5/178

UNIVERSIDAD DE GRANADA
31 OCT. 2002
COMISION DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 18.11.02
ENTRADA NUM. 4802

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 6135762S2
Nº Copia 15586297

TÉCNICAS CUALIMÉTRICAS AVANZADAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA FIABILIDAD Y COMPARABILIDAD DE RESULTADOS EN QUÍMICA ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL

Eva M. Almansa López

Granada, 2002

TÉCNICAS CUALIMÉTRICAS AVANZADAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA FIABILIDAD Y COMPARABILIDAD DE RESULTADOS EN QUÍMICA ANALÍTICA

por

Eva M. Almansa López

VISADA en Granada, a 24 de octubre de 2002

Fdo: **Dr. D. Luis Cuadros Rodríguez,** Profesor Titular del Dpto. de Química Analítica. Universidad de Granada

Fdo: **Dra. Dª. Ana M. García Campaña,** Profesora Titular del Dpto. de Química Analítica. Universidad de Granada

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección Químicas

Fdo: **Eva M. Almansa López**
Licenciada en Ciencias
Sección Quimicas

OBJETIVO DE LA TESIS

La presente memoria engloba diferentes problemas que, en el ámbito de la Química Analítica, presenta el establecimiento de la fiabilidad y la comparabilidad de los resultados obtenidos en diferentes campos de aplicación. Por ello, el objetivo general de esta Tesis Doctoral se enmarca en desarrollar nuevas metodologías cualimétricas para abordar este tipo de problemas, utilizando una amplia gama de técnicas quimiométricas avanzadas que nos permiten obtener resultados veraces y precisos.

Los objetivos específicos de esta Tesis son:

1. Establecer una metodología simple y rigurosa para el cálculo de la estequiometría y la estimación de la constante de formación de complejos de coordinación y de inclusión, junto con su incertidumbre asociada, para los métodos de Job, Yoe y Jones y Benesi-Hildebrand.

2. Proponer un protocolo que permita desarrollar fácimente los principios de la guía ISO para la estimación de la incertidumbre asociada al resultado del análisis de residuos de plaguicidas en matrices vegetales.

3. Desarrollar una estrategia para la supresión de errores en la cuantificación debido al efecto matriz mediante el establecimiento de una Función de Corrección y su aplicación al análisis de residuos de plaguicidas.

4. Desarrollar una nueva metodología, denominada método de cociente de pendientes (MOSR), para la supresión de errores en la cuantificación debido al efecto matriz utilizando un calibrado con porciones de muestra (calibrado de Youden) y su aplicación al análisis de residuos de herbicidas.

5. Proponer y aplicar una metodología bivariante para establecer una Función de Tolerancia, que permita cuantificar el nivel de tolerancia de interferentes a cualquier concentración de analito.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Propiedades de los resultados analíticos 3

1.1. Cuantificación en análisis químico 5

1.2. Errores en la cuantificación 8

1.3. Supresión de errores debidos al efecto matriz 12

1.4. Estudio de interferentes 15

2. Formación de complejos. Establecimiento de la estequiometría y la constante de formación 16

2.1. Complejos de coordinación 17

2.1.1. Métodos que operan a C_M y r variable 18

2.1.2. Métodos que operan a C_M constante y r variable 20

2.1.3. Métodos que operan a C_M variable y r constante 25

2.1.4. Problemas más frecuentes 26

2.2. Complejos de inclusión 28

2.2.1. Ciclodextrinas 29

2.2.2. Problemas más frecuentes 32

3. Calibración en química analítica 33

3.1. Aspectos metrológicos de la calibración 34

3.1.1. Calibración directa 35

3.1.2. Calibración indirccta 38

3.1.3. Calibración de equipos 40

3.1.4. Calibración de procesos 41
3.2. Aspectos metodológicos de la calibración 43
3.2.1. Calibración con patrón externo (EC) 45
3.2.2. Calibración con patrón en matriz (MC) 46
3.2.3. Calibración por adición de patrón (AC) 47
3.2.4. Calibración con patrón interno (IC) 48
3.2.5. Calibración de respuesta normalizada (NC) 49
3.2.6. Calibración de Youden (YC) 51
3.2.7. Tipos de blancos 51
3.3. Estudios de recuperación 53
4. Incertidumbre 57
4.1. Incertidumbre de calibración 57
4.2. Incertidumbre de ensayo 59

BLOQUE I: PROTOCOLOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA ESTEQUIOMETRÍA Y/O ESTIMACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN

CAPÍTULO I. MÉTODO DE JOB 61

1. Antecedentes 63
2. Constante de formación y grado de disociación 65
3. Modelos matemáticos aplicados 69
3.1. Regresión lineal por mínimos cuadrados (LSR) 70
3.2. Regresión lineal por mínima mediana de cuadrados (LMSR) 71

3.3. Punto de intersección e intervalo de cobertura 73
3.4. Regresión polinómica por mínimos cuadrados (LSPR) 75
4. Incertidumbre asociada a la constante de formación y al grado de disociación 77
5. Protocolo propuesto 79
6. Validación de la metodología propuesta con datos simulados 82
6.1. Estequiometría 1:1 83
6.2. Estequiometría 2:1 86
6.3. Estequiometría 3:1 88
6.4. Estequiometría 4:1 88
6.5. Límite de aplicación de la metodología 89
7. Aplicación de la metodología propuesta a datos reales. Estudio del complejo Ni(II)-pRNa$_2$ 90
8. Conclusiones 93

CAPÍTULO II. MÉTODO DE YOE JONES **95**

1. Antecedentes 97
2. Constante de formación y grado de disociación 98
3. Incertidumbre asociada a la constante de formación y al grado de disociación 101
4. Protocolo propuesto 102
5. Validación de la metodología propuesta con datos simulados 105
5.1. Estequiometría 1:1 106
5.2. Estequiometría 2:1 108
5.3. Estequiometría 3:1 110
5.4. Estequiometría 4:1 112

5.5. Límite de aplicación de la metodología 113

6. Aplicación de la metodología propuesta a datos reales. Estudio del complejo Co(II)-pRNa$_2$ 115

7. Conclusiones 116

CAPÍTULO III. MÉTODO DE BENESI-HILDEBRAND **119**

1. Antecedentes 121

2. Constante de formación e incertidumbre asociada 122

3. Herramientas estadísticas 125

3.1. Teorema de Fieller 125

3.2. Método de Bootstrap 127

3.3. Método de Jackknife 129

4. Estudio del complejo de inclusión HP-β-CD:2,4-D mediante fluorescencia inducida fotoquímicamente 131

4.1. Antecedentes de la determinación de 2,4-D por fluorescencia inducida fotoquímicamente 131

4.2. Reactivos y materiales 132

4.3. Equipos 133

4.4. Optimización de las variables experimentales 133

4.4.1 Metodología de superficie de respuesta 133

4.4.2 Diseño Box-Behnken 136

4.5. Características espectrales del complejo de inclusión 140

4.6. Procedimiento analítico 141

5. Determinación de la estequiometría del complejo de inclusión HP-β-CD:2,4-D 142

6. Aplicación de los métodos propuestos para el cálculo de la constante de formación del complejo de inclusión HP-β-CD:2,4-D y su incertidumbre asociada 143

7. Conclusiones 146

BLOQUE II: ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo IV. INCERTIDUMBRE ASOCIADA AL RESULTADO DEL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS **149**

1. Antecedentes 151

2. Incertidumbre global 155

3. Incertidumbre de calibración y tolerancias requeridas: declaración de conformidad 159

4. Contribución del sesgo a la incertidumbre global 161

5. Incertidumbre asociada al contenido de Lindano en pimiento 163

5.1. Determinación de Lindano en pimiento por CG 164

5.1.1. Reactivos y materiales 164

5.1.2. Equipos 164

5.1.3. Extracción del Lindano 165

5.1.4. Procedimiento analítico 165

5.2. Componentes de incertidumbre 166

5.2.1. Incertidumbre asociada a la determinación de la concentración de Lindano a partir del calibrado 167

5.2.2. Incertidumbre asociada al factor volumétrico 170

5.2.3. Incertidumbre asociada a la concentración de muestra 171
5.3. Incertidumbre combinada 171
5.4. Corrección de los resultados por recuperación..... 173
6. Conclusiones 174

Capítulo V. ESTABLECIMIENTO DE LA FUNCIÓN DE CORRECCIÓN 177

1. Antecedentes 179
2. Función de Corrección 182
3. Factor de Corrección 186
4. Herramientas estadísticas 188
4.1. Comparación de líneas de regresión. Análisis de la Covarianza ANCOVA. 188
4.1.1. Comprobación de la homogeneidad de las varianzas 191
4.1.2. Comparación de las pendientes 191
4.1.3. Comparación de los términos independientes 192
4.2. Test de hipótesis 193
4.2.1. Test de Snedecor 193
4.2.2. Test de Cochran 194
4.2.3. Test de Bartlett 194
4.2.4. Test de Dixon 195
4.2.5. Test de Bonferroni 196
5. Validación de la Función de Corrección 197
6. Incertidumbre de la Función de Corrección 202
7. Incertidumbre del Factor de Corrección 205

8. Protocolo propuesto 205
9. Conclusiones 208

Capítulo VI. APLICACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CORRECCIÓN I: CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE LINDANO EN PIMIENTO **209**

1. Antecedentes 211
2. Procedimiento 213
   2.1. Reactivos y materiales 213
   2.2. Equipos 214
   2.3. Extracción del Lindano 214
   2.4. Procedimiento analítico 215
3. Comparación de las curvas de calibrado. ANCOVA 216
   3.1. Estudio de repetibilidad: intra-comparación de calibrados 216
   3.2. Estudio de similitud entre los calibrados EC y VMC: Inter-comparación de calibrados 218
4. Función de Corrección 220
5. Validación 222
   5.1. Metodología de validación 1 223
   5.2. Metodología de validación 2 224
6. Cuantificación del contenido de Lindano en pimiento 225
7. Incertidumbre asociada al contenido de Lindano en pimiento 225
   7.1. Incertidumbre asociada al uso de la Función de Corrección 226
   7.2. Incertidumbres asociadas al factor volumétrico y a la concentración de la disolución de muestra 228

7.3. Incertidumbre combinada 228

8. Conclusiones 229

Capítulo VII. APLICACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CORRECCIÓN II: CUANTIFICACIÓN DE LA EXPOSICIÓN DÉRMICA A PROCIMIDONA DE TRABAJADORES DE INVERNADERO 231

1. Antecedentes 233
2. Procedimiento 236
   2.1. Reactivos y materiales 235
   2.2. Equipos 237
   2.3. Extracción de Procimidona 238
   2.4. Procedimiento analítico 239
3. Comparación de las curvas de calibrado. ANCOVA 241
   3.1. Estudio de repetibilidad: intra-comparación de calibrados 242
   3.2. Estudio de similitud entre los calibrados EC, CMC y CFMC: Inter-comparación de calibrados 244
4. Función de Corrección 247
   4.1. Función de corrección de EC a CFMC 247
   4.2. Función de corrección de CMC a CFMC 249
5. Factor de Corrección 251
   5.1. Factor de corrección de SC a CFMC 251
   5.2. Factor de corrección de CMC a CFMC 252
6. Validación 253
   6.1. Metodología de validación 1 255
   6.2. Metodología de validación 2 255

7. Cuantificación del contenido de Procimidona 256
8. Incertidumbre asociada al contenido de Procimidona aplicando $CF_{E\text{-}CFM}$ 257
8.1. Incertidumbre asociada al uso de la Función de Corrección 258
8.1.1 Incertidumbre asociada al Coeficiente de Corrección A 259
8.1.2 Incertidumbre asociada al Coeficiente de Corrección B 259
8.1.3 Incertidumbre asociada al término de covarianza 260
8.1.4 Incertidumbre asociada a la concentración estimada mediante EC 261
8.2. Incertidumbres asociadas al volumen de muestra 264
8.3. Incertidumbre combinada 264
9. Incertidumbre asociada al contenido de Procimidona aplicando $CF_{CM\text{-}CFM}$ ... 265
9.1. Incertidumbre asociada al uso de la Función de Corrección 266
9.1.1 Incertidumbre asociada al Coeficiente de Corrección B 266
9.1.2 Incertidumbre asociada a la concentración estimada mediante MC 267
9.2. Incertidumbres asociadas al volumen de muestra 268
9.3. Incertidumbre combinada 268
10. Conclusiones 270

Capítulo VIII. MÉTODO DEL COCIENTE DE PENDIENTES (MOSR) 273

1. Antecedentes 275
2. Sistema analito-muestra. Modelo bivariante 278
3. Relación entre el modelo bivariante y los calibrados univariantes 280
3.1. Calibrado con patrón externo, EC 280
3.2. Calibrado con patrón en matriz, MC 281

3.3. Calibrado por adición de patrón, AC 281
3.4. Calibrado de Youden, YC 283
4. Relación entre calibrados univariantes en función del tipo de error sistemático 284
4.1. Ausencia de errores sistemáticos 284
4.2. Presencia de la componente constante de error sistemático 286
4.3. Presencia de la componente proporcional de error sistemático 287
4.3.1. Componente de error proporcional no saturada 287
4.3.2. Componente de error proporcional saturada 289
4.4. Combinación de errores sistemáticos constantes y proporcionales 291
4.4.1. Componente de error proporcional no saturada 291
4.4.2. Componente de error proporcional saturada 291
5. Relación entre el modelo bivariante y la calibración bivariante 294
6. Herramientas estadísticas 297
6.1. Comprobación de la linealidad 297
6.1.1. Test de linealidad 297
6.1.2. Análisis gráfico de los residuos 299
6.2. Comparación de pendientes 300
7. Cuantificación del contenido de analito en función del tipo de error sistemático 301
7.1. Método de adición de patrón 301
7.2. Método del cociente de pendientes a partir de calibración univariante 302
7.3. Método del cociente de pendientes a partir de calibración bivariante 303
8. Incertidumbre asociada al contenido de analito 304

8.1. Método de adición de patrón 305
8.2. Método del cociente de pendientes a partir de calibración univariante 307
8.2.1. Varianzas homogéneas 308
8.2.2. Varianzas heterogéneas 309
8.3. Método del cociente de pendientes a partir de calibración bivariante 309
9. Protocolo propuesto para la cuantificación a partir de calibración univariante 311
10. Protocolo propuesto para la cuantificación a partir de calibración bivariante 314
11. Conclusiones 316

Capítulo IX. APLICACIÓN DE MOSR A LA DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS EN AGUAS A PARTIR DE CALIBRADOS UNIVARIANTES **317**

1. Antecedentes 319
2. Procedimiento 321
2.1. Reactivos y materiales 321
2.2. Equipos 322
2.3. Optimización 322
2.4. Procedimiento analítico 322
3. Optimización de las variables experimentales 324
3.1. Metodología de superficie de respuesta 324
3.2. Diseño Doehlert 326
3.3. Optimización para 2,4-D 328

3.4. Optimización para MCPP 329
3.5. Optimización para MCPA 331
3.6. Optimización para 2,4,5-T 331
4. Calibrados univariantes 333
5. Detección del tipo de error sistemático presente en la determinación 336
6. Estimación del contenido de analito y de su incertidumbre 339
6.1. Método de adición de patrón, MOSA 339
6.2. Método del cociente de pendientes, MOSR 340
7. Conclusiones 341

Capítulo X. APLICACIÓN DE MOSR A LA DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS EN AGUAS A PARTIR DE CALIBRACIÓN BIVARIANTE **343**

1. Antecedentes 345
2. Procedimiento 345
2.1. Reactivos y materiales 345
2.2. Equipos 345
2.3. Procedimiento analítico 346
3. Calibración bivariante 347
4. Detección del tipo de error sistemático presente en la determinación 348
5. Estimación del contenido de analito y de su incertidumbre 351
6. Conclusiones 352

Capítulo XI. ESTABLECIMIENTO DE LA FUNCIÓN DE TOLERANCIA 355

1. Antecedentes 357
2. Función de predicción 358
3. Superficie de Respuesta Interferente 360
4. Función de Tolerancia 361
5. Protocolo propuesto 361
6. Procedimiento 363
   - 6.1. Reactivos y materiales 363
   - 6.2. Equipos 363
   - 6.3. Procedimiento analítico 364
7. Estimación de la Función de Tolerancia para las interferencias Fe^{3+}, Al^{3+} y F^- 365
   - 7.1. Función de Predicción 365
   - 7.2. Superficie de Respuesta Interferente 365
   - 7.3. Función de Tolerancia 368
8. Conclusiones 370

CONCLUSIONES 373

ANEXOS 379

Anexo A. Símbolos y abreviaturas 381

Anexo B. Protocolos para el establecimiento de la estequiometría y/o estimación de la constante de formación

B1. Tablas capítulo I 387

B2. Tablas capítulo II 401

B3. Tablas capítulo III 417

Anexo C. Estrategias para la supresión de errores en la cuantificación debido al efecto matriz

C1. Tablas capítulo IV 419

C2. Tablas capítulo VI 421

C3. Tablas capítulo VII 427

C4. Tablas capítulo IX 439

C5. Tablas capítulo X 451

C6. Tablas capítulo XI 457

Anexo D. Tablas estadísticas 459

Introducción

1. PROPIEDADES DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

El establecimiento de la fiabilidad y la comparabilidad de los resultados obtenidos en el campo de la Química Analítica, abordado en esta tesis doctoral mediante una amplia gama de técnicas cualimétricas avanzadas, implica la validación de los procedimientos de análisis utilizados que nos permiten obtener resultados exactos. La validación[1], considerada en su sentido más amplio, es el *proceso de confirmación mediante examen y aparición de evidencias objetivas, de que se cumplen una serie de requerimientos particulares para un uso específico*. Concretamente, en el ámbito del análisis químico validar un proceso de análisis[2] es el proceso que establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho procedimiento cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos.

Desde la perspectiva de la calidad de los resultados, la validación de un proceso de análisis implica una verificación de las propiedades fundamentales[3] que definen la calidad de los resultados que genera el procedimiento analítico **(representatividad** y **exactitud)** y el establecimiento de los distintos criterios de calidad relacionados con cada una de ellas[4-7].

La representatividad, relacionada con la actuación fuera del laboratorio, es el grado de concordancia entre el resultado analítico con la muestra analizada, el material objeto del análisis, el problema analítico y el problema económico o social original. En realidad, ésta no se suele considerar dentro de los habituales protocolos de validación aunque, en términos estrictos, esto no debería ser así.

---

1. UNE–EN–ISO 8402: *Gestión de la calidad y aseguramiento de la calidad. Vocabulario.* Asociación española de normalización y certificación (AENOR), Madrid, 1995.
2. *G-CSQ-02, Guía para los laboratorios que realizan validaciones de métodos de análisis químico*, 1996.
3. Valcárcel M. and Rios A., *Anal. Chem.*, 65, 781ª, 1993.
4. Tailor J.K., *Anal. Chem.*, 55, 600A, 1983.
5. Green J.M., *Anal. Chem.*, 68, 305A, 1996.
6. Wells R.J., *Accred. Qual. Assur.*, 3, 198, 1998
7. Huber L., *LG-CG Int.*, 11, 96, 1998.

La exactitud, relacionada con la actuación dentro del laboratorio, es el grado de concordancia entre el resultado analítico y la composición real del analito en una determinada muestra. La exactitud se relaciona directamente con tres propiedades de los métodos o procedimientos de ensayo[8]: precisión, veracidad e inercia.

Un estudio completo de validación implica la consecución de las siguientes cuatro etapas[8]:

1. Delimitación de la Inercia (robustez y solidez)
2. Evaluación de la Exactitud, que implica la estimación de la precisión y la comprobación de la veracidad.
3. Estudio pormenorizado de los parámetros básicos de calidad relacionados con la precisión (linealidad, sensibilidad, repetibilidad, reproducibilidad y limites inferiores) y con la veracidad (rango dinámico lineal, intervalo de trabajo y selectividad).
4. Establecimiento de propiedades complementarias de practicabilidad (coste, rapidez, facilidad, disponibilidad, habilidad personal, seguridad,...)

Para aquellos procedimientos dirigidos al análisis rutinario, pueden ser suficientes las dos primeras etapas, siempre que los resultados del estudio sean positivos, ya que en caso contrario es necesario investigar las desviaciones encontradas analizando uno por uno los criterios de calidad. Para nuevos procedimientos desarrollados en los laboratorios, es imprescindible la realización del protocolo completo en sus cuatro etapas. Así, la propuesta de un nuevo método analítico debe suministrar a la comunidad científica toda la información derivada de la validación completa del procedimiento recomendado.

Así por ejemplo, un mal resultado en la comprobación de la veracidad puede deberse a razones tales como: trabajar fuera del intervalo de aplicación del procedimiento, o a la presencia de efectos sistemáticos debidos a la presencia de interferentes o efecto matriz; en este caso sería necesario estudiar nuevamente el rango dinámico lineal (en su caso) o la selectividad/especificidad de dicho procedimiento para la muestra en consideración.

---

8. Bosque Sendra J.M., Cuadros Rodríguez L. and García Campaña A.M., *Pure Appl. Anal. Chem.*, 1, 115-131, 1998.

1.1. Cuantificación en análisis químico

Es habitual que la cuantificación de analitos se base en la medida de una señal analítica que se corresponde con una propiedad analítica relacionada directamente con el contenido o concentración del analito o analitos. El cálculo de dicho contenido se basa en la aplicación de una relación funcional entre señal medida (Y) y el contenido (C), expresada como:

$$Y = \beta(c) \cdot C$$

donde $\beta(c)$ es un coeficiente de proporcionalidad característico de cada analito que permite transformar la cantidad medida (en unidades de señal) en contenido de analito (habitualmente en unidades de concentración). Este coeficiente se denomina **sensibilidad analítica** y establece *el número de unidades de señal que equivalen a cada unidad de concentración*. La sensibilidad puede ser constante, es decir independiente de la cantidad de analito, o tomar un valor diferente para cada valor de C.

Hay que destacar que esta relación no tiene término independiente, ya que es obvio que si el contenido de analito es cero, no es posible que aparezca ninguna señal analítica.

Generalmente esta relación funcional se obtiene de forma empírica, previamente a la cuantificación, a partir de una **calibración indirecta** del proceso analítico en la que se establece la relación utilizando como patrones materiales de referencia apropiados habitualmente preparados a partir de analito puro (materiales de referencia tipo sustancia).

Si la señal analítica obtenida sólo depende del contenido de un único analito, entonces la señal es específica de ese analito, sin embargo este hecho no es frecuente y lo habitual es que la señal dependa de más componentes aunque la mayor dependencia (mayor valor de sensibilidad) la muestre con relación al analito de interés. En este sentido se define la **selectividad**[9] de un método analítico como *la propiedad por la cual un método puede ser usado para determinar analitos individuales en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes presentes.*

---

9. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd Edition, 1997.

El término selectividad tiene su origen en la palabra latina *seligo*, que significa elegir o seleccionar. Una clara definición[10,11] es que *la selectividad de un método nos indica hasta que punto se puede determinar en una mezcla compleja un analito en particular sin la interferencia de otros componentes de la mezcla.* Por lo tanto, la selectividad mide la capacidad de un proceso analítico para producir señales que dependen casi exclusivamente del analito considerado presente en la muestra.

Algunas veces el término selectividad se confunde con el de especificidad[12,13] que es, en general, *la propiedad de un método analítico que expresa el último nivel de selectividad o la ausencia absoluta de interferencias.* La selectividad es una propiedad que se puede graduar, y por tanto es correcto hablar del "grado de selectividad", mientras que especificidad se refiere a la máxima selectividad y representa, por tanto, una propiedad absoluta. Aunque existe el deseo de eliminar el término especificidad de un método analítico, en ningún documento se menciona que el término selectividad sea preferible al de especificidad. Precisamente uno de los objetivos clásicos en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas ha sido la búsqueda de aquellas condiciones experimentales que hacen que la señal sea específica o, al menos, lo más selectiva posible.

Las señales analíticas no suelen ser espontáneas sino que han de ser provocadas modificando convenientemente el sistema analítico (p.e., añadiendo un reactivo, proporcionado un determinado valor de pH, fuerza iónica, ...); este hecho junto con la necesidad de adecuar las condiciones experimentales para conseguir la máxima selectividad hace que frecuentemente aparezca una componente "extra" de señal debida a la presencia de estos nuevos componentes añadidos que no estaban en la muestra original, por lo que la expresión anterior queda expresada en la forma:

$$Y = Y_0 + Y_{anal} = Y_0 + \beta(c)\cdot C$$

10. Vessman J., Stefan R.I., Van Staden J.F., Danzer K., Lidner W., Burns D.T., Fajgelj A. and Müller H., *Pure Appl. Chem.*, 73, 1381-1386, 2001
11. WELAC Guidance Document No. WG D2 1st ed., EURACHEM/WELAC Chemistry, Teddington, 1993.
12. Persson B.A. and Vessman J., *Trends Anal. Chem.*, 20, 526-532, 2001.
13. Den Boef G. and Hulanicki A., *Pure Appl. Chem.*, 55, 554, 1983.

donde el término Y_0 representa una contribución a la señal que es característica del sistema analítico en la forma en la que éste se presenta para ser medido. Esta contribución corresponde al **blanco de método** que se define como *la señal producida por todos aquellos componentes que se añaden, diferentes a los propios de la muestra (analito + matriz), tales como disolvente, reactivos, disoluciones reguladoras, modificadores, etc.*

Hay que destacar que el valor de la sensibilidad analítica puede verse modificada también por los componentes del blanco de método aunque este hecho es menos frecuente y por mayor facilidad no lo vamos a considerar.

En principio, la expresión anterior es característica de cada valor de concentración de analito y por tanto el método debe calibrarse para cada concentración. Sin embargo, la señal del blanco de método suele ser constante y por tanto afecta sistemáticamente a todas las medidas en la misma extensión, independientemente de la concentración de analito. Si consideramos además, para mayor facilidad, que la sensibilidad también es constante a lo largo del intervalo de aplicación del método, entonces la ecuación tiene validez general:

$$Y = Y_0 + \beta \cdot C$$

con lo que el valor de concentración vendrá dado por:

$$C = \frac{Y - Y_0}{\beta}$$

Los valores de blanco de método (Y_0) y de sensibilidad (β) pueden obtenerse promediando los valores de señal, obtenidos a partir de varios patrones homogéneamente distribuidos, p.e. aplicando un algoritmo de regresión lineal. Este proceso recibe el nombre de **calibración**, que habitualmente se realiza preparando los patrones a partir de porciones crecientes de analito puro en blanco de método. La calibración así establecida se denomina calibración con patrones externos (*EC, External Standard Calibration*).

De este modo se llega a una expresión empírica que toma la forma de:

$$Y = a + b \cdot C$$

donde a y b son los valores estimados de ordenada en el origen y pendiente, que se deben corresponder, si se cumplen las premisas anteriores, con los valores de los parámetros analíticos antes descritos: blanco de método y sensibilidad.

Puede darse el caso de que Y_0 y a sean diferentes, lo cual es achacable a que haya una componente de blanco debida a la presencia de analito y que por tanto no aparece incluida en el blanco de método.

1.2. Errores en la cuantificación

En análisis químico, el procedimiento analítico puede definirse como la adaptación del método analítico al análisis de las muestras caracterizadas por la naturaleza de su matriz[14]. Esta adaptación implica un tratamiento químico apropiado de la muestra y la aplicación de una metodología de calibración que nos indica la forma más simple de llevar a cabo las medidas químicas de una manera rutinaria, para que el error cometido para el tipo de análisis específico no exceda del límite requerido. Dependiendo del análisis rutinario, la metodología de calibración es específica para el tipo de la matriz, dado que en función del tipo de error presente es posible encontrar una diferencia entre el resultado del análisis y el verdadero valor (o considerado convencionalmente como verdadero).

En general, los resultados obtenidos de un análisis químico pueden verse afectados por tres componentes de error:

- **El error accidental** (*gross error)* es debido a accidentes durante el transcurso de una experiencia, como averías del equipo, contaminación de un reactivo, etc., Éstos pueden identificarse fácilmente por medio de técnicas estadísticas y su presencia provoca la existencia de valores anómalos que debe eliminarse.

- **El error aleatorio o indeterminado** *(random error)* es debido a factores incontrolables, se presentan por exceso y por defecto con igual probabilidad y están siempre presentes. Su determinación permite establecer un intervalo de confianza para el resultado analítico y su magnitud determina la precisión.

---

14. Taylor J.K., *Anal. Chem.*, 55, 600A-8A,1993.

- **El error sistemático o determinado** *(systematic error)* es atribuido a causas definidas aunque no siempre éstas pueden ser identificadas. Se presentan en una única dirección y afectan a todos los resultados obtenidos, aunque pueden compensarse entre sí y pasar desapercibidos. Estos errores pueden corregirse si su origen es conocido y determinan la veracidad, caracterizándose a través del sesgo *(bias),* que es la diferencia entre la media de los valores obtenidos y el valor aceptado como verdadero.

Originalmente Wilson[15] considera que las fuentes de error sistemático pueden clasificarse en cuatro tipos diferentes, hecho que fue ampliamente discutido por Cardone[16]. Estas fuentes de error son las siguientes:

- Tipo I: En el proceso de calibración o en el sistema de medida.
- Tipo II: Interferencia directa de la matriz de muestra, definida como cualquier substancia de la matriz que provoca una repuesta que depende del tamaño de la muestra y es mayor o menor que la debida al analito, produciendo así, un error sistemático inaceptable (por ejemplo, la no-resolución de los picos cromatográficos del analito y del interferente o bien que tanto el interferente como el propio analito exhiban la misma reacción del grupo funcional);
- Tipo III: Errores constantes debidos a variaciones en la respuesta no atribuibles al analito y que son independientes de tamaño de la muestra. Estos pueden ser debidos a las características propias de la matriz o a alguna propiedad físico-química del sistema de medida. Estos errores pueden ser directamente cuantificados mediante la aplicación del *método de Youden*[17];
- Tipo IV: Errores proporcionales debidos a variaciones en la repuesta que dependen de la interacción matriz-analito siendo proporcionales a ésta.

Mientras las fuentes de error I y II no pueden ser detectadas ni corregidas invalidando la determinación analítica, los errores tipo III y IV, conocidos como *efecto matriz*, pueden ser detectados mediante técnicas estadísticas y el valor obtenido puede utilizarse para corregir resultados analíticos. La mayoría de los métodos propuestos para detectar, corregir y/o cuantificar estos tipos de errores

15. Wilson A.L., *Talanta*, 21, 1109-21, 1974.
16. Cardone M.J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 1283-94, 1983.
17. Youden W.J., *Anal. Chem.*, 19, 946-50, 1947.

están fundamentalmente basados en el establecimiento de diferentes tipos de calibrados univariantes.

Otra posible clasificación de los errores sistemáticos que se pueden introducir en un resultado analítico es consecuencia de al menos una de las siguientes causas:

☺ **Errores debidos al proceso analítico.** En este caso la ecuación fundamental es adecuada pero puede ocurrir que:

- ➔ La ordenada en el origen y/o la pendiente no representen correctamente la señal del blanco de método y/o de la sensibilidad, por lo que la calibración es errónea o se han modificado las condiciones experimentales.
- ➔ La concentración de analito sea errónea, lo que implica que ha habido pérdidas o contaminaciones de analito durante el proceso.
- ➔ La señal medida sea errónea, es decir el sistema de medida (instrumento) presenta disfunciones o se han modificado las condiciones instrumentales

☺ **Errores debidos a la naturaleza de la muestra.** En la muestra hay uno o más componentes diferentes al analito que introducen cambios en los parámetros de la ecuación fundamental. Este hecho puede ser debido a que:

- ➔ Se introducen términos nuevos (aditivos o sustractivos) en la ecuación por acción de componentes generadores de señal.
- ➔ Se modifica el valor del blanco en presencia de la muestra y los componentes de la matriz.
- ➔ Se modifica el valor inicial de la sensibilidad debido a un cambio en el mecanismo de generación de la señal

Los errores del primer tipo, debidos al proceso, están relacionados con la **inercia** (robustez y/o solidez) del método analítico. Son detectados a través de las operaciones de control de calidad interno (IQC), mediante verificaciones planificadas utilizando patrones o blancos de control apropiados.

Por otro lado, los errores debidos a características de la muestra están relacionados con la **selectividad** del método analítico y, como se ha comentado,

se detectan en el estudio de validación del método analítico y se corresponden con la presencia de uno o más componentes diferentes al analito o analitos. En la segunda parte de esta tesis nos vamos a referir sólo a estos últimos y a partir de ahora vamos a considerar únicamente estos errores tipo, que son debidos a la naturaleza de la muestra.

Este componente (o componentes) presentes en la matriz se denominan **interferentes** y se definen[15] como *toda aquella sustancia que causa un error sistemático (de cualquier magnitud) en el resultado analítico para al menos un valor de concentración de analito incluido en el rango de aplicación del método.* Al error producido se le denomina habitualmente **interferencia**, y ésta es consecuencia de una baja selectividad del proceso respecto a la muestra analizada.

Generalmente el término interferente se asocia a cada componente específico, presente en la muestra que puede ser identificado, mientras que se usa el término de efecto matriz[9] al *efecto combinado de todos los componentes de la muestra distintos del analito que causa un error en el resultado analítico.*

El error introducido por un interferente o por la presencia de efecto matriz puede, a su vez, ser:

- ✓ constante
- ✓ depender de la concentración de analito
- ✓ depender de la concentración de interferente o de matriz
- ✓ depender de ambas concentraciones a la vez (interacción)

En este punto es necesario hacer un inciso para abundar sobre el significado de los términos de interferencia y efecto matriz, ya que existe en la literatura bastante confusión con el uso de ambos términos y con las diferencias de significado entre ellos.

Por un lado encontramos una distinción basada en las consecuencias derivadas del error producido. Así aparecen las siguientes definiciones:

- Efecto interferente. Contribución sobre la señal analítica producida por unos o varios componentes de la matriz sin que la sensibilidad se vea afectada.

- Efecto matriz. Situación que se produce cuando la matriz y/o otros analitos de interés modifican, aumentando o disminuyendo, la sensibilidad de la medida con relación al analito de interés.

En esta concepción sólo se distingue interferente de efecto matriz según den lugar a un error debido a la naturaleza de la muestra por la segunda o tercera vía respectivamente, sin distinguir qué tipo de componente o que características de él son las responsables de la interferencia.

Por otro lado, se utiliza el criterio antes especificado por el cual se considera efecto interferente el producido por un componente de la matriz identificado, mientras que al efecto conjunto de todos los componentes se le denomina efecto matriz. Tanto el interferente como el efecto matriz pueden causar:

- Error sistemático constante. Caracterizado por una contribución a la señal que es independiente de la concentración de analito, pero no necesariamente de la concentración de interferente o de matriz (de hecho no suele serlo).

- Error sistemático proporcional. Caracterizado por una modificación de la sensibilidad como consecuencia de una interacción entre el analito y la matriz globalmente considerada, o entre analito y uno o más interferentes considerados individualmente.

En este contexto se habla por tanto de **componentes constante** y **componente proporcional** del error sistemático debido al efecto matriz o a un determinado interferente.

1.3. Supresión de errores debidos al efecto matriz

En principio es posible diferenciar tres estrategias generales que se pueden aplicar con el objetivo de evitar que los resultados se vean afectados por los errores debidos al efecto matriz. Así, dependiendo de la metodología utilizada, se distingue entre:

✦ Eliminación del efecto matriz

Se basa en aislar el analito de la matriz o, al menos, en disminuir la cantidad de componentes de la matriz hasta unos niveles tales en los que la interferencia es despreciable (los errores introducidos son inferiores al 1 %). Por tanto, esta estrategia busca aumentar la selectividad del proceso aplicando un tratamiento previo de la muestra basado en un proceso de separación. En análisis cromatográfico, este proceso recibe el nombre de depuración de la muestra ("clean-up").

Esta estrategia, que puede ser apropiada y fácil para determinaciones de analitos individuales, presenta inconvenientes cuando se aplica sobre métodos de determinación multicomponente, ya que es difícil disponer de un método de separación que no arrastre también alguno de los analitos, lo que da lugar a pérdidas que generan a su vez errores sistemáticos debidos al proceso analítico.

✦ Compensación del efecto matriz

En esta estrategia los errores no se eliminan, sino que se busca la forma de que afecten por igual a patrones y a muestras con lo que se obtienen resultados libres de error. La compensación se puede llevar a cabo de varias formas:

- Estableciendo una calibración utilizando patrones preparados en presencia de matriz limpia. Es la denominada calibración con patrones en matriz (*MC, Matrix-matched Calibration*). Su inconveniente estriba en el hecho de disponer de matriz limpia y estable para realizar tanto las calibraciones como los controles de calidad.

- Aplicando el método de adición de patrón a la cuantificación de cada muestra. El inconveniente principal deriva de que es necesario establecer una calibración con patrones añadidos (*AC, Standard-added Calibration*) para cada muestra.

- Envenenando o contaminando el sistema instrumental con los componentes de la matriz de modo que se logre una saturación permanente del efecto matriz. Es una opción poco utilizada que se aplica en algunos casos en cromatografía de gases cuando el efecto matriz se produce en los procesos de transferencia del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria en la columna.

- Aplicando calibración multivariante. Esta metodología, propuesta en esta tesis, se puede utilizar para compensar el efecto matriz mediante la obtención de un modelo bivariante dependiente de la concentración de muestra y de patrón. La cuantificación de cada muestra se realiza mediante el método del cociente de pendientes (*MOSR, Method of Slope Ratio*) propuesto en el capitulo 8.

Esta estrategia ha sido aplicada en los capitulos 9 y 10 a la determinación de los herbicidas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2-(2-metil-4-clorofenoxi)-propiónico (MCPP), ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) y ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) en aguas.

✦ Corrección del efecto matriz

Como alternativa a las dos anteriores, que son las más utilizadas, también es posible llevar a cabo una corrección "a posteriori" de los resultados inicialmente obtenidos y que están afectados del error. Para ello se requiere cuantificar la magnitud del error sistemático debido a la matriz, independientemente de la posible presencia de otros errores sistemáticos.

Habitualmente la corrección se lleva a cabo utilizando los valores del **factor de recuperación** obtenidos en el estudio de validación. Esta metodología puede ser útil en el caso de errores constantes pero no corrige adecuadamente en el caso de errores proporcionales ya que no se suele disponer de diferentes valores de recuperación para cada concentración de analito.

Otra posibilidad estriba en obtener una expresión que relacione la magnitud del error en función de la concentración de analito, estableciendo una **función de corrección.**

Esta última posibilidad será la metodología desarrollada en el capitulo 5 y aplicada a la cuantificación de residuos del plaguicida lindano en pimiento (capitulo 6) y a la cuantificación de procimidona en la exposición dérmica de trabajadores de invernaderos (capitulo 7).

1.4. Estudio de interferentes

La selectividad es una propiedad cuya caracterización resulta difícil, dado que no existe un parámetro numérico aceptado para cuantificarla[18-20], y su validación requiere por ello la estimación de niveles de tolerancia para cada una de las especies presumiblemente interferentes[21-23].

Este estudio se realiza generalmente de forma univariante explorando, para una determinada concentración de analito (incluida en el intervalo de aplicación), la cantidad máxima de interferente en la disolución de trabajo que no genera un sesgo estadísticamente significativo en la determinación[24].

Esta aproximación presenta, a nuestro juicio, tres graves inconvenientes:

- es necesario una gran cantidad de trabajo experimental para cada interferente;
- por cada experimento, se obtiene un nivel de tolerancia referido sólo a un valor de concentración de analito y
- dado que estos valores no son aditivos no se dispone de información cuando varios interferentes se presentan juntos.

En el capitulo 11 se presenta una alternativa multivariante que permite, en un único experimento, estudiar el comportamiento del interferente sobre todo el rango de concentraciones de analito cubierto por el calibrado utilizando la metodología del diseño de experimentos. El empleo de esta metodología permite conocer los niveles de tolerancia de cada interferente en estudio, considerando de forma simultánea sus efectos a los diferentes niveles de concentración de analito.

---

18. Valcárcel M. and Rios A., *Analusis*, 18, 469, 1990.
19. Valcárcel M., Gómez Hens A. and Rubio S., *Trends Anal. Chem.*, 20, 386-393, 2001.
20. Danzer K., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369, 397-402, 2001.
21. Dadgar D. and Burnett P.E., *J. Pharm. Anal.*, 14, 23, 1995.
22. Vessman J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14, 867, 1996.
23. Persson B.A., Vesman J. and McDowall R.D., *LG-CG Int.*, 11, 160, 1998.
24. García Campaña A.M., Cuadros Rodríguez L., Jiménez Linares C., Alés Barrero F. and Román Ceba M., *Anal. Lett.*, 28, 369, 1995.

2. FORMACIÓN DE COMPLEJOS. ESTABLECIMIENTO DE LA ESTEQUIOMETRÍA Y LA CONSTANTE DE FORMACIÓN

La palabra *Estequiometría*[25] se deriva del griego *Stoicheion* que significa primer principio o elemento y *Metron* que significa medida, por lo que el término significa literalmente medir los elementos. Su significado práctico, sin embargo, sería la relación en peso entre las especies químicas reaccionantes y describe las relaciones cuantitativas entre los elementos en los compuestos (estequiometría de la composición) y entre las sustancias cuando sufren cambios químicos (estequiometría de la reacción). Los coeficientes necesarios para ajustar una ecuación química se llaman coeficientes estequiométricos y son esenciales a la hora de calcular las cantidades de reactivos utilizados o de productos formados en una reacción química.

Una reacción química[26] es el proceso mediante el cual tiene lugar una transformación química que puede ponerse de manifiesto mediante un cambio en las propiedades físicas como un cambio de color, la formación de un sólido, desprendimiento de un gas, desprendimiento o absorción de calor,... . Pero en ocasiones no aparece ningún signo de la reacción química con lo que para decidir si ha tenido lugar la reacción se necesitan evidencias de tipo químico.

Las reacciones usadas en Química Analítica en raras ocasiones son completas. La mayoría transcurren hasta un estado de *equilibrio químico* en el cual la relación de concentración de reactivos y productos es constante. Un tipo muy importante de reacciones analíticas son las de formación de complejos, donde las expresiones de las *constantes de estabilidad o formación* son ecuaciones algebraicas que describen las relaciones de concentración entre reactivos y productos en el equilibrio químico.

Ahora bien, dependiendo del tipo de reactivos podemos distinguir dos tipos de complejos:

---

25. Whitten K.W., Davis R.E and Peck M.L., *Química General,* 5ª Edición, Ed. Mc Graw Hill, 1998.
26. Petrucci R.H. and Harwood W.S., *Química General: Principios y Aplicaciones Modernas,* 7ª Edición, Ed. Prentice Hall Iberica, Madrid, 1999.

- *Complejos de coordinación,* que describen cualquier molécula que implica coordinación de ligandos a un metal central; el metal central puede ser un átomo o un ion y la especie puede ser un catión, un anión o una molécula neutra.
- *Complejos de inclusión,* que son los formados por un substrato, generalmente una molecula orgánica y un tipo especial de moléculas denominadas ciclodextrinas (CDs) que se comportan como un "organizador" del medio.

La Espectrofotometría de Absorción Molecular es una técnica muy útil para dilucidar la composición de iones complejos en disolución y para determinar sus constantes de formación. La eficacia de la técnica se debe al hecho de que las medidas cuantitativas de absorción se puede realizar sin perturbar los equilibrios que se estudian. Aunque la mayoría de los estudios espectrofotométricos de complejos se refieren a sistemas en los cuales un reactivo o un producto absorbe, también se pueden investigar con éxito sistemas no absorbentes. Este técnica es la más utilizada para la determinación de la estequiometría y la constante de formación de complejos en disolución, aunque algunos autores han hecho uso de otras técnicas como la Espectrometría de Fluorescencia Molecular[27], la Espectroscopía de Absorción Atómica[28] o la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección fluorescente[29].

2.1. Complejos de coordinación

Dos de los métodos para el establecimiento de la estequiometría y la constante de formación, más comúmente empleados en estudios de iones complejos, son el método Job[30], también denominado método de las variaciones continuas, y el método propuesto por Yoe y Jones[31] o de la razón molar.

27. Muñóz de la Peña A., Salinas F., Gómez M.J., Acedo M.I. and Sánchez Peña M., *J. Incl. Phenom.*, 15, 131-143, 1993.
28. Kakoi T.; Tomono Y; Goto M; Kago T. and Nakashio F., *Solvent Extraction Research and Development*, 4, 62-72, 1997.
29. Li C.Y., *Chromatographia*, 34, 182-184, 1992.
30. Job P., *Ann. Chim.*, 9, 113, 1928.
31. Yoe J.H. and Jones A.L.; *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.,* 16, 111, 1944.

Aunque menos utilizadas, también existen otras técnicas para la estimación de la estequiometría y la constante de formación como son el método de Harvey y Manning[32] o de la relación de pendientes, método de Holme y Langmyhr[33], método de Rose y Drago[34], método de Bent y French[35], método de Diehl y Lidstrom[36], método de dilución estequiométrica[37,38] y método de la dilución no estequiométrica[39].

Para un complejo formado por un metal M y un ligando L (M_mL_g) donde m y g represetan los coeficientes estequiométricos, estos métodos se pueden clasificar atendiendo a aquellos parámetros constantes o variables del sistema en estudio. Los parámetros C_M (concentración de metal) y razón molar ($r = C_M/C_L$, siendo C_L la concentración de ligando) (fracción molar, $x = C_L/(C_M + C_L)$ en el caso del método de Job) pueden ser variables independientes impuestas por el experimentador. Atendiendo a esta variables y considerando la espectrofotometría de absorción molecular como técnica analítica utilizada para la determinación de la estequiometría y la constante de formación, éstos se pueden clasificar en:

2.1.1. Métodos que operan a C_M y r variable

El único método donde tanto la concentración de metal como la relación estequiométrica es variable es el ***método de Job***. En este método varía tanto la concentración de ligando, C_L, como la de metal, C_M, cumpliendo la condición que la suma de los dos ($C = C_L + C_M$ = cte.) permanezca constante en todo el intervalo (por ejemplo $C_M:C_L$ = 9:1, 8:2, 7:3, y así sucesivamente). A continuación se mide la absorbancia de cada disolución a la longitud de onda adecuada y se corrige restando la absorbancia que presentaría la mezcla si no hubiese ocurrido la reacción, es decir la absorbancia que podría presentar el ligando.

---

32. Harvey A.E. and Manning D.L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 4488, 1950.
33. Holem A. and Langmyhr F.J., *Anal. Chim. Acta*, 36, 383, 1966.
34. Rose N.J. and Drago R.S., *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 6138, 1959.
35. Bent H.E. and French C.L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 63, 1568, 1941.
36. Diehl and Lindstrom, *Anal. Chem.*, 31, 414, 1959.
37. González García D.V., Arrebola Ramírez A. and Román Ceba M., *Talanta*, 26, 215, 1979.
38. Román Galan T., Arrebola Ramírez A. and Román Ceba M., *Talanta*, 27, 545, 1980.
39. Berzas Nevado J.J., Arrebola Ramírez A. and Román Ceba M., *Anal. Chim. Acta*, 124, 201, 1981.

De la representación de la absorbancia frente a la fracción molar de concentración de ligando ($x = C_L / C$) se obtiene una curva (Figura IN.1), de tal forma que conforme aumenta la concentración de ligando aumenta la señal analítica hasta llegar a la relación estequiométrica donde se obtiene un máximo (o un mínimo si el complejo absorbe menos que los reactivos) en la curva experimental que correspondería a la máxima formación de complejo y a partir de este punto al aumentar la concentración de ligando disminuye la señal analítica debido a la disminución de la concentración de metal en la disolución y por tanto a que la cantidad de complejo formada es menor.

