calibración. Se fraccionó cada muestra en $p = 2$ porciones. Se analizó cada porción bajo condiciones de repetibilidad utilizando un número de mediciones duplicadas. La tabla 3 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 3

Datos obtenidos durante la determinación de repetibilidad

Analista	Muestra 1				Muestra 2				Muestra 3			
	Porción 1		Porción 2		Porción 1		Porción 2		Porción 1		Porción 2	
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2
Analista 1	0,5	0,5	0,5	0,4	2,2	1,9	2,1	2,2	3,3	3,5	3,3	3,4
Analista 2	0,7	0,6	0,6	0,8	1,9	1,9	1,8	2,0	3,0	3,4	3,1	3,1
Analista 3	0,6	0,5	0,8	0,7	2,0	2,1	2,3	1,9	3,3	3,0	3,0	3,2
Analista 4	0,5	0,4	0,7	0,8	2,1	2,2	1,9	2,0	3,2	3,4	2,9	3,0
Analista 5	0,6	0,8	0,6	0,5	1,8	2,0	1,8	2,3	3,0	3,2	3,1	2,9
Analista 6	0,7	0,6	0,6	0,4	2,3	1,9	1,9	2,1	3,4	2,9	2,8	3,2
Analista 7	0,6	0,5	0,7	0,7	2,2	2,3	2,0	2,3	3,1	3,2	3,3	3,4

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizadas las pruebas estadísticas para la detección de valores discrepantes, se evaluó si existían diferencias significativas en la variabilidad obtenida en cada porción de muestra analizada (tabla 4). El resultado de las pruebas estadísticas para este fin sugiere que el método de ensayo posee una repetibilidad aceptable y esta, a su vez, es constante en todo el rango de concentración objeto de estudio.

Tabla 4

Evaluación de la conformidad sobre la repetibilidad

Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
S^2_{P1}	S^2_{P2}	S^2_{P1}	S^2_{P2}	S^2_{P1}	S^2_{P2}
0,011	0,019	0,027	0,032	0,035	0,036
S^2_{P1}/S^2_{P2}		S^2_{P1}/S^2_{P2}		S^2_{P1}/S^2_{P2}	
1,7		1,2		1,0	
(Aceptable)		(Aceptable)		(Aceptable)	
$u(S_P)$		$u(S_P)$		$u(S_P)$	
0,02		0,03		0,04	

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, la incertidumbre típica estándar del proceso de ensayo en condiciones de repetibilidad queda expresada por nivel de concentración como $u(S_P) \text{ mg/L} = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$ (ver tabla 4, última fila). Su valor caracteriza el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse al mensurando en condiciones de repetibilidad.

Determinación de la reproducibilidad

Para la determinación de la reproducibilidad, las tres muestras anteriores se analizaron utilizando un número de mediciones simples $n = 5$ sobre cada muestra, en días diferentes, por cada analista. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Sobre el conjunto de datos obtenidos se estimó la variabilidad del proceso de ensayo asociada a la reproducibilidad mediante el siguiente estimador de dispersión: $S_R^2 = \frac{\sum_{j=1}^D (\bar{X}_j - \bar{\bar{X}})^2}{D-1}$. En la ecuación, el término S_R^2 caracteriza la variabilidad asociada al proceso de ensayo por nivel de concentración durante el período en estudio, $\bar{X}_j$ es el valor medio obtenido en cada día por el conjunto de analistas sobre el nivel de concentración y $\bar{\bar{X}}$ el valor medio obtenido por el conjunto de analistas durante el período en estudio.