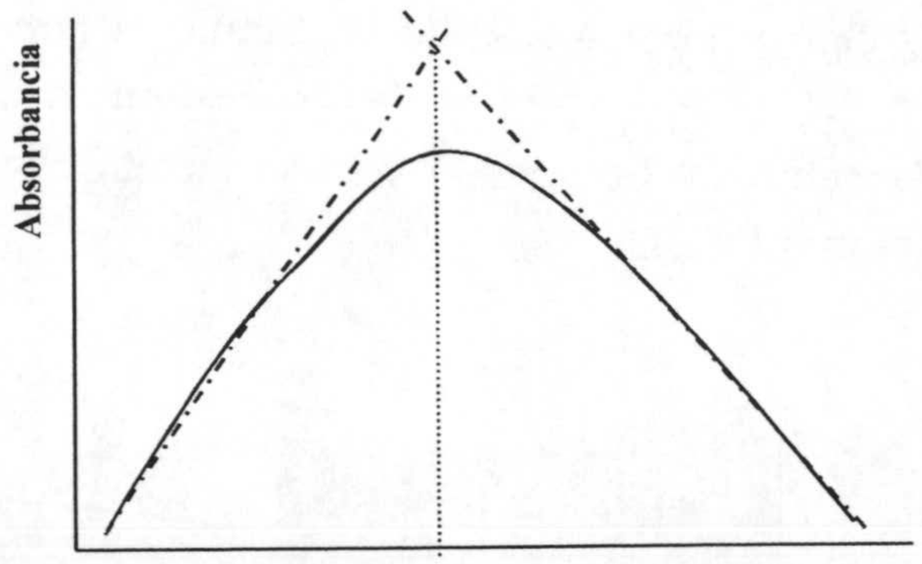


Figura IN.1

Representación del método de Job (g/(g+m) = Fracción molar estequiométrica)

Por lo tanto, del ajuste de las dos ramas de la curva se obtiene dos rectas que se cruzan, una de pendiente positiva debida al aumento de la concentración de complejo en la disolución y otra de pendiente negativa debida a la menor formación de complejo una vez alcanzado el punto estequiométrico. Dada la forma de la curva este método es sólo aplicable cuando se forma un único complejo, ML_g, entre el ligando, L y el metal, M.

Si el complejo es muy estable, los puntos experimentales obtenidos al medir la señal analítica de las diferentes disoluciones variando la concentración de ligando y de metal se ajustan a las ecuaciones de dos líneas rectas que se cortan en el punto correspondiente a la estequiometría del complejo. Si el complejo no es

muy estable los puntos experimentales se ajustan a una curva donde el punto de corte conseguido por la extrapolación de las líneas rectas, a las que se ajustan algunos de los puntos experimentales, permiten obtener la estequiometría del complejo. Así mismo, la constante de formación se puede deducir de la distancia vertical entre el punto de intersección y la curva experimental.

2.1.2. Métodos que operan a C_M constante y r variable.

Dentro de este grupo el método más utilizado es el denominado ***método de Yoe y Jones***. Este método estudia la influencia que ejerce la concentración de uno de los reactivos (generalmente el ligando) en el equilibrio, variando la concentración de ligando y permaneciendo constante la concentración de metal. De la representación de la señal analítica de las distintas disoluciones frente a la relación entre la concentración de ligando y la de metal ($r = C_L / C_M$) se obtiene también una curva (Figura IN.2).

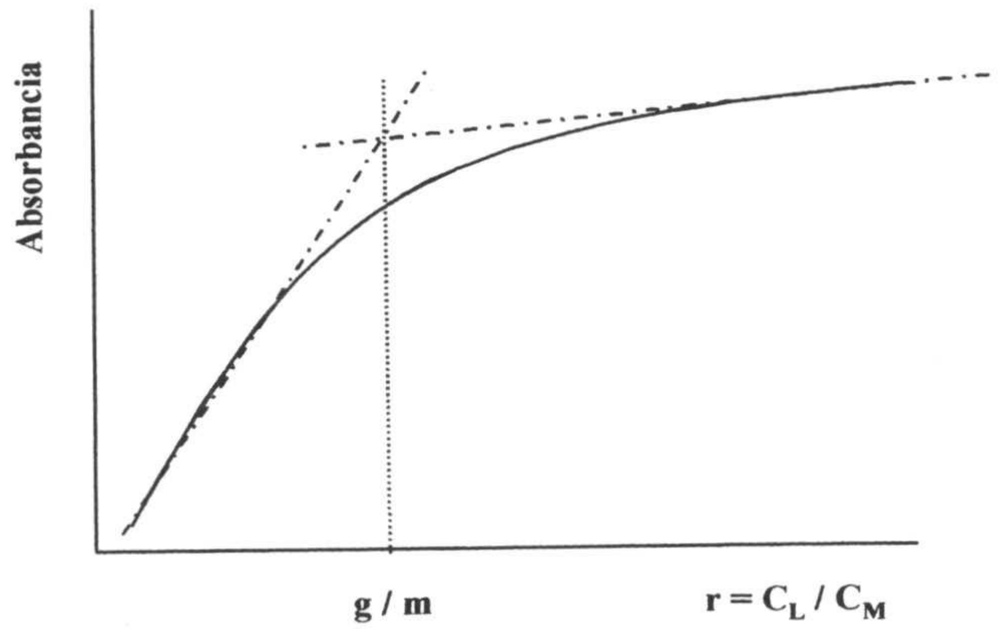


Figura IN.2

Representación del método de Yoe y Jones (g/m = razón molar estequiométrica)

Conforme aumenta la concentración de ligando aumenta la señal analítica pero, a diferencia del método de Job, al superar la relación estequiométrica la señal analítica puede aumentar un poco, obteniendo una recta de pendiente positiva menor que antes del punto estequiométrico; permanecer constante, con lo

que se obtiene una recta de pendiente cero; o incluso disminuir para obtener una recta de pendiente negativa. Ahora al ajustar los dos tramos de la curva se obtiene dos rectas una de pendiente positiva y otra de pendiente positiva, negativa o cero.

Al igual que en el método de Job, si el complejo es muy estable, los puntos experimentales obtenidos al medir la señal analítica de las diferentes disoluciones variando la concentración de ligando se ajustan a las ecuaciones de dos líneas rectas que se cortan en el punto correspondiente a la estequiometría del complejo. Si el complejo no es muy estable los puntos experimentales se ajustan a una curva donde el punto de corte conseguido por la extrapolación de las líneas rectas, a las que se ajustan algunos de los puntos experimentales, permite obtener la estequiometría del complejo. Así mismo, la constante de formación se puede deducir de la distancia vertical entre el punto de intersección y la curva experimental.

El ***método de Harvey y Manning*** es especialmente útil para complejos débiles, pero sólo es aplicable a sistemas en los que se forma un único complejo. El método supone, en primer lugar, que la reacción de formación del complejo se puede forzar hasta que sea completa mediante un gran exceso de algún reactivo y además que se cumple la ley de Beer en estas circunstancias. Para su aplicación se preparan dos series de disoluciones, una donde la concentración de ligando sea muy grande y en gran exceso con respecto al metal y otra donde la concentración de metal sea muy grande y en gran exceso con respecto al ligando, por lo que se supone que, en el primer caso, es despreciable la concentración inicial de metal y por tanto la concentración en el equilibrio será proporcional a la concentración de complejo y en el segundo caso es despreciable la concentración inicial de ligando y por tanto la concentración en el equilibrio será proporcional a la concentración de complejo.

De las representaciones de las absorbancias de estas disoluciones frente a la concentración de metal y ligando, respectivamente, se obtiene dos líneas rectas y del cociente de las pendientes de estas líneas rectas se obtiene la estequiometría del complejo (Figura IN.3).

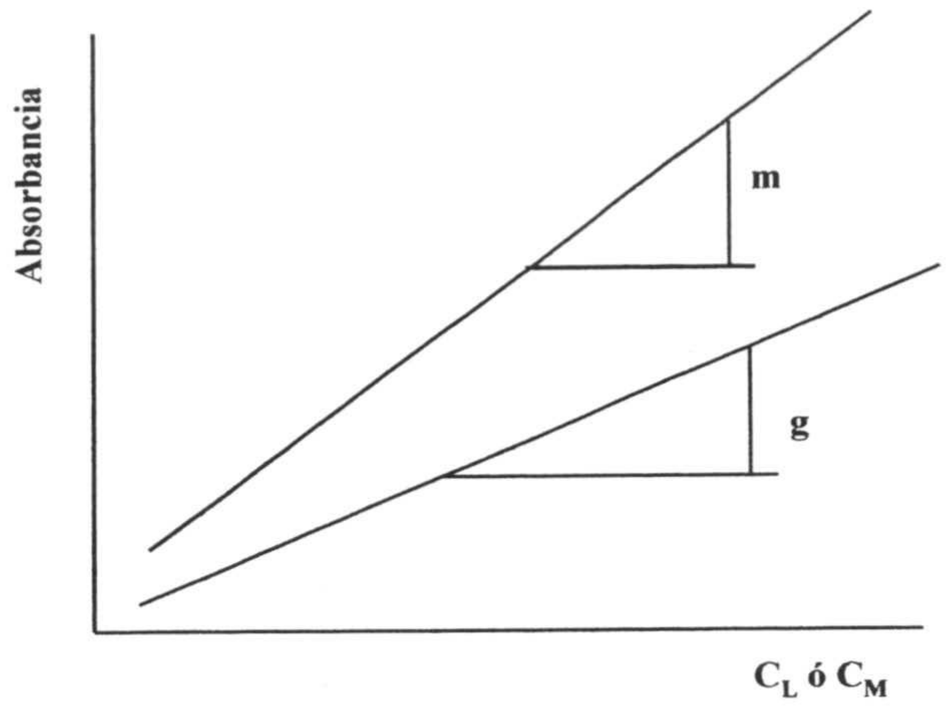


Figura IN.3

Representación del método de Harvey Manning

El ***método de Holme y Langmyhr*** es también útil para complejos débiles de la forma M_mL_g pero es necesario conocer la estequiometría del complejo poder determinar la constante de formación. Para ello se preparan disoluciones conteniendo todas la misma concentración de metal y concentración de ligando variable de forma que se cumpla que la relación molar C_L/C_M sea mayor de la razón estequiométrica. Se mide la absorbancia de estas disoluciones y se representa gráficamente la absorbancia elevaa a 1/m, dividido por la relación molar elevada a g/m ($A^{1/m}/r^{g/m}$) frente a la absorbancia de cada disolución. De la intersección de la línea recta obtenida con el eje de abscisa se obtiene el valor de la absorbancia teórica, A_o (que sería la absorbancia medida en gran exceso de ligando cuando todo el metal se ha complejado) y de la pendiente, la constante de formación, K_f (Figura IN.4).

En cambio el ***método de Bent y French*** es útil únicamente para el cálculo de la estequiometría y no de la constante de formación. Al igual que en el método de Harvey y Manning se preparan dos series de disoluciones, una que contiene la misma cantidad de metal y distinta de ligando de forma que $r = C_L/C_M$ sea mayor que la relación estequiométrica (g/m). De la representación del logaritmo de la absorbancia de cada disolución frente al logaritmo de la razón molar (log r) se obtiene una línea recta de cuya pendiente se obtiene el valor del coeficiente estequiométrico g (Figura IN.5). La otra serie de disoluciones se prepara de forma

que se mantenga constante la concentración de ligando y variable la de metal ligando para que r' = C_M/C_L sea mayor que la relación estequiométrica (m/g) y de la representación del logaritmo de la absorbancia de cada disolución frente al logaritmo de la razón molar (log r') se obtiene una línea recta de cuya pendiente se obtiene el valor del coeficiente estequiométrico m.

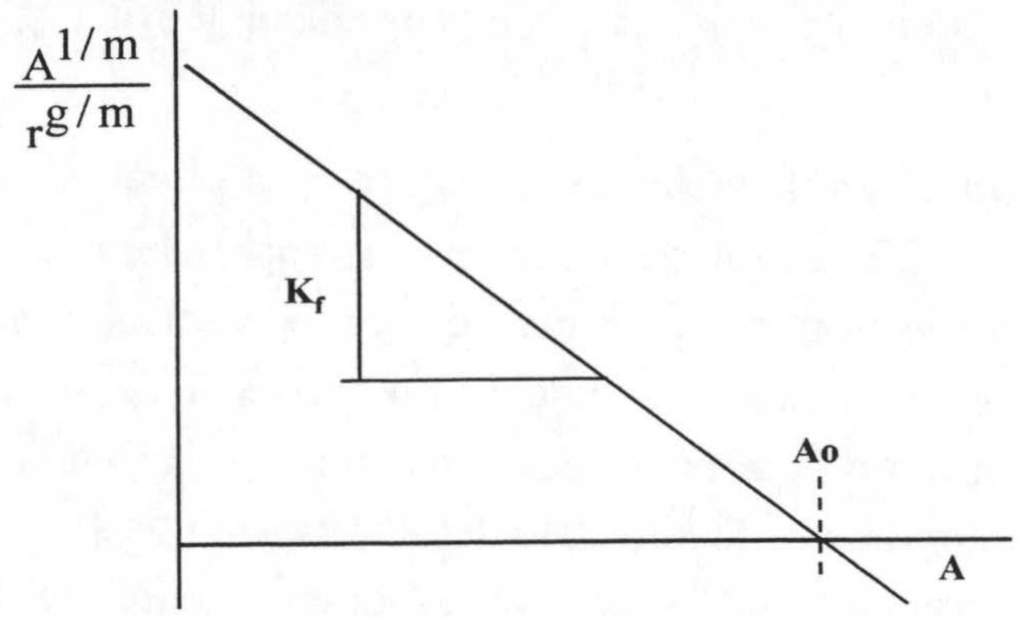


Figura IN.4

Representación del método de Holme Langmhyr

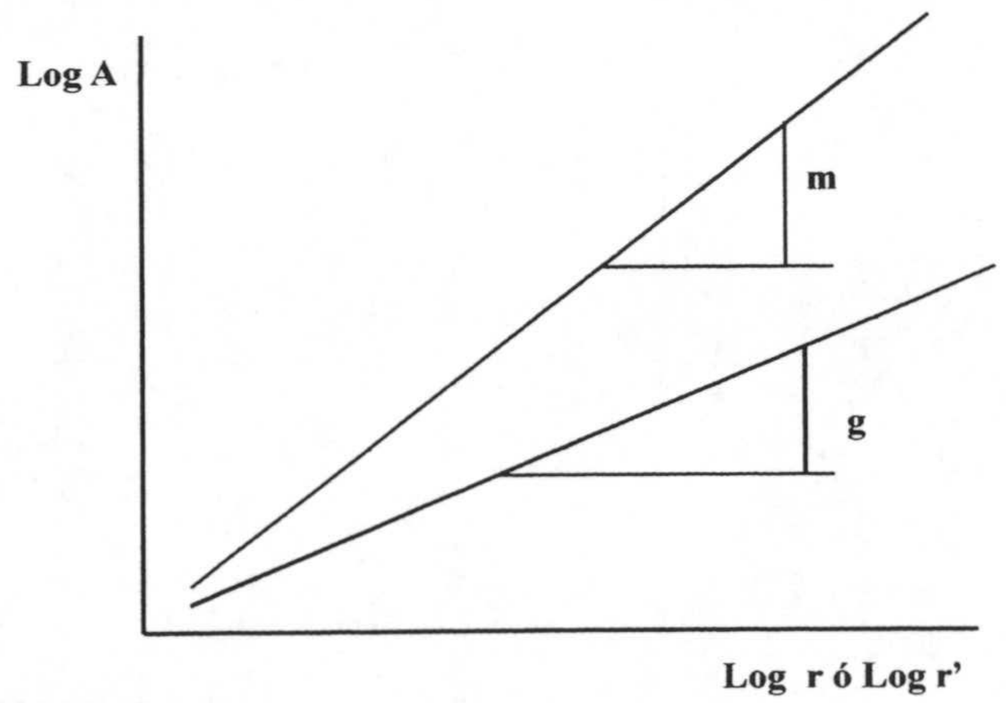


Figura IN.5

Representación del método de Bent French

Rose y Drago proponen un método que no requiere ninguna aproximación, aunque parte de la base que es necesario conocer la estequiometría del complejo. Solamente se preparan dos disoluciones que contienen la misma cantidad de metal y dos concentraciones de ligando muy diferentes de forma que en ambas se cumpla que la relación molar C_L/C_M >1. Se mide la absorbancia de ambas disoluciones con lo que se obtiene dos parejas de absorbancia – relación molar, sustituyendo ambas en la ecuación de la constante de formación y resolviendo las ecuaciones se obtiene el valor de la absorbancia teórica y de la constante de formación.

El ***método de Diehl y Lidstrom*** es útil para el cálculo de la estequiometría y la constante de formación de complejos mononuclerares débiles de la forma ML_g. Para la aplicación de este método es necesario conocer la absorbancia teórica A_o. En este método se mide la absorbancia de disoluciones preparadas manteniendo constante la concentración de metal y variando la concentración de ligando, con la condición de que la relación molar $r = C_L/C_M$ sea mayor que n. Representando gráficamente el logaritmo del cociente de la absorbancia y la diferencia entre la absorbancia teórica y la experimental en cada caso frente al logaritmo de la razón molar, r, se obtiene una línea recta de cuya pendiente se deduce el valor del coeficiente estequiométrico g y del punto de corte con el eje de abscisa se obtiene la constante de formación del complejo formado K_f (Figura IN.6).

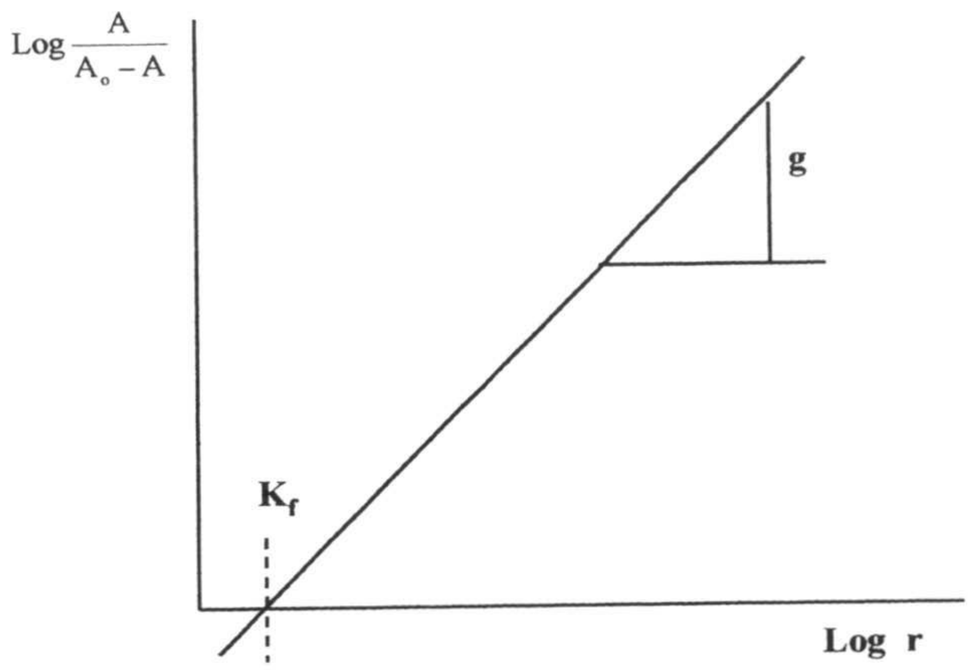


Figura IN.6

Representación del método de Diehl Lidstrom

2.1.3. Métodos que operan a C_M variable y r constante

El ***método de dilución estequiométrica*** permite determinar la constante de formación de complejos relativamente fuertes y además distinguir entre complejos mono y polinucleares. Para ello se preparan disoluciones que contienen distintas concentraciones de metal y de ligando de modo que se cumpla que $r = C_M/C_L$ sea constante. Se mide la absorbancia de cada disolución frente a una de referencia conteniendo la misma cantidad de ligando pero no de metal. Representando gráficamente el cociente de la absorbancia elevado a 1/(g+m) y la concentración de metal ($A^{1/(g+m)}/C_M$) frente al cociente de A/C_M se obtiene una línea recta de cuya pendiente se obtiene la constante de formación (Figura IN.7). Solamente se obtiene una línea recta cuando se le asigna a g y m el valor correspondiente a la estequiometría del complejo, en caso contrario se origina una curva.

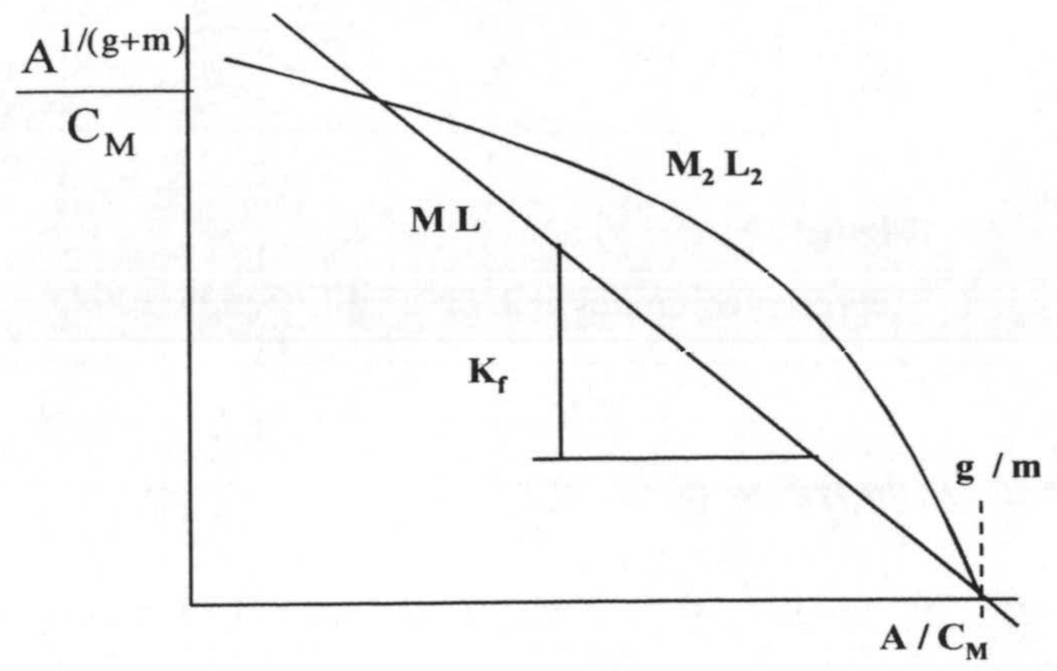


Figura IN.7

Representación del método de dilución estequiométrica

El ***método de dilución no estequiométrica*** es útil para determinar la constante de formación de complejos débiles e incluso para complejos polinucleares. Para ello se preparan disoluciones que contienen distintas concentraciones de metal y de ligando, cuando $r = C_M/C_L$ sea constante y mucho mayor que n/m. La absorbancia de cada disolución se mide con otra de referencia conteniendo la misma cantidad de ligando pero no de metal. Representando

gráficamente el cociente $A^{1/(g+m)}/[C_M^{(m+g)/g} \cdot (r - g \cdot A/(C_M \cdot \varepsilon))^{g/m}]$ (ε el coeficiente de absortividad molar del complejo) frente al cociente de A/C_M se obtiene una línea recta de cuya pendiente se obtiene la constante de formación (Figura IN.8).

Solamente se obtiene una línea recta cuando se le asigna a g y m el valor correspondiente a la estequiometría del complejo, en caso contrario se origina una curva.

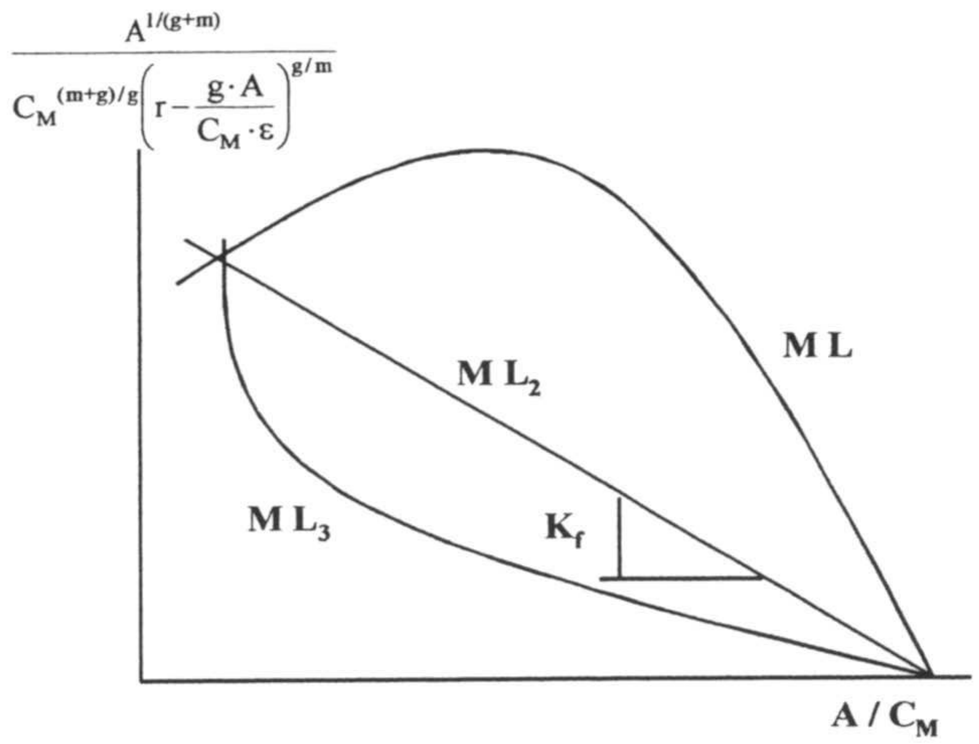


Figura IN.8

Representación del método de dilución no estequiométrica

2.1.4. Problemas más frecuentes

Los métodos de Job y Yoe y Jones son los que vamos a tratar en los dos primeros capítulos dado que habitualmente presentan problemas en la elección de los tramos rectos de la curva experimental.

Las condiciones a cumplir para poder aplicar estos dos métodos a complejos formados generalmente por un metal y un ligando son, en primer lugar, que se formen complejos de estequiometría 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 o como máximo 5:1, es decir que la cantidad de ligando en el medio no debe ser muy superior a la de metal para que se de la reacción de formación de éste, en segundo lugar que se cumpla la ley de Beer en el rango estudiado y además que se obtenga una señal analítica en el rango de concentraciones que se va a estudiar. Si alguna de estas condiciones no se cumpliera no podría aplicarse ninguno de estos métodos.

En la práctica, la aplicación tradicional del método de Job y de Yoe y Jones puede producir una gran variedad en los valores de la estequiometría y la constante de formación estimados. Con estos procedimientos la curvatura que se obtiene en las cercanías de la relación estequiométrica debida a que la reacción de formación del complejo no es cuantitativa, puede impedir una adecuada elección de los segmentos lineales, lo que se traduce en una gran incertidumbre, no cuantificada, en las conclusiones de la experiencia.

Generalmente el trazado de las líneas rectas se realiza de forma gráfica con lo que el valor obtenido no tiene corroboración estadística, ya que las líneas rectas utilizadas para ello no están validadas adecuadamente y por supuesto, la utilización de un método gráfico impide la obtención de un intervalo de cobertura tanto para el valor de la estequiometría como para la constante de formación calculada.

Otra forma de trazar de las líneas rectas es mediante la utilización de la regresión por mínimos cuadrados. El inconveniente de este método es que es difícil elegir hasta qué punto experimental se considera que hay linealidad y por tanto a partir de cúal empieza la curvatura. Por otra parte, la existencia de puntos anómalos en los datos experimentales puede modificar el trazado de dichas líneas rectas y por tanto el valor de la relación estequiométrica obtenida.

Una forma de evitar las situaciones ambiguas, expuestas anteriormente, incluye el desarrollo de una metodología simple y rigurosa para la determinación de la estequiometría y la constante de formación y sus correspondientes incertidumbres, que proporcionan un intervalo de cobertura para los valores estimados tanto en el cruce de las rectas como en el cálculo del grado de disociación y la constante de formación de los complejos estudiados.

Para desarrollar esta metodología hemos propuesto un protocolo donde se utilizan tres modelos de regresión aplicados a las distintas partes de la curva experimental, que son: regresión lineal por mínima mediana de cuadrados (LMSR, *Least Median Squares Regression*)[40], regresión lineal por mínimos cuadrados (LSR, *Least Squares Regression*)[41] y regresión polinómica por mínimos cuadrados (LSPR, *Least Squares Polynomial Regression*)[41].

---

40. Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J. and Smeyers-Verbeke J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Cap. 12, 1997.
41. De Levie R., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 30, 59, 2000.

Para validar la metodología propuesta, ésta se va a aplicar a datos simulados considerando complejos coloreados que presentan un máximo de absorción en la región UV-visible utilizando ambos métodos. La aplicación del método de Job se ha realizado para un complejo formado entre Ni(II) y un azo compuesto llamado $pRNa_2$ (sal disódica del ácido p-nitrofenilazo-2-naftol-3,6-disulfónico) y del método de Yoe y Jones sobre el complejo formado entre Co(II) y el mismo ligando $pRNa_2$.

2.2. Complejos de inclusión

El ***método de Benesi-Hildebrand***[42], es el más utilizado para calcular la estequiometría y establecer la constante de formación de complejos de inclusión, aunque también puede ser utilizado en complejos de coordinación cuando la proporción entre la concentración de ligando y la de metal es muy elevada y no es posible utilizar ninguno de los métodos anteriores.

Este método suele ser utilizado para el cálculo de constantes de formación de complejos con estequiometrías 1:1 y sólo es aplicable para complejos del tipo ML_n. Para aplicarlo se preparan disoluciones que contienen cantidades constantes de analito (generalmente una molécula orgánica) y crecientes de ligando (como por ejemplo la β-ciclodextrina) de tal forma que C_L sea mucho mayor que C_M en todas las disoluciones. Se mide la señal analítica de cada disolución y se representa gráficamente el cociente $1/\Delta A$ (ΔA sería la diferencia entre la señal analítica del complejo y la de analito o substrato) frente al cociente $1/C_L{}^g$ (Figura IN.9). Se obtiene una línea recta cuando la estequiometría del complejo de inclusión coincide con el valor de n seleccionado y a partir del cociente entre el término independiente y la pendiente se calcula la constante de formación.

---

42. Benesi H.A. and Hildebrand J.H., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2703-2707, 1949.

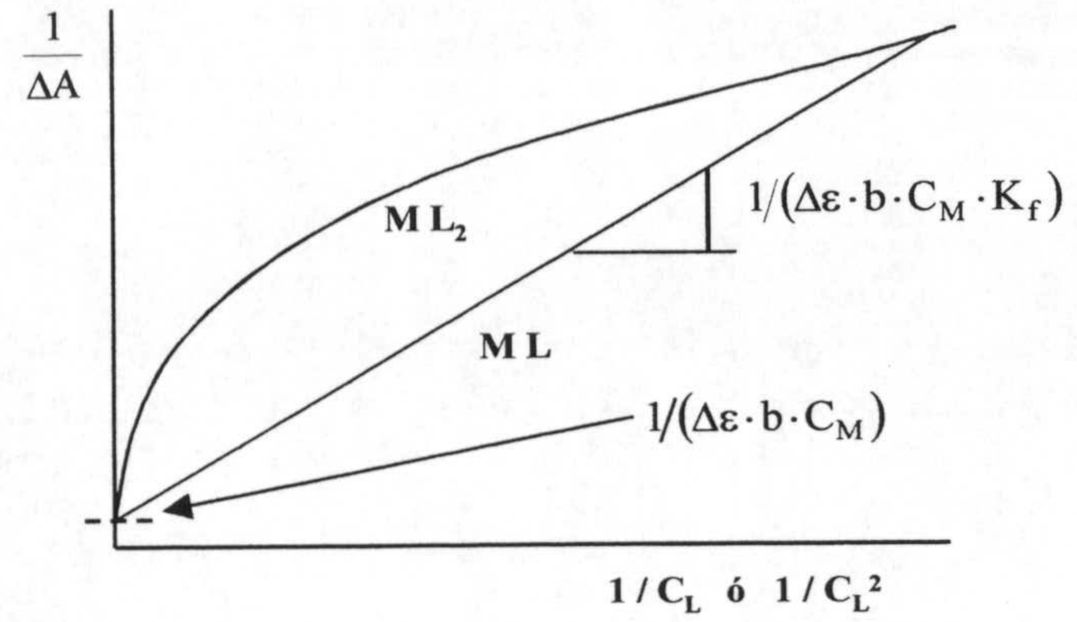


Figura IN.9

Representación del método de Benesi Hildebrand

2.2.1. Ciclodextrinas

La familia de las ciclodextrinas (CDs) comprende, entre otras, tres oligosacáridos cíclicos muy conocidos y de producción industrial. Las CDs se nombran por medio de letras griegas par denotar el número de unidades de D-glucosapiranosa que contienen (α-, β- y γ-ciclodextrinas para las de 6, 7 y 8 unidades, respectivamente) no pudiendo existir con menos de 6 unidades por impedimentos estéricos. Pueden existir homólogos de 9 o más unidades, pero presentan dificultades para ser purificados y su capacidad de complejación es pobre. Las moléculas de α-D-glucopiranosa están unidas entre sí por enlaces α-(1,4) y como consecuencia de la conformación del C_1 de estas unidades y la ausencia de libre rotación de los enlaces glucosídicos, estas moléculas no son totalmente cilíndricas, sino que presentan una conformación troncocónica.

Las dimensiones de las CDs varían según el número de unidades de glucosapiranosa. Debido a los diferentes diámetros de la cavidad ($\alpha < \beta < \gamma$), cada CD muestra distinta capacidad para formar compuestos de inclusión con moléculas de distinto tamaño (Figura IN.10).

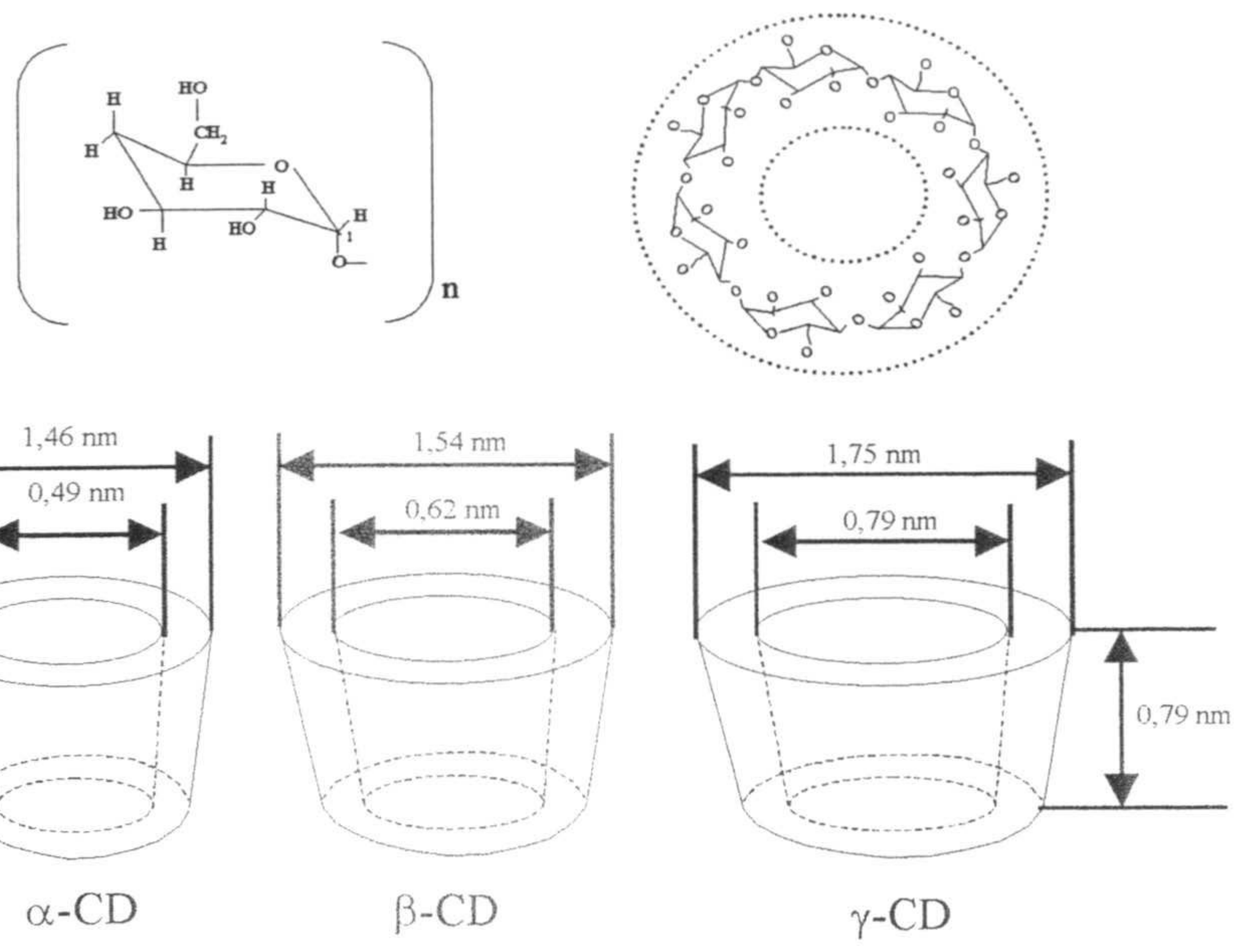


Figura IN.10

Tipos de ciclodextrinas

En solución acuosa, la cavidad ligeramente apolar de la ciclodextrina está ocupada por moléculas de agua que pueden ser sustituidas rápidamente por otras moléculas (substrato) menos polares que el agua. En esta situación, la ciclodextrina se comporta como un "organizador" del medio, siendo la proporción más frecuentemente de una molécula de ciclodextrina por cada una de substrato (estequiometría 1:1).

Una de las técnicas donde más se utiliza las ciclodextrinas para aumentar la señal analítica es la Espectrofotometría de Fluorescencia Molecular[43]. En el caso de estructuras moleculares orgánicas que muestran fluorescencia, su interacción con CDs produce normalmente un aumento en la señal de fluorescencia[44,45] a través de una encapsulación parcial o una inclusión total. La intensificación de la luminiscencia de ciertas moléculas incluidas en el interior de

---

43. Rekharsky M.V. and Inoue Y., *Chem. Rev.*, 98, 1875-19717, 1998.
44. Maafi M., Laassis B., Aaron J.J., Mahedero M.C., Muñoz de la Peña A. and Salinas F., *J. Inclus. Phenom. Mol. Recogn. Chem.*, 22, 235-247, 1995.
45. Coly A. and Aaron J.J., *Anal. Chim. Acta*, 360, 129-141, 1998.

la cavidad de la CD es debida a la alta protección contra la atenuación (quenching) u otros procesos que ocurren en la disolución.

No obstante, la baja solubilidad de las CDs en agua es un parámetro que limita su utilización en fluorescencia, a pesar de ello, la β-CD es la más ampliamente usada, dado que el diámetro de su cavidad es normalmente compatible con la mayoría de los compuestos[46,47]. Por consiguiente, la estructura de β-CD se ha modificado con objeto de mejorar su solubilidad y prevenir su cristalización. Por ejemplo, la 2-hidroxipropil-β-CD (HP-β-CD)[48,49] presenta una solubilidad mucho mayor (1620 mg/ml a 25 °C en una mezcla 50/50 v/v de agua/metanol) que β-CD (13 mg/ml en la misma mezcla).

Debido a la utilidad de las ciclodextrinas en las áreas de química, farmacia, medio ambiente o análisis de alimentos, entre otros, se han llevado a cabo varios estudios para evaluar el grado de complejación de las CDs. Con objeto de investigar y desarrollar nuevos métodos analíticos para el análisis de contaminantes, el estudio de las propiedades luminiscentes de los complejos de la inclusión entre CDs y plaguicidas constituye hoy en día un área emergente de la Química Analítica con grandes perspectivas. En el caso de análisis de plaguicidas, existen relativamente pocos artículos dedicados al estudio de complejos de la inclusión fluorescentes con CDs[50]. Para plaguicidas que presentan fluorescencia nativa, como aminocab, carbendazim y coumatetralil[51], las señales de fluorescencia son muy intensas en medios orgánicos pero en soluciones acuosas sufren efecto atenuador debido a la interacción con el disolvente. Este problema se resuelve formando complejos de inclusión con CDs (generalmente β-CD) en disoluciones acuosas.

Para plaguicidas que no pesentan fluorescencia nativa, la derivatización fotoquímica permite su conversión en compuestos fluorescentes. Esta técnica llamada fluorescencia inducida fotoquímicamente a temperatura ambiente

---

46. Muñoz de la Peña A., Salinas F., Gómez M.J., Acedo M.I. and Sánchez Peña M., *J. Inclus. Phenom. Mol. Recogn. Chem.*, 15, 131-143, 1993.
47. Will A.Y., Muñoz de la Peña A., Ndou T.T. and Warner I.M., *Appl. Spectroscopy*, 49, 520-525, 1995.
48. Maafi M., Aaron J.J., Mahedero M.C. and Salinas F., *Appl. Spectroscopy*, 52, 91-95, 1998.
49. Maafi M., Mahedero M.C. and Aaron J.J., *Talanta*, 44, 2193-2199, 1997.
50. Coly A. and Aaron J.J., *Talanta*, 46, 815-843, 1998.
51. García-Sanchez F., Cedazo M., Lovillo J. and Navas-Díaz A., *Talanta,* 43, 1327-1333, 1996.

(RTPIF, *Room Temperature Photochemically-Induced Fluorescence*) está basada en la conversión de analitos no fluorescentes en fotoproductos fluorescentes después de la irradiación directa con luz ultravioleta. Desde un punto de vista analítico, no es necesario identificar la estructura del compuesto fluorescente formado después de la irradiación porque la señal de fluorescencia es reproducible y directamente proporcional a la concentración de analito no fluorescente. Como ejemplo de esta reacción destacan los herbicidas clorofenoxiácidos, que no muestran fluorescencia nativa, así como otros plaguicidas aromáticos, que pueden ser convertidos en fotoproductos altamente fluorescentes[50], permitiendo el establecimiento de nuevos métodos de análisis[52,53]. Además, se ha estudiado la influencia de medios organizados como surfactantes catiónicos, aniónicos y no-iónicos sobre la derivatización fotoquímica de estos herbicidas en estática, mediante irradiación estática y en flujo, permitiendo la determinación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y de Mecoprop (MCPP) en medio de micelar catiónico, evitando con ello el uso de disolventes orgánicos[54,55].

2.2.2. Problemas más frecuentes

En el tercer capítulo se va a tratar el método de Benesi–Hildebrand (B-H), dado que es el más utilizado para obtener la constante de formación en complejos de inclusión donde la concentración de substrato suele ser mucho mayor que la de ciclodextrina.

Generalmente, las CDs forma un complejo 1:1 con el substrato, pero también es posible encontrar otras estequiometrías. La evaluación correcta de la estequiometría es necesaria para una determinación exacta de la constante de inclusión ya que ésta proporciona una medida de la formación del complejo. El método B-H puede utilizarse para determinar la estequiometría y la constante de inclusión del complejo pero muestra varias desventajas en su aplicación clásica en términos de inexactitud en la estimación de la constante de inclusión[56,57].

52. Eremin S.A., Laasis B., Aaron J.J., *Talanta*, 43, 259-301, 1996.
53. García L.F., Eremin S.A. and Aaron J.J., *Anal. Lett.*, 29, 1447-1461, 1996.
54. García-Campaña A.M. and Aaron J.J., *Luminescence*, 15, 110-112, 2000.
55. García-Campaña A.M., Aaron J.J. and Bosque-Sendra J.M., *Talanta*, 55, 531-539, 2001.
56. Martin R B., *J. Chem. Educ.*, 74, 1238-1240, 1997.
57. Yang C, Liu L, Mu T W, Gluo Q X., *Anal. Sci.*, 16, 537-539, 2000.

Uno de los problemas de la aplicación de LSR en el método B-H es que al considerar como variable independiente la inversa de la concentración el rango obtenido para la variable X, ésta no es uniforme y por tanto una pequeña variación a concentraciones bajas (alto valor de X) implica una gran variación en la pendiente de la recta de calibración obteniendo un amplio rango en el valor de la constante de formación que se traduce en un gran valor de incertidumbre.

Hemos evaluado distintos métodos estadísticos, entre los que cabe citar el método de Bootstrap[58] y el método de Jackknife[58], ambos no paramétricos, para determinar la constante de formación y su incertidumbre asociada recomendando el que, a nuestro juicio, proporciona los mejores resultados. Estos métodos se han aplicado a la determinación de la constante de inclusión del complejo fluorescente formado por HP-β-CD y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), mediante fluorescencia inducida fotoquímicamente.

3. CALIBRACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA

La calibración se define[59,60] formalmente como *el conjunto de operaciones que establecen, en unas condiciones especificadas, la relación existente entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o un material de referencia (RM), y los valores correspondientes de esa magnitud obtenidos mediante un patrón*; entendiendo por patrón *una medida materializada, un instrumento de medida, un material de referencia o un sistema de medida destinado para definir, proporcionar, conservar o reproducir una unidad o uno o más valores de una magnitud con el objeto de ser utilizado como referencia.*

---

58. Efron B, Tibshirani R J., *An introduction to the bootstrap*, Chapman & Hall/CRC: UK, 1993.
59. VIM: *International vocabulary of basic and general terms used in metrology*, 2nd ed. BIPM, IEC, IFCC, ISO, OIML, IUPAC, IUPAP, Geneva, 1993.
60. UNE–EN 30012-1: *Requisitos de aseguramiento de la calidad de los equipos de medida – Parte 1: Sistema de confirmación metrológica de los equipos de medida.* Asociación española de normalización y certificación (AENOR), Madrid, 1994.

Esta definición de la calibración[61] abarca diferentes operaciones que puede estudiarse desde un punto de vista "**Metrológico**" o "**Metodológico**". Inicialmente, en metrología, la calibración se puede clasificar por un lado en calibración directa e indirecta, y por otro en calibración de equipos y procesos. Sin embargo, desde el punto de vista metodológico, la base de la clasificación es la calibración de procesos que tiene en cuenta aspectos tales como el uso de patrones de calibración, problemas relacionados con la matriz y la presencia de interferencias.

3.1. Aspectos metrológicos de la calibración

Desde un punto de vista metrológico[61], la calibración es una operación básica dentro de las actividades de los laboratorios de ensayo que tiene como objetivo el relacionar la magnitud de entrada ("input") y la de salida ("output") de un sistema de medida.

Otra definición de calibración, de contenido similar a la definición anterior, se presenta en un documento ISO acerca de la capacidad de detección en procesos de medida[62]. Esta definición genérica da lugar a malas interpretaciones, así por un lado es usual encontrar diferentes nombres para la operación de calibración, y diferentes tipos de calibración llamados de la misma forma.

IUPAC[63] distingue entre dos diferentes tipos de calibración:

- Función de Calibración para la identificación de especies y análisis cualitativo. Es decir, calibración de los parámetros analíticos que caracterizan los tipos de especies químicas estableciendo un modelo para la identificación y el análisis cualitativo.
- Función de Calibración para análisis cuantitativo, cuyo principal objetivo es obtener la concentración de analito como una función de la respuesta instrumental.

---

61. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E.M. and Laso Sánchez J., *Trends Anal. Chem.*, 20, 195-206, 2001.
62. ISO 11843-1: *Capability of detection, Part 1: Terms and definitions*, ISO, Geneva, 1997.
63. Danzer K. and Currie L.A., Guidelines for calibrations in analytical chemistry, Part 1: Fundamentals and single component calibration, IUPAC recommendations, *Pure Appl. Chem.*, 70, 993-1014, 1998.

En general, la calibración es una operación que relaciona, para un sistema de medida, la respuesta de un instrumento (magnitud de salida), y el valor proporcionado por un patrón (magnitud de entrada). Dependiendo de la relación entre estas magnitudes y el sistema de medida, podemos clasificar la calibración cuantitativa de dos formas diferentes no excluyentes:

- Distinguir entre calibración directa e indirecta,
- Distinguir entre calibración de equipos o instrumentos y calibración de procesos o métodos.

Estas dos últimas vertientes de la calibración, **calibración de equipos** y **calibración de procesos**, están implícitas en la definición que aparece en la norma ISO 11095[64], según la cual la calibración es *un procedimiento que determina la diferencia sistemática que puede existir entre un sistema de medida y un sistema de referencia representado por un material de referencia y su valor aceptado*; donde el término "sistema" se utiliza para representar no sólo un instrumento de medida sino también un conjunto de procedimientos, operadores y condiciones ambientales asociadas con dicho instrumento que caracterizan el proceso de medida, y el término "Material de Referencia (RM)" sustituye al más genérico de "patrón", y se define[59,60] como *material o sustancia en el que una o varias propiedades se encuentran suficientemente bien definidas para permitir emplearlo en la calibración de un instrumento, en la evaluación de un método de medida, o en la asignación de valores de un material.*

3.1.1. Calibración directa

Se establee cuando el valor del patrón está expresado en las mismas unidades en las que se expresa el resultado de la medida (ambos valores, patrón y respuesta, son medidas de la misma magnitud).

La calibración directa tiene el objetivo[59] principal de conocer la desviación del equipo o proceso en relación con un patrón, es decir *la diferencia entre el valor obtenido y el valor de referencia*, que es introducida por un equipo o proceso en las medidas realizadas. Cuando la desviación es constante, se

64. ISO 11095: Linear calibration using reference materials. International Organization for Standardization, Geneva, 1996.

representa habitualmente por el término de corrección de la medida, mientras que cuando el sesgo es proporcional al valor medido, hablamos de factor de corrección. Por tanto, cuando se utilice un equipo o se aplique un proceso que está calibrado, es posible compensar el valor obtenido y, como consecuencia, conseguir un adecuado valor del mesurando libre de error sistemático. El término mesurando[59,60], propio de la Metrología, indica: *la magnitud a ser medida*, que en el caso del análisis químico cuantitativo suele ser el contenido (o cantidad) de analito, expresado como concentración o masa.

El procedimiento de calibración directa se basa siempre en medir el patrón y comparar el valor obtenido con el valor declarado del patrón. La diferencia entre en ambos valores se expresa con dos denominaciones:

Sesgo = Valor medido – Valor patrón

Corrección = Valor patrón – Valor medido

y siempre se cumple que: Corrección = – Sesgo.

La **corrección**[59,60] se define formalmente como *el valor que, añadido algebraicamente al resultado no corregido de una medida, sirve para compensar un error sistemático*; mientras que el valor del **sesgo o error**[65], definido como: *la diferencia entre el valor estimado de un resultado y un valor de referencia aceptado*, representa la expresión metrológica del error sistemático y se utiliza cuando el valor medido se estima a partir de la media aritmética de varias medidas realizadas sobre el mismo objeto.

El valor de la corrección permite estimar valores reales insesgados del mesurando, identificando al valor real con el valor declarado del patrón, y operando en la forma:

$$X_{est} = X_{exp} + \delta$$

donde X_{est} indica el valor estimado para el resultado de la medida; X_{exp} es el valor medido u obtenido en la medición; y δ representa la corrección estimada en la calibración (dicha corrección puede ser positiva o negativa en función de que el error sea por defecto o por exceso).

65. ISO 3534-1: *Statistics – Vocabulary and symbols.* ISO, Geneva, 1996.

En el caso de que la relación entre ambos valores se exprese como un cociente, nuevamente se definen dos parámetros:

Error relativo = (Valor medido / Valor patrón) – 1

Factor corrección = Valor patrón / Valor medido

y por tanto: Factor de corrección = 1 / (Error relativo + 1)

El **factor de corrección**[59] se define como *un factor numérico por el que debe multiplicarse el resultado no corregido de una medida para compensar un error sistemático*. Por tanto, identificando nuevamente el valor real con el valor declarado del patrón, se puede expresar que:

$$X_{est} = X_{exp} \cdot \Phi$$

donde nuevamente X_{est} es el valor estimado para la muestra (resultado final de la medida); X_{exp} es el valor medido; y Φ representa el factor corrección obtenido en la calibración.

Estos valores, corrección o factor, estimados a partir de la calibración se refieren únicamente al punto donde se ha realizado dicha calibración. Por tanto si se desea conocer el comportamiento del equipo o proceso a lo largo de un rango de valores, es necesario realizar la calibración en una serie de puntos y para cada uno de ellos se establece su correspondiente corrección o factor de corrección.

La corrección correspondiente a cualquier otro punto se obtiene a partir de estos valores obtenidos experimentalmente, y será el analista quien decida la metodología a utilizar con este fin. Para ello se pueden utilizar diferentes estrategias:

- Utilización del valor más próximo o del valor promedio entre los dos más cercanos
- Estimación de un nuevo valor interpolado entre los dos puntos más cercanos
- Determinación de una función de corrección, (lineal, polinómica de orden superior, exponencial, etc.) que puede establecerse de dos formas:

  i) que relacione la corrección con el valor medido por el equipo:

  Corrección = f(Valor medido)

ii) que relacione el valor medido por el equipo con el valor del patrón:

Valor medido = f(Valor patrón)

Los estudios de recuperación, que se llevan a cabo como parte del programa de validación de ciertos procesos analíticos, no representan más que una calibración directa de dichos procesos.

3.1.2. Calibración indirecta

En este tipo de calibración el equipo suministra un valor (denominado genéricamente señal de medida o respuesta instrumental) que es de diferente magnitud que el que caracteriza al patrón, y por tanto ambos vienen expresados en unidades distintas.

La calibración consiste en una traslación de las unidades de la señal medida a las unidades de la magnitud a determinar; esta traslación se realiza a través de un factor multiplicativo habitualmente denominado en este contexto como factor de respuesta, definido como:

Factor de respuesta = Respuesta medida / Valor patrón

Una vez realizada la calibración, los valores del mesurando se obtienen a partir de las respuestas para cada muestra utilizando un factor de calibración:

Factor de calibración = 1 / Factor de respuesta

Y por tanto, la expresión queda:

$$X_{est} = R \cdot \Phi$$

donde X_{est} es el valor estimado del mesurando; R indica la respuesta obtenida en la medida y Φ representa el factor de calibración.

Sin embargo, salvo en algunos pocos ejemplos (por ejemplo, en las determinaciones cromatográficas que utilizan la denominada calibración en un punto) es más frecuente expresar el resultado de una calibración indirecta a través de una relación matemática que se establece empíricamente entre ambas magnitudes (respuesta/patrón) en forma de función de calibrado:

Respuesta = f(valor patrón).

El procedimiento de calibración se basa, en este caso, en obtener la respuesta instrumental correspondiente a una serie de patrones caracterizados por un determinado valor del mesurando. A partir de las parejas de valores patrón/respuesta, o bien se obtienen los diferentes factores de calibración, o bien se estima una función de calibrado (caracterizada por una serie de parámetros o coeficientes de calibración) que explique suficientemente bien la variabilidad de todos los datos, y que permita, por tanto, realizar interpolaciones intermedias entre patrones dentro del rango de valores explorado experimentalmente. Generalmente, en este último caso, se utilizan métodos estadísticos de regresión para encontrar la mejor función de calibración (en términos geométricos se expresa como la realización de un ajuste de los datos a una curva de calibrado) a partir de un modelo matemático elegido, que ha de ser seleccionado previamente.

Así, cuando se realiza una calibración lineal[63,66], se obtiene una ecuación que se expresa en la forma:

$$R = a + b \cdot X_{exp}$$

donde a y b son los coeficientes de calibración, denominados respectivamente término independiente (que representa el término aditivo) y coeficiente de sensibilidad (que representa el término multiplicativo). Cuando la función se representa gráficamente, ambos términos se identifican con la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de calibrado obtenida.

Como en los casos anteriores, utilizando la función de calibración se pueden estimar valores del mesurando para una muestra, a partir de la expresión:

$$X_{est} = (R - a) / b$$

Los resultados de una calibración no son estables indefinidamente y puede variar en el tiempo en función de las características del proceso y del estado de funcionamiento del equipo. Por ello es necesario programar recalibraciones periódicas en función de la estabilidad específica de cada uno y de los resultados de las operaciones de verificación de los parámetros de calibración. Estos periodos de calibración suelen ser mucho menores en el caso de las calibraciones indirectas, llegando a tener incluso una periodicidad diaria; sin embargo un

---

66. ISO 8466-1: *Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.* ISO, Geneva, 1990.

adecuado control estadístico de los parámetros de calibrado[64] permitiría aumentar considerablemente dichos periodos de calibración para muchos de los instrumentos o procesos habituales en los ensayos químicos.

3.1.3. Calibración de equipos

Se entiende por calibraciones de equipos aquella calibración en las que los patrones se miden directamente sin que éstos sufran ningún proceso ni modificación previa y, por tanto, la relación obtenida depende únicamente de las características metrológicas de equipo. Los equipos son susceptibles de ser calibrados tanto directa como indirectamente, dependiendo de su naturaleza y del tipo de medida a realizar. La mayoría de los análisis químicos instrumentales (pero también en algunos de tipo físico como por ejemplo la medida de temperaturas con un termopar) requieren al menos una calibración indirecta de equipos y a ella se refiere la definición propuesta por la IUPAC[63] para calibración en análisis cuantitativo: *operación que determina la relación funcional entre valores medidos (intensidad de señal a una cierta posición) y magnitudes analíticas que caracterizan la cantidad de analito*. En este contexto, la calibración incluye la selección del modelo y la estimación de sus parámetros y de la incertidumbre asociada, así como su validación.

Es necesario destacar en este punto el hecho de que, seleccionando convenientemente el patrón de calibración en la calibración indirecta de un instrumento para la obtención de medidas químicas, es posible resolver muchos de los problemas relacionados con la presencia de **efecto matriz**, es decir, con la influencia que presentan los componentes de la muestra diferentes al analito sobre el valor obtenido en la medición y que da lugar a un error sistemático en la medida. Así, si el efecto matriz es despreciable, es posible calibrar directamente con materiales de referencia tipo sustancia (por ejemplo, con disoluciones de analito puro), pero si existe un efecto matriz significativo, entonces es necesario calibrar con materiales de referencia similares a la muestra, para compensar el error sistemático introducido por dicho efecto matriz.

Una calibración, en sí misma, no tiene por qué realizar ninguna modificación sobre el instrumento o proceso. Las modificaciones realizadas con el fin de corregir la desviación (en su caso) y anular la corrección (o hacer el factor

de corrección igual a la unidad) se denomina ajuste, y es una operación independiente de la calibración, aunque veces se realiza de forma paralela.

Además, hay que tener en cuenta que la operación de calibración, en algunos casos, por sí sola no es suficiente para garantizar la comparabilidad de las medidas. Para ello, es necesario garantizar que algunos equipos de ensayo cumplen determinadas condiciones de referencia[59,60], y que para mantener el equipo bajo control estadístico en un intervalo de tolerancias, es necesario controlar determinadas magnitudes indirectas (denominadas magnitudes de influencia[59,60]) que puedan afectar a los procesos de medida. Esto requiere la realización de comprobaciones periódicas bajo las genéricamente denominadas operaciones de verificación[67] de equipos o de procesos.

3.1.4. Calibración de procesos

Cuando se habla de calibración de procesos, se consideran aquellos casos en que los patrones sufren un proceso de modificación, previa a la medida, de modo que el mesurando no se obtiene directamente del patrón original sino del resultado de aplicar el citado proceso de modificación previa al patrón y, por ello, en realidad la medida se toma sobre el patrón modificado. Este tipo de calibración, poco habitual en el campo de las medidas físicas en el que la calidad de una medida depende fundamentalmente de las características del instrumento, adquiere una dimensión especial en el campo de las medidas químicas (análisis químico) en las que el proceso de preparación de la muestra para la medida instrumental suele ser un aspecto bastante crítico en relación con la calidad del resultado obtenido.

La calibración de procesos requiere que los patrones (o materiales de referencia) se sometan a todo el proceso analítico de forma similar a las muestras reales con independencia del equipo a utilizar. Así, un mismo equipo se puede utilizar para la determinación de varios analitos en diferentes procesos de análisis y la calibración de los correspondientes procesos implica diferentes operaciones de calibración, que son independientes unas de otras, aunque se utilice en todas el mismo equipo.

---

67. UNE–EN–ISO 8402: *Gestión de la calidad y aseguramiento de la calidad. Vocabulario.* Asociación española de normalización y certificación (AENOR), Madrid, 1995.

Tradicionalmente la calibración de procesos se aborda desde el punto de vista de la calibración indirecta, con los mismos objetivos que en la calibración de equipos, es decir se busca establecer una relación funcional entre señal analítica y contenido de analito y se aplica fundamentalmente en aquellos procesos analíticos en los que, como consecuencia de la preparación de la muestra, se generan errores sistemáticos en los resultados, debido a que:

- Se modifica la naturaleza de la matriz de la muestra y con ella la influencia significativa de los componentes de la muestra, distintos al analito, sobre el valor obtenido de la señal analítica. Este hecho modifica el efecto matriz y si la calibración se realiza únicamente con patrones químicos o materiales de referencia sin modificar (calibración de equipos), ésta no compensa los errores sistemáticos presentes.
- Se producen cambios en el contenido de analito (generalmente pérdidas pero también son posibles las contaminaciones) que no son reflejados en la calibración de equipos.

Sin embargo existe también la posibilidad de realizar calibraciones directas de un proceso de análisis químico, de modo que se pueda relacionar directamente el contenido de analito real con el contenido de analito estimado y, de esta manera, poder realizar las oportunas correcciones a fin de obtener resultados veraces, exentos de error sistemático.

Esta clasificación de la calibración nos proporciona la base para el establecimiento de la Función de Corrección desarrollada en el capítulo 5. Esta Función de Corrección es una calibración directa que pretende corregir la concentración de analito estimada a partir de una calibración indirecta cuando la señal del analito se modifica por la existencia de errores sistemáticos debido a la presencia de la matriz. La estrategia propuesta para la estimación de esta Función de Corrección ha sido aplicada a la determinación de dos plaguicidas en diferentes matrices: Lindano en matriz de pimiento y Procimidona en matriz de traje protector en exposición dérmica.

3.2. Aspectos metodológicos de la calibración

Desde el punto de vista metodológico[68], la calibración se puede clasificar teniendo en cuenta aspectos tales como, el empleo de patrones de calibración o los problemas generados por la presencia de matriz y de interferentes, y puede utilizarse con el propósito de detectar o diagnosticar la presencia de errores sistemáticos debido a la matriz.

Los patrones de calibración utilizados usualmente en química son los Materiales de Referencia (MR), que en términos de composición química se pueden clasificar en dos categorías:

- *Material de referencia tipo substancia* (Substancia RM), preparadas únicamente con el analito o analitos de interés y pueden incluir: substancias puras (PS) caracterizadas por su pureza química y disoluciones de patrones (SS) preparadas gravimétricamente por disolución de substancias puras (simples o mezclas) en disolvente.
- *Material de referencia tipo matriz* (Matriz RM), caracterizados por poseer la composición de los constituyentes químicos específicos mayoritarios, minoritarios y trazas. Pueden ser preparados a partir de las matrices a ser analizadas o mediante mezclas sintéticas. Así, éstos RM contienen el analito de interés y los compuestos químicos característicos de la matriz.

Los Materiales de Referencia Certificados (CRM) se definen[59] como el *material de referencia, acompañado de un certificado, donde una o más de sus propiedades están certificadas por un procedimiento que establece trazabilidad para una exacta determinación, en las unidades en las cuales el valor de la propiedad es expresado, y para el cual, cada valor certificado es acompañado de una incertidumbre a un nivel de confianza establecido.* Ésta definición hace referencia tanto a substancia como a matriz RMs.

---

68. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E.M. and Bosque Sendra J.M., *Trends Anal. Chem.*, 20, 620-636, 2001.

En general, los CRMs son una importante herramienta en las medidas químicas, donde los errores sistemáticos son frecuentes, siendo utilizados, además para la validación de métodos y medidas, estimación de la incertidumbre de la medida y otros controles de calidad. Básicamente, los CRMs tienen tres principales usos[69]:

- como materiales de control, que analizados junto con materiales desconocidos, confirman las propiedades en estudio de un método
- como materiales de calibración y/o verificación para calibrar y/o verificar equipos o procesos
- como materiales para el desarrollo de nuevos métodos o técnicas.

En última instancia, el objetivo de los CRMs[70] es proporcionar valores de referencia que suministren los resultados que deberían obtenerse.

Así, dependiendo de cómo se empleen los materiales de referencia en relación con la medida[71,72], se pueden distinguir diferentes tipos de calibrados. Los RMs pueden ser *patrones externos* medidos independientemente de las muestras, *patrones añadidos*, donde el patrón es añadido a la muestra y esta muestra enriquecida es la que se mide y *patrones internos,* que se refieren a patrones secundarios utilizados junto con uno de los anteriores. Los diferentes tipos de calibrados dependiendo del uso de RMs se recogen en la tabla IN.1.

---

69. Gills T.E., *NIST standards reference materials for measurement assurance-practices, issues and perspectives,* in: Fagelj A. and Parkany M. (Editors), *The use of matrix reference materials in enviromental analytical processes*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 59, 1999.
70. ISO 2000-01/1000, *The role of reference materials: Achieving quality in analytical chemistry*, ISO, 2000.
71. Newman E.J., *Quality in the Analytical Chemistry Laboratory*, ACOL, John Wiley and Sons, Chichester, p. 138, 1995.
72. *Metrology in Chemistry and Biology: A Pratical Approach*, European Commision, Report EUR 18405 EN, BCR Information, 1998.

Tabla IN.1

Clasificación de la calibración en función del material de referencia

Calibración	Material de referencia	Muestra	Propósito
con patrón externo (EC)	Substancia RM	No	Calibrar cuando se sospecha que no existe efecto matriz
con patrón en matriz (MC)	Matriz RM o substancia RM + matriz libre de analito	No	Compensar el efecto matriz
por adición de patrón (AC)	Substancia RM	Cantidad constante	Corregir el efecto matriz
con patrón interno (IC)	Matriz o Substancia RM + otro analito	No	Corregir la respuesta instrumental
de respuesta normalizada (NC)	Matriz o Substancia RM	No	Determinar el porcentaje de composición en series homólogas
de Youden (YC)	No	Cantidades crecientes de muestra	Detectar el efecto matriz

3.2.1. Calibración con patrón externo (EC)

Ésta es la metodología, también llamada calibración externa, de la calibración normalmente más empleada e involucra uno, dos o más patrones para cuantificar la concentración de analito en la muestra. El patrón debería idealmente responder de la misma forma que el analito presente en la matriz (Figura IN.11), pero en algunos casos el pretratamiento de la muestra puede causar pérdidas de analito, por lo que la substancia RM debería, a ser posible, estar sujeta al mismo proceso que la muestra para que las pérdidas se produzcan de igual forma en ambas, corrigiendo así la posible fuente de error sistemático.

La principal limitación de EC deriva del supuesto de que las diferencias entre la matriz del patrón (generalmente disolvente) y la matriz de la muestra no tienen efecto en el factor de calibración o en la sensibilidad. Así, tanto la componente constante como proporcional de error sistemático pueden estar presentes cuando se ignoran estas diferencias. No obstante, el calibrado EC se recomienda cuando se conoce perfectamente las condiciones experimentales y la

contribución de interferencia a las medidas es despreciable o puede ser considerada constante. En éste último caso, se puede aplicar una corrección del calibrado a partir del sesgo.

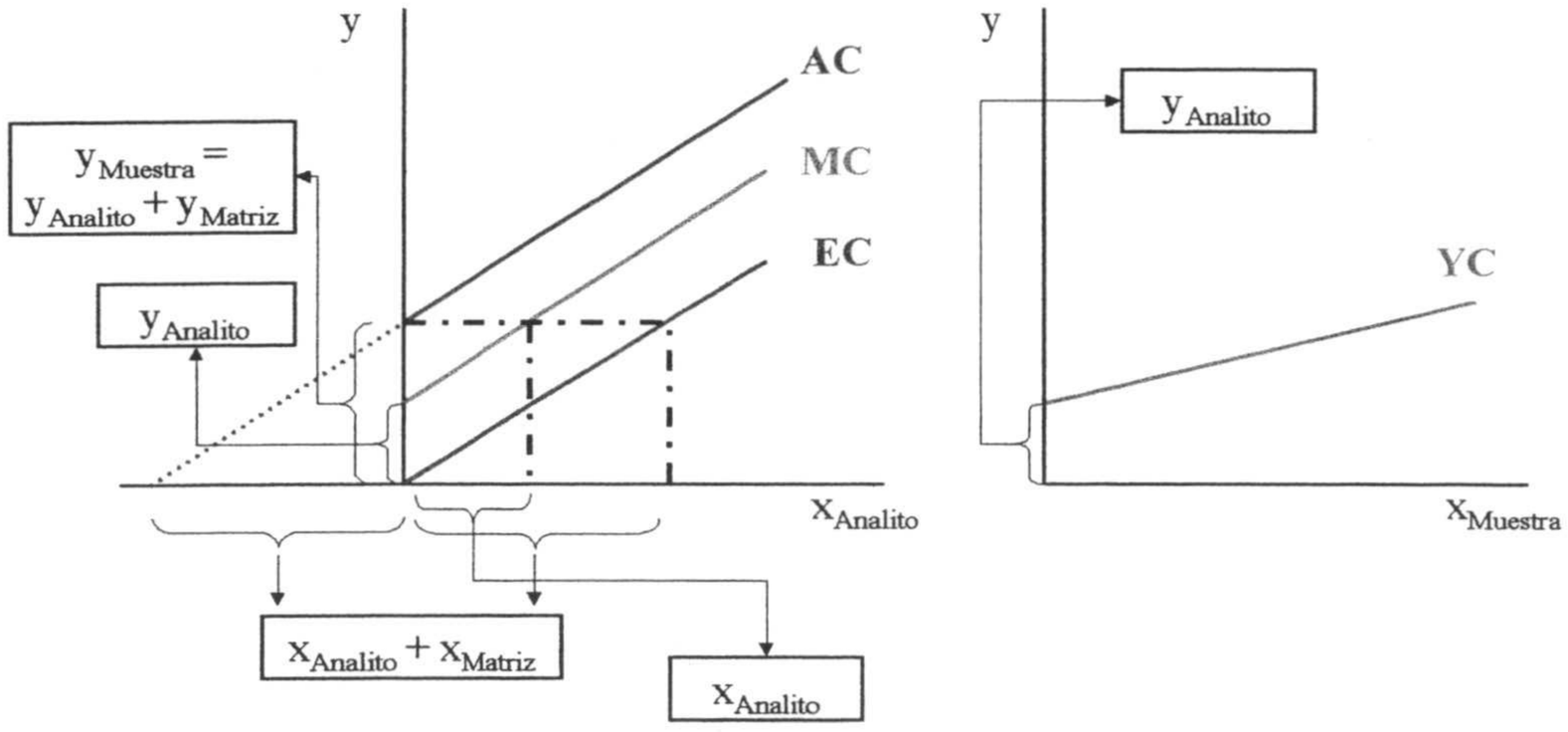


Figura IN.11

Relación entre los diferentes tipos de calibrados, EC: Calibrado con patrón externo, MC: calibrado con patrón en matriz, AC: calibrado por adición de patrón e YC: Calibrado de Youden. La componente proporcional de error sistemático no ha sido considerada.

3.2.2. Calibración con patrón en matriz (MC)

Esta calibración, también denominada calibración en blanco matriz se utiliza cuando se sospecha que existen problemas derivados de la presencia de matriz y no están bien caracterizados. Puede utilizarse matriz RM (si es posible) o substancia RM con matriz libre de analito (placebo) para compensar el efecto de la matriz o de los posibles interferentes. La principal ventaja de MC sobre EC es que proporciona una mejor respuesta de la composición de la muestra (Figura IN.11). Por el contrario, se debe tener en cuenta que la matriz RM podría contener

uno o más analitos no presentes en las muestras que podrían provocar efecto matriz, no siendo un efecto matriz real[73].

Por ejemplo, si los mismos analitos son determinados en suero humano y en disolución acuosa, pueden obtenerse resultados erróneos debido al efecto matriz; siendo mejor la utilización de suero humano como matriz RM que la disolución acuosa para la calibración[74]. Esta metodología es recomendada frecuentemente en análisis de residuos de plaguicidas o de fármacos.

3.2.3. Calibración por adición de patrón (AC)

Esta calibración es comúnmente conocida como *Método de Adición de Patrón (SAM, Standard addition method)* y conlleva la adición de una substancia pura o patrón a la propia muestra, que contiene analito, con objeto de poder determinar la concentración de analito en la muestra de forma eficaz. La adición de una cantidad conocida de patrón a la matriz (muestra enriquecida o "fortificada") es la metodología más fácil para reproducir la muestra. Esta calibración se debe utilizar cuando la matriz de la muestra es desconocida o tan compleja que un patrón externo no puede utilizarse con confianza dado que se sospeche que existe efecto matriz. Esta metodología sólo puede usarse cuando el método es bastante selectivo; es decir, cuando la respuesta se debe completamente al analito en presencia o asencia de efecto matriz.

La calibración se lleva a cabo en los siguientes pasos: (i) se adicionan cantidades crecientes de la disolución de patrón con cantidades conocidas de analito a una porción constante de muestra (adición de patrón); (ii) la muestra, previamente adicionada o dopada, es entonces medida; y (iii) la cantidad de analito contenida en la muestra se calcula de la función de calibración lineal por extrapolación del valor de $y_{analito}$ a concentración cero, como sigue:

$$x_{analito} = -\frac{1}{b_A} \cdot (y_{Muestra} - y_{Matriz})$$

73. Steger H.F., *Uses of matrix reference materials,* in: Fagelj A. and Parkany M. (Editors), *The use of matrix reference materials in enviromental analytical processes*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 128, 1999.
74. Rong P.X. and Min Z., *China GBW reference materials,* in: Fagelj A. and Parkany M. (Editors), *The use of matrix reference materials in enviromental analytical processes*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 24, 1999.

donde el b_A es la pendiente (sensibilidad) de la curva AC, $y_{Muestra}$ es la distancia (en unidades de señal) entre la curvas AC y EC sin son paralelas, que es el caso más usual, y y_{Matriz} es el blanco obtenido extrapolando en la calibración de Youden. Si se ignora la contribución de la matriz a la respuesta analítica procedente de la muestra pueden obtenerse resultados sesgados[75]. Un ejemplo gráfico de una curva de adición de patrón se muestra en Figura IN.11.

El calibrado AC se debe establecer para cada muestra específica y no puede extenderse al análisis de otras muestras, dado que cada una requiere su propia calibración, siendo éste es un serio inconveniente en la aplicación rutinaria de esta metodología. Por otro lado, también puede usarse para realizar una validación intralaboratorio de métodos analíticos cuando no se puede establecer un calibrado MC[76].

3.2.4. Calibración con patrón interno (IC)

Esta nomenclatura podría dar lugar a confusiones, pues puede parecer el opuesto de la calibración de patrón externo, cuando en realidad son utilizados conjuntamente. Además, la calibración con sólo el patrón interno no se puede realizar. Sin embargo, hemos mantenido esta denominación ya que es muy conocida en la comunidad científica, y la introducción de una nueva nomenclatura podría crear confusión.

En esta calibración, el patrón interno (substancia RM) es un compuesto estrechamente relacionado con el analito, pero lo suficientemente diferente para poder ser cuantificado separadamente. Este patrón se escoge normalmente de tal forma que se esté convencido de su ausencia en la muestra a analizar y además que posea un comportamiento similar al del analito. El patrón interno se añade junto con el patrón externo para llevar a cabo la calibración y con la muestra a ser analizada. El contenido de analito se calcula de las respuestas relativas del analito y el patrón interno.

El procedimiento es añadir la misma cantidad de patrón interno a cada uno de los patrones de calibración obteniendo la curva de la representación del

75. Castells R.C. and Castillo M.A., *Anal. Chim. Acta*, 423, 179-185, 2000.
76. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Alés Barrero F., Jiménez Linares C. and Román Ceba M., *J. AOAC Int.*, 78, 471-476, 1995.

cociente entre la señal del analito y la señal del patrón interno frente a la concentración de analito. La muestra debe adicionarse con la misma cantidad de patrón interno.

IC se recomienda cuando el proceso analítico no permite un control estricto del tratamiento de muestra y patrones. Por ejemplo, cuando la preparación de la muestra es compleja o muy variable (posibles errores debido a la preparación de la muestra), y cuando el análisis depende de unas condiciones instrumentales muy precisas y difíciles de controlar (posibles errores debido a la medida instrumental), IC permite compensar los efectos que ocurren durante el tratamiento de la muestra y de la medida. Esta metodología es muy común en cromatografía, fundamentalmente para compensar las posibles variaciones entre inyecciones.

3.2.5. Calibración de respuesta normalizada (NC)

Esta calibración se aplica cuando una serie de compuestos de la misma categoría son determinados simultáneamente y el resultado se expresa como un porcentaje de la composición[77]. En realidad, estrictamente hablando, NC no constituye una nueva metodología sino una modificación de EC o IC para cuantificar.

La metodología considera que la respuesta corresponde al 100% de los analitos presentes; así, la de un analito individual será su porcentaje en peso en la muestra. Esto es así cuando el detector muestre la misma sensibilidad (o factor de calibración) para todos los compuestos homólogos y permanezca constante en el intervalo de aplicación del método analítico.

Sin embargo, como la respuesta del detector normalmente cambia de un analito a otro, es necesario normalizar las respuestas medidas determinando un "Factor de Normalización" (NF) para cada analito respecto a uno que se selecciona como analito de referencia. Este analito es un componente homólogo de la serie que puede estar presente o ausente en la composición real de la muestra. La respuesta normalizada (y_i^N) para cada analito (i), qué indica el área

77. Valcárcel M. and Gómez-Hens A., *Ténicas analíticas de separación*, Reverté, Barcelona, p. 660, 1990.

hipotética que se mediría si el factor de calibración fuese similar para todos ellos, se calcula a partir de:

$$y_i^N = NF_i \cdot y_i$$

donde y_i es la respuesta medida (altura o área absoluta o relativa a la respuesta del patrón interno) para el analito i en el cromatograma de la muestra.

Los valores de NF dependen del detector empleado, por lo que habrá que estimarlos para cada detector. Para este propósito, generalmente se aplica una calibración de un solo punto y los diferentes factores de respuesta se obtienen del cromatograma como:

$$NF_i = \frac{y_{patrón,r}}{y_{patrón,i}} \cdot \frac{x_{patrón,i}}{x_{patrón,r}} = \frac{x_{patrón,i} / y_{patrón,i}}{x_{patrón,r} / y_{patrón,r}}$$

donde el subíndice r hace referencia al analito de referencia. Por consiguiente, los valores de NF representan el factor de respuesta de cada analito respecto al analito de referencia. En la práctica, los valores de NF se calculan directamente del porcentaje en peso de cada analito ($C_{patrón,i}$) en la calibración como:

$$NF_i = \frac{y_{patrón,r}}{y_{patrón,i}} \cdot \frac{C_{patrón,i}}{C_{patrón,r}}$$

Obviamente, esta última ecuación es similar a la anterior, y puede ser fácilmente deducida.

El "Factor de Calibración" ($CF_i = C_{patrón,i}/y_{patrón,i}$) de cada analito se puede descomponer en dos factores:

$$CF_i = NF_i \cdot CF_r$$

donde NF_i es el correspondiente factor de normalización y CF_r denota el factor de calibración del analito de referencia.

Así, la composición real de cada analito en la muestra ($C_{analito,i}$), expresada como porcentaje en peso, se calcula como:

$$C_{analito,i} = \frac{x_{analito,i}}{\sum x_{analito,i}} = \frac{NF_i \cdot CF_r \cdot y_{Muestra,i}}{\sum NF_i \cdot CF_r \cdot y_{Muestra,i}} = \frac{y^N_{Muestra,i}}{\sum y^N_{Muestra,i}}$$

donde $y_{Muestra,i}$ es el área medida del analito i en el cromatograma de la muestra.

NC normalmente se usa en cromatografía de gases para series homólogas con puntos de ebullición altos, cuando todos los analitos, para ser cuantificados, son eluidos de la columna en un rango relativamente pequeño de tiempos de retención, y el detector proporciona respuestas lineales y reproducibles para todos ellos, aunque su aplicación no es recomendable.

3.2.6. Calibración de Youden (YC)

De acuerdo con la definición de calibración dada en el apartado 1, ésta no puede ser considerada una verdadera calibración, pues no se utiliza ningún patrón, sólo disoluciones de muestra de concentraciones diferentes (expresadas como cantidad de muestra por unidad de volumen de disolución) (Figura IN.11).

Además, la calibración de Youden se utiliza para determinar el Blanco de Youden, a partir del cual se pueden poner de manifiesto la presencia de errores sistemáticos constantes.

Esta metodología raramente se utiliza para cuantificar el contenido de analito en la muestra, sino para detectar la presencia de errores sistemáticos debido al efecto matriz. Sin embargo, junto con EC, YC se puede utilizar para obtener el contenido de analito en muestras reales libre de error[76].

3.2.7. Tipos de blancos

En análisis químico se considera que un blanco es aquella medida de la señal analítica que corrige todos los errores constantes del método analítico, teniendo en cuenta las señales debidas a los reactivos, disolventes, instrumentación, etc. utilizados en el análisis y todos los sesgos debidos a la interacción entre el analito y la matriz de la muestra. La mayoría de los blancos utilizados en el análisis químico no tienen en cuenta esta interacción matriz-analito por lo que no pueden considerarse como blancos reales[78].

Una posible clasificación de los tipos de blancos se establece considerando que el término blanco se puede asignar tanto a una medida directa de una

78. Cardone M.J., *Anal. Chem.*, 58, 433-438, 1986.

disolución sin analito como al término obtenido por extrapolación de una curva de calibrado o término independiente, de modo que podemos distiguir entre[79,80]:

- ❒ **Blancos de reactivo.** Son obtenidos por medida directa de una disolución sin analito y compensan el posible sesgo debido a la instrumentación, reactivos y/o disolventes, analistas y, en general, cualquier fuente de variación excepto el analito. Considerando el tipo de disolución medida, podemos encontrar dos tipos de blancos:
  - ♠ *Blanco químico o del método (MB).* Éste es una medida directa de la respuesta analítica del disolvente y todos los demás componentes excepto la muestra. MB es muy útil para detectar posibles errores accidentales, pero no es una verdadera medida del blanco porque no existe una contribución real de la muestra.
  - ♠ *Blanco de la muestra o placebo (PB).* Éste resulta de la medida directa en un placebo (material idéntico a la muestra pero sin analito). PB compensa las posibles componentes de error incluidos en MB y la componente de error sistemático constante procedente de la matriz.
- ❒ **Blancos de calibración.** Son obtenidos por extrapolación de una curva de calibrado compensando el posible sesgo debido a la instrumentación, reactivos y/o disolventes, analistas y analito. En este caso, también podemos considerar dos tipos:
  - ♠ *Blanco del sistema (SB).* Obtenido por extrapolación de la curva de calibrado con patrón externo (EC) y compensa, al igual que en el caso anterior, las posibles componentes de error incluidos en los blancos de reactivos además de la componente constante debida al analito.
  - ♠ *Blanco Total de Youden (TYB).* Éste es obtenido por extrapolación de la calibración de Youden y engloba cualquier componente constante incluida la interacción matriz-analito, por lo tanto TYB se considera como el blanco verdadero o real. Así, restando el blanco total de

79. Torrades F., Riva M.C., Torres S., García Hortal J.A., Domènech X., Peral J. and Pérez M., *Anal. Chim. Acta*, 333, 139-146, 1996.
80. Torrades F. and Cecília E., *Analyst*, 126, 127-130, 2001.

Youden de la señal analítica dada por EC (SB) se obtiene la componente de error sistemático constante[81].

Tanto el blanco del método (MB) como el blanco del sistema (SB), corrigen señales debidas a los reactivos, instrumentos y disolventes. Generalmente estos dos tipos de blanco no difieren en su valor, a menos que el analito interaccione de alguna forma con el resto de reactivos (o matriz simplificada) presentes en la disolución provocando un aumento o disminución del blanco del sistema. En cuanto a la diferencia entre el blanco de placebo (PB) y el blanco total de Youden (TYB), dado que en el último está presente al analito, es evidente que su posible interacción con la matriz provoca una variación en la señal analítica que será despreciable sólo en el caso de que no existan errores sistemáticos constantes y proporcionales.

En esta Tesis, tan sólo vamos a referirnos a los blancos de calibración, dado que combinándolos apropiadamente podemos cuantificar la componente de error sistemático constante debida a la interacción matriz-analito.

3.3. Estudios de recuperación

La recuperación (o factor de recuperación), $\Re$, se define[82] como la *proporción de contenido de analito, presente o añadido a la porción de muestra o material a analizar, que se extrae en el proceso analítico*.

En principio, las recuperaciones se podrían estimar utilizando materiales de referencia tipo matriz y utilizar estas recuperaciones para corregir los resultados obtenidos en la muestra. Sin embargo, existen potencialmente diversos problemas asociados al uso de estos materiales de referencia como:

- la validez de la estimación de estas recuperaciones depende de la utilización de métodos analíticos no sesgados
- el rango disponible de concentraciones del material de referencia tipo matriz está limitado

81. García Campaña A.M., Cuadros Rodríguez L., Aybar Muñoz J., Alés Barrero F., Román Ceba M. and Baeyens W.R.G., *Biomed. Chromatog.*, 13, 151-154, 1999.
82. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. IUPAC Technical Report, *Pure Appl. Chem.*, 71, 337-348, 1999.

- ☛ puede existir una diferencia en la matriz entre la muestra y la mayoría de los materiales de referencia disponibles.

En los casos en que los materiales de referencia no puedan ser utilizados, por alguna de las razones anteriores, se puede recurrir a la adición de analito a la muestra al que se le aplica el procedimiento analítico. Estas muestras pueden ser placebos con lo que tendríamos muestras añadidas o dopadas o una muestra real a la que se le añade más analito y serían muestras enriquecidas. En ambos casos, la recuperación se podrá estimar siempre y cuando el analito añadido se comporte de la misma forma que el analito nativo.

La recuperación, por lo tanto, se obtiene como la proporción del contenido de analito presente (real, X_{real}) que es obtenido (estimado, X_{exp}) en el proceso de medida[83]:

$$\Re = \frac{X_{exp}}{X_{real}}$$

La recuperación obtenida a partir de la ecuación anterior no es más que el inverso del factor de corrección, definido previamente, aplicado a los procesos de análisis químico. Estos estudios de recuperación, que se realizan habitualmente, pocas veces tienen el objetivo de corregir los valores inicialmente obtenidos, sino más bien se llevan a cabo con el único propósito de comprobar la veracidad del proceso.

Como ocurre con los puntos de calibración, los valores de recuperación así obtenidos sólo representan a los contenidos de analito ensayados, y no a todo el proceso, ya que habitualmente la recuperación no es constante en todo el intervalo de aplicación del método analítico sino que depende del valor del contenido de analito. Por esta razón, sería deseable realizar calibraciones en varios puntos del intervalo de aplicación del método, y, a partir de los datos obtenidos, establecer una función de calibración como:

Valor real = f(Valor obtenido)

83. Burns D.J., Townshend A. and Danzer K., *Recommendation for the term recovery in analytical procedure.* IUPAC, Draft, 2001.

que en el caso de funciones lineales, se obtendría:

$$X_{real} = A + B \cdot X_{exp}$$

donde A y B que representan las componentes de error sistemático constante y proporcional, respectivamente. Por lo tanto el valor de la recuperación se podría obtener, para cada valor real, a partir de los coeficientes A y B:

$$\Re = \frac{X_{real} - A}{B \cdot X_{real}}$$

y sólo en el caso de que A=0 (no hay corrección aditiva), la recuperación es constante e igual al inverso del coeficiente B, que en este caso representa al factor de calibración:

$$\Re = \frac{1}{B}$$

Así, la recuperación es una medida del error sistemático global del proceso, sin diferenciar si este error es debido a pérdidas de analito o al efecto matriz. Esta doble concepción del término de recuperación está siendo objeto de un documento de recomendación que está en proceso de discusión en la IUPAC[83].

Los objetivos de los estudios de recuperación pueden ser:

- para obtener un factor de corrección de los resultados
- para verificar la veracidad de un método analítico.

El primero corresponde a una calibración directa de procesos mientras que el segundo es parte de un programa de validación. En este sentido, ambos tienen metodologías comunes dado que la validación del proceso podría ser considerado como una operación similar a la verificación, definida[84] como la *confirmación por examen de evidencias objetivas de que los requisitos específicos se han cumplido*, sin embargo, los objetivos de ambas operaciones son diferentes.

84. ISO 8402, *Quality – Vocabulary*, ISO, Geneva, 1994.

Raramente se piensa que los estudios de recuperación puedan corregir los valores experimentales y normalmente se usan para verificar la veracidad del proceso y se requieren en la mayoría de los programas de validación de procesos analíticos[85-87].

El uso apropiado de la información de la recuperación para corregir medidas analíticas ha sido el objeto de una guia[82], en la que IUPAC, ISO y EURACHEM realizan las siguientes recomendaciones:

- ✓ Los resultados analíticos cuantitativos deben corregirse mediante recuperación, a menos que haya razones para no hacerlo. Estas razones incluyen situaciones como que el método analítico se considere empírico, que se haya establecido un límite para valores no corregidos o que las recuperaciones sean cercanas a la unidad. En el caso de realizarse la corrección de los datos, debe identificarse claramente la cantidad corregida y el método usado.
- ✓ Los valores de recuperación siempre deben establecerse como parte de la validación del método.
- ✓ El método utilizado para estimar los factores de recuperación debe ser especificado en el protocolo del método.
- ✓ Se deben establecer gráficos de control de calidad internos durante la validación del método y utilizarse en todos los análisis rutinarios.

Por el contrario, AOAC no comparte la misma opinión afirmando que, como política general, los resultados analíticos no deberían ser corregidos por recuperación. Esta afirmación está basada en el hecho de que las recuperaciones obtenidas de muestras añadidas pueden ser mayores que el correspondiente valor del analito nativo dado que su comportamiento puede ser diferente en la muestra además de producir un aumento en la incertidumbre del resultado con respecto a los valores no corregidos

---

85. Analytical Methods Committee, International quality control of analytical data, *Analyst*, 120, 29, 1995.
86. Parkani M., *The use of recovery factors in trace analysis*, International Organization for Standardization, Geneva, 1996.
87. Korth W., 16th Conference of Residue Chemists, Merbourne (Australia), 1997.

4. INCERTIDUMBRE

En Metrología, la **incertidumbre** de una medida se define[88,89] formalmente como *un parámetro asociado con el resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando*. A partir de la definición, puede considerarse que dicho parámetro queda representado por la anchura media de un intervalo de probabilidad. El cálculo de la incertidumbre se basa en la estimación de un valor de desviación estándar que acumula todas las fuentes de variabilidad (componentes sistemáticas y aleatorias) que afectan al proceso de medida, según las directrices recomendadas en la guía GUM[90] y documentos análogos[91-93], y entre las que se encuentran como una componente ineludible la derivada de la calibración del instrumento o del proceso de ensayo.

Como se puede deducir, cuando se habla de incertidumbre en relación con las medidas, es necesario diferenciar entre incertidumbre de calibración e incertidumbre de ensayo. A continuación damos algunos aspectos generales de cada una de ellas, tratadas en detalle en el capítulo 4.

4.1. Incertidumbre de calibración

Como se ha visto en las páginas anteriores, el resultado de una calibración (directa o indirecta) requiere una doble información:

---

88. VIM: *International vocabulary of basic and general terms used in metrology*, 2nd ed. BIPM, IEC, IFCC, ISO, OIML, IUPAC, IUPAP, Geneva, 1993.
89. EAL-R2: *Expression of the uncertainty of measurement in calibrations.* European Cooperation for Accreditation Laboratory, 1997.
90. Guide to the expression of uncertainty in measurement, 1st ed. BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. Genève, 1995.
91. Taylor B.N. and Kuyatt C.E., NIST Technical Note 1297: *Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results*. National Institute of Standards and Technology, 1994.
92. EAL-G23: *The expression of uncertainty in quantitative testing.* European Cooperation for Accreditation of Laboratories, 1996.
93. EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2nd ed. EURACHEM, 1999.

- Una calibración supone realizar una serie de medidas con el equipo incluyendo una serie de referencias que son los patrones, por lo que se debe obtener la desviación de la indicación del equipo con relación al patrón o valor de referencia, expresado como corrección o como factor.
- Ambos, medidas y patrones, llevan asociadas una incertidumbre a su valor que se transmite a los resultados de la calibración. Como consecuencia, la relación estimada (corrección, factor o función) lleva asociada así mismo una cierta incertidumbre debida, al menos, a esos dos valores (medida y patrón) y generalmente a otra serie de condiciones que han influido en la obtención de los mismos, como p.e.: el procedimiento de calibración, condiciones ambientales, estado del equipo, requisitos de tolerancia en la verificación de magnitudes asociadas, etc.

Esta incertidumbre es la denominada incertidumbre de calibración y se refiere al valor obtenido para la relación en el momento de la calibración; esta incertidumbre será heredada por todas las medidas realizadas con el equipo calibrado, y constituirá una de las componentes de incertidumbre que habrá que tener en cuenta cuando se trate de calcular la incertidumbre global de los resultados de un ensayo en los que interviene el equipo calibrado como instrumento de ensayo.

La incertidumbre de calibración es característica del sistema de medida (equipo o proceso), es heredada por todas las medidas realizadas con él y depende fundamentalmente (aunque no de forma exclusiva) de:

- ✗ las características metrológicas intrínsecas del sistema de medida,
- ✗ las características metrológicas del patrón utilizado (incertidumbre declarada o estimada sobre el valor de referencia utilizado en la calibración),
- ✗ las peculiaridades metodológicas del procedimiento operacional de calibración,
- ✗ en el caso de funciones de corrección o de calibración, del algoritmo de regresión aplicado y de la calidad del ajuste estadístico de los datos experimentales a la función de calibración.

El valor considerado depende de que se realice o no correción sobre las medidas, ya que las medidas corregidas siempre tienen menos incertidumbre que

las no corregidas. Éstas últimas llevan incluida una componente extra debida a la deriva de la desviación con relación al patrón. Por tanto, la incertidumbre constituye un parámetro característico de toda calibración y de hecho es el que da validez a las posibles correcciones realizadas como consecuencia de dicha calibración. De hecho, sólo tiene sentido aplicar correcciones cuando éstas son significativamente mayores que la incertidumbre asociada a su estimación[94,95]. Por tanto, y como regla general, la incertidumbre de los resultados (o valores estimados), u(result), será siempre mayor que la incertidumbre asociada a los valores directamente medidos, u(medida), como consecuencia de la regla de propagación de incertidumbres (derivada de la propagación de varianzas en variables aleatorias), que indica que:

① en el caso de correcciones aditivas se cumple que:

$$u^2(\text{result}) = u^2(\text{medida}) + u^2(\text{correc})$$

② y de forma equivalente, en el caso de factores de corrección o calibración:

$$u_{rel}^2(\text{result}) = u_{rel}^2(\text{medida}) + u_{rel}^2(\text{factor})$$

③ cuando se establecen funciones de corrección o calibración, la expresión final es más complicada y depende del modelo funcional utilizado.