Tabla 5

Datos obtenidos durante la determinación de la reproducibilidad

Estadístico	Muestra 1					Muestra 2					Muestra 3				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Analista 1	0,8	0,7	0,6	0,5	0,6	1,9	2,2	1,9	2,1	2,2	3,2	3,3	3,5	3,3	3,4
	0,6	0,8	0,7	0,6	0,4	2,2	1,9	1,9	1,8	2,0	2,9	3,0	3,4	3,1	3,1
	0,7	0,8	0,5	0,4	0,7	2,3	2,0	2,1	2,3	1,9	3,1	3,3	3,0	3,0	3,2
Analista 2	0,4	0,5	0,4	0,8	0,6	1,9	2,1	2,2	1,9	2,0	3,0	3,2	3,4	2,9	3,0
	0,5	0,6	0,6	0,8	0,5	2,0	1,8	2,0	2,2	1,9	3,1	3,0	3,2	3,1	2,9
	0,4	0,6	0,6	0,4	0,7	2,3	2,3	1,9	2,3	2,0	3,0	3,4	2,9	2,8	3,2
Analista 3	0,4	0,5	0,4	0,8	0,6	1,9	2,1	2,2	1,9	2,1	3,0	3,2	3,4	3,0	3,2
	0,5	0,4	0,5	0,8	0,8	2,1	2,2	2,0	1,8	2,3	3,1	3,0	3,2	3,1	3,0
	0,7	0,6	0,5	0,4	0,7	1,8	2,0	1,9	1,9	2,1	3,0	3,4	2,9	3,0	3,4
Analista 4	0,6	0,6	0,4	0,8	0,6	2,3	1,9	2,2	1,9	2,0	3,3	3,0	3,0	3,2	3,1
	0,4	0,4	0,5	0,8	0,4	2,0	1,8	1,9	1,9	1,8	3,2	3,4	2,9	2,9	2,8
	0,7	0,4	0,6	0,6	0,7	2,0	1,9	2,0	2,1	2,3	3,0	3,2	3,1	3,4	2,9
Analista 5	0,8	0,6	0,8	0,5	0,8	1,9	2,2	2,1	2,2	1,9	3,4	2,9	2,8	2,9	3,0
	0,5	0,6	0,8	0,7	0,8	1,8	2,0	2,0	1,8	2,3	3,1	3,0	3,2	3,1	2,9
	0,7	0,4	0,7	0,4	0,7	2,3	2,3	1,9	1,9	2,1	3,0	3,4	2,9	2,8	3,2
$\bar{X}_{ii}$	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1	3,1	3,2	3,1	3,0	3,1
S^2_{Di}	0,011	0,014	0,014	0,010	0,008	0,006	0,013	0,001	0,011	0,006	0,005	0,002	0,019	0,012	0,016
$\bar{X}$	0,6					2,0					3,1				
S^2_{reprod}	0,001					0,001					0,003				
$S^2_{máx}$	0,014					0,013					0,019				
S^2_{τ}	0,057					0,036					0,053				
C	0,2					0,3					0,4				
Evaluación	Reproducibilidad adecuada					Reproducibilidad adecuada					Reproducibilidad adecuada				

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

Para evaluar la homogeneidad de las varianzas en el conjunto de mediciones realizadas se aplicó la prueba de Cochran. La tabla 5 muestra que los valores de los estadísticos utilizados para la prueba sugieren que el método de ensayo proporciona resultados con una adecuada reproducibilidad, con un nivel de confianza de 95 %.

Finalmente, la incertidumbre típica estándar del proceso de ensayo, asociada a las condiciones de reproducibilidad, se expresa por: $u(S_{PI}) = \frac{SR}{\sqrt{n}}$, para cada nivel de concentración.

Los resultados anteriores muestran que el método de ensayo proporciona una adecuada precisión en la determinación del contenido de iones fosfato en muestras de agua.

Veracidad

Para la evaluación de la veracidad se prepararon tres soluciones de concentración exactamente conocida, a partir de un Material de Referencia Certificado. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos durante el análisis de las soluciones.

Tabla 6

Datos obtenidos durante la determinación de la veracidad

Analista	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Analista 1	0,6	1,8	2,8
Analista 2	0,8	2,3	3,2
Analista 3	1,1	1,6	3,4
Analista 4	0,6	1,9	3,1
Analista 5	1,2	2,1	2,6
$V_{referencia}$	1,0	2,0	3,0
$\bar{X}$	0,9	1,9	3,0
s	0,279	0,270	0,319
t	2,5	1,1	0,3
Evaluación	Aceptable	Aceptable	Aceptable

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

La evaluación sobre la conformidad de la veracidad del método para el fin propuesto se realizó mediante una prueba *t-Student*. Los resultados de la aplicación de esta prueba se muestran en la tabla 6. Los resultados sugieren una veracidad aceptable para un 95 % de confianza.

La incertidumbre asociada al sesgo, empleando un Material de Referencia, se estimó

$$\text{según: } \mu_C(\delta) = C_{Ref} \times \sqrt{\left(\frac{s_x}{C_{Ref}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{Ref})_{MRC}}{C_{Ref}}\right)^2}.$$

Límite de detección. Límite de cuantificación

Para la determinación del Límite de detección (*LD*) y del Límite de cuantificación (*LC*) se obtuvieron 20 determinaciones sobre el primer punto de la Curva de Calibración. Los valores estimados para cada uno de ellos se calcularon a partir de considerar los estadísticos de tendencia central y dispersión alrededor de este nivel de concentración (tabla 7). De este modo se estableció que $LD = \bar{X} \cdot 3s$ y que $LC = \bar{X} \cdot 10s$.