4.2. Incertidumbre de ensayo

Está referida al resultado final del ensayo (o análisis) y, por tanto, recoge como contribuciones todas aquellas incertidumbres de calibración de todos los equipos o procesos que hayan sido previamente calibrados y que su uso (la medida correspondiente) es aplicado al procedimiento global de medida.

Por tanto, la incertidumbre de ensayo engloba a todas las contribuciones derivadas de los efectos sistemáticos o aleatorios de todas aquellas operaciones que contribuyan en la generación de resultados. Este aspecto será desarrollado con más detalle en el capítulo 4.

94. Kane J.S., *Analyst,* 122, 1283-1288, 1997.
95. Hässelbarth W., *Accred. Qual. Assur.,* 3, 418-422, 1998.

Dependiendo del tipo de ensayo, habrá mayor número de contribuciones a la incertidumbre y algunas siempre tomarán mayor protagonismo (serán más significativas que otras), y por la misma razón, la estimación de la incertidumbre se va complicando conforme mayor sea el número de contribuciones a considerar.

Las correcciones aditivas no se suelen presentar en el caso de análisis químicos, pero sí las correcciones proporcionales, basadas en los estudios de recuperación, y por tanto la componente de incertidumbre asociada al valor de recuperación determinado ha de ser forzosamente considerada[96,97]. Sobre este aspecto en particular, recientemente han aparecido algunos documentos que reflejan la metodología a utilizar para realizar dichas correcciones, así como para estimar y incorporar la incertidumbre derivada de tal corrección[98,99]. Sin embargo, en todos los casos la recuperación se obtiene experimentalmente por análisis directo de muestras con contenidos conocidos de analitos (materiales de referencia o muestras fortificadas), y la incertidumbre asociada depende de la incertidumbre sobre el contenido conocido de analito y de la incertidumbre de la medida de dicho contenido debida al proceso de análisis.

---

96. P. Willets and R. Wood, *Accred. Qual. Assur.*, 3, 231-236,1998.
97. Ellison S.L.R and Williams A. *Measument uncertainty: the key to the use of recovery factors?,* in: Parkany M. (Editors), *The use of recovery factors in trace analysis*, International Organization for Standardization, Geneva, p. 30, 1996.
98. V. J. Barwich and S. L. R. Ellison, *Analyst*, 124, 981-990, 1999.
99. V. J. Barwich and S. L. R. Ellison, Protocol for uncertainty evaluation from validation data. Report No: LGC/VAM/1998/088, Laboratory of the Government Chemist, 2000.

Bloque I

PROTOCOLOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA ESTEQUIOMETRÍA Y/O ESTIMACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN

Capítulo I

MÉTODO DE JOB

1. ANTECEDENTES

Desde el momento en que Job[1] propuso su método en 1928, muchos autores han elegido éste para el estudio de iones complejos. En los últimos años, se ha utilizado para la determinación, principalmente de la estequiometría de complejos en disolución (generalmente de estequiometrías 1:1 y 2:1), aunque también para la determinación de sus correspondientes constantes de formación, siendo la espectrofotometría de absorción molecular la técnica analítica más utilizada para este propósito.

La mayoría de los complejos estudiados son los formados con metales y reactivos orgánicos, tales como los de Co(II), Ni(II) y Fe(III), de estequiometría 1:1 y 2:1 con la Pirazolina[2,3] y sus derivados.

También se ha aplicado a los complejos que forma el Fe(III), de estequiometría 1:1 y 2:1 con tiazinas sustituidas[4], o con fluoroquinolonas como Ciprofloxacina[5] y Norfloxacina[6], con Ácido Salicílico o Tiocianato[7], de estequiometrías 1:1. Igualmente se han estudiado los complejos de Co(II), de estequiometría 1:1, con Isoxazolina[8,9] o con Cetoconazol[10].

Otros complejos estudiados son los formados con Pb(II) y Calixarenos[11], de estequiometría 2:1, los de Ni(II) con Cefaclor[12] o con Oxibenzona[13], de

1. Job P., *Ann. Chim.*, 9, 113, 1928.
2. Raghuwanshi P.B., Narwade M.L. and Doshi A.G., *Orient. J. Chem.*, 12, 83-85, 1996.
3. Lonare S.B., Raghuwanshi P.B. and Doshi A.G., *Orient. J. Chem.*, 13, 87-90, 1997.
4. Raghuwanshi P.B., Narwade M.L. and Doshi A.G., *Asian J. Chem.*, 9, 327-329, 1997.
5. Linnhoff G., Vidal R and Ges J.M., *Boll. Chim. Farm.*, 135, 391-396, 1996.
6. Suliman F:E.O. and Sultan S.M., *Talanta*, 43, 559-568, 1996.
7. Echols R.T. and Tyson. J.F., *Analyst*, 120, 1175-1179, 1995.
8. Raghuwanshi P.B., Doshi A.G. and Narwade M.L., *Orient. J. Chem.*, 13, 181-184, 1997.
9. Raghuwanshi P.B., Doshi A.G. and Narwade M.L., *Asian J. Chem.*, 8, 211-216, 1996.
10. El Ragehy N.A. and El Saharty Y.S., *J. AOAC Inter.*, 84, 563-568, 2001.
11. Ohto K., Fujimoto Y. and Inoue, K, *Anal. Chem. Acta*, 387, 61-69, 1999.
12. Dimitrovska A., Andonovski B. and Stojanoski K., *Anal. Letters*, 29, 937-951, 1996.
13. Chisvert A., Salvador A., Pascual-Marti M.C. and March J.G., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369, 684-689, 2001.

estequiometrías 1:1, el de Fe(III) y Pd(II) con Prometazina[14], de estequiometría 1:1, los complejos que forma Al(III), de varias estequiometrías, tanto con Quercitina como con Morina[15] o con 3'4'-dihidroxiflavona en medio básico[16], el Zn(II) con un derivado de Antraquinona[17], Mg(II) con Oxitetraciclina[18] o el Cu(II) con Ácido Salicílico y Cisteina[19].

Este método también es aplicable al estudio de la estequiometría de complejos ternarios, como el formado entre el V(V) con 4-(2-piridilazo)resorcinol y peróxido de hidrógeno[20].

Además, con este método se han estudiados reactivos inorgánicos como el Arsenazo (III)[21,22] con lantánidos[23], complejos de transferencia de carga de butirofenonas como el Haloperidol y Droperidol como electrón donor con derivados de la Quinona como aceptor[24], complejos entre la Buclizina como n-donor y el yoduro como aceptor[25] o transferencia de carga entre el DDQ (Dicloro-diciano-benzoquinona) y el producto de la reacción de la Triamterina con el ácido p-cloroanílico[26], complejos entre moléculas orgánicas como derivados de fenoles con MBTH (2-hidrazona-3-metilbenzotiazolina)[27] o complejos de inclusión como el formado por el Clorambucil[28] con ciclodextrinas o el 1-cloro-4-(trifluorometil)benceno[29] con 4-tert-butilcalix[4]arenos.

14. Sultan S.M. and Desai N.I., *Analyst*, 122, 911-914, 1997.
15. Gutiérrez A.C. and Gehlen M.H., *Spectrochim. Acta A*, 58, 83-89, 2002.
16. Cornard J.P., Boudet A.C. and Merlin J.C., *Spectrochim. Acta A*, 57, 591-602, 2001.
17. Akl M.A:, *Anal. Sci.*, 17, 561-564, 2001.
18. Tongaree S., Goldberg A.M., Flanagan D.R. and Poust R.I., *Pharm. Develop. Techn.*, 5, 189-199, 2000.
19. Cakir S., Bicer E. and Cakir O., *Electrochim. Communications*, 2, 124-129, 2000.
20. Vachirapatama N., Dicinoski G.W., Townsend A.T. and Haddad P.R., *J. Chromatog. A*, 956, 221-227, 2002.
21. Liang W.A., Zhang Z.Y. and Zou S.F., *Fenxi Huaxue*, 17, 22-25, 1998.
22. Liang W.A., Qin M.Q., Zhang Z.Y. and Zou S.F., *Fenxi Huaxue*, 27, 589-592, 1999.
23. Rohwer H., Collier N. and Hosten E., *Anal. Chim. Acta*, 314, 219-223, 1995.
24. Askal H.F., *Talanta*, 44, 1749-1755, 1997.
25. Fattah A., El Walily M., El Gindy A. and Wahbi A.A.M., *Spectrosc. Lett.*, 29, 217-230, 1996.
26. El Ragehy N.A., Abbas S.S. and El Khateeb S.Z., *Anal. Lett.*, 30, 2045-2058, 1997.
27. Pospisilova M., Polasek M. and Svobodova D., *Mikrochimica Acta*, 129, 201-208, 1998.
28. Loukas Y.L., *J. Pharm. and Biom. Anal.*, 16, 275-280, 1997.
29. Kunsagi-Mate S., Nagy G., Jurecka P. and Kollar L., *Tetrahedron*, 58, 5119-5124, 2002.

2. CONSTANTE DE FORMACIÓN Y GRADO DE DISOCIACIÓN

El ***método de Job*** es el único donde tanto la concentración de metal como la relación estequiométrica es variable permitiendo calcular la estequiometría de complejos fuertes y la estequiometría y constante de formación de complejos moderadamente fuertes. Las condiciones necesarias para la aplicación de este método son:

- formación de un solo complejo;
- la cantidad de ligando requerido para la formación del complejo no debe ser mucho más alta que la del ion metálico;
- obtención de respuesta analítica en el rango estudiado de concentraciones; y
- dependencia lineal entre la respuesta analítica y la concentración del complejo en este rango.

Para la formación del complejo coloreado:

$$m\,M + g\,L \leftrightarrow M_mL_g$$

donde M es el metal y L el ligando, se preparan disoluciones de la misma molaridad de metal, C_M, y ligando, C_L, y se mezclan en diversas proporciones procurando que en las distintas disoluciones de ensayo la suma de C_M y C_L permanezca constante ($C_M + C_L = C$ = cte.). Se miden las señales analíticas de dichas disoluciones (con las correcciones oportunas si el ligando o el metal absorben), y representando gráficamente la correspondiente señal analítica (S) frente a la fracción molar (x):

$$x = \frac{C_L}{C_L + C_M} = \frac{C_L}{C} \qquad \text{(I-1)}$$

se obtiene una curva con un máximo de absorción para un valor de la fracción molar del cual se puede deducir la fracción molar estequiométrica, SMF, que indica la estequiometría del complejo:

$$x_{max} = SMF = \frac{g}{g + m} \qquad \text{(I-2)}$$

Ahora bien, la curvatura de las líneas experimentales se debe a que la reacción de formación del complejo no es cuantitativa, por lo que se puede evaluar la constante de formación a partir de las desviaciones a las rectas teóricas. La constante de formación, K_f, viene dada por la expresión:

$$K_f = \frac{[M_m L_g]}{[M]^m \cdot [L]^g} \qquad \text{(I-3)}$$

y cada una de estas concentraciones puede ser expresada en función de su concentración inicial (de metal y/o ligando) cuando en el medio hay un exceso de ligando, siendo α el grado de disociación del complejo.:

$$[M_m L_g] = \frac{C_M}{m} \cdot (1-\alpha)$$
$$[M] = C_M - m \cdot [M_m L_g]$$
$$[L] = C_L - g \cdot [M_m L_g]$$

Las concentraciones C_L y C_M se pueden expresar también como:

$$C_L = C \cdot x \quad \text{y} \quad C_M = C - C_L = C \cdot (1-x)$$

sustituyendo estas expresiones en la ecuación I-3 y reagrupando términos nos queda una ecuación[30] general:

$$K_f = \frac{(1-\alpha)C}{g \cdot (\alpha C)^{m+g}} \frac{x^{1-g}}{(1-x)^m} \qquad \text{(I-4)}$$

Sustituyendo el valor de SMF (ecuación I-2) en la ecuación anterior, se obtiene la constante de formación en términos de la concentración total (C), grado de disociación (α) y los coeficientes estequiométricos m y g:

$$K_f = \frac{(1-\alpha) \cdot C}{(\alpha C)^{m+g}} \frac{(m+g)^{m+g-1}}{g^g m^m} \qquad \text{(I-5)}$$

Para poder calcular la constante de formación es necesario conocer el grado de disociación del complejo, α, que se obtiene a partir de la ecuación:

30. González García D.V., Arrebola Martínez A. and Román Ceba M., *Talanta*, 26, 3, 215-218, 1979.

$$\alpha = \frac{S_{IP} - S_{max}}{S_{IP}} = 1 - \frac{S_{max}}{S_{IP}} \qquad \text{(I-6)}$$

donde S_{max} sería la señal analítica del máximo de la curva experimental, que representa la máxima cantidad de complejo que se forma con un grado de disociación α, y S_{IP} sería la señal analítica correspondiente al punto de corte de las rectas tangentes a la curva. Cuando el complejo es lo suficientemente fuerte la señal analítica del punto de corte coincide con la señal analítica cuando el metal se ha transformado totalmente en complejo, es decir la señal analítica debida al complejo si se considera que se forma la máxima cantidad de complejo posible con un valor de $\alpha = 0$.

Para un complejo moderadamente fuerte (Figura I.1C) las rectas tangentes a la curva (Figura I.1B) se cortan en un punto por debajo del punto de corte de las rectas que representan el comportamiento del complejo cuando esta totalmente complejado (Figura I.1A).

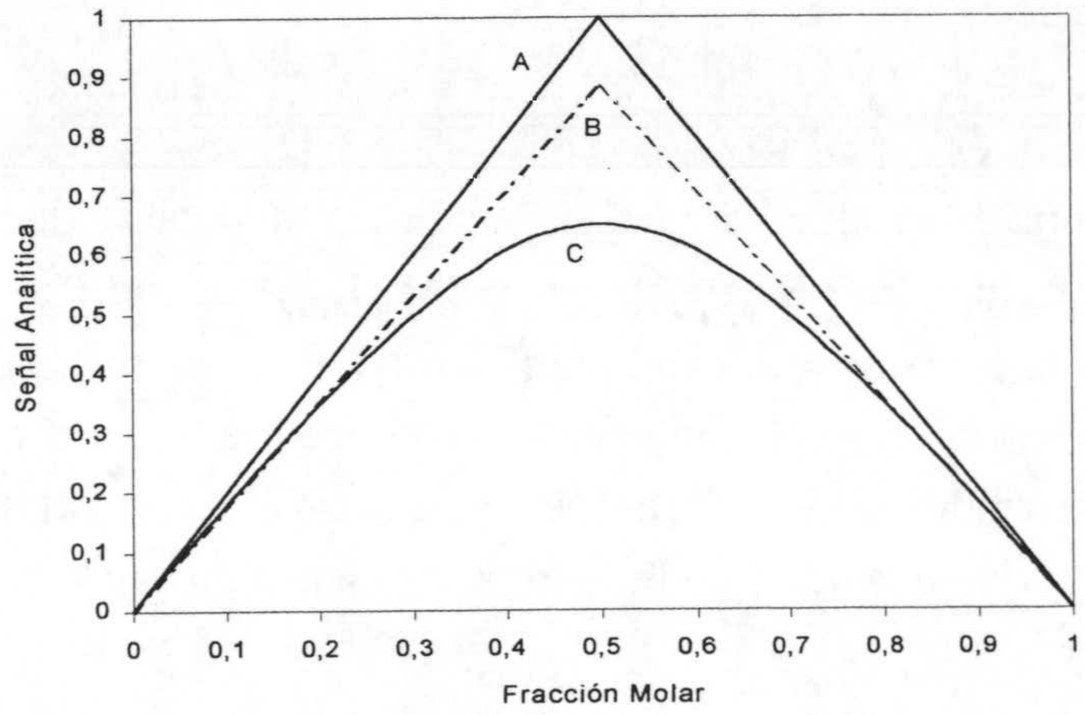


Figura I.1.

Datos simulados para un complejo moderadamente fuerte (C), rectas tangentes a la curva C (B) y rectas para la sustancia totalmente complejada (A).

Esta diferencia en los puntos de corte de dichas rectas hace que al calcular el valor del grado de disociación con el punto de corte B disminuya

considerablemente con respecto al valor que se obtendría al obtener el grado de disociación con el punto de corte A. Esta disminución en el grado de disociación (error por defecto) conllevaría la sobrestimación de la constante de formación, por lo que el uso de la absorbancia correspondiente al punto de corte de las rectas es sólo válido cuando la diferencia entre las señales analíticas de los dos puntos (A y B) sea muy pequeña, es decir, cuando la diferencia entre los grados de disociación sea prácticamente despreciable.

Dado que el grado de disociación depende de la constante de formación y de la concentración C ($\alpha = f(K_f \cdot C)$) se puede establecer un límite de utilización[30] para el punto de corte de las rectas, es decir cuando el producto de $K_f \cdot C^{m+g-1} \geq 100$ es posible utilizar el punto de corte de las rectas tangentes a la curva.

En la práctica y para evitar situaciones como ésta, el grado de disociación puede ser calculado a partir del valor de la señal analítica del máximo de la curva experimental, S_{max} y el valor teórico de señal analítica[31], S_o en condiciones de máxima complejación ($\alpha = 0$), es decir cuando todo el metal se ha transformado en complejo:

$$\alpha = \frac{S_o - S_{max}}{S_o} = 1 - \frac{S_{max}}{S_o} \qquad \text{(I-7)}$$

Si se considera que la señal analítica depende linealmente de la concentración de complejo: $\mathbf{S = \varphi_o + \varphi \cdot [M_m L_g]}$, donde φ_o es el término independiente de la función y φ es el coeficiente lineal que representa el factor de proporcionalidad entre la señal analítica y la concentración de complejo. Como $[M_m L_g] = C_M/m$ cuando se considera que se ha formado la máxima concentración de complejo ($\alpha=0$), la ecuación quedaría de la siguiente forma:

$$S = \varphi_o + \frac{\varphi}{m} \cdot C_M \qquad \text{(I-8)}$$

Esta ecuación no es más que una expresión particularizada de la función de calibrado cuando ésta sigue, como es habitual, un modelo lineal. Por tanto, representando gráficamente la señal analítica obtenida cuando se trabaja en exceso de reactivo frente a la concentración de metal, C_M, se debe obtener una línea recta cuya ordenada en el origen es φ_o y cuya pendiente es φ/m.

---

31. Likussar W. and Boltz D.F., *Anal. Chem.*, 43, 1265-1277, 1971.

El valor de señal analítica máxima teórica, S_o, se obtiene sustituyendo el valor de la concentración de metal en el máximo de la curva de Job en la función definida por la ecuación anterior:

$$S_o = \varphi_o + (\varphi/m)\cdot C_{M,max} \qquad \text{(I-9)}$$

donde $C_{M,max}$ corresponde a la concentración de metal en el punto estequiométrico: $C_{M,max} = C \cdot (1\text{-}x_{max})$.

3. MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS

Para calcular la estequiometría del complejo, una vez obtenida la curva experimental, se deben ajustar las dos ramas de la curva a dos líneas rectas para que a partir del punto de corte de sus prolongaciones, se pueda encontrar el valor de SMF.

La propuesta presentada en esta Memoria consiste en elegir los puntos experimentales que se ajustan a las líneas rectas mediante la **regresión lineal por mínima mediana de cuadrados** (LMSR). La aplicación de los métodos de regresión robusta sobre grupos de datos experimentales que no tengan distribuciones normales de los errores o en presencia de puntos anómalos permite seleccionar zonas lineales de la curva experimental. El protocolo propuesto permite seleccionar los tramos rectos de la curva experimental mediante el cálculo de los Residuos Estandarizados, que nos permiten discernir entre los puntos que se ajustan a la línea recta y los que son considerados anómalos o pertenecen a la zona curva.

Una vez elegidos los puntos experimentales, mediante una **regresión lineal por mínimos cuadrados** (LSR), calculamos las dos ecuaciones que mejor se ajustan a estos datos. Estas dos rectas, una de pendiente positiva y otra de pendiente negativa, se cortan en un punto del que se puede deducir la estequiometría del complejo.

Debido a la presencia de errores aleatorios en las medidas, este punto de corte podrá no coincidir exactamente con alguno de los valores teóricos de estequiometría, pero si se calcula un intervalo de cobertura para dicho valor y éste

contiene un único valor teórico de estequiometría será posible asignarle dicho valor teórico al complejo estudiado. Este intervalo de cobertura asociado al punto de corte de las rectas se puede estimar mediante el método propuesto por Lark y colaboradores[32,33], que proporciona una validación del valor obtenido.

Los datos experimentales pertenecientes al segmento central, eliminados anteriormente en LMSR, pueden ajustarse a una ecuación de segundo o tercer orden por medio de una **regresión polinómica por mínimos cuadrados** (LSPR). El valor del máximo obtenido de la regresión polinómica se usa para verificar que la fracción molar está incluida en el intervalo de confianza del punto de la intersección obtenido en el cálculo de la estequiometría del complejo.

3.1. Regresión lineal por mínimos cuadrados (LSR)

El modelo aplicable a una línea recta sigue la ecuación: $S = a + b \cdot x + \Delta e$. En este caso, la variable predictora, x, sería la fracción molar de ligando; y la variable respuesta, S, sería la señal analítica medida del complejo, en las condiciones del método aplicado, mientras que Δe son los errores aleatorios que afectan a la respuesta experimental.

Para obtener la ecuación de la línea recta que modela las parejas valores experimentales (x_i, S_i), la utilización de la regresión lineal por mínimos cuadrados (LSR), es el método más adecuado para la estimación de la pendiente y del término independiente de la recta. La regresión por mínimos cuadrados permite la estimación de los parámetros (a y b) más exactos y de menor varianza, pues los errores aleatorios, además de seguir una distribución normal, son independientes de la variable predictora, x, y presentan homocedasticidad.

Para ello, los valores estimados, a y b, deben ser tales que

$$\text{mín} \left[\Sigma \left[S_i - (a + b\, x_i)\right]^2,\ i = 1, 2, \ldots, n\right]$$

32. Lark P.D., Graven B.R. and Bosworth R.C.L., *The Handling of Chemical Data*, p. 177. Pergamon, London, 1968.
33. Liteanu C. and Rica I., *Statistical Theory and Methodology of Trace Analysis*, Ellis Horwood, Chichister, Capítulo 5, 1990.

sin embargo, si por alguna razón uno o más datos no siguen la tendencia lineal, su contribución a la suma de cuadrados es muy importante, lo que ocasiona una mala estimación de los valores del término independiente y de la pendiente.

La aplicación de LSR nos permite obtener además las desviaciones estándar asociadas a los coeficientes de regresión:

$$s_b = s_{res}\sqrt{\frac{1}{Q_{x^2}}} \qquad s_a = s_{res}\sqrt{\frac{1}{n}+\frac{\bar{x}}{Q_{x^2}}} \tag{I-10}$$

donde s_{res} es la desviación estándar residual, n representa el número de datos experimentales, $\bar{x}$ es el valor medio de la variable x, y Q_{x^2} es la suma de cuadrados reducida de x, dada por la ecuación:

$$Q_{x^2} = \sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2$$

De forma similar, es posible asociar un valor de desviación estándar para las variables dependiente e independiente, s_S y s_x, respectivamente:

$$s_S = s_{res}\sqrt{\frac{1}{n}+\frac{x-\bar{x}}{Q_{x^2}}} \qquad s_x = \frac{s_{res}}{b}\sqrt{\frac{1}{n}+\frac{x-\bar{x}}{Q_{x^2}}} \tag{I-11}$$

3.2. Regresión lineal por mínima mediana de cuadrados (LMSR)

Si uno o varios datos se apartan de la linealidad, el método LSR tenderá a modificar los coeficientes de regresión para disminuir los residuos. Dependiendo de la posición de estos datos experimentales en el conjunto, su influencia sobre los coeficientes de regresión puede llegar a ser muy importante, hasta el extremo de modificar notablemente el resultado.

La utilización de una técnica de regresión robusta sobre los puntos experimentales, tal como la regresión de mínima mediana de cuadrados (LMSR), proporciona la posibilidad de reproducir, con exactitud, la zona de corte de las líneas rectas, ya que esta regresión permite seleccionar de forma objetiva las zonas rectas en una serie de puntos experimentales, independientemente de la existencia

de puntos anómalos. Este tipo de regresión fue introducida por Massart[34] y Rousseeuw[35].

Los métodos robustos de regresión[36,37] se han utilizado para solucionar algunos problemas químicos, tales como, detección de puntos anómalos[34], obtención del rango lineal de calibración[38], y como criterio para la determinación de las zonas lineales en curvas de valoración[39], lo que pone de manifiesto su potencialidad como herramienta analítica.

LMSR estima los parámetros del modelo, con los valores a y b tal que:

$$\text{mín mediana } [\Sigma\ [S_i - (a + b\ x_i)]^2,\ i = 1, 2, ..., n]$$

y puesto que la mediana es menos sensible a la presencia de grandes residuales, la presencia de puntos anómalos no modificará los parámetros que permiten alcanzar el mínimo en la ecuación anterior. De hecho, LMSR presenta el mayor "punto de ruptura" (breakdown point), de un 50%, lo cual nos indica que si al menos el 50% de los puntos experimentales concuerdan con un modelo lineal, su aplicación permitirá la estimación de dicho modelo, independientemente de la existencia de puntos anómalos. Además tiene la propiedad del ajuste exacto, es decir, si una mayoría de los datos experimentales están alineados, LMSR será precisamente esa línea recta.

Una vez estimados los parámetros a y b mediante LMSR, el proceso para identificar los puntos considerados como anómalos o los puntos que se alejan de la línea recta, conlleva dos pasos:

- ☞ En primer lugar, se calcula un estimador inicial[40], s^o:

---

34. Massart D.L., Kaufman L., Rousseeuw P.J. and Leroy A., *Anal. Chim. Acta*, 187, 171-179, 1986.
35. Rousseeuw P.J. and Leroy A., *Robust Regression and Outlier Detection,* John Wiley, New York, 1987.
36. Hampel F.R., Ronchetti E.M., Rousseeuw P.J. and Stahel W.A, *Robust Statistics, The Approach Based on Influence Functions*, Wiley, Zürich, 1985.
37. Huber P.J., *Robust Statistics*, Wiley, New York, 1981.
38. Ortiz M.C., Arcos J., Juarros J.V., López–Palacios J. and Sarabia L.A., *Anal. Chem.*, 65, 678, 1993.
39. Ortiz–Fernández M.C. and Herrero–Gutiérrez A., *Chem. Int. Lab. Syst.*, 27, 231, 1995.
40. Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J. and Smeyers-Verbeke J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Capítulo 12, 1997.

$$s^{o} = 1{,}4826 \cdot (1 + 5/(n-2)) \cdot \sqrt{\text{med}(R_i^2)} \qquad \text{(I-12)}$$

donde 1,4826 · (1+5/(n-2)) es un factor de corrección, n es el número de puntos experimentales y R_i son los residuos obtenidos. Aquellos puntos que tengan un valor de $|R_i / s^o|$ menor o igual a 2,5 son retenidos (seleccionados).

- En segundo lugar, con los puntos retenidos en el paso anterior se calcula un estimador final, s*:

$$s^* = \sqrt{\sum_{i=1}^{n^*} R_i^2 \Big/ (n^* - 2)} \qquad \text{(I-13)}$$

donde n* es el número de puntos seleccionados. Los puntos que deben considerarse anómalos son los que cumplan que $|R_i / s^*|$ sea mayor de 2,5. El cociente $|R_i / s^*|$ es lo que se conoce con el nombre de **Residuo Estandarizado** (SR) de tal forma que si SR > 2,5 el punto es considerado anómalo y debe ser eliminado o rechazado para estimar la recta de regresión a la que se ajustan los puntos experimentales.

La aplicación de LMSR sobre los puntos experimentales obtenidos en una experiencia realizada para el cálculo de la estequiometría de un complejo permitirá la selección de los tramos rectos y la identificación de los puntos anómalos como aquellas observaciones con mayores valores de los residuos que los correspondientes al estimador robusto. Además LMSR garantiza que se cumplan las hipótesis previas a la aplicación de LSR, obteniendo los puntos que claramente pertenecen al modelo lineal. Así la aplicación de LSR, de forma objetiva, permite obtener las ecuaciones de las rectas correspondientes y con ellas estimar el punto de corte de dichas rectas y por consiguiente, la fracción molar entre el ligando y el metal, es decir la estequiometría del complejo en disolución.

3.3. Punto de intersección e intervalo de cobertura

De la representación gráfica de los datos experimentales (señal analítica frente a fracción molar) según el método de Job, como ya se ha dicho anteriormente, se obtiene aproximadamente una parábola y del punto de corte de

las rectas ajustadas a los tramos lineales se obtiene la estequiométrica del complejo. Ahora bien, la fracción molar estequiométrica (en el punto de corte), SMF, tomará valores teóricos tales como 0,5, 0,666, 0,75 y 0,8 para estequiometrías 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4, respectivamente.

El establecimiento del punto de corte de las dos líneas rectas obtenidas mediante LSR: $S = a_1 + b_1 \cdot x$ y $S = a_2 + b_2 \cdot x$, donde S es la señal analítica del complejo y x la fracción molar de ligando, $C_L/(C_L + C_M)$, nos permitirá la estimación de la estequiometría del complejo que vendrá dada por la abscisa de dicho punto de corte:

$$x_{IP} = \frac{a_2 - a_1}{b_1 - b_2} = \frac{\Delta a}{\Delta b} \qquad \text{(I-14)}$$

como cada línea esta asociada a dos bandas de cobertura (un arco hiperbólico a cada lado de la línea), está claro que el punto de intersección, x_{IP} , es un valor medio al que se le puede asociar un cierto intervalo de cobertura. De los distintos procedimientos propuestos para la determinación del intervalo de cobertura del punto de corte de dos rectas, se ha elegido el método de Lark y colaboradores[32,33], que es relativamente sencillo y proporciona una buena estimación del intervalo de cobertura, presentando, al mismo tiempo, sólidas justificaciones estadísticas[41].

Para obtener el intervalo de cobertura se resuelve una ecuación que depende de los parámetros de las dos rectas de regresión, es decir de las pendientes y sus varianzas asociadas, de los términos independientes y sus varianzas asociadas y además de un término de covarianza debido a que existe una correlación entre la pendiente y el término independiente en cada una de las rectas:

$$x^2 \cdot [(\Delta b)^2 - k^2 \cdot s^2_{\Delta b}] - 2 \cdot x\,[\Delta a \cdot \Delta b - k^2 \cdot s_{\Delta a \Delta b}] + [(\Delta a)^2 - k^2 \cdot s^2_{\Delta a}] = 0 \quad \text{(I-15)}$$

donde $s^2_{\Delta a} = s^2_{a1} + s^2_{a2}$, es la varianza de la diferencia de los términos independientes, $s^2_{\Delta b} = s^2_{b1} + s^2_{b2,}$ es la varianza de la diferencia de las pendientes y $s_{\Delta a \Delta b}$ es el término de covarianza y viene dado por la expresión:

$$S_{\Delta a \Delta b} = \bar{S}^{2}_{resid} \left(\frac{\bar{x}_1}{(Q_{x^2})_1} \right) + \left(\frac{\bar{x}_2}{(Q_{x^2})_2} \right) \qquad \text{(I-16)}$$

41. Carter Jr. K.N., Scott D.M., Salmon J.K. and Zarcone G.S., *Anal. Chem.*, 63, 1270-8, 1991.

siendo

$$\overline{s}^{2}_{resid} = \frac{\nu_1 \left(s^2_{resid}\right)_1 + \nu_2 \left(s^2_{resid}\right)_2}{\nu_1 + \nu_2}$$

donde s^2_{resid} es la varianza residual en la regresión, n el número de puntos experimentales en cada una de las líneas rectas y $\nu = n - 2$ son los grados de libertad en cada una de las rectas de regresión. El término Q_{x^2} ha sido previamente definido.

Resolviendo la ecuación I-15 se obtienen dos valores que corresponden al intervalo de cobertura asociado al punto de corte en la abscisa ($x_{IP} - k \cdot s_x$ y $x_{IP} + k \cdot s_x$) de las dos rectas para un factor de cobertura k con un nivel de confianza α y $\nu = n_1 + n_2 - 4$ grados de libertad (Tabla 1 del Anexo D). A partir de este intervalo es posible calcular la desviación estándar asociada a dicho punto de corte, s_x.

Por lo tanto, si el intervalo de cobertura calculado para la fracción molar incluye solamente uno de los valores teóricos de estequiometría se puede asignar dicho valor al complejo estudiado. En caso contrario, es decir si el intervalo de cobertura incluye a más de uno de los valores de estequiometría o no incluye a ninguno de ellos, no será posible asignarle ninguna de las estequiometrías y sería aconsejable repetir las experiencias aumentando el número de puntos experimentales o bien buscar otro método.

3.4. Regresión polinómica por mínimos cuadrados (LSPR)

Para ajustar los puntos experimentales situados en la zona curva a una ecuación polinómica, el modelo aplicable es: $S = a + b\,x + c\,x^2 + ... + z\,x^p + \Delta e$, donde p representa el grado del polinomio.

La regresión múltiple puede ser utilizada para resolver problemas de regresión polinómica, considerando x, x^2, x^3, ..., x^p como variables independientes diferentes. El procedimiento de mínimos cuadrados[42] (LSPR)

42. Funk W., Dammann V. and Donnevert G., *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, VCH, p185, 1995.

puede ser extendido para la estimación de los coeficientes de regresión y obtener la ecuación que mejor se ajusta a los datos experimentales.

Una vez seleccionado el grado del polinomio (generalmente p = 2 para la estequiometría 1:1 y p = 3 para estequiometrías superiores) y obtenida la ecuación que mejor se ajusta a los datos experimentales, es posible calcular el máximo o extremo de la curva, MAX = (x_{max}, S_{max}), donde x_{max} sería la fracción molar y S_{max} sería el valor de la señal analítica predicha para la fracción molar del máximo de la curva.

Para calcular el máximo de la ecuación se iguala a cero la primera derivada de la función con respecto a la variable independiente y se obtienen las raíces de la ecuación resultante. Cuando el polinomio elegido es de segundo orden ($S = a + b\ x + c\ x^2$) se obtiene que la fracción molar y la señal analítica en el máximo de la curva se calculan según las ecuaciones siguientes:

$$x_{max} = \frac{-b}{2 \cdot c} \qquad S_{max} = a + b \cdot x_{max} + c \cdot x_{max}^2 \qquad \text{(I-17)}$$

Sin embargo, en el caso de un polinomio de tercer orden ($S = a + b\ x + c\ x^2 + d\ x^3$), al resolver la ecuación derivada resultan dos soluciones, de las cuales será seleccionado aquel valor del extremo relativo que haga menor que cero la segunda derivada de la función con respecto a x dos veces, según las ecuaciones siguientes:

$$x_{max} = \frac{-c}{3 \cdot d} \pm \sqrt{\left(\frac{c}{3 \cdot d}\right)^2 - \frac{b}{3 \cdot d}} \qquad S_{max} = a + b \cdot x_{max} + c \cdot x_{max}^2 + d \cdot x_{max}^3 \qquad \text{(I-18)}$$

Este valor de fracción molar así obtenido puede ser también un estimador de la estequiometría del complejo dado que corresponde a la fracción molar de complejo una vez alcanzado el equilibrio químico de la reacción de formación del complejo.

La desviación estándar[43] asociada al valor máximo de señal en la curva polinómica estimada se calcula como:

43. Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J. and Smeyers-Verbeke J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Capítulo 10, 1997.

$$s_{S,max} = s_{resid} \cdot \sqrt{X_o^T \left(X^T X\right)^{-1} X_o} \qquad \text{(I-19)}$$

donde s_{resid} es la desviación estándar residual, $\mathbf{X_o}$ es la matriz formada por las variables independientes (x, x^2,x^3,...) al sustituir el valor del máximo, $\mathbf{X_o}^T$ sería la matriz transpuesta de $\mathbf{X_o}$:

$$X_o = \begin{pmatrix} 1 \\ x_{max} \\ x^2_{max} \\ \vdots \\ x^n_{max} \end{pmatrix}$$

y $\mathbf{(X^TX)^{-1}}$ se obtendría a partir de la matriz de varianza–covarianza, **V**, de los coeficientes de regresión:

$$\left(X^T X\right)^{-1} = \frac{\mathbf{V}}{s^2_{resid}} \quad \rightarrow \quad \mathbf{V} = \begin{pmatrix} s_a^2 & cov(a,b) & cov(a,c) & \cdots & cov(a,z) \\ cov(b,a) & s_b^2 & cov(b,c) & \cdots & cov(b,z) \\ cov(c,a) & cov(c,b) & s_c^2 & \cdots & cov(c,z) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ cov(z,a) & cov(z,b) & cov(z,c) & \cdots & s_z^2 \end{pmatrix}$$

donde la diagonal principal (s^2_a, s^2_b, s^2_c,...,s^2_z) representa las varianzas asociadas a los parámetros de regresión (a, b, c,..., z, respectivamente) y el resto de la matriz son las covarianzas entre los parámetros de regresión.

4. INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA CONSTANTE DE FORMACIÓN Y AL GRADO DE DISOCIACIÓN

El valor de constante de formación debe ir acompañado de su correspondiente incertidumbre, $K_f \pm k \cdot u_{Kf}$ donde u_{Kf} es la incertidumbre estándar asociada al valor de la constante de formación y k es el valor de la constante de cobertura con ν grados de libertad efectivos. Esta incertidumbre se calcula aplicando la regla de propagación de varianzas a la ecuación I-5, obteniendo:

$$u_{Kf}^2 = u^2\left\{\frac{(m+g)^{m+g-1}}{g^g m^m C^{m+g-1}}\cdot\frac{1-\alpha}{\alpha^{m+g}}\right\} = \left(\frac{(m+g)^{m+g-1}}{g^g\, m^m\, C^{m+g-1}}\right)^2\cdot\left(\frac{\partial\left(\frac{1-\alpha}{\alpha^{m+g}}\right)}{\partial\,\alpha}\right)^2\cdot u_\alpha^2$$

operando y reagrupando términos se obtiene:

$$u_{Kf}^2 = \left[\frac{(m+g)^{m+g-1}}{g^g\, m^m\, C^{m+g-1}}\cdot\frac{(m+g-1)\,\alpha^{(m+g)}-(m+g)\,\alpha^{(m+g-1)}}{\alpha^{2(m+g)}}\right]^2 u_\alpha^2 \qquad \text{(I-20)}$$

donde C sería constante e igual a la suma de las concentraciones iniciales de metal, C_M y ligando, C_L, y m y g son los coeficientes estequiométricos que también son constantes, α es el grado de disociación y u_α es la incertidumbre asociada a la estimación del grado de disociación.

La incertidumbre asociada al grado de disociación, u_α, se calcula aplicando la regla de propagación de varianzas a la ecuación I-7 y depende de la señal analítica correspondiente al máximo de la curva, S_{max} y del valor de la señal analítica máxima teórica S_o:

$$u_\alpha^2 = u^2\left(1-\frac{S_{max}}{S_o}\right) = \left(\frac{S_{max}}{S_o}\right)^2\left[\frac{u_{S,max}^2}{S_{max}^2}+\frac{u_{So}^2}{S_o^2}\right] \qquad \text{(I-21)}$$

$u_{S,max}$ y u_{So} son las incertidumbres asociadas a las magnitudes antes mencionadas, que se corresponden con sus desviaciones estándar ($s_{S,max}$ y s_{So}) calculadas por regresión.

El valor de s_{So} se calcula por aplicación de la ecuación I-11 sobre la regresión indicada por la función lineal expresada en la ecuación I-9:

$$s_{So} = s_{resid}\cdot\sqrt{\frac{1}{n}+\frac{(C_{M,max}-\overline{C}_M)^2}{\sum\left(C_{M,i}-\overline{C}_M\right)^2}} \qquad \text{(I-22)}$$

donde $C_{M,max}$ sería la concentración de metal estimada a partir de la razón molar en el máximo de la curva experimental y C_M sería el valor medio de las concentraciones utilizadas en la curva de calibrado.

Los grados de libertad efectivos, ν, asociados a la estimación de la constante de formación, necesarios para fijar el valor del factor de cobertura[44], k (Tabla 1 del Anexo D), en el cálculo de la incertidumbre ($K_f \pm k \cdot u_{Kf}$) pueden ser calculados a partir de la ecuación de Welch–Satterthwaite[45,46]:

$$\nu = \frac{\sum_i \left(s_i^2 / n_i\right)^2}{\sum_i \left(\frac{\left(s_i^2 / n_i\right)^2}{n_i - 1} \right)} \qquad \text{(I-23)}$$

5. PROTOCOLO PROPUESTO

Para conseguir el objetivo final, calcular la estequiometría y la constante de formación de un complejo, de manera rigurosa, con sus intervalos de cobertura asociados, hemos propuesto la siguiente estrategia experimental, que de forma esquemática se presenta en el diagrama de flujo (Figura I.2):

- En primer lugar mediante la aplicación del método de Job se obtienen los datos experimentales.

- Se aplica la regresión de mínima mediana de cuadrados (LMSR) a los diferentes puntos experimentales que constituyen los segmentos lineales, incluyendo puntos de la zona curva que podrían presentar problemas sobre su pertenencia o no a uno u otro de los segmentos.

- Se eligen los tramos rectos mediante la eliminación de los puntos considerados anómalos en cada zona, basándonos en los estimadores robustos habituales en LMSR: residuos estandarizados (SR) mayores de 2,5 y/o resistencia al diagnóstico (DR) mayor de 2,5.

44. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, *International Organisation for Standardisation*, 1993
45. Welch B.L, *J.R. Stat. Soc. Suppl.*, 3, 29-48, 1936, *Biometrika*, 29, 350-362, 1938, *ibid.*, 34, 28-35, 1947.
46. Satterthwaite F.E., *Psychometrika*, 6, 309-316, 1941, *Biometrics Bull*, 2(6), 110-114, 1946.

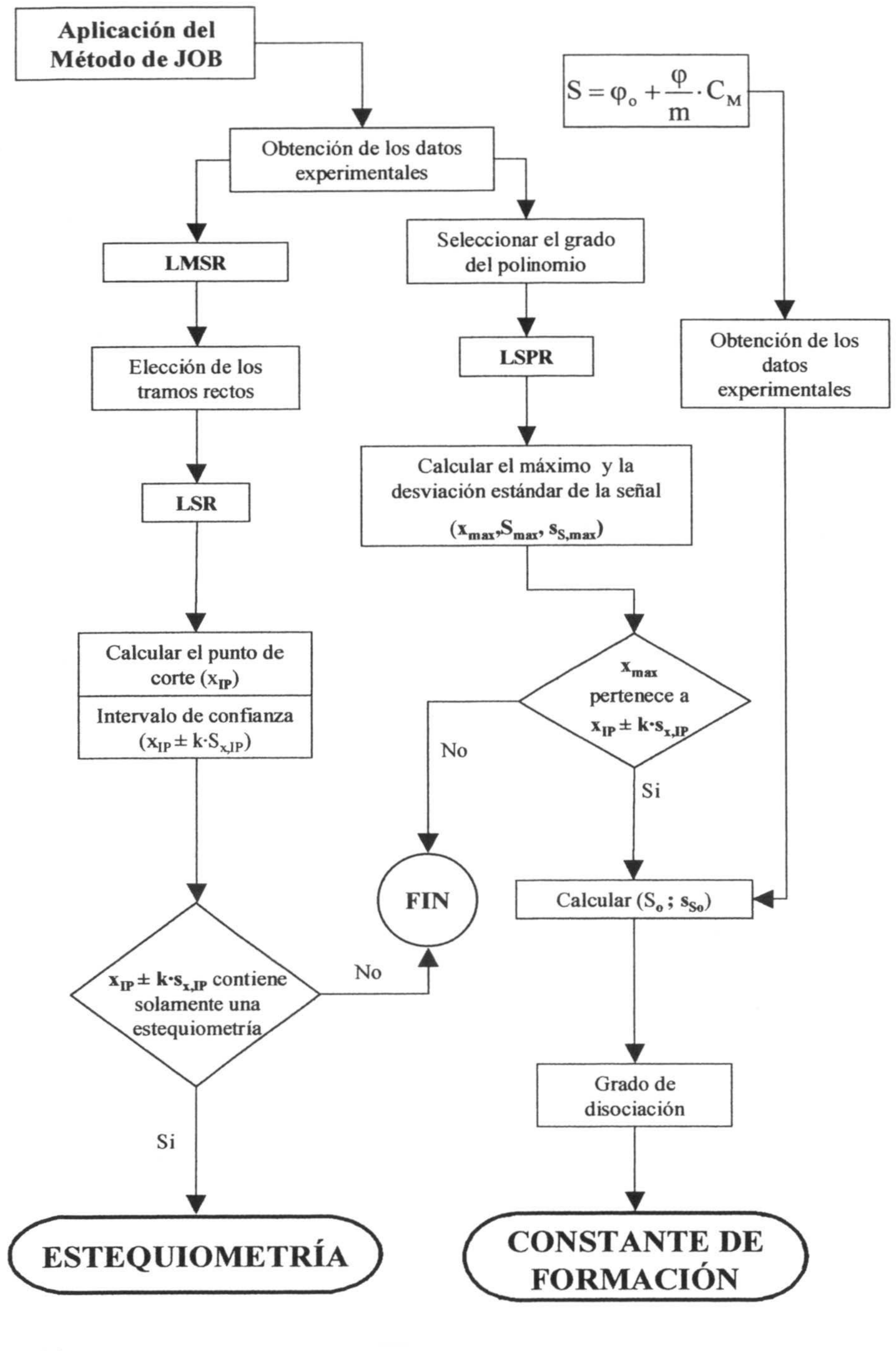


Figura I.2

Diagrama de flujo para el establecimiento de la constante de formación y la estequiometría de un complejo mediante el método de Job, aplicando el protocolo cualimétrico propuesto.

◆ Se aplica la regresión por mínimos cuadrados (LSR) a los puntos de cada zona no rechazados.

◆ Se calcula el punto de intersección, x_{IP}, de las dos líneas rectas usando las ecuaciones obtenidas mediante LSR, lo que nos proporciona la fracción molar ligando/metal y por tanto la estequiometría del complejo.

◆ Se obtiene el intervalo de cobertura horizontal del punto de corte de ambas líneas, $x_{IP} \pm k \cdot s_{x,IP}$, con k para un nivel de confianza del 95% y ν grados de libertad. Si este intervalo incluye solamente un único valor de estequiometría se le asigna dicha estequiometría, en caso contrario no se podría asignar ninguna estequiometría al complejo y habría que obtener más datos experimentales. El valor obtenido de esta forma, por una parte tiene una ratificación estadística, ya que las líneas rectas utilizadas para ello están validadas adecuadamente y por otra parte, la obtención de un intervalo de cobertura para la estequiometría calculada permite comprobar la bondad del resultado.

◆ Se selecciona el orden del polinomio y se ajusta la zona curva mediante una regresión por mínimos cuadrados (LSPR).

◆ Se calcula el punto máximo, MAX = (x_{max}, S_{max}), de dicha función y la desviación estándar del máximo de la curva, $s_{S,max}$. El máximo de la curva, x_{max}, debe estar incluido dentro del intervalo de cobertura horizontal asociado al punto de corte, $x_{IP} \pm k \cdot s_{x,IP}$, ya que el grado de disociación en definitiva se calcula a partir de una distancia vertical (S_o–S_{max}). Como S_o se calcula a partir de la concentración de metal en el punto estequiométrico, es decir a partir del valor de fracción molar del punto de corte de las rectas, el intervalo de cobertura de la fracción molar del punto de corte debe incluir al máximo de la curva.

◆ Se calcula el valor de la señal analítica en condiciones de máxima complejación, para lo cual se obtienen los valores de señal analítica correspondientes a diferentes disoluciones donde se varía la concentración de metal. Representando gráficamente la señal analítica frente a la concentración de metal se obtiene una recta de cuya pendiente se puede estimar el factor de proporcionalidad entre la señal analítica y la concentración de complejo, además del valor predicho de señal analítica máxima teórica junto con su desviación estándar, S_o y s_{So}.

◆ Se calcula el grado de disociación, α y su desviación estándar. Mediante la ecuación de Welch-Satterthwaite se calculan los grados de libertad asociados al grado de disociación.

◆ Se calcula la constante de formación, K_f del complejo y su intervalo de cobertura. En este caso, como la constante de formación sólo depende de α, pues C, m y n son constantes, los grados de libertad obtenidos mediante la ecuación de Welch-Satterthwaite coinciden con los del grado de disociación.

Para validar la metodología propuesta hemos aplicado el protocolo a datos simulados considerando complejos coloreados que presentan un máximo de absorción en la región UV-visible. La aplicación del protocolo cualimétrico propuesto la hemos llevado a cabo a datos experimentales obtenidos sobre un complejo formado entre un metal y un azo compuesto.

6. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA CON DATOS SIMULADOS

La validación utilizando datos simulados se ha realizado considerando complejos coloreados que presentan un máximo de absorción en la región UV-visible y por tanto que pueden ser analizados mediante espectrofotometría de absorción molecular. Desde este punto de vista, la señal analítica hasta ahora utilizada se convierte en absorbancia, A, y el factor de proporcionalidad en la constante de absortividad molar, ε.

Aplicando la ecuación teórica de constante de formación es posible obtener datos simulados para distintas constantes de formación, K_f, fijando los valores de estequiometría (m y g), el valor de absorbancia máxima $A_o = 1$ y el valor de la concentración $C = C_M + C_L$, que serán constantes en cada uno de los casos estudiados. Como el valor del grado de disociación es función del producto de la constante de formación y la concentración C, $\alpha = f(K_f \cdot C^{m+g-1})$, si representamos α frente a $-\log(C)$ para cada una de las constantes de formación podremos conocer el valor del máximo de absorción, A_{max} (Figura I.3) para cualquier valor de C en el rango estudiado de constantes de formación.

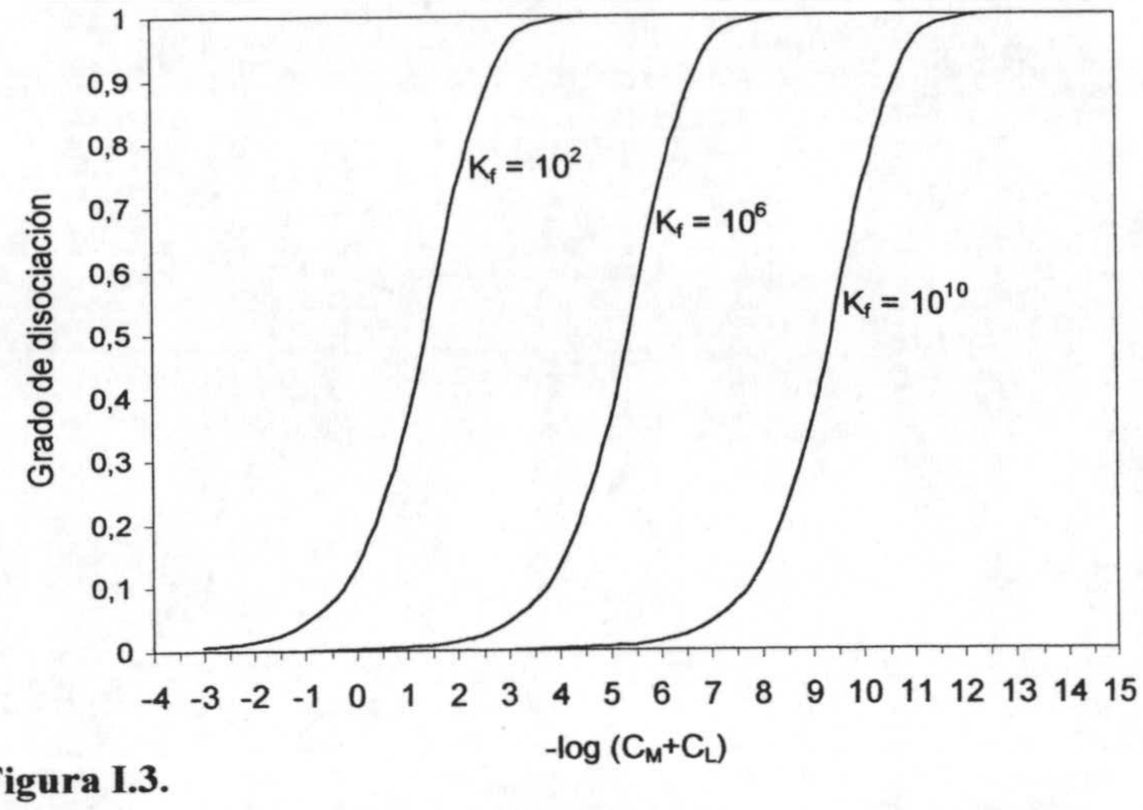


Figura I.3.

Representación del grado de disociación, α, para complejos de K_f 10^{10}, 10^6 y 10^2 M^{-1}, en estequiometrías 1:1, utilizando datos simulados.

Variando el valor de la fracción molar entre 0,01 y 0,99 se obtienen los valores de absorbancia teóricos correspondientes a cada valor de fracción molar (99 datos). A estos valores teóricos de absorbancia se les suma una componente de variabilidad que vendría dado por una distribución normal de media cero y desviación estándar de repetibilidad, N(0, RSD), donde RSD sería el valor teórico de desviación estándar relativa de repetibilidad de las medidas de absorbancia, que toma valores entre 1-15% de la absorbancia máxima, A_o. Dado que en todos los casos estudiados se considera que esta absorbancia máxima es igual a la unidad, a partir de este momento, y para simplificar la nomenclatura, consideramos la RSD como una desviación estándar SD.

6.1. Estequiometría 1:1

Considerando un complejo coloreado de estequiometría 1:1 (g = m = 1) se han obtenido los datos simulados para una constante de formación 10^6 M^{-1}, considerando $A_o = 1$, $C = 1{,}8 \cdot 10^{-4}$ M y SD = 0,01. Así mismo, en la zona donde

se presenta la curvatura se han obtenido réplicas de los puntos para conseguir un mejor ajuste de los datos experimentales al modelo polinómico (Tabla 1 del Anexo B1 y Figura I.4A).

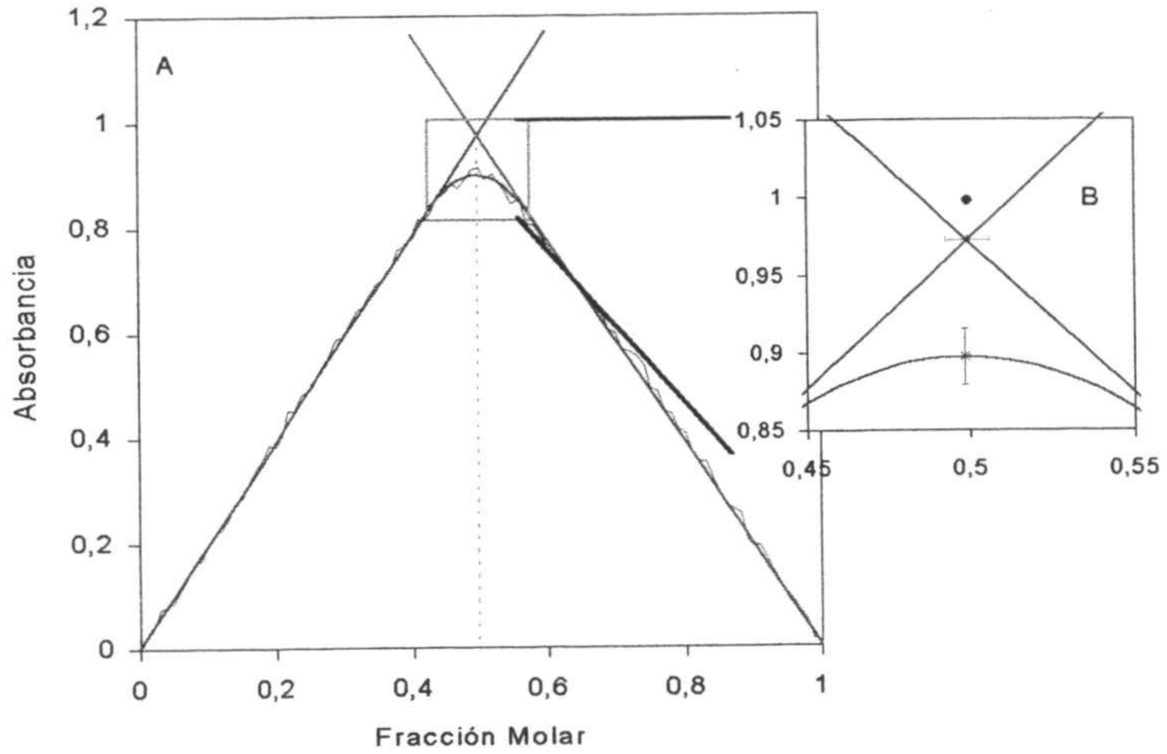


Figura I.4.

Punto de intersección e intervalos de cobertura (K_f=10^6 M^{-1}; esteq. 1:1; C=$1{,}8 \cdot 10^{-4}$; SD=0,01).

A los datos que pueden constituir los segmentos lineales se le aplica la regresión de mínima mediana de cuadrados (LMSR), incluyendo puntos de la zona curva que podrían presentar problemas sobre su pertenencia o no a uno u otro de los segmentos. Basándonos en los residuos estandarizados se eliminan los puntos con un valor mayor de 2,5 (marcados con un asterisco en la Tabla 1 del Anexo B1) y se aplica LSR con los puntos, de cada zona, no rechazados para obtener los parámetros de los modelos lineales (Tabla 2 del Anexo B1, Figura I.4A) asociados a cada uno de los tramos rectos.

A partir de las ecuaciones obtenidas mediante LSR se obtiene el punto de intersección, x_{IP}, de las dos líneas rectas, lo que nos proporciona la fracción molar ligando/metal y por tanto la estequiometría del complejo (k=2):

$$\mathbf{x_{IP} = 0{,}495 \pm 0{,}007} \qquad \textbf{\textit{ESTEQUIOMETRÍA 1:1}}$$

Este intervalo de cobertura para la fracción molar [0,488 ; 0,502], incluye solamente el valor teórico 0,5 correspondiente a la estequiometría 1:1.

Por otro lado, se consideran los puntos cercanos al máximo de la curva con sus réplicas correspondientes (Tabla 3 del Anexo B1) y se ajustan a una ecuación de 2º orden mediante una regresión polinómica por mínimos cuadrados (LSPR) (Tabla 3 del Anexo B1) para así obtener el punto máximo, MAX = (x_{max}, A_{max}) = (0,499, 0,902), de dicha función y la desviación estándar del máximo de absorbancia en la curva, $S_{A,max} = 0,003$.

El máximo de la curva, x_{max}, debe estar incluido dentro del intervalo de cobertura horizontal asociado al punto de corte, $x_{IP} \pm k \cdot S_x$ ($0,499 \in [0,488 ; 0,502]$) (Figura I.4B).

Para estimar el valor de absortividad molar, ε, se han obtenido datos simulados de absorbancia frente a concentración de metal (para los valores teóricos de A_o=1 y $\varepsilon_{teórico}$ =$1,111 \cdot 10^4$ $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$). Sumándole la componente de variabilidad, SD = 0,01 (Tabla 4 del Anexo B1). Mediante LSR se obtiene una línea recta de cuya pendiente se deduce el valor de la absortividad molar (Tabla 4 del Anexo B1) junto con su intervalo de cobertura deducidao de la desviación estándar de la pendiente. (ε ; s_ε) = ($1,112 \cdot 10^4$; $0,004 \cdot 10^4$).

El valor teórico de absorbancia se estima a partir de la recta de regresión para la concentración en el punto estequiométrico ($C_M = 9,00 \cdot 10^{-5}$ M) junto con su desviación estándar (A_o ; s_{Ao}) = (1,002 ; 0,002).

A partir de A_{max}, $s_{A,max}$, A_o y s_{Ao} se calcula el grado de disociación, α junto con su desviación estándar (α ; s_α) = (0,100 ; 0,004), por lo que la constante de formación para un 95% y 36 grados de libertad (k = 2) es:

$$\mathbf{K_f \pm k \cdot u_{Kf} = 9,99 \cdot 10^5 \pm 1,63 \cdot 10^5\ M^{-1}}$$

El intervalo de cobertura para la constante de formación incluye el valor teórico ($K_f = 10^6$ M^{-1}) que se ha fijado para obtener los datos, por lo que se puede concluir que el protocolo propuesto demuestra su validez en este caso.

6.2. Estequiometría 2:1

Considerando un complejo coloreado de estequiometría 2:1 (n = 2 y m = 1) se han obtenido los datos simulados para $K_f = 10^{10}$ M^{-2}, fijando el valor de absorbancia máxima $A_o = 1$, $C = 1{,}5 \cdot 10^{-4}$ M y SD = 0,02. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 5 del Anexo B1 (Figura I.5).

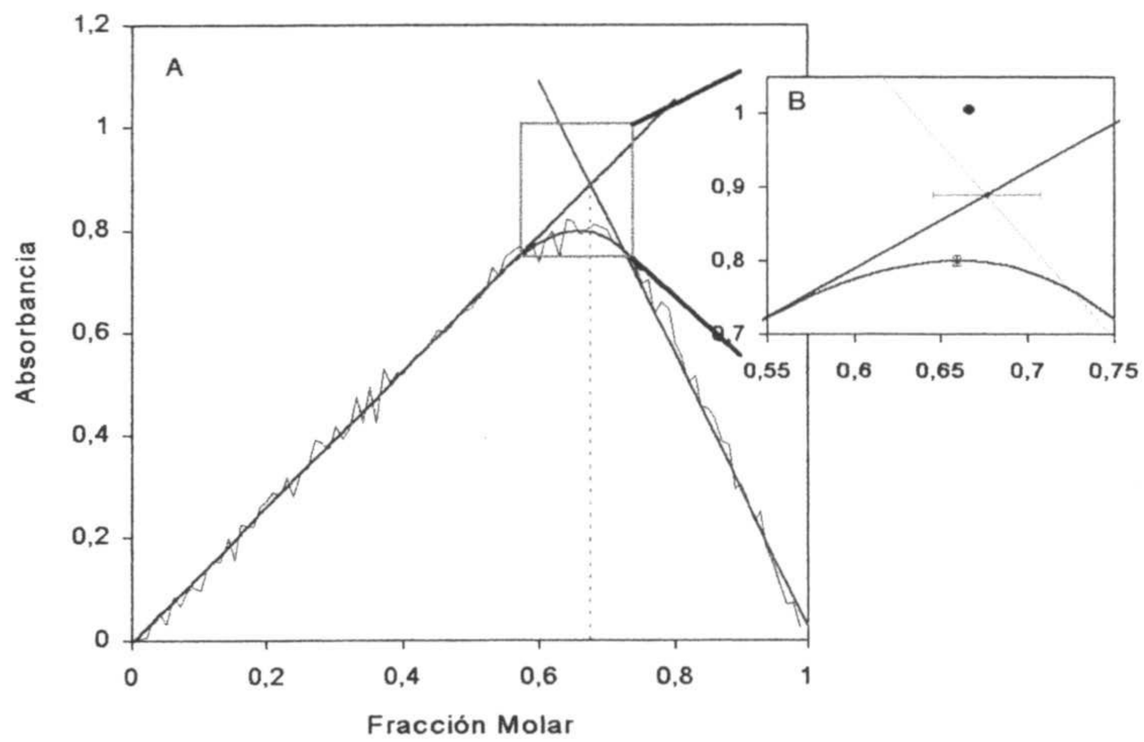


Figura I.5.

Punto de intersección e intervalos de cobertura (K_f=10^{10} M^{-2}; esteq. 2:1; C=$1{,}5 \cdot 10^{-4}$; SD=0,02).

Basándonos en los residuos estandarizados (SR), se eliminan los puntos con un valor mayor de 2,5 (marcados con un asterisco en la Tabla 5 del Anexo B1) y se aplica LSR con los puntos de cada zona no rechazados (Tabla 6 del Anexo B1), para obtener los parámetros de los modelos lineales asociados a cada uno de los tramos rectos. Como la curvatura se presenta alrededor del punto de fracción molar 0,666, en esta zona se realizan las réplicas de los datos.

A partir de las ecuaciones obtenidas mediante LSR, se obtiene el punto de intersección, x_{IP}, de las dos líneas rectas lo que nos proporciona la fracción molar ligando/metal y por tanto la estequiometría del complejo (k = 2):

$x_{IP} = 0{,}677 \pm 0{,}031$ ***ESTEQUIOMETRÍA 2:1***

El intervalo de cobertura para la fracción molar en el punto de corte, [0,646; 0,708], incluye solamente el valor teórico 0,6667 correspondiente a la estequiometría 2:1.

Por otro lado, en las cercanías al máximo de la curva, los puntos (Tabla 7 del Anexo B1) se ajustan a una ecuación de 3er orden mediante LSPR (Tabla 7 del Anexo B1) para obtener el punto máximo, MAX = (x_{max}, A_{max}) = (0,660 ; 0,799), siendo la desviación estándar vertical del máximo de la curva, $S_{A,max}$ = 0,004. El máximo de la curva, x_{max}, está incluido dentro del intervalo de cobertura horizontal asociado al punto de corte, $x_{IP} \pm k \cdot S_{xIP}$ (0,660 $\in$ [0,646 ; 0,708]), por lo que es posible calcular el grado de disociación.

Para el cálculo del valor de absortividad molar se han obtenido datos de absorbancia frente a la concentración de metal para un valor de absorbancia máxima teórica A_o=1 ($\varepsilon_{teórico}$=2,00·10^4 dm^3·mol^{-1}·cm^{-1}). A estos valores simulados se les suma la componente de variabilidad, SD obteniendo dos réplicas de cada punto (Tabla 8 del Anexo B1). Aplicando LSR se obtiene una línea recta de cuya pendiente se deduce el valor de la absortividad molar junto con su desviación estándar, (ε ; s_ε) = (2,01·10^4 ; 0,01·10^4).

Para calcular el valor teórico de absorbancia se utiliza la recta de regresión estimada considerando la concentración de metal en el punto estequiométrico (C_M = 5,00·10^{-5} M) obteniendo, (A_o ; s_{Ao}) = (1,004 ; 0,005)

A partir de A_{max}, $s_{A,max}$, A_o y s_{Ao} se calcula el grado de disociación, α junto con su desviación estándar, (α ; s_α) = (0,204 ; 0,005), y la constante de formación con su intervalo de cobertura que incluye el valor teórico (K_f = 10^{10}), donde k = 2 para un nivel de cobertura del 95% y 21 grados de libertad, demostrándose la validez del protocolo:

$$\mathbf{K_f \pm k \cdot u_{Kf} = 9{,}32 \cdot 10^9 \pm 1{,}64 \cdot 10^9\ M^{-2}}$$

6.3. Estequiometría 3:1

Considerando complejo coloreado de estequiometría 3:1 (g = 3 y m = 1) se han obtenido los datos simulados para una $K_f = 10^{15}$ M^{-3}, fijando el valor de absorbancia máxima $A_o = 1$, $C = 1{,}06 \cdot 10^{-4}$ M y SD = 0,01 (Tabla 9 del Anexo B1).

Se aplica LSR a los puntos no rechazados para obtener los parámetros de los modelos lineales (Tabla 10 del Anexo B1) asociados a cada uno de los tramos rectos.

Al calcular el punto de intersección de las dos líneas rectas: $\mathbf{x_{IP} = 0{,}764 \pm 0{,}044\ (k=2)}$, el intervalo de cobertura para dicho punto de corte, [0,720; 0,809], incluye tanto el valor teórico de la estequiometría 3:1 (0,75) como el de la estequiometría 4:1 (0,8), por lo que no podríamos discernir entre una y otra por la cercanía de los puntos de corte, por lo que el método no es aplicable a este tipo de estequiometrías.

6.4. Estequiometría 4:1

Para un complejo de estequiometría 4:1 (n = 4 y m = 1) se han obtenido los datos simulados con un valor $K_f = 10^{10}$ M^{-4}, fijando la absorbancia máxima $A_o = 1$, $C = 1{,}6 \cdot 10^{-2}$ M y SD = 0,01 (Tabla 11 del Anexo B1). Los puntos con SR mayor de 2.5 se eliminan (marcados con un asterisco en la Tabla 11 del Anexo B1) y se aplica LSR con los puntos, de cada zona, no rechazados para obtener los parámetros de los modelos lineales asociados a cada uno de los tramos rectos.

Del punto de intersección de las líneas rectas: $\mathbf{x_{IP} = 0{,}831 \pm 0{,}052\ (k=2)}$, el intervalo de cobertura para el punto de corte, [0,779; 0,883], incluye tanto el valor teórico 0,8 correspondiente a la estequiometría 4:1 como el valor 0,833 correspondiente a la estequiometría 5:1, por lo que en este caso tampoco es aplicable el método de Job.

6.5. Límite de aplicación de la metodología

Para las estequiometrías 1:1 (n=m=1), 2:1 (n= 2 y m=1), 3:1 (n=3 y m=1) y 4:1 (n=4 y m=1) se han obtenido los datos simulados para distintos valores de constante de formación, variando el valor $C = C_M + C_L$, siempre manteniendo constante la absorbancia A_o=1. Las combinaciones probadas se muestran en la Tabla 15 del Anexo B1. A cada conjunto de datos se les suma diferentes niveles de ruido obtenido de una distribución normal N(0, SD), y a cada uno de ellos se les aplica la metodología propuesta para comprobar la validez del procedimiento propuesto.

Para cada uno de estos casos, se debe demostrar que la metodología propuesta es válida y que se cumplen las condiciones impuestas, es decir que el intervalo de cobertura para la fracción molar incluye solamente el valor teórico de estequiometría, que el máximo de la curva también está incluido en dicho intervalo y que el intervalo de cobertura para la constante de formación incluye el valor verdadero (fijado de antemano) de la constante de formación.

Si se representa gráficamente el nivel de variabilidad (SD) frente al grado de disociación (Figura I.6) se obtiene una curva que representa el límite de aplicabilidad de este procedimiento para las diferentes estequiometrías. La parte inferior de las curvas proporciona la zona donde el método puede ser aplicado, es decir los valores de desviación estándar de repetibilidad, SD, que puede tener el método para cada una de los grados de disociación. Por ejemplo, se ha comprobado que si se tiene una desviación estándar relativa del 5%, para una estequiometría 1:1 sólo es aplicable el método para complejos con grado de disociación comprendido entre aproximadamente 0,07 y 0,85 y para una estequiometría 2:1 sólo para complejos con grado de disociación entre 0,1 y 0,36.

En el caso de las estequiometría 3:1 y 4:1, las combinaciones probadas no producen resultados concluyentes, pues debido a la cercanía del punto de corte de la estequiometría 3:1 (0,75), 4:1 (0,8) y 5:1 (0,833) no es posible discernir claramente entre una estequiometría y otra.

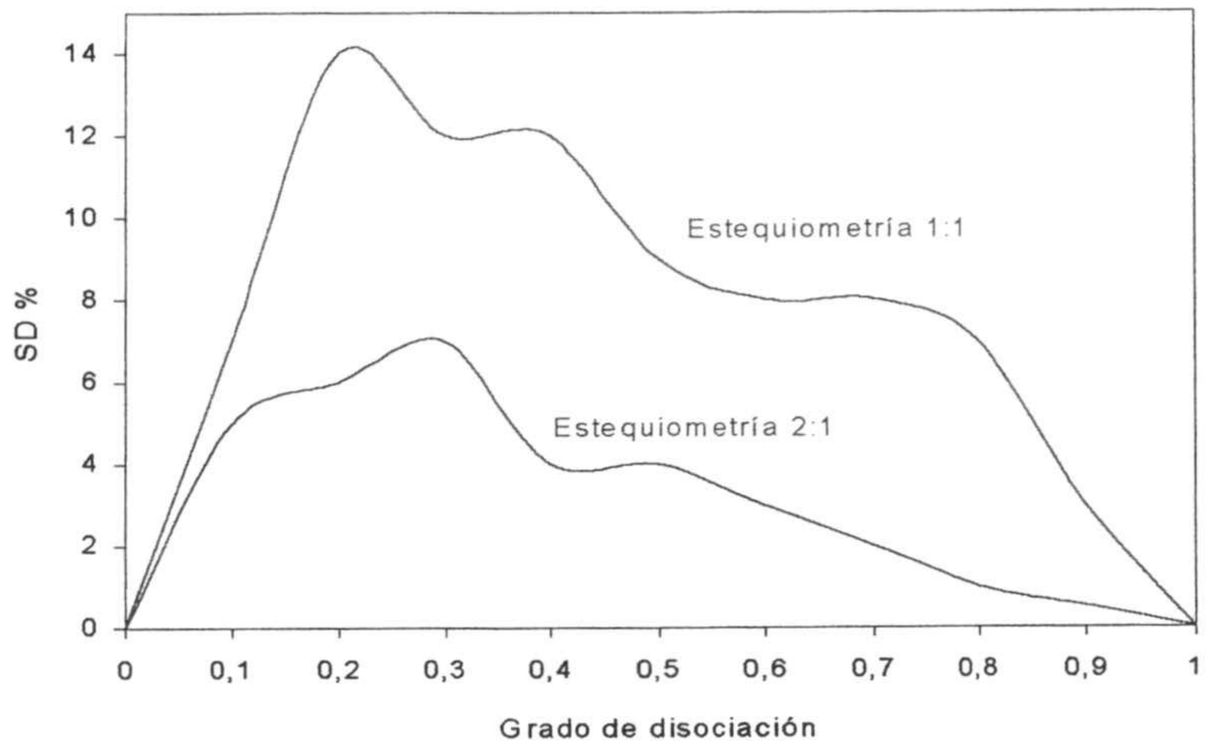


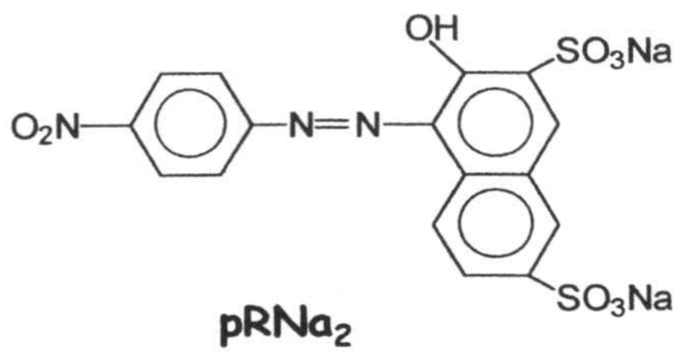
Figura I.6.

Límite de aplicación para las estequiometrías 1:1 y 2:1.

(SD: Desviación estándar de repetibilidad teórica).

7. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA A DATOS REALES. ESTUDIO DEL COMPLEJO Ni(II)-pRNa$_2$.

Para aplicar la metodología propuesta al complejo formado por el Ni(II) y pRNa$_2$ (sal disódica del ácido p-nitrofenilazo-2-naftol-3,6-disulfónico)[47] se preparan disoluciones de Ni(II) y pRNa$_2$ de la misma concentración molar (10^{-3} M), a continuación, en matraces de 25 ml, se mezclan cantidades decrecientes del metal correspondiente y crecientes de pRNa$_2$, de forma que en todos ellos la suma de concentraciones sea constante e igual a $2 \cdot 10^{-4}$ M, se añade 5 ml de tampón (H_3BO_3 0,1M/NaOH 0,1M) de pH = 9,30 y agua



pRNa$_2$

47. Bosque Sendra, J.M., *Estudio y Aplicaciones Analíticas del 1-Fenilazo-2-Naftol-3,6-Disulfonato Sódico y de su p-Nitroderivado*, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 1983.

desionizada hasta el enrase. Se mide la absorbancia frente a blancos constituidos por las mismas cantidades crecientes de $pRNa_2$, a la longitud de onda de 555 nm. Los datos experimentales se recogen en las Tabla 16 del Anexo B1.

La aplicación de LMSR permitió obtener los residuos estandarizados para los segmentos lineales antes y después del punto estequiométrico. Los datos marcados con asteriscos indican los valores experimentales que no fueron utilizados posteriormente para la estimación del término independiente y de la pendiente de las rectas mediante LSR, pues estos puntos no pertenecen al tramo recto.

Para el complejo Ni(II)–$pRNa_2$, en la 1ª recta se utilizan los valores experimentales 2 a 12, ambos inclusive (n=11) y para la 2ª recta únicamente se utilizan los 5 últimos datos. De esta forma, se asegura la objetividad en la selección de los puntos que se ajustan a una línea recta en cada una de las zonas experimentales, con la previa eliminación de los puntos anómalos. En la Tabla 16 del Anexo B1 se recogen los parámetros de las rectas ajustadas mediante LSR.

El punto de corte de las rectas, $\mathbf{x_{IP} = 0{,}695 \pm 0{,}031\ (k=2)}$, permite atribuir una estequiometría 2:1 de forma clara, dado que el valor de la fracción molar obtenida no difiere significativamente del valor teórico, 0,666, y al mismo tiempo en su intervalo de cobertura **(0,665 – 0,727)** no se incluyen ningunas de las fracciones molares que indicarían otras estequiometrías diferentes (fracciones molares de 0,5 y 0,75 de ligando indican complejos de estequiometría 1:1 y 3:1, respectivamente).

A continuación se ajustan los puntos experimentales de la zona curva, con sus réplicas correspondientes, a una función polinómica mediante LSPR. En la Tabla 17 del Anexo B1 aparecen los coeficientes del modelo polinómico ajustados por LSPR a una ecuación de orden 3.

El máximo de la curva para el complejo es MAX = (x_{max}, A_{max}) = (0,669, 0,603). Como la fracción molar correspondiente al máximo de la curva, x_{max}, está incluida dentro del intervalo de cobertura horizontal asociado al punto de corte, $x_{IP} \pm k \cdot S_{xIP}$ (0,669 $\in$ [0,665; 0,727]), es posible calcular el grado de disociación. A los valores de absorbancia de dicho máximo se les asocia una desviación estándar, $s_{A,max} = 0{,}003$.

Para calcular la absortividad molar, ε, se han utilizado disoluciones de Ni(II) de concentraciones comprendidas entre $1{,}6 \cdot 10^{-5}$ y $8{,}0 \cdot 10^{-5}$ M, 2 ml de disolución de reactivo de concentración $5 \cdot 10^{-3}$ M y 1 ml de la disolución reguladora de pH 9,3, enrasando hasta 25 ml con agua desionizada. Las medidas se realizaron media hora después de haber preparado los matraces, midiendo la absorbancia a 555 nm. Los resultados experimentales se recogen en la Tabla 18 del Anexo B1, junto con los parámetros del modelo lineal.

Representado gráficamente la absorbancia frente a la concentración de metal se obtiene una línea recta de cuya pendiente se deduce el valor de la absortividad molar junto con su desviación estándar, $(\varepsilon \; ; \; s_\varepsilon) = (11650{,}0 \; ; \; 131{,}9)$. El valor teórico de absorbancia se obtiene de la recta de regresión estimada para la concentración de metal en el punto estequiométrico ($C_M = 6{,}67 \cdot 10^{-5}$ M), junto con su desviación estándar y toma el valor: $(A_o \; ; \; s_{Ao}) = (0{,}681 \; ; \; 0{,}004)$.

Una vez obtenido el valor de la absorbancia teórica se puede calcular el grado de disociación, α, y la constante de formación, K_f con sus correspondientes intervalos de cobertura para k = 2 con un nivel de cobertura del 95% y 10 grados de libertad:

$$\mathbf{(\alpha \; ; \; s_\alpha) = (0{,}115 \; ; \; 0{,}007)}$$

$$\mathbf{K_f \pm k \cdot u_{Kf} = 3{,}30 \cdot 10^{10} \pm 1{,}21 \cdot 10^{10} \; M^{-2}}$$

El hecho de que la incertidumbre asociada a la constante de formación sea tan grande (37% de incertidumbre relativa) es debido a que el número de puntos experimentales obtenidos para el cálculo de la estequiometría es demasiado pequeño, por lo tanto si se quiere disminuir esta incertidumbre habría que realizar más experiencias.

8. CONCLUSIONES

En este capítulo hemos propuesto una metodología simple y rigurosa para la determinación de la estequiometría y la constante de formación de un complejo y de sus correspondientes incertidumbres. De los resultados obtenidos se deduce que el método de Job es aplicable para complejos de estequiometrías 1:1 o 2:1 con un amplio rango de grados de disociación a los que pueda ser aplicado. En cuanto a las estequiometrias 3:1 y 4:1 no se han obtenido resultados concluyentes, debido principalmente a la cercanía de los valores de las fracciones molares estequiométricas, pues la propia variabilidad de los datos, por pequeña que sea, produce intervalos de confianza que abarcan más de una estequiometría, no pudiendo discernir entre ellas. Por lo tanto para estas estequiometrías es mejor la utilización de otros métodos para el establecimiento de la constante de formación del complejo de coordinación correspondiente.

Otro aspecto a tener en cuenta, es que para obtener un valor aceptable de incertidumbre asociada a la constante de formación es necesario la realización de un gran número de experiencias, sobre todo en la zona de curvatura, pues en caso contrario ésta tomará valores muy cercanos a la propia constante, es decir que las desviaciones estándar relativas de la constante de formación estarán muy próximas al 100%. Sin embargo, si el objetivo del estudio es solamcntc obtener la estequiometría del complejo no será necesario que el número de datos experimentales sea tan elevado, ya que las zonas lineales pueden ser delimitadas con un número reducido de puntos, aunque en este caso el intervalo de punto de corte de las rectas podría incluir más de una estequiometría, debiendo en este caso aumentar el número de experiencias.

Bloque I

PROTOCOLOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA ESTEQUIOMETRÍA Y/O ESTIMACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACION

Capítulo II

MÉTODO DE YOE Y JONES

1. ANTECEDENTES

El segundo método estudiado es el propuesto por Yoe y Jones[1] en 1944 y aunque menos utilizado que el método de Job, también ha sido muy empleado para la determinación de la estequiometría y la constante de formación. Al igual que en el método de Job, la técnica más utilizada para la aplicación de este método también es la espectrofotometría de absorción molecular.

Entre los complejos más estudiados en los últimos años por este método se encuentran complejos formados con reactivos orgánicos derivados de la fenona con cationes metálicos, tales como HBP (2-hidroxi-4-n-butoxipropiofenona) con Fe(III)[2] y HIPAO (2-hidroxi-4-isopropoxiacetofenona-oxima) con Mn(II)[3], todos ellos con estequiometría 1:1.

Con respecto a los complejos de estequiometría 2:1, se han estudiado los formados entre HEBO (2-hidroxi-4-etoxibutirofenona) con Pd(II)[4], HIPAT (2-hidroxi-4-isopropoxi-acetofenona) con Ni(II)[5], derivados de la hidrazona como MSAG (5-metilsalicilaldehido guanil-hidrazona) con Fe(III)[6], derivados de la quinolina como la 8-hidroxiquinolina con Zn (II)[7], Ru(II), Rh(II), Pd(II), Os(II), Ir(II) y Pt(III)[8] y fluoroquinolona con Fe(III)[9].

El único complejo estudiado, encontrado en bibliografía, de estequiometría 3:1, es el formado entre el Ni(II)[10] con el 3-hidroxi-3-n-propil-1-p-toliltriazina.

1. Yoe J.H. and Jones A.L., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.,* 16, 111, 1944.
2. Talati J.D. and Shah S.S., *Acta Cienc. Indica, Chem.*, 20, 14-18, 1994.
3. Desai V.K. and Desai K.K., *Orient. J. Chem.*, 12, 215-216, 1996.
4. Desai G.R. and Desai K.K., *Orient. J. Chem.*, 11, 197-198, 1995.
5. Desai V.K. and Desai K.K., *Orient. J. Chem.*, 12, 203-205, 1996.
6. Kawatkar S.G. and Nimbalkar R.V., *Acta Cienc. Indica, Chem.*, 20, 27-29, 1994.
7. Alafandy M., Willen R., Mahieu B., Alturky M., Gielen M., Biesemans M., Legros F., Camu F. and Kauffmann J.M., *Inorg. Chim. Acta*, 255, 175-179, 1997.
8. Wenclawiak B. and Flemming M., *Fresenius'Z. Anal. Chem.K,* 326, 551-557, 1987.
9. Suliman F.E.O. and Sultan S.M., *Talanta*, 43, 559-568, 1996.
10. Bhatt R., Rezaie B., Goswami A.K., Chauhan R.S. and Purohit D.N., *J. Indian Chem. Soc.*, 73, 89, 1996.

2. CONSTANTE DE FORMACIÓN Y GRADO DE DISOCIACIÓN

Dentro del grupo de métodos que operan a C_M constante y r variable, el más utilizado es el denominado ***método de Yoe y Jones o de la relación molar***. Este método estudia la influencia que ejerce la concentración de uno de los reactivos (generalmente el ligando) en el equilibrio, variando la concentración de ligando y permaneciendo constante la concentración de metal. Al igual que en el caso anterior, el método de Yoe y Jones permite calcular la estequiometría de complejos fuertes y además la estequiometría y constante de formación de complejos moderadamente débiles. Las condiciones necesarias para la aplicación de este método son:

- la cantidad de ligando requerido para la formación del complejo no debe ser mucho más alta que la del ion metálico;
- obtención de respuesta analítica en el rango estudiado de concentraciones; y
- dependencia lineal entre la respuesta analítica y la concentración del complejo en este rango.

La metodología a seguir en la formación del complejo coloreado M_mL_g, donde M es el metal y L el ligando, es preparar disoluciones con la misma concentración de metal, C_M, y distinta concentración de ligando, C_L, de forma que en una serie de disoluciones se cumpla que C_L/C_M sea menor que g/m (exceso de ligando) y en la otra serie que C_L/C_M sea mayor o igual que g/m (exceso de metal). Se miden las señales analíticas de dichas disoluciones, y se representan gráficamente estas señales frente a r obteniendo una curva:

$$r = \frac{C_L}{C_M} \qquad \text{(II-1)}$$

A partir del punto donde la curva cambia de pendiente se puede deducir la relación molar estequiométrica (SMR), es decir la estequiometría del complejo:

$$r_{max} = SMR = \frac{g}{m} \qquad \text{(II-2)}$$

Ahora bien, la constante de formación, K_f, viene dada por la expresión:

$$K_f = \frac{[M_m L_g]}{[M]^m \cdot [L]^g} \qquad \text{(II-3)}$$

y cada una de estas concentraciones puede ser expresada en función de la concentración inicial de cada una de ellos. Considerando que r > g/m, la concentración de complejo viene delimitada por la concentración de metal en el medio:

$$[M_m L_g] = \frac{C_M}{m} \cdot (1-\alpha)$$
$$[M] = C_M - m \cdot [M_m L_g]$$
$$[L] = C_L - g \cdot [M_m L_g] = r \cdot C_M - g \cdot [M_m L_g]$$

donde α es el grado de disociación del complejo. Sustituyendo estas expresiones en la ecuación II-3 y reagrupando términos nos queda una ecuación general:

$$K_f = \frac{(1-\alpha) \cdot C_M}{m^{1-g} \cdot {C_M}^{m+g} \cdot \alpha^m [m \cdot r - g \cdot (1-\alpha)]^g} \qquad \text{(II-4)}$$

Sustituyendo el valor de relación molar dado por la ecuación II-2 es posible obtener una ecuación simplificada de la constante de formación en función de la concentración de metal, C_M que es un valor constante y del grado de disociación, α, ya que una vez obtenida la estequiometría g y m son valores fijos:

$$K_f = \frac{(1-\alpha) \cdot C_M}{(\alpha \cdot C_M)^{m+g}} \cdot \frac{m^{g-1}}{g^g} \qquad \text{(II-5)}$$

Para poder calcular la constante de formación es necesario conocer el grado de disociación del complejo, α que se obtendría a partir de la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{S_{IP} - S_{SMR}}{S_{IP}} = 1 - \frac{S_{SMR}}{S_{IP}} \qquad \text{(II-6)}$$

donde S_{SMR} sería la señal analítica correspondiente a la razón estequiométrica en el punto de intersección con la curva ajustada y S_{IP} sería la señal analítica correspondiente al punto de corte de las rectas. Cuando el complejo es lo

suficientemente fuerte la señal analítica del punto de corte coincide con la señal analítica cuando el metal se ha transformado totalmente en complejo. Pero considerando un complejo moderadamente fuerte, las rectas tangentes a la curva se cortan en un punto por debajo del punto de corte de las rectas que representan el comportamiento del complejo cuando esta totalmente complejado (Figura II.1).

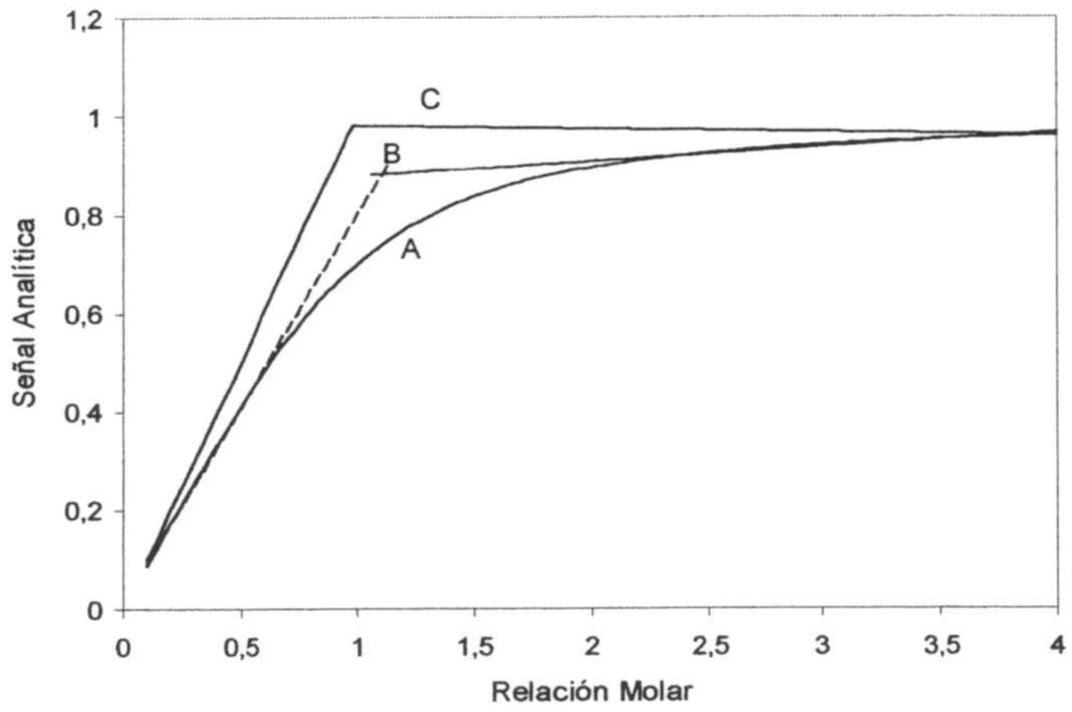


Figura II.1.

Datos simulados para un complejo moderadamente fuerte (A), rectas tangentes a la curva A (B) y rectas para la sustancia totalmente complejada (C).

Esta diferencia en los puntos de corte de dichas rectas hace que el valor del grado de disociación obtenido con el punto de corte B sea menor que el obtenido con el punto de corte C. Esta disminución en el grado de disociación (error por defecto) conllevaría la sobre estimación de la constante de formación, por lo que el uso de la absorbancia correspondiente al punto de corte de las rectas es sólo válido cuando la diferencia entre las señales analíticas de los dos puntos (A y B) sea muy pequeña, es decir, cuando la diferencia entre los grados de disociación sea prácticamente despreciable. Dado que el grado de disociación depende de la constante de formación y de la concentración C_M ($\alpha = f(K_f \cdot C_M)$) se puede establecer un límite de utilización para el punto de corte de las rectas, es decir cuando el producto de $K_f \cdot C_M^{m+g-1} \geq 100$ es posible utilizar el punto de corte de las rectas tangentes a la curva.

Al igual que en el Método de Job, el grado de disociación puede ser calculado a partir del valor de la señal analítica asociado a la relación estequiométrica correspondiente a la curva ajustada, S_{SMR}, y del valor teórico de señal analítica, S_o calculado en condiciones donde se forme la máxima cantidad de complejo para poder considerar una valor de $\alpha = 0$, es decir cuando todo el metal se ha transformado en complejo:

$$\alpha = \frac{S_o - S_{SMR}}{S_o} = 1 - \frac{S_{SMR}}{S_o} \qquad \text{(II-7)}$$

Esta ecuación es similar a la obtenida en el Método de Job (Ecuación I-7) pero utilizando S_{SMR} en vez de S_{max}. Por lo tanto, el valor teórico de señal analítica, S_o, se obtiene de la misma forma que en el método anterior.

Una vez obtenida la curva experimental, se deben ajustar las dos ramas de la curva a dos líneas rectas. El procedimiento tanto para elegir los puntos experimentales que se ajustan a las líneas rectas mediante LSMR, el ajuste por LSR y LSPR, así como el cálculo del punto de corte de las dos líneas rectas junto con su intervalo de confianza se ha desarrollado en el apartado 3 del capítulo I.

Dado que la ecuación teórica de la estequiometría de un complejo al aplicar el método de Yoe y Jones viene dada por la ecuación II-2, el valor de relación molar tomará valores tales como 1, 2, 3 y 4 para estequiometrías 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 respectivamente, por lo que si el intervalo de confianza calculado para la relación molar incluye solamente uno de los valores teóricos de estequiometría se puede asignar dicho valor al complejo estudiado.

3. INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA CONSTANTE DE FORMACIÓN Y AL GRADO DE DISOCIACIÓN

El valor de la constante de formación debe ir acompañado de su correspondiente incertidumbre, $K_f \pm k \cdot u_{Kf}$ donde u_{Kf} es la incertidumbre de la constante de formación y se calcula mediante la regla de propagación de varianzas aplicada a la ecuación II-5, obteniendo:

$$u_{Kf}^2 = u^2\left\{\frac{m^{g-1}\cdot C_M}{g^g\cdot(C_M)^{m+g}}\cdot\frac{1-\alpha}{\alpha^{m+g}}\right\} = \left(\frac{m^{g-1}\cdot C_M}{g^g\cdot(C_M)^{m+g}}\right)^2\cdot\left(\frac{\partial\left(\frac{1-\alpha}{\alpha^{m+g}}\right)}{\partial\alpha}\right)^2\cdot u_\alpha^2$$

Con lo que sí se opera y se reagrupan los términos quedaría:

$$u_{Kf}^2 = \left[\frac{m^{g-1}\cdot C_M}{g^g\cdot(C_M)^{m+g}}\cdot\frac{(m+g-1)\alpha^{(m+g)}-(m+g)\alpha^{(m+g-1)}}{\alpha^{2(m+g)}}\right]^2 u_\alpha^2 \qquad \text{(II-8)}$$

donde C_M, m y g son valores constantes, α es el grado de disociación y $u^2{}_\alpha$ es la varianza asociada al grado de disociación.