Tabla 7

Datos obtenidos durante la determinación de los límites de detección y cuantificación

Serie	Abs	c(PO ₄ ³⁻)	Evaluación
1	0,048	0,08	LD = 0,08
2	0,034	0,02	
3	0,031	0,01	
4	0,040	0,04	LC = 0,22
5	0,037	0,03	
6	0,044	0,06	
7	0,034	0,02	u_c(LC) = 0,02
8	0,037	0,03	
9	0,032	0,01	
10	0,030	0,00	
11	0,030	0,00	
12	0,035	0,02	
13	0,037	0,03	
14	0,030	0,00	
15	0,033	0,02	
16	0,030	0,00	
17	0,030	0,00	
18	0,037	0,03	
19	0,034	0,02	
20	0,030	0,00	

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

La incertidumbre típica combinada asociada al límite de cuantificación se calculó según

$$\text{la expresión: } \mu_c(LC) = C_{LC} \times \sqrt{\left(\frac{s_x}{\bar{c}_{LC}}\right)^2 + \left(\frac{s_{LD}/\sqrt{n}}{\bar{y}_{LD}}\right)^2}.$$

Rango de medición

El rango de medición se estableció a partir de la evaluación de los parámetros de desempeño relacionados con la veracidad y la precisión asociada a los resultados en tres intervalos de concentración (niveles bajos, medios y altos) del contenido del analito en las muestras objeto de estudio. Dado que la evaluación de los parámetros de desempeño resultó satisfactoria para todos los niveles de concentración, el rango de medición se acotó entre el límite de cuantificación calculado y el valor máximo de los puntos de la curva de calibración.

De este modo el rango de medición para el método objeto de estudio se estableció como:

$$(0,22 \leq c(PO_4^{3-}) \leq 4,00) \text{ mg/L}$$

Robustez

Para determinar la robustez del método se identificaron tres variables de interés analítico. Para cada una de ellas se estableció el rango crítico de trabajo y se realizaron determinaciones por duplicado bajo condiciones de cada extremo de este rango. La tabla 8 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 8

Datos obtenidos durante la determinación de la robustez

Factor a variar	Máx	Mín	Resultados obtenidos (mgPO ₄ ³⁻ /L)				D_i	Evaluación
			Extremo máximo	Extremo mínimo				
pH	8,3	7,0	2,0	2,1	2,3	1,9	0,05	No significativo
Tiempo desarrollo del color	12 min	10 min	2,1	2,2	1,9	2,0	0,20	No significativo
Temperatura	30 °C	20 °C	1,8	2,0	1,8	2,3	0,15	No significativo

Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

El resultado de la evaluación muestra que el método es robusto para las variaciones de las variables analíticas de interés, en el rango definido, para un 95 % de confianza.

Carta de Control (media y rango)

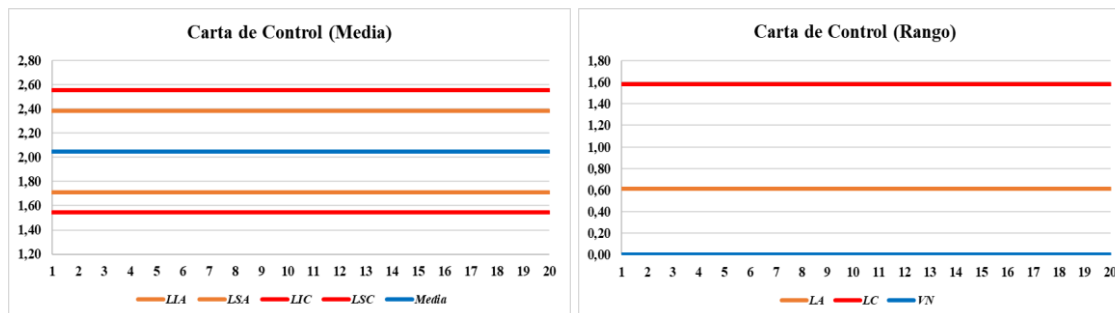
Para la elaboración de la carta de control de media y rango, se realizaron 30 determinaciones a una solución de referencia. A partir de los resultados obtenidos se determinaron los límites de control, según:

- Carta de Control (Media):
 - Límites de Aviso (LIA y LSA): $\bar{X} \pm 2 \cdot s$.
 - Límites de Control (LIC y LSC): $\bar{X} \pm 3 \cdot s$.
- Carta de Control (Rango):
 - Límite de Aviso (LA): $5.921 \cdot s - \frac{2}{3} (LC - 5.921 \cdot s)$.
 - Límite de Control (LC): $1.585 \cdot 5.921 \cdot s$.

La figura 6 muestra las cartas de control obtenidas.

Figura 6

Cartas de Control



Nota. Captura de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Fuente: Elaboración propia.

Evaluación de la idoneidad para el fin específico

Una vez realizada la evaluación de cada parámetro de desempeño del método de ensayo, integrando en el proceso de validación la estimación de incertidumbre de la medición, se revisó si los resultados obtenidos permiten la aplicación efectiva del método en el alcance previsto. La tabla 9 muestra un resumen de los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de desempeño estudiados.