La incertidumbre asociada al grado de disociación se calcula aplicando la ley de propagación de varianzas y depende de la señal analítica dada por el valor de SMR en la curva ajustada, S_{SMR} y del valor de la señal analítica máxima teórica S_o:

$$u_\alpha^2 = u^2\left(\frac{S_{SMR}}{S_o}\right) = \left(\frac{S_{SMR}}{S_o}\right)^2\left[\frac{u_{S,SMR}^2}{S_{SMR}^2}+\frac{u_{So}^2}{S_o^2}\right] \qquad \text{(II-9)}$$

$u_{S,SMR}$ y u_{So} son las incertidumbres asociadas a las magnitudes antes mencionadas que se corresponden con sus respectivas desviaciones estándar, $s_{S,SMR}$ y s_{So}. Los grados de libertad asociados tanto a la constante de formación como al grado de disociación se calculan aplicando la ecuación de Welch–Satterthwaite (Ecuación I-23).

4. PROTOCOLO PROPUESTO

Para calcular la estequiometría y la constante de formación mediante el método de Yoe y Jones con sus intervalos de confianza asociados, hemos propuesto la siguiente estrategia experimental que de forma esquemática se presenta en el diagrama de flujo (Figura II.2):

- Mediante la aplicación del método de Yoe y Jones se obtienen los datos experimentales.

- Se aplica la regresión de mínima mediana de cuadrados (LMSR) a los diferentes puntos experimentales que constituyen los segmentos lineales, incluyendo puntos de la zona curva que podrían presentar problemas sobre su pertenencia o no a uno u otro de los segmentos.

- Se eligen de los tramos rectos mediante la eliminación de los puntos considerados anómalos en cada zona, basándonos en los estimadores robustos habituales en LMSR, así: residuos estandarizados (SR) mayores de 2,5 y/o resistencia al diagnóstico (DR) mayor de 2,5.

- Se aplica la regresión por mínimos cuadrados (LSR) con los puntos, de cada zona, no rechazados.

- Se calcula el punto de intersección, r_{IP}, de las dos líneas rectas usando las ecuaciones obtenidas mediante LSR, lo que nos proporciona la relación molar ligando/metal y por tanto la estequiometría del complejo.

- Se estima el intervalo de confianza horizontal del punto de corte de ambas líneas, $r_{IP} \pm k \cdot s_{r,IP}$. Si este intervalo incluye solamente un único valor de estequiometría se le asigna dicha estequiometría, en caso contrario no se podría asignar ninguna estequiometría al complejo y habría que obtener más datos experimentales. El valor obtenido de esta forma, por una parte tiene una ratificación estadística, ya que las líneas rectas utilizadas para ello están validadas adecuadamente y por otra parte, la obtención de un intervalo de confianza para la estequiometría calculada permite comprobar la bondad del resultado.

- Se ajusta la zona curva mediante una regresión por mínimos cuadrados (LSPR) a un polinomio de tercer orden.

- Se calcula la señal analítica correspondiente a la razón estequiométrica y el intervalo de confianza vertical de dicho punto, $S_{SMR} \pm k \cdot s_{S,SMR}$.

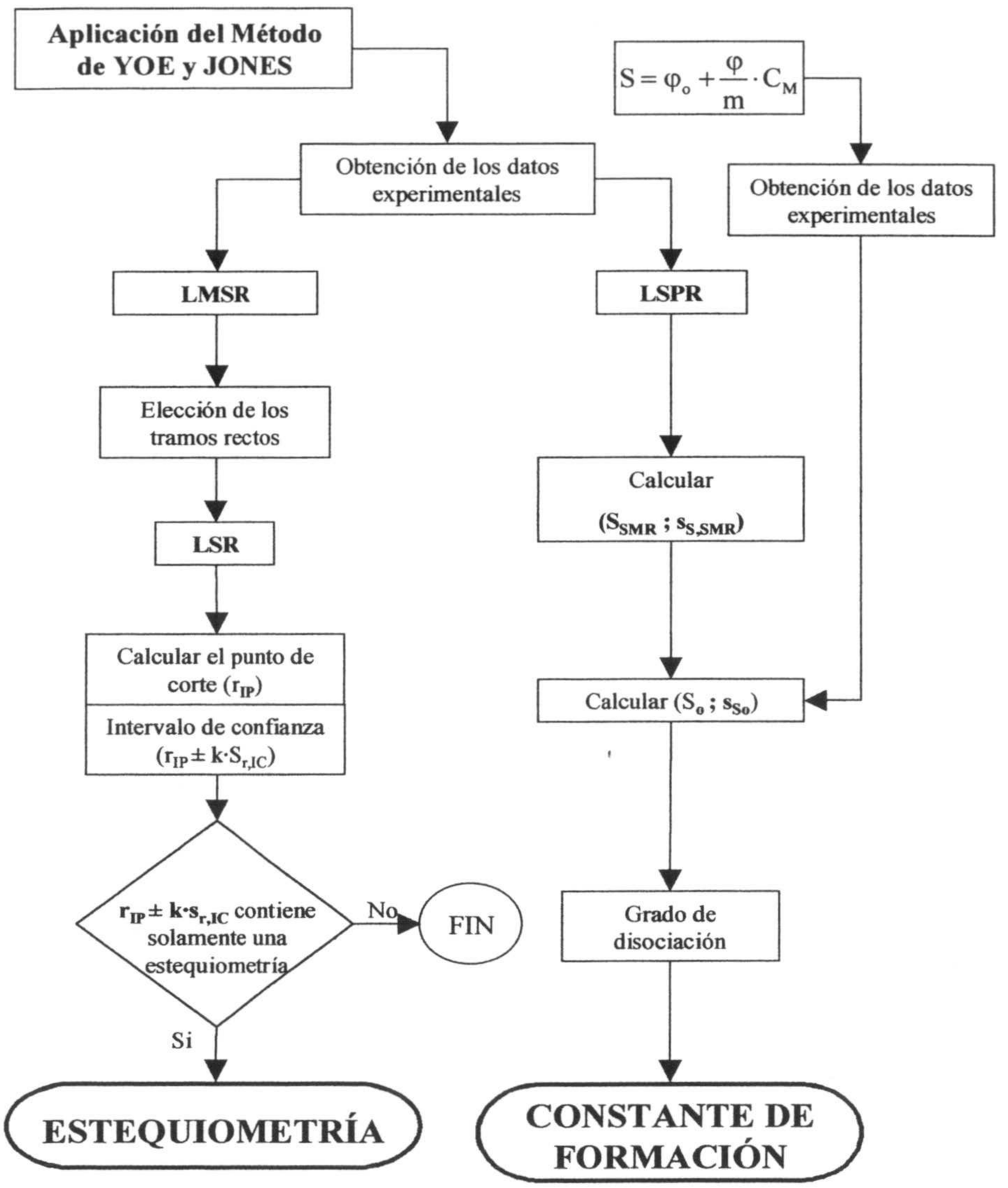


Figura II.2

Diagrama de flujo para el establecimiento de la constante de formación y la estequiometría de un complejo aplicando el método de Yoe y Jones, mediante el protocolo cualimétrico propuesto.

- Se calcula el valor de la señal analítica en condiciones de máxima complejación para lo cual se obtienen los valores de señal analítica correspondientes a diferentes disoluciones donde se varía la concentración de metal.

- Se representa gráficamente la señal analítica frente a la concentración de metal, obteniéndose una recta de cuya pendiente se puede calcular la constante de proporcionalidad y a partir de la cual se puede calcular el valor predicho de señal analítica máxima teórica junto con su desviación estándar.

- Se calcula el grado de disociación, α y su incertidumbre. Mediante la ecuación de Welch–Satterthwaite se calculan los grados de libertad asociados al grado de disociación.

- Se calcula la constante de formación, K_f del complejo y su incertidumbre.

5. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA CON DATOS SIMULADOS

Para llevar a cabo este estudio se considera la espectrofotometría de absorción molecular como técnica para la estimación de la estequiometría y de la constante de formación de complejos coloreados que presentan un máximo de absorción en la región UV-visible. Al igual que en el capítulo anterior, la señal analítica será reemplazada por absorbancia, A, y el factor de proporcionalidad por la constante de absortividad molar, ε.

En todos los casos estudiados se aplica la ecuación teórica de la constante de formación para obtener los datos simulados variando, de un estudio a otro, el valor de la constante de formación, K_f y el valor de la concentración C_M, para una estequiometría fijada de antemano (m y g). El valor de absorbancia máxima se considera en todos los casos, para simplificar el estudio, constante e igual a 1.

Representando α frente a $-\log(C_M)$, para cada una de las constantes de formación, podremos conocer el valor del máximo de absorción, A_{max} (Figura II.3) para cualquier valor de C_M en el rango estudiado de constantes de formación.

Variando el valor de relación molar se obtienen los valores de absorbancia teóricos correspondientes a cada valor de relación molar (99 datos). A estos valores teóricos de absorbancia se les suma una componente de variabilidad que vendría dado por una distribución normal de media cero y desviación estándar de

repetibilidad, N(0, SD), donde SD sería el valor teórico de desviación estándar de repetibilidad de las medidas de absorbancia (entre 1%-20% de la absorbancia máxima).

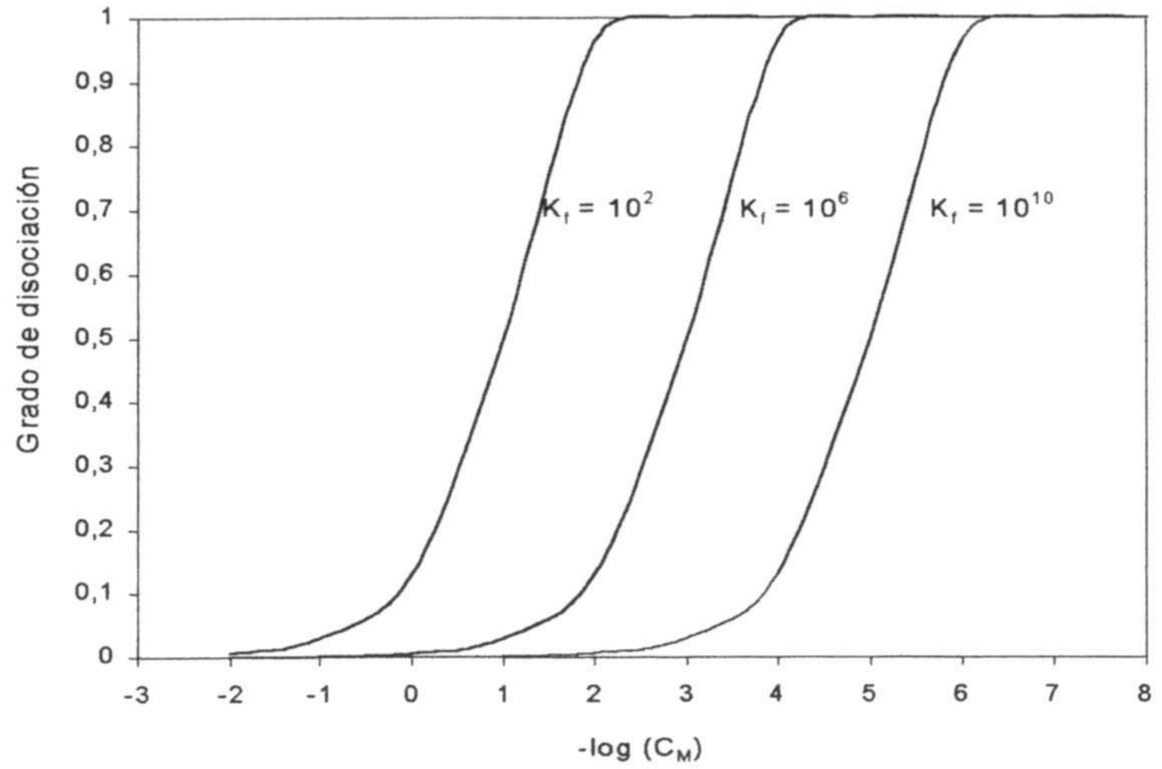


Figura II.3.

Representación del grado de disociación, α, para complejos de K_f 10^{10}, 10^6 y 10^2 M^{-1} en estequiometrías 2:1 utilizando datos simulados.

5.1. Estequiometría 1:1

Un ejemplo de la aplicabilidad del protocolo propuesto en el método de Yoe y Jones para un complejo de estequiometría 1:1 (g = m = 1) y constante de formación 10^{10} M^{-1}, considerando A_o = 1, puede ser el caso en que la concentración de metal sea $C_M = 9{,}00 \cdot 10^{-9}$ M para lo cual se han obtenido datos simulados en el rango de razones molares entre 0,1 y 2,06 (99 datos) con una SD = 0,01 (Tabla 1 del Anexo B2 y Figura II.4).

A los datos que constituyen los segmentos lineales se le aplica LMSR, incluyendo puntos de la zona curva que podrían presentar problemas sobre su pertenencia o no a uno u otro de los segmentos.

Los puntos con un valor de SR superior a 2,5 se eliminan y se aplica LSR con los puntos, de cada zona, no rechazados para obtener los parámetros de los modelos lineales (Tabla 2 del Anexo B2) asociados a cada uno de los tramos rectos.

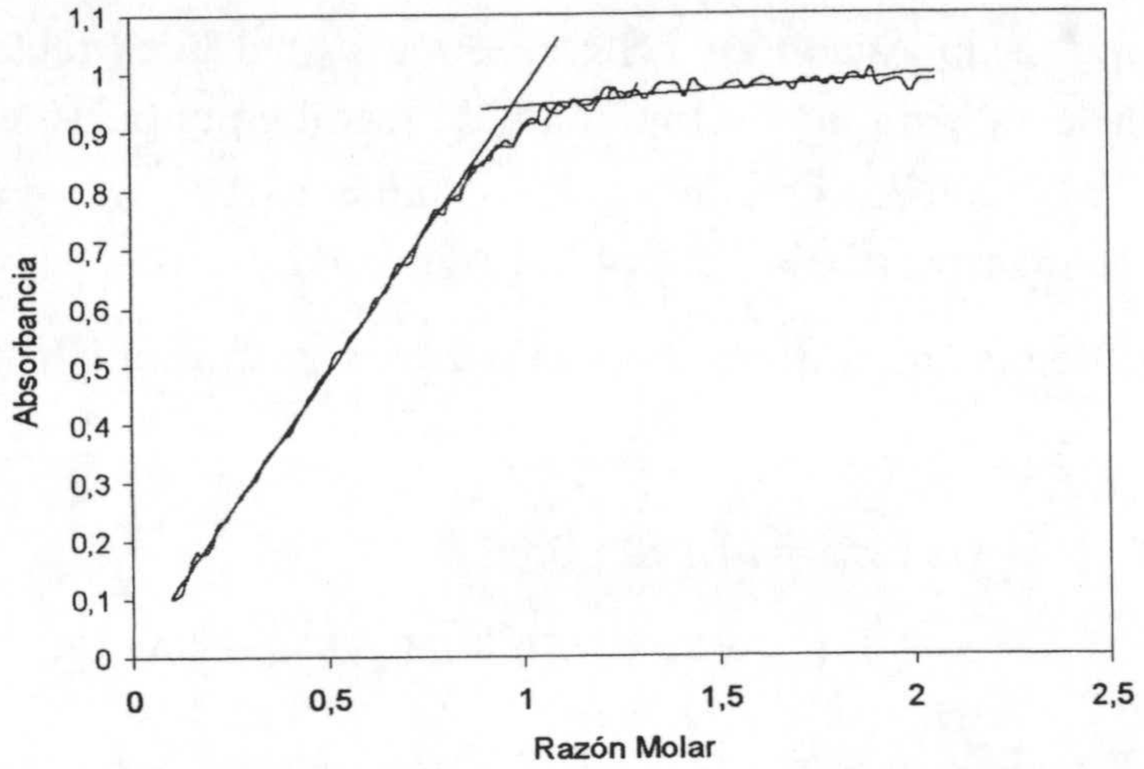


Figura II.4.

Datos experimentales simulados y punto de intersección ($K_f=10^{10}$ M^{-1}; g=m=1; C_M =9,00·10^{-9}; SD=0,01)

A partir de las ecuaciones obtenidas mediante LSR se obtiene el punto de intersección, r_{IP}, de las dos líneas rectas lo que nos proporciona la estequiometría del complejo:

$$\mathbf{r_{IP} = 0{,}978 \pm 0{,}026} \qquad \textbf{\textit{ESTEQUIOMETRÍA 1:1}}$$

Este intervalo de confianza para la razón molar [0,952 ; 1,004], incluye solamente el valor teórico r =1 correspondiente a la estequiometría 1:1.

Por otro lado, se consideran los puntos cercanos a la zona de curvatura con sus réplicas correspondientes (Tabla 3 del Anexo B2) y se ajustan a una ecuación de 3er orden mediante una regresión polinómica por mínimos cuadrados (LSPR)

(Tabla 3 del Anexo B2). Para la razón molar estequiométrica, r = 1, se obtiene el valor predicho de absorbancia junto con su desviación estándar: (A_{SMR} ; $S_{A,SMR}$) = (0,8991 ; 0,0020).

Para estimar el valor de la señal analítica en condiciones de máxima complejación se han obtenido datos simulados de absorbancia frente a C_M (para los valores teóricos A_o=1 y $\varphi_{teórico}$ =1,111·10^8 dm^3·mol^{-1}·cm^{-1}) sumándole una SD = 0,01. Mediante la aplicación de LSR se obtiene una línea recta de la cual se obtiene el valor de A_o para la concentración de metal en el punto estequiométrico (C_M = 9,00·10^{-9} M) junto con su desviación estándar: (A_o ; s_{Ao}) = (0,999 ; 0,003) Los resultados se muestran en la Tabla 4 del Anexo B2.

El grado de disociación y la constante de formación son por tanto:

$$\mathbf{(\alpha\ ;\ s_\alpha) = (0{,}100\ ;\ 0{,}003)}$$

$$\mathbf{K_f \pm k \cdot u_{Kf} = 1{,}00 \cdot 10^{10} \pm 0{,}52 \cdot 10^{10}\ M^{-1}}$$

donde k =2 para ν = 19. El intervalo de confianza para la constante de formación incluye el valor teórico (K_f = 10^{10} M^{-1}) fijado para obtener los datos, por lo que se puede concluir que el protocolo propuesto es aplicable en este caso.

5.2. Estequiometría 2:1

Para aplicar el procedimiento descrito a la estequiometría 2:1 (g = 2 y m = 1) se han obtenido los datos simulados para un complejo coloreado de constante de formación K_f = 10^{10} M^{-2}, fijando el valor de absorbancia A_o = 1, C_M = 1,50·10^{-4} M y SD = 0,01. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 5 del Anexo B2 (Figura II.5).

Los puntos con un valor mayor de 2,5 de SR son eliminados (marcados con un asterisco) y se aplica la regresión por mínimos cuadrados (LSR) con los puntos, de cada zona, no rechazados para obtener los parámetros de los modelos lineales (Tabla 6 del Anexo B2) asociados a cada uno de los tramos rectos.

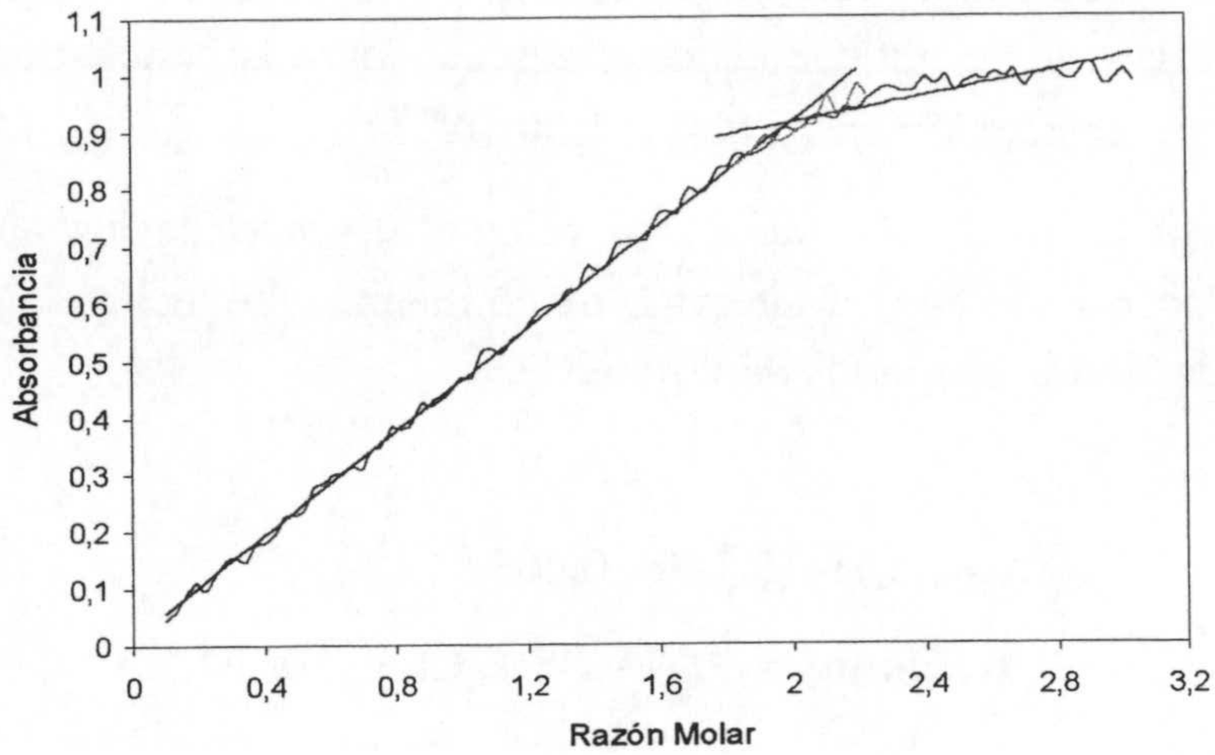


Figura II.5.

Datos experimentales simulados y punto de intersección (K_f=10^{10} M^{-2}; g=2; m=1; C_M =1,50·10^{-4} M; SD=0,01)

A partir de las ecuaciones obtenidas por LSR se obtiene el punto de intersección, r_{IP}, de las dos líneas rectas lo que proporciona la estequiometría del complejo:

$$\mathbf{r_{IP} = 2{,}001 \pm 0{,}184} \qquad \textbf{\textit{ESTEQUIOMETRÍA 2:1}}$$

El intervalo de confianza para la relación molar en el punto de corte, [1,823 ; 2,192], incluye solamente el valor teórico 2, correspondiente a la estequiometría 2:1.

Por otro lado, en las cercanías a la zona de curvatura, los puntos (Tabla 7 del Anexo B2) se ajustan a una ecuación de 3er orden mediante LSPR para obtener el valor de señal analítica en la razón molar estequiométrica y su desviación estándar asociada, (A_{SMR} ; $S_{A,SMR}$) = (0,897 ; 0,003).

Para calcular el grado de disociación hace falta obtener el valor de la señal analítica en condiciones de máxima complejación y para ello se han obtenido datos de absorbancia frente a la concentración de metal para un valor de absorbancia máxima teórica A_o=1 ($\varphi_{teórico}$ = 6,67·10^3 $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$). A estos

valores simulados se les suma la componente de variabilidad, DSR obteniendo dos réplicas de cada punto (Tabla 8 del Anexo B2). Aplicando LSR se obtiene una línea recta de la cual se obtiene el valor buscado para la concentración de metal dada por la razón estequiométrica ($C_M = 1{,}50 \cdot 10^{-4}$ M): (A_o ; s_{Ao}) = (0,998 ; 0,002).

A partir de la A_{SMR} y de A_o se calcula el grado de disociación, α y la constante de formación con su intervalo de confianza, que incluye el valor teórico ($K_f = 10^5$), k = 2 para 46 grados de libertad:

$$\mathbf{(\alpha \; ; \; s_\alpha) = (0{,}100 \; ; \; 0{,}003)}$$

$$\mathbf{K_f \pm k \cdot u_{Kf} = 9{,}77 \cdot 10^9 \pm 1{,}04 \cdot 10^9 \; M^{-2}}$$

5.3. Estequiometría 3:1

Para un complejo coloreado de estequiometría 3:1 (g = 3 y m = 1) se han obtenido los datos simulados para una constante de formación $K_f = 10^{15}$ M^{-3}, fijando el valor de absorbancia máxima $A_o = 1$, $C_M = 2{,}65 \cdot 10^{-5}$ M y SD = 0,02. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 9 del Anexo B2 (Figura II.6).

Los puntos con un valor mayor de 2,5 SR son eliminados (marcados con un asterisco en la Tabla 9 del Anexo B2) y se aplica LSR con los puntos, de cada zona, no rechazados para obtener los parámetros de los modelos lineales (Tabla 10 del Anexo B2) asociados a cada uno de los tramos rectos.

A partir de las ecuaciones obtenidas mediante LSR se obtiene el punto de intersección, r_{IP}, que nos proporciona la razón molar ligando/metal y por tanto la estequiometría del complejo.

$$\mathbf{r_{IP} = 3{,}213 \pm 0{,}381} \qquad \textbf{\textit{ESTEQUIOMETRÍA 3:1}}$$

El intervalo de confianza para el punto de corte, [2,850 ; 3,622], incluye solamente el valor teórico 3 correspondiente a la estequiometría 3:1.

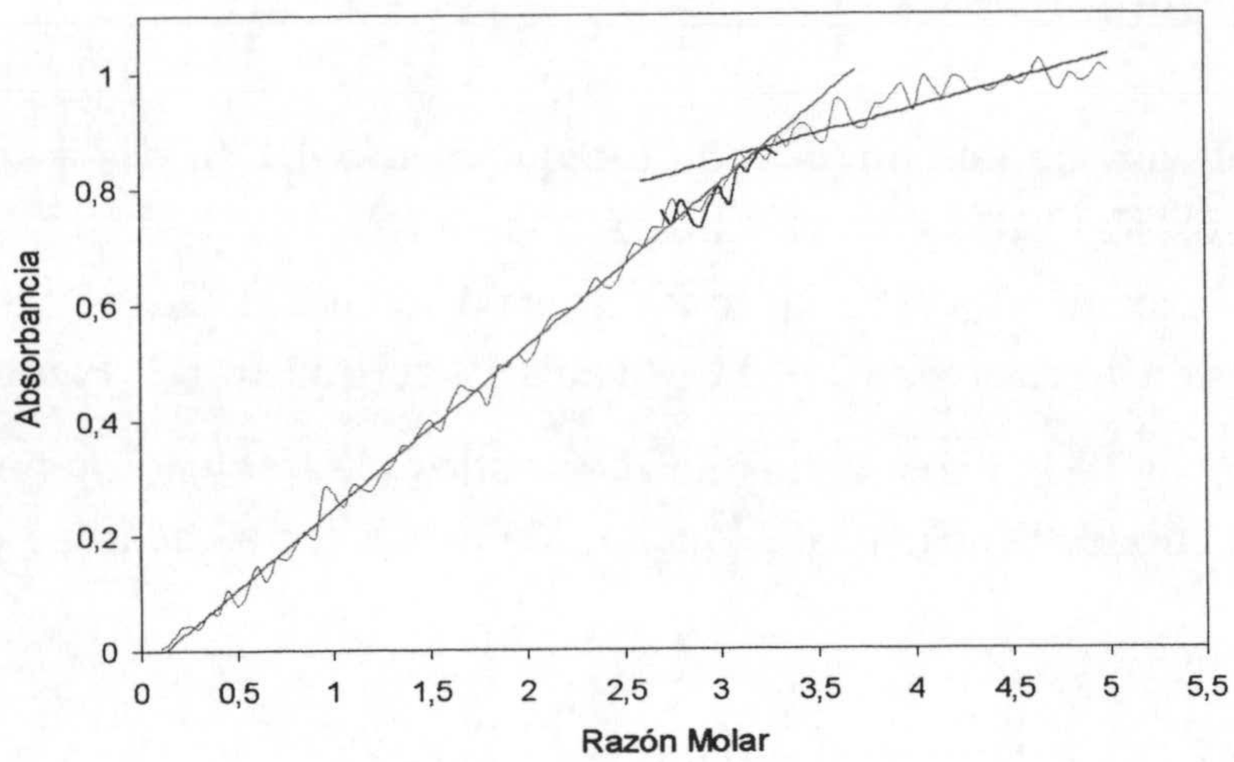


Figura II.6.

Datos experimentales simulados y punto de intersección (K_f=10^{15} M^{-3}; Esteq. 3:1; C_M =2.65·10^{-5} M; SD=0.02)

Por otro lado, los puntos cercanos al máximo de la curva (Tabla 11 del Anexo B2) se ajustan a un polinomio de 3er orden mediante LSPR. La señal analítica en el punto SMR es (A_{SMR} ; $S_{A,SMR}$) = (0,792 ; 0,006).

Para calcular el valor de la señal analítica teórica, se han obtenido datos simulados de absorbancia frente a C_M, fijando un valor de absorbancia máxima teórica A_o=1 (el valor teórico de absortividad molar para la concentración considerada es $\varphi_{teórico}$ =3,78·10^4 $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) (Tabla 12 del Anexo B2). Del ajuste de la absorbancia frente a la concentración de metal se obtiene una línea recta de la cual es posible obtener el valor de A_o para la concentración de metal en el punto estequiométrico (C_M = 2,65·10^{-5} M), junto con su desviación estándar: (A_o ; s_{Ao}) = (0,997 ; 0,005).

A partir de las absorbancias A_{SMR} y A_o se calcula el grado de disociación y la constante de formación con su intervalo de confianza que incluye el valor teórico (K_f = 10^{15} M^{-3}) para k = 2 y 36 grados de libertad:

(α ; s_α) = (0,206 ; 0,007)

$K_f \pm k \cdot u_{Kf}$ = 8,82 · 10^{14} ± 2,50 · 10^{14} M^{-3}

5.4. Estequiometría 4:1

En el caso de un complejo de estequiometría 4:1 (g = 4 y m = 1) se han obtenido datos simulados con una constante de formación $K_f = 10^{20}$ M^{-4}, fijando la absorbancia máxima A_o = 1, la concentración de metal $C_M = 4{,}3 \cdot 10^{-5}$ M y la desviación estándar relativa SD = 0,01 (Tabla 13 del Anexo B2, Figura II.7).

Se aplica LSR a los puntos no rechazados para obtener los parámetros de los modelos lineales (Tabla 14 del Anexo B2) asociados a cada uno de los tramos rectos.

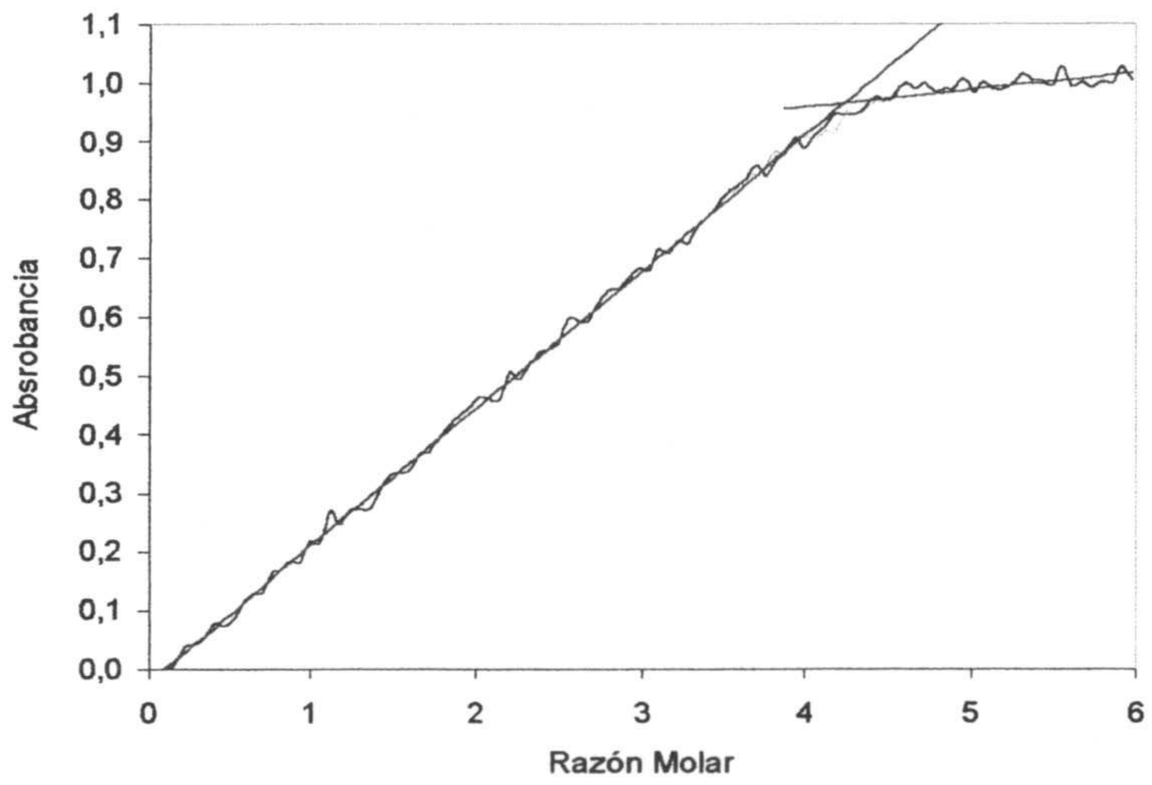


Figura II.7.

Datos experimentales simulados y punto de intersección (K_f=10^{20} M^{-4}; Esteq. 4:1; C_M =$4.3 \cdot 10^{-5}$ M; SD=0.01)

A partir de las ecuaciones obtenidas mediante LSR se obtiene el punto de intersección, r_{IP}, que nos proporciona la razón molar ligando/metal y por tanto la estequiometría del complejo.

r_{IP} = 4,240 ± 0,293 ***ESTEQUIOMETRÍA 4:1***

El intervalo de confianza para el punto de corte, [3,956 ; 4,542], incluye solamente el valor teórico 4 correspondiente a la estequiometría 4:1.

Por otro lado, los puntos cercanos al máximo de la curva (Tabla 15 del Anexo B2) se ajustan a un polinomio de 3er orden mediante LSPR. La señal analítica en el punto SMR es (A_{SMR} ; $S_{A,SMR}$) = (0,902 ; 0,002).

Para calcular el valor de la señal analítica teórica, se han obtenido datos simulados de absorbancia frente a C_M fijando un valor de absorbancia máxima teórica A_o=1 (el valor teórico de absortividad molar para la concentración considerada es $\varphi_{teórico}$ =2,31·10^4 dm^3·mol^{-1}·cm^{-1}) (Tabla 16 del Anexo B2). Del ajuste de la absorbancia frente a la concentración de metal se obtiene una línea recta de la cual es posible obtener el valor de A_o para la concentración de metal en el punto estequiométrico (C_M = 4,33·10^{-5} M), junto con su desviación estándar: (A_o ; s_{Ao}) = (0,998 ; 0,003).

A partir de las absorbancias A_{SMR} y A_o se calcula el grado de disociación y la constante de formación con su intervalo de confianza que incluye el valor teórico (K_f = 10^{20} M^{-4}) para k = 2 y 24 grados de libertad:

(α ; s_α) = (0,096 ; 0,003)

$K_f \pm k \cdot u_{Kf} = 1{,}23 \cdot 10^{20} \pm 0{,}45 \cdot 10^{20}$ M^{-4}

5.5. Límite de aplicación de la metodología

Para las estequiometrías 1:1 (g=1, m=1), 2:1 (g=2, m=1), 3:1 (g=3, m=1) y 4:1 (g=4, m=1) se han obtenido los datos simulados para distintos valores de constante de formación, variando el valor C_M y manteniendo siempre constante la absorbancia A_o=1. Las combinaciones probadas se muestran en la Tabla 17 del Anexo B2. A cada conjunto de datos se les suma diferentes niveles de ruido obtenido de una distribución normal N(0, SD), y a cada uno de ellos se les aplica la metodología propuesta para comprobar la aplicabilidad del procedimiento propuesto.

En cada uno de estos casos, se comprueba que la metodología propuesta es válida y que se cumplen las condiciones impuestas (que el intervalo de confianza para la relación molar incluye solamente el valor teórico de estequiometría y que el intervalo de confianza para la constante de formación incluye el valor verdadero (fijado de antemano) de la constante de formación).

Si se representa gráficamente el nivel de variabilidad (SD) frente al grado de disociación (Figura II.8) se obtiene una curva que representa el límite de aplicabilidad de este procedimiento para las diferentes estequiometrías. La parte inferior de las curvas nos da la zona donde el método puede ser aplicado, es decir el porcentaje de desviación estándar relativa, RSD, máxima que puede tener el método para cada una de los grados de disociación. Por ejemplo, se ha comprobado que si se tiene una desviación estándar relativa del 3%, para una estequiometría 1:1 sólo es aplicable el método para complejos con grado de disociación comprendido aproximadamente entre 0,04 y 0,68, para una estequiometría 2:1 para complejos con grado de disociación entre 0,08 y 0,58, para una estequiometría 3:1 sería aplicable entre un grado de disociación 0,14 y 0,34 y para la estequiometría 4:1 no sería aplicable a este nivel de ruido.

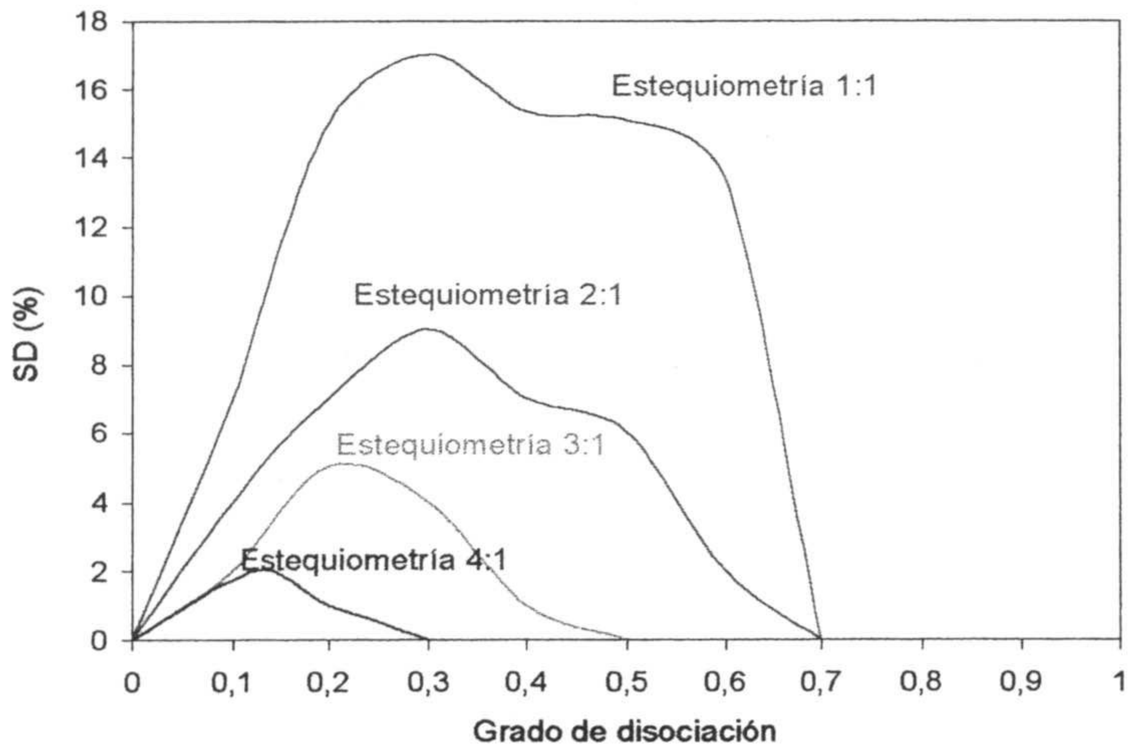


Figura II.8.

Límite de aplicación de la metodología propuesta para las estequiometrías 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1. SD: Desviación estándar de repetibilidad teórica.

6. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA A DATOS REALES. ESTUDIO DEL COMPLEJO Co(II) – $pRNa_2$.

Para determinar la estequiometría y la constante de formación del complejo[11] formado por el Co(II) y el reactivo $pRNa_2$ se preparan disoluciones de metal de concentración constante e igual a $8 \cdot 10^{-5}$ M y de reactivo crecientes desde $1 \cdot 10^{-5}$ a $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ M. En matraces de 25 ml, se añade 5 ml de tampón (H_3BO_3 0,1M/NaOH 0,1M) de pH = 9,60, 4 ml de la disolución de Co(II) y cantidades crecientes de reactivo enrasando con agua desionizada. Se mide la absorbancia frente a blancos constituidos por las mismas cantidades crecientes de $pRNa_2$, a la longitud de onda de 560 nm. Los datos experimentales se recogen en las Tabla 18 del Anexo B2.

La aplicación de LMSR permitió obtener los residuos estandarizados para los segmentos lineales antes y después del punto estequiométrico. Los datos marcados con asteriscos indican los valores experimentales que no fueron utilizados posteriormente para la estimación de la pendiente y término independiente mediante LSR, pues estos puntos no pertenecen al tramo recto.

Para el complejo Co(II)–$pRNa_2$, en la 1ª recta se utilizan los valores experimentales 2 a 16, ambos inclusive (n=15) y para la 2ª recta se utilizan los 6 últimos datos. De esta forma, se asegura la objetividad en la selección de los puntos que se ajustan a una línea recta en cada una de las zonas experimentales, con la previa eliminación de los puntos anómalos. En la Tabla 18 del Anexo B2 se recogen los parámetros de las rectas ajustadas mediante LSR.

El cálculo posterior de la abscisa de los puntos de corte y de los intervalos de confianza horizontales correspondientes, han permitido obtener los resultados de las estequiometrías. Se puede comprobar que para el complejo de Co(II), tanto el valor de la razón molar, 2,149 ± 0,297, como su intervalo de confianza horizontal, 1,872 – 2,465, permiten atribuir una estequiometría 2:1 de forma clara, dado que el intervalo de confianza incluye solamente la razón molar correspondiente a esta estequiometría (r = 2).

---

11. Bosque Sendra, J.M., *Estudio y Aplicaciones Analíticas del 1-Fenilazo-2-Naftol-3,6-Disulfonato Sódico y de su p-Nitroderivado*, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 1983.

A continuación se ajustan los puntos experimentales de la zona curva, con sus réplicas correspondientes, a una función polinómica de orden 3 mediante LSPR (Tabla 19 del Anexo B2). En esta tabla aparecen los coeficientes del modelo polinómico ajustados por LSPR a una ecuación de orden 3.

El valor de absorbancia asociado a la razón molar estequiométrica (r = 2) junto con su desviación estándar es: $(A_{SMR} ; s_{A,SMR}) = (0,554 ; 0,002)$.

Para calcular el valor de la señal analítica teórica, se ha preparado disoluciones de Co(II) comprendidas entre $4,0 \cdot 10^{-5}$ y $1,0 \cdot 10^{-4}$ M que contenían 6 ml de disolución de reactivo de concentración $5,0 \cdot 10^{-4}$ M y 5 ml de la disolución reguladora de pH 9,6, enrasando hasta 25 ml. Las medidas de absorbancia se hicieron a 560 nm. Los resultados experimentales se recogen en la Tabla 20 del Anexo B2 junto con los parámetros del modelo lineal. Del ajuste de la absorbancia frente a la concentración de metal se obtiene una línea recta de la cual es posible obtener el valor de A_o para la concentración de metal en el punto estequiométrico ($C_M = 8,0 \cdot 10^{-5}$ M), junto con su desviación estándar: $(A_o ; s_{Ao}) = (0,597 ; 0,001)$.

Una vez obtenidos el valor de la absorbancia teórica se puede calcular el grado de disociación, α, y la constante de formación, K_f con su correspondiente intervalo de cobertura para k = 2 con un nivel de confianza del 95% y 22 grados de libertad.

$$\mathbf{(\alpha ; s_\alpha) = (0,071 ; 0,005)}$$

$$\mathbf{K_f \pm k \cdot u_{Kf} = 8,95 \cdot 10^{11} \pm 3,47 \cdot 10^{11}\ M^{-2}}$$

7. CONCLUSIONES

La metodología propuesta para el método de Yoe y Jones es similar a la correspondiente para el método de Job, pero en este caso sí es aplicable, en mayor o menor medida, a todas las estequiometrías probadas, cosa que no sucedía con el método de Job. La principal razón es que en este caso la distinción de las razones

molares estequiométricas es lo suficientemente grande para no incluir más de una estequiometría en el intervalo de confianza de éste, a menos que la variabilidad de los datos sea muy grande, hecho bastante improbable en la técnica analítica utilizada.

Así podemos aconsejar la elección del método de Job para el cálculo de la estequiometría y de la constante de formación para bajas estequiometrías (1:1 o 2:1) ya que abarca un intervalo mayor de grados de disociación a los que pueda ser aplicado aunque el rango de desviación estándar de repetibilidad (SD) sea menor que el del método de Yoe y Jones. Pero en el caso de tener un complejo cuya estequiometría sea 3:1 o 4:1 es conveniente la aplicación del método de Yoe y Jones, pues se ha comprobado que el método de Job no ofrece resultados concluyentes debido a la imposibilidad de discernir entre estequiometrías cercanas.

Al igual que en el caso anterior, es conveniente realizar un número elevado de experiencias, sobre todo en la zona de curvatura para obtener un valor de incertidumbre asociada a la constante de formación aceptable.

Bloque I

PROTOCOLOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA ESTEQUIOMETRÍA Y/O ESTIMACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN

Capítulo III

MÉTODO DE BENESI-HILDEBRAND

1. ANTECEDENTES

La última parte de este bloque está dedicada al método de Benesi-Hildebrand[1] (B-H) propuesto en 1949, que ha sido el más utilizado durante más de medio siglo. Generalmente este método es utilizado para determinar la estequiometría y la constante de formación o inclusión de complejos formados por ciclodextrinas[2] (CDs) y moléculas orgánicas, tales como el ácido 2-naftiloxiacético y el ácido 1-naftilacético[3], derivados de la fenotiazina[4,5,6], norbornadieno y sus derivados[7] o pireno en presencia de trietanolamina[8]. Además cabe destacar la utilización de las ciclodextrinas para aumentar la señal de fluorescencia de complejos de inclusión formados con plaguicidas[9], tales como coumatetralyl[10], clorpìrifos o metil pirimifos[11].

Entre la bibliografia encontrada sobre el método de Benesi-Hildebrand y sus posibles aplicaciones, cabe destacar el trabajo realizado por Seal y colaboradores[12] en el que proponen un método gráfico para determinar la constante de inclusión y el coeficiente de extinción molar reorganizando la ecuación propuesta por B-H. En 1996, Hoenigman y Evans[13] ponen de manifiesto que mediante la aplicación directa del método de B-H se produce una sobrestimación de la constante de inclusión y proponen una corrección del error

---

1. Benesi H.A. and Hildebrand J.H., *J. Am. Chem. Soc.,* 71, 2703-2707, 1949.
2. Rekharsky M.V. and Inoue Y., *Chem. Rev.,* 98, 1875-1917, 1998.
3. Muñoz de la Peña A., Salinas F., Gómez M.J., Acedo M.I. and Sánchez Peña M., *J. Inclus. Phenom. Mol. Recogn. Chem.*, 15, 131-143, 1993.
4. Maafi M., Laassis B., Aaron J.J., Mahedero M.C., Muñoz de la Peña A. and Salinas F., *J. Inclus. Phenom. Mol. Recogn. Chem.,* 22, 235-247, 1995.
5. Maafi M., Mahedero M.C. and Aaron J.J., *Talanta*, 44, 2193-2199, 1997.
6. Maafi M., Aaron J.J., Mahedero M.C. and Salinas F., *Appl. Spectroscopy*, 52, 91-95, 1998.
7. Maafi M., Aaron J.J. and Lion C., *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.*, 30, 227-241, 1998.
8. Will A.Y., Muñoz de la Peña A., Ndou T.T. and Warner I.M., *Appl. Spectroscopy*, 49, 520-525, 1995.
9. Coly A. and Aaron J.J., *Talanta*, 46, 815-843, 1998.
10. García-Sanchez F., Cedazo M., Lovillo J. and Navas-Díaz A., *Talanta,* 43, 1327-1333, 1996.
11. Coly A. and Aaron J.J., *Anal. Chim. Acta*, 360, 129-141, 1998.
12. Seal B.K., Sil H. and Mukherjee D.C., *Spectrochim. Acta*, 38ª, 289-292, 1982.
13. Hoenigman S.M. and Evans C.E., *Anal. Chem.*, 68, 3274-3276, 1996.

sistemático mediante una corrección de la concentración en equilibrio de la molécula orgánica sin complejar.

Un año más tarde, Exner[14] establece que el método de B-H sólo proporciona resultados razonables en determinadas condiciones que dependen de la calidad de los datos, del rango de concentraciones estudiado y del número de experiencias realizadas. Recientemente Yang y colaboradores[15] han realizado un estudio de la aplicabilidad del método de B-H con relación al coeficiente de correlación al aplicar métodos lineales, estableciendo que su aplicación es sólo recomendable cuando la complejación es moderada, en caso contrario es mejor la aplicación de métodos no lineales[16].

Nosotros hemos evaluado distintos métodos estadísticos, entre los que cabe citar el método de Bootstrap[17] y el método de Jackknife, ambos no paramétricos, para determinar la constante de formación y su incertidumbre asociada al aplicar el método de B-H, recomendando el que a nuestro juicio proporciona los mejores resultados. Estos métodos se han aplicado a la determinación de la constante de inclusión del complejo formado por HP-β-CD y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), mediante fluorescencia inducida fotoquímicamente.

2. CONSTANTE DE FORMACIÓN E INCERTIDUMBRE ASOCIADA

Este método generalmente se utiliza cuando la proporción entre la concentración de ligando y la de metal es muy elevada y no es posible utilizar ninguno de los métodos anteriores (Job o Yoe y Jones). Este método suele ser utilizado para el cálculo de constantes de formación de complejos con

14. Exner O., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 39, 85-93, 1997.
15. Yang C., Liu L., Mu T.W. and Gou Q.X, *Anal. Sci.*, 16, 537-539, 2000.
16. Pistolis G. and Malliaris A., *Chem.Phys. Lett.*, 310, 501-507, 1999.
17. Efron B. and Tibshirani R.J., *An introduction to the bootstrap*, Chapman & Hall/CRC: UK, pp 45-150, 1993.

estequiometrías 1:1 como es el caso de los complejos de inclusión (generalmente con ciclodextrinas) y sólo es aplicable para complejos del tipo ML_g.

Considerando un complejo de inclusión fluorescente, el equilibrio entre un substrato S y la ciclodextrina CD es:

$$g{\cdot}S + m{\cdot}CD \leftrightarrow S_gCD_m$$

donde m y g son los correspondientes coeficientes estequiométricos para S y CD, respectivamente.

Los complejos de inclusión están formados normalmente por una molécula de CD (m = 1, estequiometría g:1), siendo la constante de formación (K_f) para el complejo de inclusión S_gCD:

$$K_f = \frac{[S-CD]}{[CD]\cdot[S]^g} = \frac{X_b}{(C_{CD} - C_S \cdot X_b)(1-X_b)^g} \qquad \text{(III-1)}$$

donde [S–CD], [CD] y [S] representan la concentraciones molares en equilibrio del complejo S-CD, de la CD libre y del substrato S libre, respectivamente. C_{CD} y C_S son las concentraciones analíticas de CD y S, y $X_b = [S–CD]/C_S$ es la fracción molar del substrato S.

El método de B-H está basado en la variación continua de la concentración de ciclodextrina, C_{CD}, siendo ésta siempre mayor que la concentración de substrato, C_S, la cual permanecerá constante. Considerando que las intensidades de fluorescencia del substrato libre y complejado son F_S y $F_{S\text{-}CD}$, respectivamente, la intensidad de fluorescencia de la CD libre es F_{CD} y F es la fluorescencia para cada concentración de HP-β-CD a las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas, se puede obtener la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{K_f} = C_{CD}{}^g\left(\frac{\Delta F_{max}}{\Delta F} - 1\right) \Rightarrow \frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{max}} + \frac{1}{\Delta F_{max}\cdot K_f}\cdot\frac{1}{C_{CD}{}^g} \qquad \text{(III-2)}$$

donde $\Delta F = F - F_S - F_{CD}$ es la intensidad de fluorescencia debido al complejo de inclusión y ΔF_{max} es la intensidad de fluorescencia máxima que se obtendría si S estuviera totalmente complejado con HP-β-CD, siendo $\Delta F_{max} = F_{S-CD} - F_S - F_{CD}$.

En el método original de B-H, se representa $1/\Delta F$ frente a $1/C_{CD}$ para la estequiometría 1:1 y frente a $1/(C_{CD})^2$ para la estequiometría 2:1. Según la

ecuación III-2, se obtiene una relación lineal cuando el valor de g es escogido correctamente siendo $1/\Delta F_{max}$ el término independiente y $1/(K_f \cdot \Delta F_{max})$ la pendiente.

Este método basado en una regresión lineal recíproca doble por mínimos cuadrados (DR-LSR), no deben utilizarse para cuantificar la constante de formación pero es un método bueno para estimar la estequiometría (1:1 o 2:1) del complejo de inclusión. Los pricipales argumentos para desaconsejar su utilización son:

- ☞ Dado que el rango considerado para la variable independiente ($1/C_{CD}{}^{g}$) no es simétrico, las concentraciones bajas tienen mayor peso en la pendiente que las concentraciones altas, por lo que una pequeña variación en ellas puede producir una gran variación en la pendiente de la recta.
- ☞ Incluso cuando la variable $1/(C_{CD})^{g}$ pudiera ser considerada libre de error y la incertidumbre se concentre en la variable $1/\Delta F$, el valor estimado K_f se calcula como un cociente de dos parámetros que poseen una distribución normal pero dependientes entre sí, por lo que el cociente tiene una distribución irregular.

El método de B-H puede modificarse multiplicando la ecuación III-2 por $(C_{CD})^{g}$. Con esta modificación se obtiene una regresión lineal recíproca simple por mínimos cuadrados (SR-LSR) representando $(C_{CD})^{g}/\Delta F$ frente a $(C_{CD})^{g}$:

$$\frac{C_{CD}{}^{g}}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{max} \cdot K_f} + \frac{1}{\Delta F_{max}} \cdot C_{CD}{}^{g} = a + b \cdot C_{CD}{}^{g} \qquad \text{(III-3)}$$

donde $b = 1/\Delta F_{max}$, es la pendiente y $a = 1/(\Delta F_{max} \cdot K_f)$, es el término independiente, pero dado que las dos variables son mutuamente dependientes, la estimación de K_f está afectada por el segundo defecto que comentábamos en el método DR-LSR.

El valor de la constante de formación debe ir acompañada de su correspondiente intervalo de cobertura, $K_f \pm k \cdot u_{Kf}$, donde u_{Kf} es la incertidumbre estándar asociada al valor estimado de la constante de formación (K_f) y k es el factor de cobertura[18,19], el cual depende de los grados de libertad efectivos

---

18. ISO, Guide to the expression of uncertainty in measurement, International Standards Organization, Geneva, 1993.
19. EAL-R2, Expression of the uncertainty of measurement in calibrations. European Cooperation for Accreditation Laboratory, 1997.

calculados a partir de la expresión de Welch-Satterthwaite. Esta incertidumbre es el máximo error estimado mediante cada una de las metodologías propuestas.

3. HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

3.1. Teorema de Fieller

En la regresión lineal por mínimos cuadrados (LSR), aplicada a la ecuación III-3, asumimos que los errores experimentales son independientes y existe homocedasticidad, por lo que los parámetros de regresión, a y b, presentan una distribución normal y sesgo cero. Sin embargo, el cociente entre dos variables normales (a y b) es diferente ya que sus propiedades son difíciles de establecer. En particular, si el cociente está sesgado presentando una distribución asimétrica, es difícil de obtener un intervalo de confianza exacto para éste. Dado que la obtención de la constante de formación y su incertidumbre asociada es muy importante en el análisis de complejos de la inclusión, es necesario aplicar un método estadístico en el que los requisitos básicos para su aplicación sean mínimos.

La incertidumbre asociada al cociente de dos parámetros, que pueden ser: un valor medio, una diferencia entre valores medios o coeficientes de regresión obtenidos a partir de datos experimentales, puede estimarse mediante la aplicación del **teorema de Fieller**[20]. Este teorema es poco utilizado en Química Analítica, y entre las escasas referencias encontradas destaca el trabajo realizado por Franke y colaboradores[21] para evaluar y optimizar el método de adición de patrón.

En nuestro caso, estos parámetros son coeficientes de regresión ($K_f = b/a$) y por consiguiente, al aplicar el teorema de Fieller se obtienen dos valores[22] de la

20. Fieller E.C., *J. R. Stat. Soc.*, 7, 1-64, 1940.
21. Franke J.P., de Zeeuw R.A. and Hakkert R., *Anal. Chem.*, 50, 1374-1380, 1978.
22. Finney D.J., *Statistical Method in Biological Assay* (third edition), Charles Griffin & Company LTD: London, UK, pp 69-87, 1978.

constante de formación, uno superior ($K_{f,U}$) y otro inferior ($K_{f,L}$), que delimitan el intervalo de confianza asociado a dicha constante:

$$K_{f,L}, K_{f,U} = \frac{1}{1-g} \cdot \left[K_f - \frac{g \cdot \mathrm{cov}(b,a)}{s_a^2} \pm \right.$$
$$\left. \pm \frac{k}{a} \left\{ s_b^2 - 2K_f \cdot \mathrm{cov}(b,a) + {K_f}^2 s_a^2 - g\left(s_b^2 - \frac{\mathrm{cov}^2(b,a)}{s_a^2} \right) \right\}^{1/2} \right] \qquad \text{(III-4)}$$

donde ${s_a}^2$, ${s_b}^2$ y cov(b,a) son las varianzas asociadas a los coeficientes de regresión a y b y su covarianza, respectivamente, k es el factor de cobertura (Tabla 1 del Anexo D) con ν grados de libertad (ν= n – 2, siendo n el número de datos experimentales) y g:

$$g = \frac{k^2 s_a^2}{a^2} = k^2 \cdot \mathrm{DSR}^2(a) \qquad \text{(III-5)}$$

Cuando la desviación estándar relativa del coeficiente a, DSR(a), es muy pequeña (el coeficiente a muestra un valor muy grande con relación a su desviación estándar), g toma un valor muy pequeño y puede ser despreciado, quedando la siguiente ecuación:

$$K_{f,L}, K_{f,U} = K_f \pm \frac{k}{a} \sqrt{s_b^2 - 2 \cdot K_f \cdot \mathrm{cov}(b,a) + {K_f}^2 s_a^2} \qquad \text{(III-6)}$$

siendo el término que multiplica al factor de cobertura la varianza de la constante de formación:

$${u_{Kf}}^2 = \frac{1}{a^2} \left(s_b^2 - 2 \cdot K_f \cdot \mathrm{cov}(b,a) + {K_f}^2 s_a^2 \right) \qquad \text{(III-7)}$$

Esta aproximación es adecuada cuando $g < 0{,}05$, lo cual implica que para una probabilidad del 95%, el coeficiente a es nueve veces mayor que su desviación estándar. En caso contrario la ecuación III-4 será esencial.

3.2. Método de Bootstrap

Existen algunos métodos estadísticos no-paramétricos basados en simulaciones para el análisis robusto con mínimas premisas, como por ejemplo el **método de Autoiducción de Secuencias o Bootstrap**[23]. Éste proporciona una medida de la variación estadística del cociente entre los coeficientes de regresión y una estimación del sesgo y de su desviación estándar con mínimas premisas de partida.

La técnica del Bootstrap[24,25] se ha aplicado, en Química Analítica, de forma muy limitada. Por ejemplo, en la determinación de una mezcla de Tl(I) y Pb(II) mediante polarografía[26], para complejos de Cu(II) mediante espectrofotometría[27], en la estimación de los parámetros de regresión no-lineal de señales polarográficas[28], en la determinación de la aromaticidad de un carbón basado en calibración con redes neuronales[29] o en la medida de la incertidumbre en modelos bilineares[30].

El método de bootstrap estudia la variabilidad de una estimación usando los datos existentes, junto con algunos supuestos sobre cómo ellos fueron generados, para producir un nuevo un "pseudo-conjunto de datos". Una estimación de la constante de formación se puede obtener para cada "pseudo-conjunto de datos" a partir de los cuales se obtiene una aproximación a las características estadísticas del valor real.

La idea básica es simular repeticiones de las experiencias y analizar los datos, sin asumir ninguna distribución de los errores experimentales, observando la variación estadística del cociente entre los coeficientes de regresión.

Existen fundamentalmente dos aproximaciones diferentes en la aplicación de bootstrap a los problemas de la regresión[23]: **muestreo de datos** (RC, *Resampling*

---

23. Wehrens R., Putter H. and Buydens L.M.C., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 54, 35-52, 2000.
24. Bonate P.L., *Anal. Chem.*, 65, 1367-1372, 1993.
25. Wehrens R., Putter H. and Buydens L.M.C., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 54, 35-52, 2000.
26. Ortiz M.C., Arcos J. and Sarabia L., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 34, 245-262, 1996.
27. Prenesti E., Daniele P.G., Prencipe M. and Ostacoli G., *Polyhedrom*, 18, 3233-3241, 1999.
28. Pais A.A.C.C., Pereira J.L.G.C. and Redinha J.S., *Computers & Chemistry*, 24, 533-539, 2000.
29. Dathe M. and Otto M.., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 356, 17-20, 1996.
30. Faber N.M., *Anal. Chim. Acta*, 439, 193-201, 2001.

Cases) y **muestreo de residuos** (RR, *Resampling Residuals*). En cada una de ellas se considera una regresión lineal, de modo que en el caso de los complejos de inclusión con Cds, las parejas $[(C_{CD})_1, Y_1],..., [(C_{CD})_n, Y_n]$ son los datos experimentales tal que:

$$Y_i = a + b\cdot(C_{CD})_i + e_i \qquad \text{(III-8)}$$

donde i = 1, ..., n son cada uno de los datos experimentales, Y, la respuesta y C_{CD} la concentración de ciclodextrina, siendo:

$$Y_i = \frac{(C_{CD})_i}{\Delta F_i} \qquad a = \frac{1}{\Delta F_{max}\cdot K_f} \qquad b = \frac{1}{\Delta F_{max}} \qquad \text{(III-9)}$$

Por lo tanto la constante de formación se obtiene del cociente de los coeficientes de regresión a y b:

$$K_f = \frac{b}{a} \qquad \text{(III-10)}$$

Los residuos (e_i) proporcionan la estimación más simple de los errores y se calculan como la respuesta observada menos la predicha por el modelo ($e = Y - \hat{y}$), donde $\hat{y}$ es el valor predicho calculado según la ecuación III-8, sustituyendo los valores correspondientes de a y b.

✒ Muestreo de datos (RC)

Nuevos conjuntos de datos son creados seleccionando independientemente parejas $[(C_{CD})_i, Y_i]$, cada nueva pareja es denominada $[(C_{CD})_i^B, Y_i^B]$. A partir de estos conjuntos de datos $[(C_{CD})_1^B, Y_1^B]$, ..., $[(C_{CD})_n^B, Y_n^B]$ se calculan valores simulados de a^B, b^B y K_f^B de la misma forma en que fueron calculados con los datos originales. Este proceso de la simulación es realizado un número elevado de veces (N^B).

✒ Muestreo de residuos (RR)

Los residuos se utilizan para crear nuevos conjuntos de datos, seleccionando y sustituyendo aleatoriamente los residuos por e_i^B se crean nuevos datos aplicando la ecuación:

$$Y_i^B = a + b \cdot (C_{CD})_i + e_i^B \qquad \text{(III-11)}$$

Así, valores simulados de los coeficientes a^B, b^B y K_f^B pueden obtenerse a partir de los nuevos conjuntos de datos $[(C_{CD})_i, Y_i^B]$. Al igual que en el caso anterior, este proceso de simulación debe repetirse un gran número de veces (N^B).

En ambos casos, los estadísticos de interés como el sesgo y la desviación estándar puede deducirse de los resultados obtenidos con los nuevos conjuntos de datos:

$$s^2(K_f)_B = \frac{\sum\left(K_{f,i}^B - \overline{K_f}^B\right)^2}{N^B} \quad ; \quad \text{SESGO}\,(K_f)_B = K_f - \overline{K_f}^B \qquad \text{(III-12)}$$

donde $K_{f,i}^B$ es la constante de formación estimada en cada simulación (i = 1,..., N^B) y $\overline{K_f}^B$ es el valor medio de las N^B simulaciones. El valor $\overline{K_f}^B$ es utilizado como estimación del valor real de la constante de formación K_f.

El método del bootstrap asume que el $\text{SESGO}(K_f)_B = 0$. En caso contrario, un test estadístico se utiliza para verificar si el cociente entre el valor del sesgo y su incertidumbre es mayor que el factor de cobertura, k, (Tabla 1 del Anexo D) y por consiguiente si el sesgo no difiere significativamente de cero. Si el sesgo es demasiado grande para ser ignorado, el valor de la constante de formación podría ser corregido por el sesgo:

$$K_f = \overline{K_f}^B + \text{SESGO}(K_f)_B \qquad \text{(III-13)}$$

3.3. Método de Jackknife.

En cuanto al método de jackknife se ha aplicado, por ejemplo, a la identificación de anómalos en calibración multivariante[31], en la determinación de constantes de disociación termodinámica por regresión de datos potenciométricos[32] o en determinaciones farmacocinéticas por HPLC[33]. En varios

31. Hardy A.J., MacLaurin P., Haswell S.J. and Jong S., Vandeginste B G M., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 34, 117-129, 1996.
32. Meloun M. and Cernohorsky P., *Talanta*, 52, 931-945, 2000.
33. Ramu K., Lam G.N. and Chien B., *J. Chromatogr.* 751, 49-59, 2001.

artículos[28,30,34] se han comparado las dos técnicas citadas, bootstrap y jackknife, e incluso algunos autores[30] han acoplado estas dos técnicas con resultados satisfactorios.

Este método se basa en la eliminación de una pareja de datos experimentales cada vez, por lo que obtendríamos N^J nuevos conjuntos de datos. En analogía con el método de bootstrap, los estadísticos de interés se calculan para cada nuevo conjunto de datos, proporcionando N^J estimaciones de $K_{f,i}$ cuando la pareja i fue eliminada del conjunto de datos. El sesgo y la desviación estándar son obtenidos para cada conjunto de nuevos datos como:

$$s^2(K_f)_J = \frac{N^J - 1}{N^J}\sum\left(K_{f,i}^J - \overline{K_f}\right)^2 ;\ \ \mathrm{SESGO}(K_f)_J = (N^J - 1)(K_f - \overline{K_f}^J) \quad \text{(III-14)}$$

siendo N^J el número de datos experimentales.

Dado que el método de jackknife sólo requiere el cómputo de la constante de formación N^J veces (recordemos que N^J es igual a n datos experimentales), éste será más fácil de calcular dado que con bootstrap al menos tendremos 100 o 200 estimaciones. Sin embargo, jackknife sólo utiliza una limitada información sobre el estadístico K_f, y así se podría suponer que jackknife es menos eficaz que bootstrap. De hecho, jackknife puede considerarse como una aproximación de bootstrap y a veces proporciona una aproximación más simple y mejor que bootstrap, sobre la estimación de la desviación estándar y el sesgo. Pero esto es únicamente cierto si los estadísticos en estudio no se modifican drásticamente con pequeños cambios en los datos. Sin embargo, cuando el número de datos experimentales es demasiado pequeño (como después podremos comprobar), la incertidumbre obtenida aumenta con respecto al método del bootstrap.

34. Meinrath G., Ekberg C., Landgren A. and Liljenzin J.O., *Talanta*, 51, 231-246, 2000.

4. ESTUDIO DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN HP-β-CD:2,4-D MEDIANTE FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE

4.1. Antecedentes de la determinación de 2,4-D por fluorescencia inducida fotoquímicamente

Los herbicidas clorofenoxiácidos, entre los que se encuentra el 2,4-D, así como otros plaguicidas aromáticos, no muestran fluorescencia nativa pero pueden ser convertidos en fotoproductos fuertemente fluorescente. Este hecho ha permitido el establecimiento de un nuevo método de análisis cuantitativo basado en RTPIF que, como ventaja principal, muestra su simplicidad, rapidez y bajo costo del equipo requerido en contraste con los métodos anteriormente. Este método para el análisis de herbicidas clorofenoxiácidos totales se llevó a cabo en una mezcla de metanol y disolución reguladora a pH 5 (50/50 v/v) usando tiempos de irradiación de 15 min[35]. Esta técnica, de fácil adaptabilidad a sistemas en flujo, se ha utilizado para analizar cinco herbicidas clorofenoxiácidos cn agua de río[36], obteniendo que este acoplamiento es un método más simple y barato para análisis rutinarios.

Recientemente el medio micelar ha estado incorporado al establecimiento de nuevos métodos considerado las propiedades de fluorescencia fotoinducida de los analitos. Ésta metodología se ha denominado fluorescencia inducida fotoquímicamente en medio micelar (*MEPIF, Micellar-Enhanced Photoinduced-Fluorescence*) y está basada en el aumento de la intensidad de fluorescencia proporcionada por medios organizados, aumentando la sensibilidad y reduciendo el uso de disolventes orgánicos. Hasta ahora, un número reducido de aplicaciones han sido desarrolladas aplicando MEPIF, como la determinación de plaguicidas carbamatos[37], insecticidas del piretroides[38] y herbicidas sulfonilurea[39].

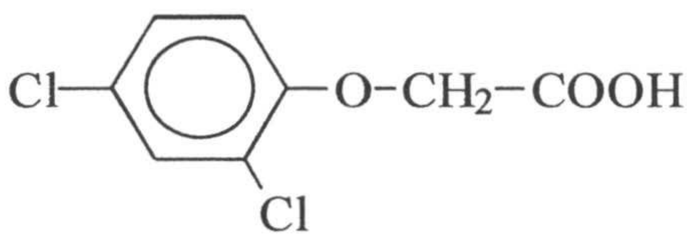
---

35. Fremin S.A., Laasis B. and Aaron J.J., *Talanta*, 43, 295-301, 1996.
36. García L.F., Eremin S.A. and Aaron J.J., *Anal. Lett.*, 29, 1447-1461, 1996.
37. de la Guardia M., Hernández M.L., Sancenón S. and Carrión J.L., *Colloids Surf.*, 48, 57, 1990.
38. Aaron J.J. and Coly A., *Analyst*, 121, 1545, 1996.

En previos trabajos se ha estudiado la influencia de varios surfactantes en disoluciones reguladoras acuosas en las propiedades PIF de los herbicidas clorofenoxiácidos[40]. Este estudio permitió el uso de la detección PIF para la determinación sensible de 2,4-D y MCPP en medio micelar, proponiendo a su vez la determinación de ambos herbicidas utilizando un sistema FIA con detección MEPIF en medio de cationico micelar[41]. Además, se ha llevado una determinación simultánea a tiempo resuelto de mezclas binarias de herbicidas clorofenoxiácidos usando detección MEPIF considerando la gran diferencia entre los tiempos óptimos de irradiación para los distintos compuestos para obtener el fotoproducto fluorescente[42].

4.2. Reactivos y materiales

Los patrones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y HP-β-CD fueron obtenidos de Merck y Aldrich, respectivamente. El metanol utilizado para disolver el patrón fue proporcionado por Acros Organics. Las disoluciones reguladoras a pH 2, 5 y 8 fueron obtenidas de Fluka. En todo el trabajo experimental se utilizó agua desionizada. Las disoluciones madre de 2,4-D (100 mg/l) y HP-β-CD (0,2 M) fueron preparadas por disolución del compuesto en metanol y agua destilada, respectivamente. Las disoluciones de trabajo fueron obtenidas por dilución con agua destilada de las correspondientes disoluciones madre. Todas las disoluciones preparadas fueron protegidas de la luz con papel aluminio para evitar su degradación.



2,4-D

39. Coly A. and Aaron J.J., *Talanta*, 49, 107, 1999.
40. García-Campaña A.M. and Aaron J.J., *Luminescence,* 15, 110, 2000.
41. García Campaña A.M., Aaron J.J. and Bosque Sendra J.M., *Talanta*, 55, 531-539, 2001.
42. Almansa López E.M., García Campaña A.M., Aaron J.J. and Cuadros Rodríguez L., Send for the publication.

4.3. Equipos

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro, Kontron SFM-25, el cual poseía un programa de control y adquisición de datos. El voltaje seleccionado en la lámpara del equipo fue de 500 V. Para la reacción de fotodegradación se utilizó una lámpara de mercurio de alta presión HBO Osram de 200 W conectada a una fuente Oriel modelo 8500. La cubeta para la reacción fue de cuarzo de 1 cm^2 modelo Hellma colocada a 45 cm de la lámpara.

Todo el tratamiento estadístico para la optimización fue realizado con el programa Statgraphics® Plus 5.0 y el resto de operaciones fueron realizadas con Excel 97 de Microsoft®.

4.4. Optimización de las variables experimentales

El primer paso consiste en encontrar las condiciones experimentales óptimas (pH, tiempo de irradiación y concentración de HP-β-CD) para obtener la máxima eficacia en la obtención de los derivados fluorescentes mediante irradiación de las correspondientes disoluciones de 2,4,-D, con objeto de obtener la mejor respuesta analítica, función de la concentración del herbicida en el complejo de inclusión formado con la β-CD. El máximo de intensidad de fluorescencia (F) fue registrado a una longitud de onda de excitación de 268 nm y emisión de 296 nm. Las variables experimentales fueron optimizadas simultáneamente mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) utilizando el diseño experimental de Box-Behnken[43].

4.4.1. Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta, RSM, abarca un grupo de técnicas estadísticas y matemáticas utilizadas para analizar y modelar un sistema, donde la respuesta es función de un conjunto de variables. RSM obtiene una estimación de una función (superficie de respuesta), por ajuste de los datos experimentales mediante regresión por mínimos cuadrados generalmente a una

43. Montgomery D.C., *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons: Chichester, UK, pp 604, 1997.

función polinómica cuadrada, que relaciona matemáticamente la respuesta instrumental con los factores o variables experimentales estudiadas[43,44,45]. Para ello es necesario que se cumplan al menos dos condiciones: i) el número de puntos experimentales ha de ser superior al número de coeficientes a estimar en la función; y ii) la matriz experimental requiere que las variables consideradas sean medidas al menos a tres niveles diferentes. Esta metodología ha sido propuesta por Bosque Sendra y colaboradores[46] y se ha desarrollado para dos[46] y tres[47] variables.

La metodología del diseño de experimentos ofrece numerosas posibilidades para poder aplicar RSM a un problema concreto. De las respuestas analíticas obtenidas a partir de un diseño para tres variables, es posible estimar los coeficientes de regresión de la función de respuesta como:

$$R(X,Y,Z) = a + b_X X + b_Y Y + b_Z Z + c_X X^2 + c_Y Y^2 + c_Z Z^2 +$$
$$+ d_{XY} XY + d_{XZ} XZ + d_{YZ} YZ$$

donde R es la respuesta analítica, X, Y y Z son las variables a optimizar, a es el término independiente, b_i representan los coeficientes de los términos lineales y c_i y d_i son los coeficientes de los término cuadráticos.

Para evaluar el punto crítico (X_C, Y_C, Z_C), obtenido mediante la segunda derivada de la función respuesta, R(X,Y,Z), es necesario aplicar el criterio de Lagrange[48] y caracterizar dicha función. Podemos encontrar cuatro situaciones diferentes[47]:

- No existe punto crítico: $\Delta_2 = 0$
- Máximo relativo: $\Delta_1 < 0$; $\Delta_2 > 0$; $\Delta_3 < 0$
- Mínimo relativo: $\Delta_1 > 0$; $\Delta_2 > 0$; $\Delta_3 > 0$

---

44. Box G.E.P., Hunter W.G. and Hunter J.S., *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building,* John Wiley & Sons, Reverté, Barcelona, ch. 15, p. 525, 1989.
45. Lawson J., Erjavec J. and Madrigal J.M., *Estrategias Experimentales para el Mejoramiento de la Calidad en la Industria*, Grupo Editorial Iberoamericano, Mexico, ch. 4, p. 181, 1992.
46. Nechar M., Molina Molina M.F., Cuadros Rodríguez L. and Bosque Sendra J.M., *Anal. Chim. Acta*, 316, 185, 1995.
47. García-Campaña A.M., Cuadros Rodríguez L., Lupiañez González A., Alés Barrero F. and Román Ceba M., *Anal. Chim. Acta*, 348, 237-246, 1997.
48. Valderrama M.J., *Métodos Matemáticos Aplicados a las Ciencias Experimentales*, Pirámide, Madrid, pp. 288-291, 1989.

- Punto de silla: Ninguna de las situaciones anteriores

donde Δ_3 es el denominado determinante *Hessiano* de la función y será:

$$\Delta_3 = H(X,Y,Z) = \begin{vmatrix} R''_{XX} & R''_{XY} & R''_{XZ} \\ R''_{YX} & R''_{YY} & R''_{YZ} \\ R''_{ZX} & R''_{ZY} & R''_{ZZ} \end{vmatrix} > 0$$

UNIVERSIDAD DE GRANADA
31 OCT. 2002
COMISION DE DOCTORADO

Δ_2 se calcula del determinante:

$$\Delta_2 = \begin{vmatrix} R''_{XX} & R''_{XY} \\ R''_{YX} & R''_{YY} \end{vmatrix}$$

y Δ_1 es la segunda derivada de la función con respecto a la variable X.

Las coordenadas del óptimo se obtienen resolviendo algebraicamente el sistema de ecuaciones:

$$R'_X = b_X + 2 \cdot c_X \cdot X_C + d_{XY} \cdot Y_C + d_{XZ} \cdot Z_C = 0$$

$$R'_Y = b_Y + 2 \cdot c_Y \cdot Y_C + d_{XY} \cdot X_C + d_{YZ} \cdot Z_C = 0$$

$$R'_Z = b_Z + 2 \cdot c_Z \cdot Z_C + d_{XZ} \cdot X_C + d_{YZ} \cdot Y_C = 0$$

Analizando la función respuesta podríamos encontrarnos con tres situaciones cuya resolución es diferente:

- La función muestra un máximo incluido dentro del dominio experimental. En este caso el proceso de optimización ha concluido.
- La función muestra un máximo fuera del dominio experimental. En este caso se debe realizar un nuevo diseño alrededor del máximo calculado para confirmar su posición.
- La función no presenta un máximo, y será necesario plantear otro diseño en la región donde se estima la respuesta óptima. Para localizar esta posición, es necesario buscar la dirección de máxima variación de respuesta calculando el vector gradiente a 2 o más puntos del diseño inicial:

$$[\text{grad } R]_X = [R'_X]_{Xi,Yi,Zi} = b_X + 2 \cdot c_X \cdot X_i + d_{XY} \cdot Y_i + d_{XZ} \cdot Z_i$$

$$[\text{grad } R]_Y = [R'_Y]_{Xi,Yi,Zi} = b_Y + 2 \cdot c_Y \cdot Y_i + d_{XY} \cdot X_i + d_{YZ} \cdot Z_i$$

$$[\text{grad } R]_Z = [R'_Z]_{Xi,Yi,Zi} = b_Z + 2 \cdot c_Z \cdot Z_i + d_{XZ} \cdot X_i + d_{YZ} \cdot Y_i$$

La intersección de las líneas rectas, trazada en la dirección de los vectores gradientes, indicará la zona donde es posible encontrar el máximo de la función respuesta.

4.4.2. Diseño Box-Behnken

Los diseños Box-Behnken[43] son rotatables y presentan una distribución uniforme de puntos dentro del dominio experimental. Estos diseños presentan algunas ventajas respecto a otro tipo de diseños:

- Son más eficaces
- Son más fáciles de diseñar e interpretar
- Las dimensiones iniciales pueden acortarse o extenderse en el dominio experimental
- Pueden utilizarse para re-optimizar[49] los métodos analíticos en caso de que existan factores con mucha variabilidad no conocida o difícil de controlar.

La figura III.1 muestra dos conformaciones diferentes y equivalentes del diseño Box-Behnken de tres variables, dode cada uno de los puntos representa las coordenadas de los puntos experimentales a realizar.

En nuestro caso, todas las experiencias se han realizado con una concentración del herbicida 2,4-D constante e igual a 4 mg/l, siendo las variables experimentales que influyen en la respuesta analítica: el tiempo de irradiación del complejo (T), la concentración de HP-β-CD (C_{CD}) y el pH (pH). Para la optimización hemos aplicado dos diseños (Figura III.2), utilizando valores codificados para el estudio de las variables, ya que estos nos permiten una normalización del dominio experimental.

49. Bosque-Sendra J.M., Pescarolo S., Cuadros-Rodriguez L., García-Campaña A.M., Almansa-López E.M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369, 715-718, 2001.

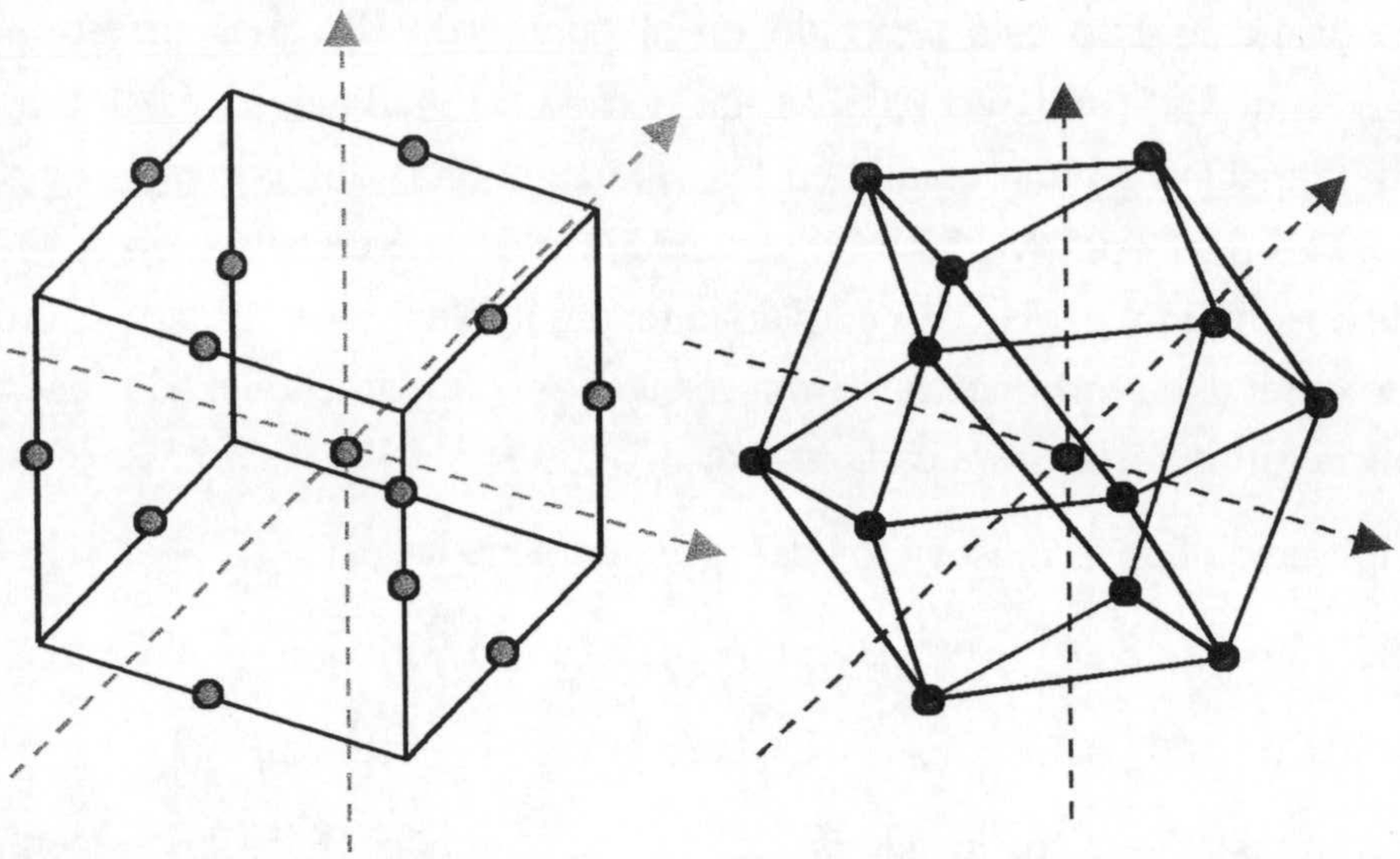


Figura III.1.

Diferentes representaciones de las tres variables en el diseño de Box-Behnken.

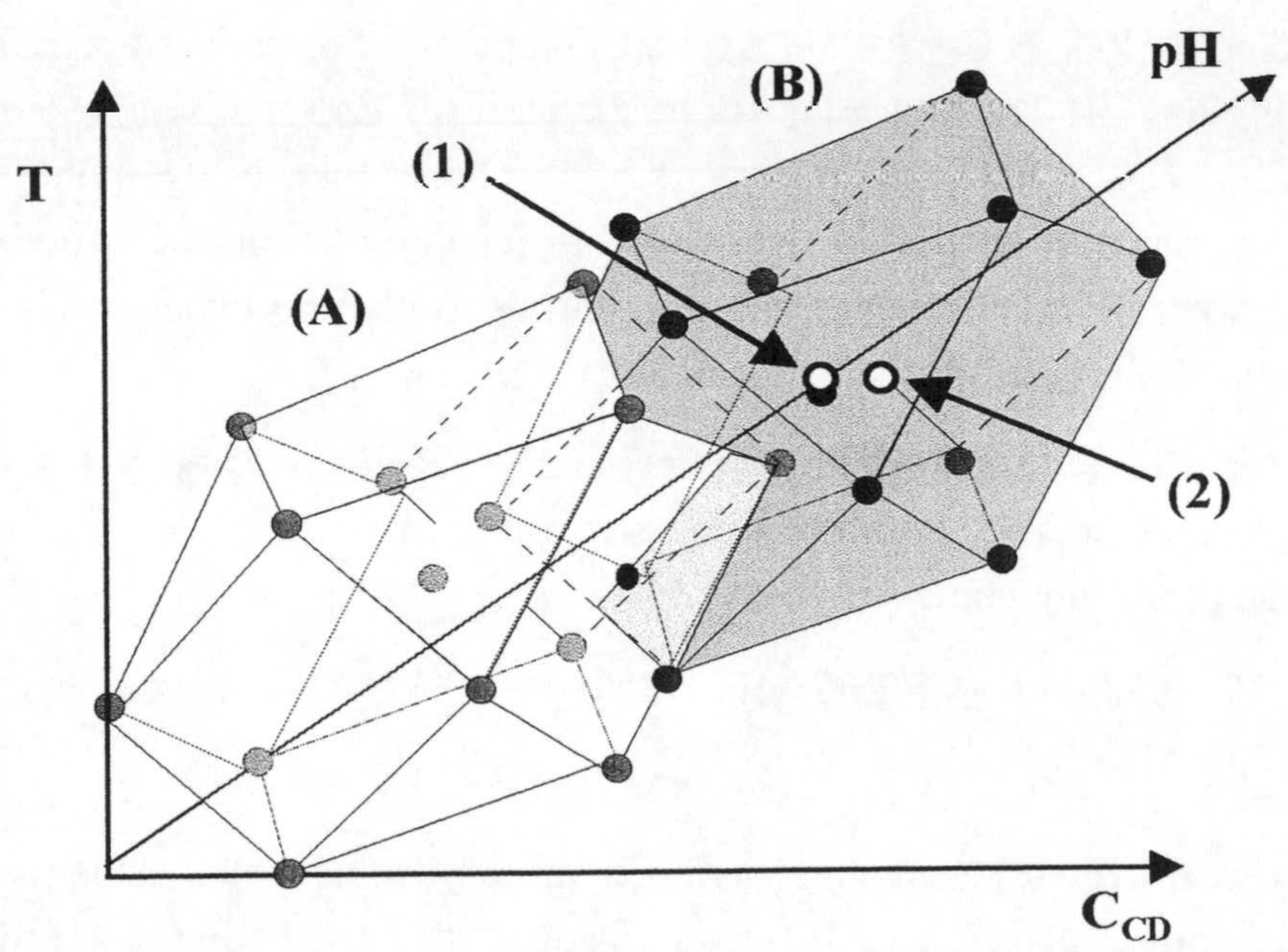


Figura III.2.

Diseños utilizados en la optimización de la concentración de HP-β-CD, pH y tiempo de irradiación del complejo de inclusión. (A) 1er Diseño; (B) 2º Diseño; (1) Máximo obtenido del diseño 1, (2) Máximo obtenido del diseño 2.

El primer diseño está centrado en el punto (0,0,0), que corresponde a una concentración de HP-β-CD de 0,03 M, un tiempo de irradiación de 20 min. y un pH de 5. Cada variación de una unidad en los valores codificados corresponde a cambios en las variables de ± 0,02 M, 10 min. y 3 unidades de la concentración de HP-β-CD, tiempo de irradiación y pH, respectivamente. La tabla 1 del Anexo B3 muestra el diseño Box-Behnken propuesto y los resultados experimentales de intensidad de fluorescencia fotoinducida para cada punto.

La función que se ajusta a los datos experimentales es:

$$F = 45{,}33 + 15{,}42 \cdot C_{CD} + 2{,}93 \cdot pH + 6{,}27 \cdot T - 3{,}90 \cdot C_{CD}^2 - 3{,}75 \cdot pH^2 -$$

$$- 0{,}20 \cdot T^2 - 0{,}53 \cdot C_{CD} \cdot pH + 0{,}27 \cdot C_{CD} \cdot T - 0{,}17 \cdot pH \cdot T$$

y muestra la relación entre la intensidad de fluorescencia (F) y la concentración de HP-β-CD (C_{CD}), el pH y el tiempo de irradiación (T). Los datos experimentales se ajustan muy bien al modelo seleccionado con un coeficiente de determinación R^2 = 98.6% y un valor P del test de fallo de ajuste P = 18.6%).

La aplicación del criterio de Lagrange[50], a la función, nos indica la presencia de un máximo (F"(C_{CD}, C_{CD}) = –7,81, Δ(C_{CD}, pH) = 58,35, H(C_{CD}, pH, T) = –373,08) (Figura III.3), el cual corresponde a las siguientes condiciones experimentales: C_{CD} = 0,07 M, pH = 5,7 y T = 30,6 min. No obstante, como el óptimo no se encuentra localizado dentro del dominio experimental estudiado por el diseño experimental, es conveniente diseñar un nuevo plan de experiencias alrededor el óptimo estimado para confirmar su posición.

La tabla 2 del Anexo B3 muestra el 2º diseño planteado y los resultados experimentales obtenidos. La función, en este caso, para los nuevos datos experimentales es la siguiente:

$$F = 39{,}46 + 18{,}08 \cdot C_{CD} - 2{,}66 \cdot pH + 8{,}80 \cdot T - 3{,}31 \cdot C_{CD}^2 - 6{,}68 \cdot pH^2 -$$

$$- 2{,}98 \cdot T^2 + 0{,}82 \cdot C_{CD} \cdot pH - 0{,}62 \cdot C_{CD} \cdot T + 0{,}45 \cdot pH \cdot T$$

Una vez más se encuentra un buen ajuste de los datos experimentales al modelo seleccionado (coeficiente de determinación R^2 = 94,9% y valor P del test de fallo de ajuste P = 10,3%). La aplicación del criterio de Lagrange nos indica la

50. Valderrama M.J., *Métodos Matemáticos Aplicados a las Ciencias Experimentales*, Pirámide: Madrid, Spain, pp 288-291, 1989.

presencia de un óptimo dentro de la región experimental estudiada (F"(C_{CD}, C_{CD}) = –6,62, Δ(C_{CD}, pH) = 87,76, H(C_{CD}, pH, T) = –517,5) (Figura III.4). Estas condiciones óptimas (C_{CD} = 0,08 M, pH = 5 y T = 32 min.) son utilizadas en las posteriores experiencias.

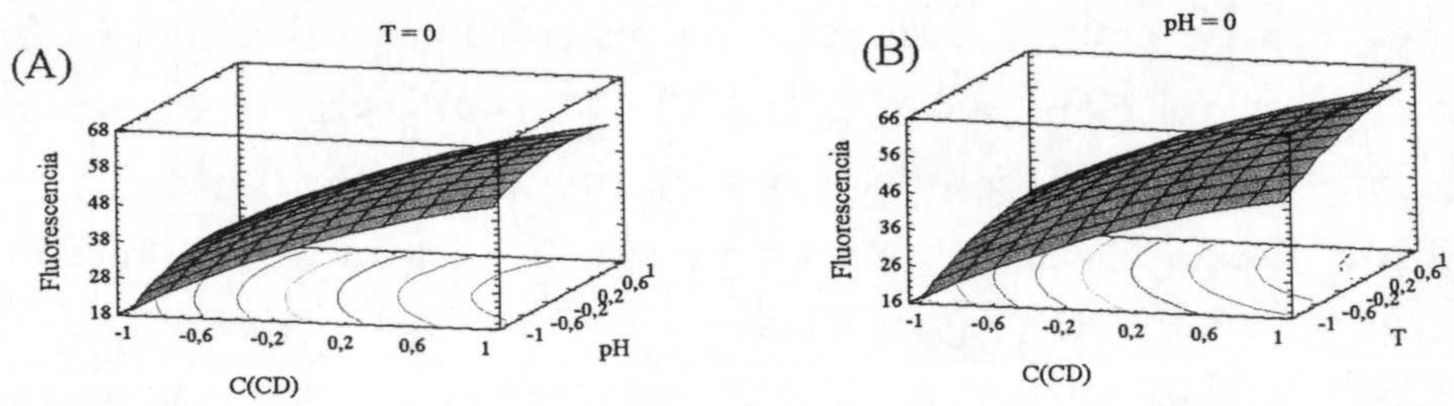


Figura III.3.