Tabla 9.

Resumen de la evaluación de los parámetros de desempeño del método

Parámetros de desempeño	Evaluación
Definición del mensurando/Modelo de estimación	Concentración de iones fosfato, expresada en mg/L, en muestras de aguas limpias y residuales Esta determinación se fundamenta en la relación que existe entre la concentración de iones fosfato disueltos en una muestra de agua y la absorbancia a 690 nm, del producto de la reducción con cloruro de estaño (II) del ácido molibdofosfórico formado a partir del fosfato presente en la muestra
Especificidad	Adecuada especificidad para el fin propuesto
Calibración, curva patrón (linealidad/función)	$Abs = 0,2505c(PO_4^{3-}) + 0,0288$ $R^2 = 0,9983$
Precisión	Repetibilidad y reproducibilidad adecuadas
Veracidad	Veracidad aceptable para un 95 % de confianza
Rango de medición	$(0,22 \leq c(PO_4^{3-}) \leq 4,00)$ mg/L
Límite de detección. Límite de cuantificación	$LD = 0,08$ mg/L $LC = 0,22$ mg/L

Robustez	Robusto para las variaciones de las variables analíticas de interés, en el rango definido
Carta de Control (media y rango)	El diseño experimental permitió establecer los límites de control para la determinación

Nota. Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

De manera general, la literatura relaciona los fundamentos teórico-metodológicos que sustentan la validación de un método de ensayo y ofrece ejemplos prácticos para la estimación de la incertidumbre de medición, sin que logren establecer una adecuada correlación entre el proceso de validación y el proceso de estimación de incertidumbre.

La integración de la estimación de la incertidumbre de medición dentro de la evaluación de los parámetros de desempeño del método de ensayo, permite la validación de la determinación de físico-química de especies químicas en una matriz acuosa.

El procedimiento aplicado permitió la validación de los métodos de ensayo físico-químicos en matrices acuosas, reproduciendo las condiciones rutinarias de trabajo, con un enfoque a proceso e integrando la estimación de incertidumbre dentro de la evaluación de cada parámetro de desempeño.

Los parámetros de desempeño y los estimados de incertidumbre se verificaron mediante ensayos a Materiales de Referencia, comprobándose que el método de ensayo escogido como caso de estudio es adecuado para el fin propuesto.

Referencias

- Ávila, W. O. (2018). *Estimación de la Incertidumbre de medida en ensayos por Espectrometría de Emisión Óptica en aceros al carbono y de baja aleación*. [Tesis de Maestría, Universidad de Oriente].
- Ávila, W. O., Arada, M. A. y Hechavarría, A. (2018). Estimación de la Incertidumbre de medida en ensayos por Espectrometría de Emisión Óptica en aceros al carbono y de baja

- aleación. *Afinidad*, *LXXV*(584), 290-295.
<https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/347919>
- Camero, J. W. y Huamaní, V. A. (2013). Criterios de aseguramiento de calidad para resultados de ensayo en la determinación de bario por espectrometría de absorción atómica en agua residual mediante cartas de control de Shewhart. *TECNIA*, 23(1), 25-32.
<https://revistas.uni.edu.pe/index.php/tecnia/article/view/64>
- De Bièvre, P. (2012). “Quality of a measurement result” is established by means of metrological criteria. *Accred Qual Assur*, 17, 479-480.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00769-012-0917-z>
- Ellison, S., Barwick, V. J. y Williams, A. (2000). Legislative limits below detection capability”. *Accred Qual Assur*, (5), 308-313.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s007690000183>
- Hechavarría, A. (2016). *Estimación de la incertidumbre del resultado en la determinación espectrofotométrica de sulfato en agua, una visión desde el ciclo de medición*. [Tesis de Maestría, Universidad de Oriente].
- Hechavarría, A. y Arada, M. (2017). Estimación de la incertidumbre de la medición en análisis químico, un caso de estudio. *Rev Cubana Quím*, 29(1), 54-72.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000100005
- Oficina Nacional de Normalización. [ONN]. (2010). Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos (NC-TS 368:2010, Primera Edición).
- Oficina Nacional de Normalización. [ONN]. (2017). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (NC-ISO/IEC 17025:2017, Tercera Edición).

- Oficina Nacional de Normalización. [ONN]. (2020). *Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados* (NC-OIML V2-200:2020, Segunda Edición).
- Órgano Nacional de Acreditación de la República de Cuba. [ONARC]. (2016). *Política de Incertidumbre de la Medición*. (POL 3, Revisión 04).
- Weitzel, J. (2014). *Peer Reviewed: Method Validation*. [Institute of Validation Technology]. <http://www.ivtnetwork.com/article/quality-design-analyticalprocedure>.