Superficies de respuesta para el primer diseño en la optimización de la concentración de ciclodextrina (C_{CD}), tiempo de irradiación (T) y pH, para $C_{2,4\text{-}D}$ = 4 mg/l. A) T = 0 y B) pH = 0

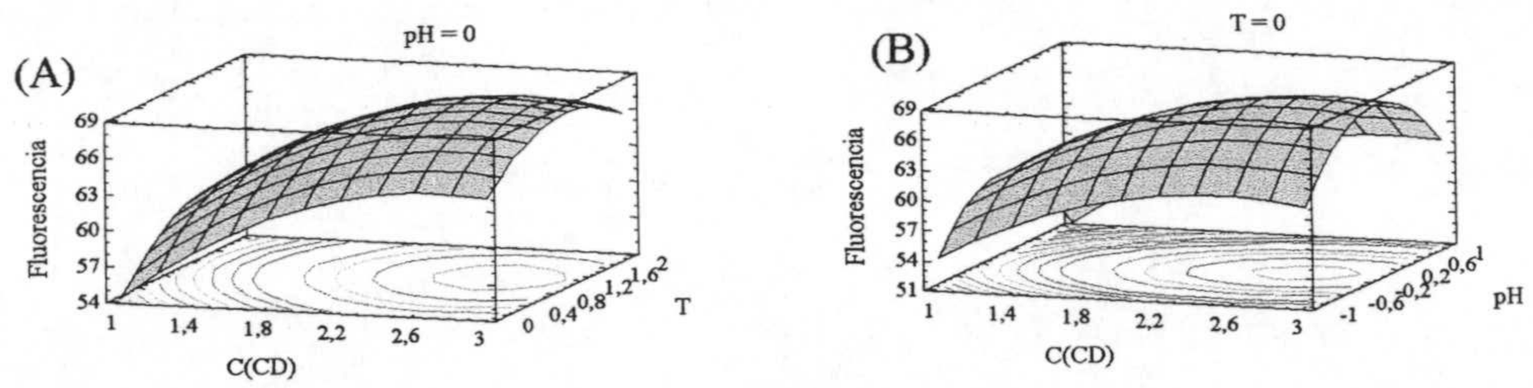


Figura III.4.

Superficies de respuesta para el segundo diseño en la optimización de la concentración de ciclodextrina (C_{CD}), tiempo de irradiación (T) y pH, para $C_{2,4\text{-}D}$ = 4 mg/l. A) pH = 0 y B) T = 0

4.5. Características espectrales del complejo de inclusión

En solución acuosa y en las condiciones óptimizadas anteriormente (T = 32 min y pH = 5), HP-β-CD presenta emisión de fluorescencia tras irradiación, al contrario que 2,4-D, que debido a efectos de atenuación no presenta emisión. Sin embargo, la señal de fluorescencia de 2,4-D en presencia de HP-β-CD aumenta debido a la habilidad de la CD de formar complejos de inclusión (Figura III.5). La longitud de onda de emisión y la señal de fluorescencia del complejo formado varían cuando la relación molar [HP-β-CD]/[2,4-D]. Así, el aumento en la concentración de HP-β-CD produce dos efectos diferentes: un aumento de la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento del pico de emisión hacia longitudes de onda mayores (Figura III.6).

Debido al solapamiento de los espectros de emisión de HP-β-CD y del complejo de inclusión (Figura III.5), con fines analíticos, es necesario restar la señal correspondiente a un blanco en presencia de HP-β-CD. El máximo de F del espectro diferencia se utiliza para determinar la estequiometría y la constante de inclusión del complejo.

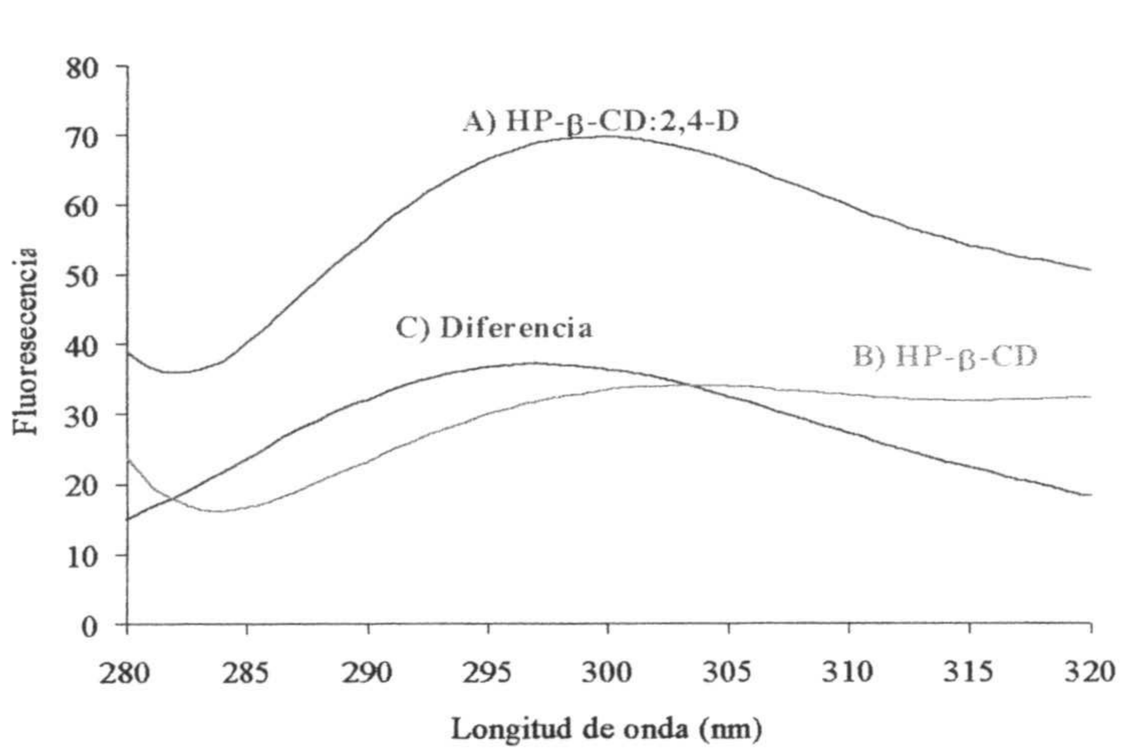


Figura III.5.

Espectros de emisión de A) complejo HP-β-CD:2,4-D, B) HP-β-CD y C) espectro diferencia (λ_{exc} = 268 nm; T = 32 min; C_S = 4 mg/l; C_{CD}= 0,08 M)

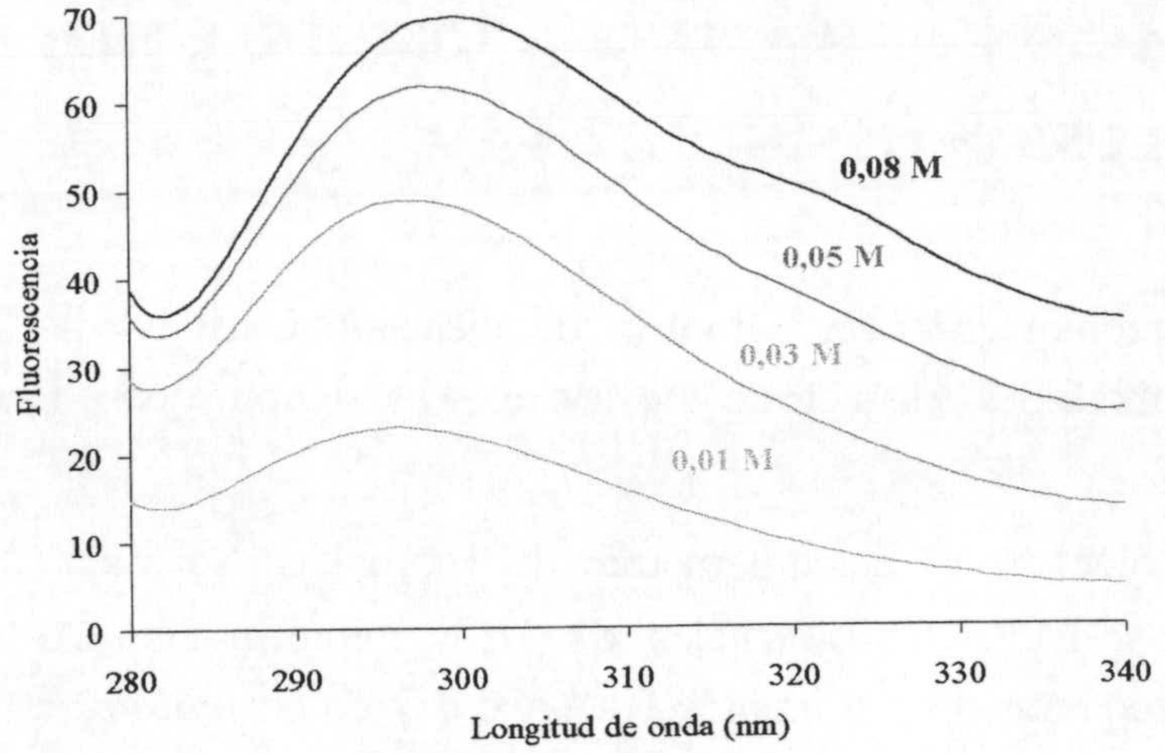


Figura III.6.

Evolución del espectro de emisión del complejo de inclusión con diferentes concentraciones de HP-β-CD (λexc = 268 nm, $C_{2,4\text{-}D}$ = 4 mg/l, T = 32 min).

4.6. Procedimiento analítico

Las disoluciones de trabajo de 2,4-D y HP-β-CD necesarias para estudiar las características espectrales del complejo de inclusión se prepararon en matraces de 10 ml, añadiendo 4 ml de una mezcla al 50% de metanol y disolución reguladora a pH 5, 0,4 ml (4 mg/l) de la disolución madre de 2,4-D y volúmenes variables de la disolución madre de HP-β-CD entre 0,5 ml (0,01 mol/l) y 3,5 ml (0,08 mg/l), enrasando con agua destilada y agitando suavemente.

Las disoluciones así preparadas se midieron a las condiciones experimentales óptimas de tiempo de irradiación registrando el máximo de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 268 nm y emisión de 296 nm.

5. ESTIMACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN HP-β-CD:2,4-D

La estequiometría del complejo de inclusión entre HP-β-CD y 2,4-D fue determinada mediante el método de Benesi-Hildebrand que viene dada por la ecuación III-2.

Para obtener la estequiometría del complejo solamente será necesario representar los datos experimentales de $1/\Delta F$ frente a $1/C_{CD}{}^{g}$, considerando el coeficiente estequiométrico g igual a 1 o igual a 2 como muestra la Figura III.7. En este caso, se obtiene una relación lineal (para el rango de concentraciones de HP-β-CD estudiadas) cuando se representa $1/\Delta F$ frente $1/C_{CD}$ lo cual indica que la estequiometría del complejo es 1:1, presentando curvatura cuando se considera un complejo de estequiometría 2:1.

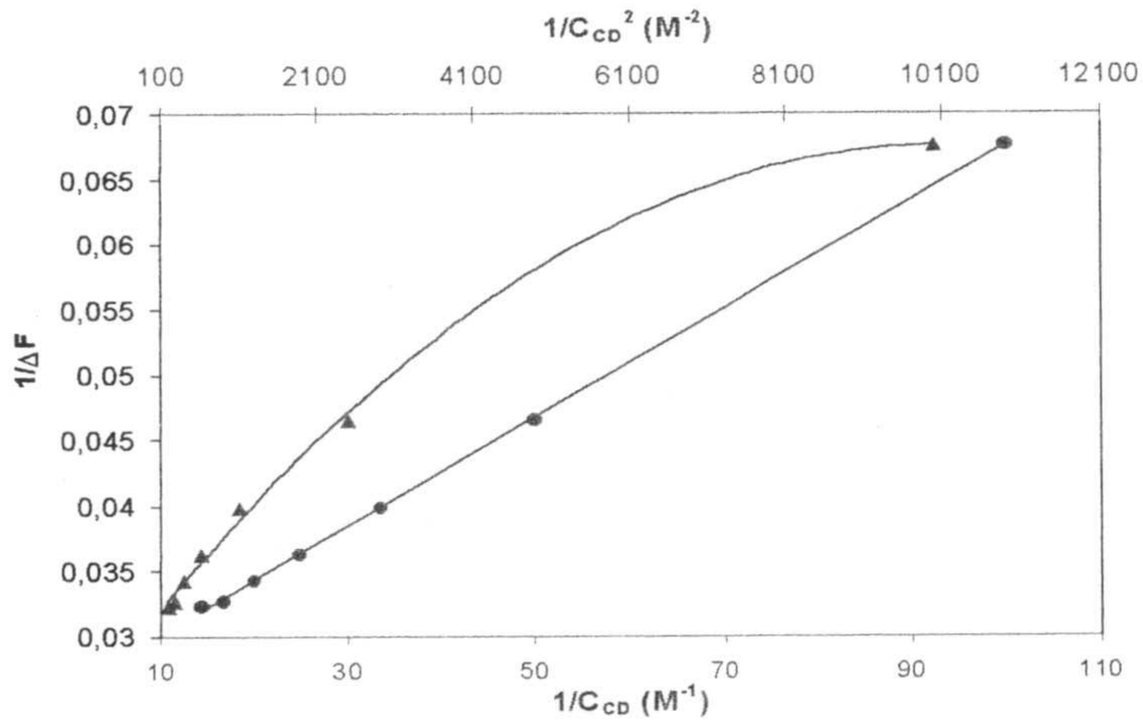


Figura III.7.

Representación doble recíproca para el complejo HP-β-CD:2,4-D.

(●) estequiometría 1:1. (▲) estequiometría 2:1.

6. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS PARA EL CÁLCULO DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN HP-β-CD:2,4-D Y SU INCERTIDUMBRE ASOCIADA

Teorema de Fieller

El método de B-H modificado (ecuación III-3) se aplica a los datos experimentales para obtener los parámetros de la regresión (Tabla 3 del Anexo B3) mediante regresión simple recíproca por mínimos cuadrados (SR-LSR), a partir de los cuales se calcula la constante de formación (K_f = 63,59 l/mol) como cociente de la pendiente entre el término independiente. La incertidumbre asociada a la constante de formación, se calcula aplicando la expresión reducida dada por la ecuación III-7, debido a que el parámetro g muestra un valor inferior a 0,05 (g = 0,0044). El intervalo de cobertura obtenido por medio de esta aproximación, para un 95% de confianza y 5 grados de libertad (k = 2,65):

$$\mathbf{K_f = 63{,}59 \pm 5{,}77\ \ l/mol}$$

Método Bootstrap RC

A partir de los datos originales se crean N^B = 2000 nuevos conjuntos de datos, seleccionando independientemente siete parejas de datos para cada conjunto, a los cuales se le calculan los parámetros de la regresión mediante SR-LSR. Como se puede observar en la Figura III.8A, el histograma resultante para 2000 constantes de formación obtenidas por este método no muestran una distribución normal. En este caso, la constante de formación calculada como el valor medio de todas las experiencias y el intervalo de cobertura obtenido a partir de la varianza, con un nivel de cobertura del 95% y más de 10 grados de libertad (k = 2), es:

$$\mathbf{K_f = 63{,}67 \pm 5{,}26\ \ l/mol}$$

Método Bootstrap RR

En primer lugar y aplicando DRR a los datos experimentales, es necesario estimar los residuos para cada pareja de datos usando los coeficientes de regresión obtenidos para calcular la respuesta predicha por el modelo (Tabla 3, Anexo B3). Estos residuos se usan para hacer nuevos conjuntos de datos simulando repeticiones de cada experimento para calcular la variabilidad estadística del cociente de los coeficientes.

De cada conjunto de datos $[(C_{CD})_i, Y_i^B]$ se computan los coeficientes de regresión a^B y b^B a partir de los cuales se estima la constante de formación K_f^B. Este proceso de simulación se ha realizado, igual que en el caso anterior, N^B = 2000 veces. La Figura III.8B muestra el histograma resultante para los conjuntos de nuevos datos donde podemos ver que la distribución obtenida es una buena aproximación a una distribución normal, y por tanto los estadísticos de interés como el sesgo y la varianza puede ser obtenidos de los nuevos conjuntos de datos. De esta manera, se obtiene que la constante de formación junto con su intervalo de cobertura, para un 95% de confianza y más de 10 grados de libertad (k = 2) vale:

$$\mathbf{K_f = 63{,}66 \pm 3{,}73 \ \ l/mol}$$

Método de Jackknife

Este método está basado en el efecto en la variabilidad de los parámetros estimados cuando se elimina una pareja de datos experimentales del conjunto de datos originales. Los estadísticos de interés se calculan para cada nuevo conjunto de datos obteniendo N^J = 7 valores de $K_{f,i}$, siendo $K_{f,i}$ el valor estimado de constante de formación cuando la observación i es eliminada, éstos son mostrados en forma de histograma en la Figura III.8C. De los resultados obtenidos, se estima el sesgo, la varianza y la constante de formación, con un nivel de cobertura del 95% y 5 grados de libertad (k = 2,65):

$$\mathbf{K_f = 63{,}58 \pm 7{,}62 \ \ l/mol}$$

Método de Jackknife-Bootstrap RR

Esta estrategia consiste en obtener, en primer lugar, por medio del método de Jackknife (omitiendo una pareja de datos cada vez) 7 nuevos conjuntos de datos. A continuación se aplica el método de B-H modificado para obtener los coeficientes de regresión y los residuos correspondientes para cada conjunto. Por último, se aplica el método Bootstrap RR con 2000 repeticiones a cada uno de las regresiones obtenida con Jackknife, aumentando así el número de constantes de formación.

La Figura III.8D muestra el histograma resultante para los datos aplicando esta estrategia. Finalmente, de las ecuaciones correspondientes al método del bootstrap es posible obtener la constante de formación y su incertidumbre, para un 95% de confianza y más de 10 grados de libertad (k = 2):

$$\mathbf{K_f = 63{,}61 \pm 4{,}66\ l/mol}$$

Método de Bootstrap RR-Jackknife

Al contrario que el caso anterior, los coeficientes de regresión y los residuos se obtienen del método de B-H modificado con los datos experimentales aplicando, en primer lugar el método Bootstrap RR, con lo que se obtienen 2000 nuevos conjuntos de datos a los cuales se les aplica el método de Jackknife a cada regresión simulada. El número de constantes de formación estimadas, en este caso también es de 14000 y su distribución es mostrada en el histograma de la Figura III.8E. Ahora, el resultado, para un 95% de confianza y más de 10 grados de libertad (k = 2), es:

$$\mathbf{K_f = 63{,}61 \pm 4{,}08\ l/mol}$$

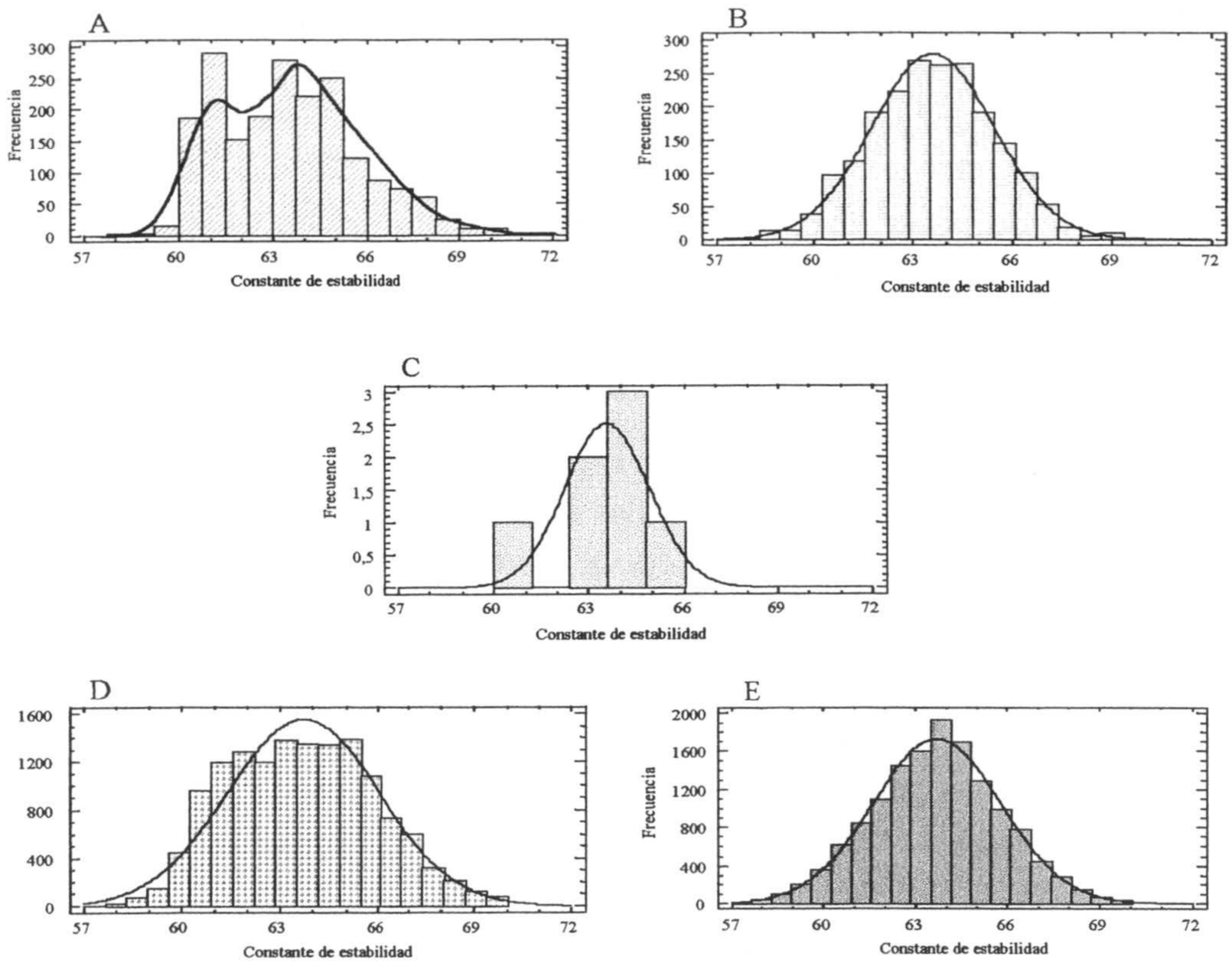


Figura III.8.

Distribución N constantes de formación por los métodos: A) Bootstrap RC (N = 2000), B) Bootstrap RR (N = 2000), C) Jackknife (N = 7), D) Jackknife seguido de Bootstrap RR (N = 1400) y E) Bootstrap RR seguido de Jackknife (N = 1400).

7. CONCLUSIONES

La tabla III.1 y la Figura III.9 muestran los intervalos de cobertura de las constantes de formación estimadas siguiendo las distintas metodologías aplicadas. Todos los métodos proporcionan estimaciones similares de las constantes de formación y, como se observa, los diferentes intervalos calculados se solapan.

Tabla III.1.

Resultados obtenidos de la constante de formación, su incertidumbre y el sesgo mediante la aplicación de los métodos propuestos.

Método	K_f	s_{Kf}	SESGO (K_f)*
Teorema de Fieller	63,58	2,18	—
Bootstrap RC	63,67	2,63	– 0,08
Bootstrap RR	63,66	1,87	– 0,07
Jackknife	63,58	3,03	0,05
Jackknife-Bootstrap RR	63,61	2,33	0,03
Bootstrap RR-Jackknife	63,61	2,04	0,02

* Calculado a partir de las ecuaciones III-12 y III-14. En ningún caso difiere significativamente de cero.

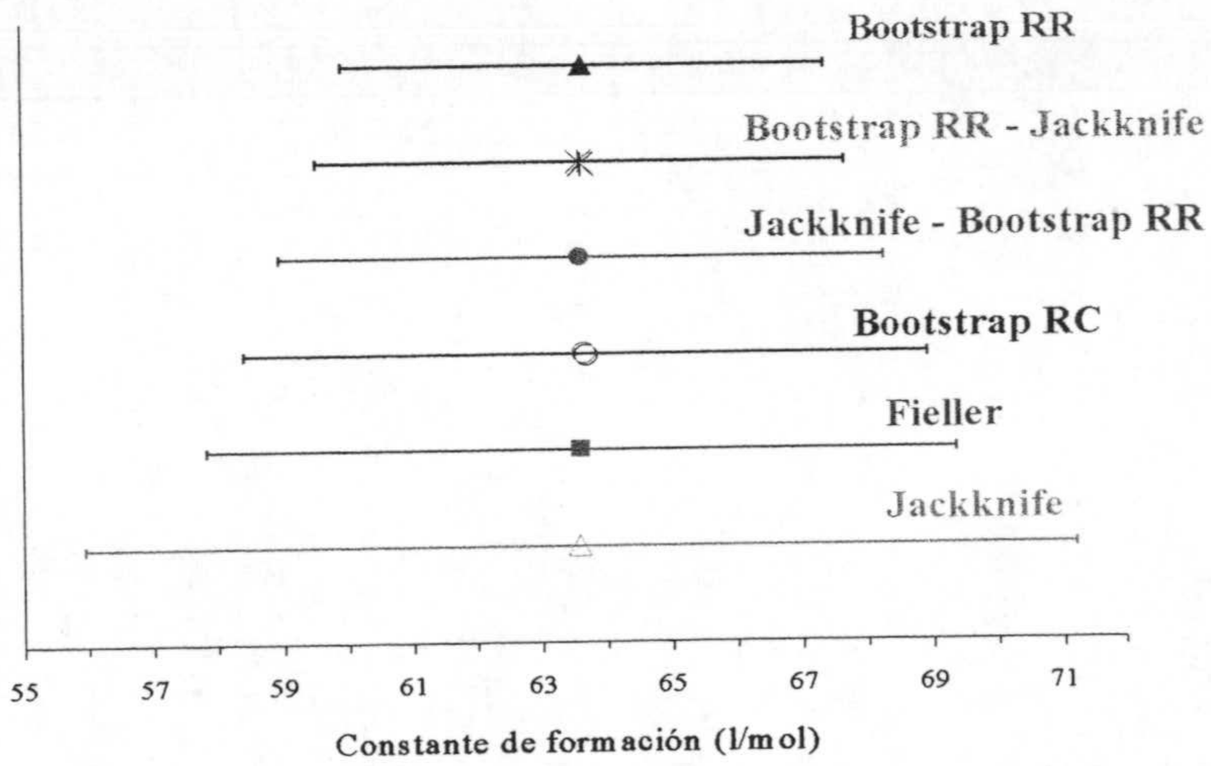


Figura III.9.

Comparación de las constantes de formación y sus incertidumbres

Por lo tanto, todos los métodos aplicados son igualmente válidos y pueden utilizarse para una estimación rigurosa de constantes de formación para complejos de inclusión y su incertidumbre asociada. Hay que destacar que el método de jackknife proporciona una sobrestimación de la incertidumbre asociada a la constante de formación siendo dos veces mayor que la incertidumbre calculada por el método bootstrap RR. La incertidumbre menor se ha obtenido con el método bootstrap RR, considerándolo el más apropiado en términos de exactitud en el valor estimado.

Bloque II

ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo IV

INCERTIDUMBRE ASOCIADA AL RESULTADO DEL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

1. ANTECEDENTES

La incertidumbre[1] de un resultado, definida ya en la introducción, tiene en cuenta tanto los errores aleatorios como los sistemáticos, proporcionando información sobre el grado de fiabilidad en la estimación. El error no puede determinarse en la mayoría de métodos analíticos a menos que se declare el verdadero valor, pero la incertidumbre puede estimarse a partir del método analítico, describiendo detalladamente el procedimiento. Desde este punto de vista, la incertidumbre puede considerarse como una estimación probabilística del error máximo de una medida.

La evaluación de la incertidumbre en análisis químico presenta un reto, que no resulta nuevo en Metrología sin que existan procedimientos disponibles para llevarla a cabo. Los beneficios de dicha evaluación residen en:

- ✗ la mejora de la comprensión de la medida
- ✗ da la oportunidad de trabajar sobre los costos
- ✗ genera información para hacer juicios de valores sobre las medidas
- ✗ aumenta la aceptabilidad de los resultados
- ✗ permite evaluar la calidad de los resultados y por tanto capacita al usuario a hacer evaluaciones objetivas de su fiabilidad

En el campo de las medidas químicas, la muestra junto con los problemas derivados de las calibraciones constituye un factor decisivo ya que, independientemente de la incertidumbre propia del instrumento de medida, la naturaleza de la muestra y, con ella, todas las operaciones dirigidas a la preparación de ésta para ser medida, influyen drásticamente en la incertidumbre total del resultado.

Se han propuesto tres aproximaciones para la expresión de la incertidumbre en las medidas químicas. La primera, denominada metodología

1. ISO, *Guide to the expression of uncertainty in measurement*, International Standards Organization, Geneva, 1993

"ascendente" (*bottom-up*)[2,3,4], considera una división en: identificación de fuentes, cuantificación de componentes y combinación de todas las fuentes de incertidumbre de las distintas etapas del método analítico, para lo cual ISO desarrolló una guía para la armonización de la expresión de resultados con incertidumbre que fue adaptada por EURACHEM al problema analítico. La segunda, denominada metodología "descendente" (*top-down*)[5], incluye el uso de información interlaboratorio y la tercera, denominada validación intralaboratorio (*in-house validation*)[6,7], incluye la información obtenida de análisis repetidos derivados de la validación interna de métodos analíticos. En este contexto, para cualquier análisis químico parece tener sentido usar la primera aproximación junto con datos de validación interna por estimar la incertidumbre derivada de cada paso del método analítico[8,9,10,11].

Por otra parte, la definición de incertidumbre[2], indica que deben darse resultados exentos de errores sistemáticos. En muchos métodos analíticos, como en el análisis de plaguicidas, la recuperación de la mayoría de los analitos es diferente al 100%, por lo que, en una primera consideración, debe ser necesaria una corrección de esta recuperación para asegurar la fiabilidad de resultados[12]. No obstante, teniendo de nuevo en cuenta la diversidad de rangos de concentración y el gran número de analitos, resulta difícil estimar un factor de la corrección para cada combinación, por lo que se adopta el criterio aceptado de que no corregir es mejor que una corrección errónea.

---

2. EURACHEM/CITAC Guide: *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 2nd Ed., EURACHEM, 1999.
3. Bettencourt da Silva R.J.N., João Lino M., Ribeiro A. and Santos J.R., *Analyst*, 126, 743-746, 2001.
4. Quintana J., Martí I. and Ventura F., *J. Chromatogr. A*, 928, 3-13, 2001.
5. Analytical Methods Committee, *Analyst*, 120, 2303, 1995.
6. *Protocol for In-house Method Validation*, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 1999
7. Hill A.R. and Reynolds S.L., *Analyst*, 124, 953, 1999.
8. Maroto A., Boqué R., Riu J. and Rius F.X., *Trends Anal. Chem.*, 18, 577-584, 1999.
9. Maroto A., Boqué R., Riu J. and Rius F.X., *Química Analítica*, 19, 85-94, 2000.
10. Bettencourt da Silva R.J.N., João Lino M., Santos J.R. and Camões M.F.G.F.C., *Analyst*, 125, 1459-1464, 2000.
11. Lisinger T.P.J., Füherer M., Kandler W. and Schuhmacher R., *Analyst*, 126, 211-216, 2001.
12. *Harmonised Guidelines for the use of recovery information in analytical measurements*, IUPAC Technical Report, *Pure Appl. Chem.*, 71, 337, 1999.

En este capítulo vamos a proponer una metodología sencilla y novedosa para el cálculo de la incertidumbre asociada al resultado del análisis de residuos de Lindano en muestras de pimiento, basada en el análisis multiresiduos de plaguicidas por cromatografía de gases[13]. Todo el metodología propuesta está basada en las indicaciones dadas en las guías GUM[1] y EURACHEM[2].

2. INCERTIDUMBRE GLOBAL

La estimación de la incertidumbre global, según indica la guía EURACHEM[2], a partir de los principios enunciados en la guía GUM[1], implica el seguimiento de diferentes etapas:

✏ Especificación

Debe hacerse una indicación clara y por escrito de qué es el mesurando (lo que va a ser medido) y la relación que existe entre dicho mesurando y los parámetros de los que depende (p.e.: cantidades medidas, constantes, patrones de calibración, etc.) incluyendo las correcciones de alteraciones sistemáticas conocidas.

Cuando el resultado final dependa a su vez de otras cantidades medidas o de constantes, se debe indicar la expresión algebraica que las relaciona (en caso de que se conozca).

✏ Identificación de las fuentes

Debe confeccionarse un listado de las posibles fuentes de error que afecten, durante el procedimiento, al resultado final. Cada una de estas contribuciones, consideradas de forma separada, se denominan *componentes de incertidumbres.*

---

13. Cuadros Rodríguez L., Hernández Torres M.E., Almansa López E., Egea González F.J., Arrebola Liébanas F.J. and Martínez Vidal J.L., *Anal. Chim. Acta*, 454, 297-314, 2002.

✏ Cuantificación de las componentes

Una vez identificadas las posibles fuentes, es preciso hacer una evaluación aproximada de la magnitud de la contribución de cada una de ellas, ya que sólo una pequeña fracción de todas las seleccionadas en la etapa anterior afectará significativamente a la incertidumbre global.

En esta etapa, a menos que se tenga un profundo conocimiento de la contribución de cada componente, a efectos prácticos es más sencillo agrupar las componentes por bloques que son evaluados juntos, simplificando así el trabajo experimental y los cálculos matemáticos implicados.

Es necesario tener en cuenta que la incertidumbre suele variar con el nivel de analito en la muestra, disminuyendo conforme este aumenta. Por ello, o se asocian distintas incertidumbres a intervalos pequeños de analito, o bien se hace una sobreestimación de validez general, realizando el cálculo para una concentración baja de analito.

Existen varias vías para la estimación de las componentes individuales de la incertidumbre:

- *Cuantificación experimental.* A partir de experiencias repetitivas (n<15) en las que se varían los parámetros de los que depende cada componente.
- *Empleo de materiales de referencia (MR).* Informa del efecto combinado de las componentes que influyen. Debe tenerse en cuenta la incertidumbre del valor del MR, la precisión de las medidas sobre él, las diferencias entre el valor certificado y el estimado y las posibles diferencias entre el MR y la muestra.
- *Empleo de resultados o datos previos.* A partir de estudios de evaluación de la calidad (ejercicios interlaboratorios), datos de la bibliografía, información de las casas comerciales, etc.

✏ Obtención de desviaciones estándar

En principio, cada componente considerada individualmente se asocia a una incertidumbre estándar o desviación estándar (SD) que se calcula a partir de otras posibles expresiones (en su caso) para cuantificar la incertidumbre. Dependiendo de cómo se obtiene esta SD, se habla de dos tipos de incertidumbre:

❍ Incertidumbre de **Tipo A**, donde podemos distinguir varios casos:

- *Se dispone de una SD.* En este caso, el valor disponible se acepta directamente para su utilización.
- *Se dispone de datos experimentales.* Mediante un tratamiento estadístico adecuado se calcula la SD correspondiente, por ejemplo, en caso de disponer de un único conjunto de datos, el tratamiento estadístico puede ser el cálculo de directo de la SD, previa comprobación de la ausencia de datos anómalos o mediante regresión y si se dispone de más de un conjunto de datos el tratamiento estadístico puede ser una análisis de la varianza (ANOVA).

❍ Incertidumbre de **Tipo B**, calculada mediante otros métodos diferentes al análisis estadístico, p.e. información previa, especificaciones instrumentales, experiencia profesional, etc. Los más frecuentes son:

- *Se dispone de un valor de incertidumbre declarada (u)*. Obtenido a partir de un certificado de calibración (interno o externo). Generalmente viene expresada como incertidumbre expandida (U) acompañada del correspondiente valor del parámetro k. Por tanto la incertidumbre estándar se calcula a partir de: $SD = u = U / k$
- *Se dispone de un intervalo de confianza (IC)*. Si el nivel de confianza, α, es conocido, se asume una distribución normal y se calcula a partir de las correspondientes tablas estadísticas. Recordemos que en general el intervalo de confianza es: $IC = \pm z_\alpha \cdot u \Rightarrow u = IC/z_\alpha$ (En una distribución normal: $z(95\%) = 1'96 \approx 2 \Rightarrow IC = \pm 1'96 \cdot s$ (ó $\pm 2 \cdot s$) $\Rightarrow u = IC/1'96 \approx IC/2$). Si no se dispone de esta información, debe asumirse una distribución rectangular, de modo que: $IC = \pm\sqrt{3} \cdot u \Rightarrow u = IC/\sqrt{3}$
- *Se dispone de un intervalo máximo de variabilidad (IV_{max})*. Un intervalo máximo de variabilidad se puede considerar como el doble de un intervalo de confianza y por ello se considera el semi-intervalo, como en el caso anterior, asumiendo una distribución rectangular. Por ello queda que: $\frac{1}{2} \cdot IV_{max} = \pm\sqrt{3} \cdot u \Rightarrow u = IV_{max} / 2\sqrt{3}$
- *Se dispone de unos límites superior (L_{sup}) e inferior (L_{inf})*. Es un caso similar al anterior de un intervalo máximo de variabilidad, con la

diferencia de que el intervalo no es simétrico. Utilizando ambos valores límite, queda la expresión: $u = (L_{sup}–L_{inf})/2\sqrt{3}$

- *Se dispone de un valor de error.* O bien se utiliza su valor máximo como incertidumbre, o bien se asume una distribución rectangular y se calcula como en el apartado anterior.

✏ Cálculo de la incertidumbre combinada

En algunos casos particulares puede interesar el cálculo de una *incertidumbre estándar combinada*, por ejemplo, para una función y que dependa a su vez de varias variables, $y = y(x_1, x_2, ...)$. Aplicando la ley de propagación de varianzas sobre los cuadrados de las incertidumbres estándar, se obtiene:

$$u(y) = \sqrt{c^2(x_1)\cdot u^2(x_1) + c^2(x_2)\cdot u^2(x_2) + ...} \qquad \text{(IV-1)}$$

donde c representa el coeficiente de sensibilidad asociado a cada una de las variables calculado mediante la correspondiente derivada parcial de la función:

$$c(x_i) = \frac{\partial y}{\partial x_1} \qquad \text{(IV-2)}$$

El coeficiente c, para cada variable, describe el grado en que la incertidumbre se ve afectada por variaciones en la SD de dicha variable, y puede evaluarse a partir de la función, aplicando la expresión anterior, o utilizando métodos numéricos. La aplicación de esta expresión a casos sencillos conduce a las usuales reglas de propagación de varianzas.

La combinación de incertidumbre debe tener en cuenta el criterio de las cifras significativas, de modo que no contribuya a aumentar o disminuir la incertidumbre total (suele ser una regla general expresar las incertidumbres intermedias con al menos 2 cifras significativas).

✏ Cálculo de la incertidumbre global estándar

La incertidumbre global se calcula por combinación de todas las contribuciones calculadas, bien agrupadas por bloques (en su caso) o bien considerando cada componente en forma individual. La combinación se realiza

sumando los cuadrados de las incertidumbre estándar consideradas, según la expresión general:

$$u_{GLOBAL} = \sqrt{\sum u_i^{\,2}} = \sqrt{u_1^{\,2} + u_2^{\,2} + u_3^{\,2} + \ldots} \qquad \text{(IV-3)}$$

Cuando el resultado final de un análisis implique el uso de más de un ensayo diferente, la incertidumbre global se calculará a partir de las incertidumbres de los resultados de cada ensayo por aplicación también de las mismas reglas de propagación de varianzas.

En ciertos casos (p.e. cuando se calcula la incertidumbre asociada a una dilución) es factible usar **incertidumbres relativas** (estándar o expandida) que representan el valor de la incertidumbre normalizado a la magnitud de la propiedad que representa. Se obtiene (al igual que ocurre con la desviación estándar relativa, RSD) dividiendo la incertidumbre estándar por el valor de la propiedad excepto cuando la magnitud estimada es igual a cero. Esta incertidumbre es adimensional y se expresa como fracción a la unidad o como porcentaje.

✏ **Reevaluación de las componentes significativas.**

Una vez obtenido un resultado final de la incertidumbre, se puede comparar este con el valor inicialmente estimado de cada componente a fin de chequear la significación o no de cada una. Aquellas cuya contribución se considere despreciable (su valor es inferior al menos en 5 veces el valor de la mayor, aunque otros autores indican que pueden ya despreciarse cuando es 3 ó 4 veces menor), se eliminan del cálculo y por contra, las que se consideren significativas se pueden reevaluar de forma más rigurosa en caso de que se precise disponer de un valor de incertidumbre calculado con unos determinados requisitos.

En este último caso, se procede a un nuevo cálculo de la incertidumbre global estándar utilizando los valores reestimados para las componentes significativas.

✏ Cálculo de la incertidumbre global expandida

La incertidumbre expandida, U, representa *la incertidumbre que define un intervalo sobre el resultado de una medida que puede esperarse que incluya una gran fracción de la de los valores que puedan ser atribuidos al mesurando* y se calcula multiplicando la incertidumbre estándar por el factor de seguridad o cobertura k (Tabla 1 del Anexo D):

$$U_{GLOBAL} = k \cdot u_{GLOBAL} \qquad \text{(IV-4)}$$

Esta operación tiene por objeto aumentar el intervalo de confianza como consecuencia de utilizar como representativo un estimado de la SD poblacional, σ, calculado a partir de una muestra reducida de datos experimentales, que se representa por s.

Los posibles valores que puede tomar el factor k depende del tipo de distribución comprobada sobre el resultado, que generalmente corresponde a una distribución normal ya que, si la incertidumbre final estimada se obtiene a partir de varias componentes, se cumplen las condiciones del Teorema Central de Límite. Así el factor de cobertura puede ser:

- Cuando se puede atribuir la distribución normal al mesurando, y la incertidumbre tiene la suficiente fiabilidad (la estimación de la SD, en caso de incertidumbres de tipo A, se ha hecho con no menos de 10 medidas repetidas), debe utilizarse el factor de cobertura usual de k=2, que proporciona una probabilidad de cobertura a la incertidumbre expandida del 95% (o de k=3 para un 99%). Estas condiciones se cumplen en la mayoría de los casos.

- Si no se cumple alguna de las condiciones anteriores debe utilizarse un valor que mantenga aproximadamente la probabilidad de cobertura al valor deseado (usualmente al 95%).

  Para ello pueden ocurrir dos casos:

  - Si no se puede justificar la normalidad de los datos, es necesario utilizar información sobre la distribución de probabilidad real del mesurando.

  - Aunque se admita la normalidad, si no se tiene suficiente fiabilidad en la estimación de la incertidumbre, y no se puede aumentar el número de

medidas para las estimaciones de tipo A poco fiables, o utilizar en su lugar estimaciones B (éstas siempre se consideran fiables), debe utilizarse el valor aproximado calculado a partir de los grados de libertad efectivos definidos por la ecuación de Welch-Satterwhaite[14,15]:

$$\nu = \frac{u^4}{\sum u_i{}^4(x)/\nu_i} \qquad \text{(IV-5)}$$

donde u es la incertidumbre estándar global, $u_i(x)$ representa cada una de las componentes significativas de incertidumbre estándar y ν_i son los grados de libertad asociados. En el caso de incertidumbres de tipo A, los grados de libertad vienen dados por $\nu_i = n_i - 1$, mientras que para las incertidumbres de tipo B se puede considerar que $\nu_i = \infty$, con lo cual los correspondientes términos del sumatorio se hacen nulos. El valor obtenido de los grados de libertad efectivos, ν_{ef}, que suele ser un número decimal, debe siempre redondearse al número entero más pequeño.

El cálculo de la incertidumbre expandida siempre debe hacerse sobre el resultado final, y no sobre las incertidumbres estándar de las componentes, a fin de no añadir incertidumbre "extra" debida al uso de cifras significativas incorrectas.

3. INCERTIDUMBRE DE CALIBRACIÓN Y TOLERANCIAS REQUERIDAS: DECLARACIONES DE CONFORMIDAD

Como comentamos en la introducción, la calibración de un equipo da lugar a una doble información:

- ✗ por una lado la desviación con relación al patrón, expresada como Sesgo o Corrección:

14. Welch B.L; *J.R. Stat. Soc. Suppl.*, 3, 29-48, 1936; *Biometrika*, 29, 350-362, 1938; *ibid.*, 34, 28-35, 1947.
15. Satterthwaite F.E.; *Psychometrika*, 6, 309-316, 1941; *Biometrics Bull*, 2(6), 110-114, 1946.

- ✗ por otro lado la incertidumbre de calibración, que expresa el error máximo que se puede cometer debido a las propias características intrínsecas del equipo y del patrón de calibración:

La suma de ambas magnitudes, en valor absoluto, nos da la denominada **Tolerancia de calibración**, que mide la magnitud del máximo error posible con relación al patrón:

Tolerancia calibración = |Corrección| + Incertidumbre expandida

Este valor de tolerancia de calibración puede servir como parámetro para definir la conformidad de un equipo con relación a unos requerimientos previamente impuestos por el procedimiento de medida (ensayo) o establecidos por el laboratorio en su programa de mantenimiento. Estos requerimientos también se expresan como error máximo o tolerancia.

La declaración de conformidad de un equipo se basa en una comparación en dos etapas:

1. Comprobar que: **Tolerancia calibración < Error máximo permitido**

   En el caso de que se cumpla, el equipo es conforme y se puede utilizar sin reservas. Por el contrario, si no se cumple, es necesario realizar una segunda comparación.

2. Comprobar que: **Incertidumbre calibración < Error máximo permitido**

   En el caso de que sea cierta, el equipo es conforme siempre y cuando se corrijan las medidas en un valor dado por el sesgo de calibración (corrección o factor de corrección). Si tampoco se cumple, el equipo no es apto para el ensayo considerado y es necesario darlo de baja y someterlo a mantenimiento correctivo.

Esta estrategia es sumamente útil en el caso de material volumétrico, ya que es necesario verificarlo a la entrada (por sondeo) y se acepta si se cumple la proposición 1, y en caso contrario se desecha. Existen varias propuestas sobre tolerancias (o errores máximos) permitidos dependiendo del tipo de material y del volumen nominal.

4. CONTRIBUCIÓN DEL SESGO A LA INCERTIDUMBRE GLOBAL

La mayoría de las fuentes de error (muestras, equipos, patrones, ...) introducen efectos sistemáticos o **sesgos**[16] en el resultado, pero generalmente éstos no son significativos. En estos casos, que son la mayoría en análisis químico, el sesgo evaluado se introduce como una componente más de incertidumbre. Sin embargo, cuando los errores sistemáticos conocidos son significativos, han de ser evaluados, y éstos se pueden incluir como una componente de incertidumbre, o bien, más habitualmente, se corrigen durante la etapa de tratamiento de datos. Esta corrección en sí misma introduce una incertidumbre extra que también será necesario considerar en la incertidumbre estimada del resultado, sin embargo, la incertidumbre asociada a esta operación siempre será significativamente inferior al propio error sistemático y por tanto la incertidumbre total será menor. No obstante, este caso genérico de la realización de correcciones, que puede ser relativamente frecuente en el campo de las medidas físicas, no es habitual para las medidas químicas.

La evaluación de la significación del sesgo se realiza utilizando dos etapas:

1.- Analizar (o medir) repetidamente una muestra (o material) cuyo mesurando es previamente conocido, C_{ref}, con una incertidumbre declarada, u_{ref} .

2.- Comparar el resultado obtenido, C_{obt}, (con su correspondiente desviación estándar, s, obtenida a partir de r réplicas) con el valor de referencia mediante un sencillo test estadístico. C_{obt} y C_{ref} pueden ser tanto concentraciones como contenidos en muestras.

En el ámbito de los análisis químicos, el sesgo se suele identificar habitualmente a través de la *Recuperación*[17], por lo tanto viene dado por:

$$\Re = \frac{C_{obt}}{C_{ref}} \quad \Rightarrow \quad \text{SESGO} = \left(1 - \frac{1}{\Re}\right) \cdot C_{obt} \qquad \text{(IV-6)}$$

16. ISO 3534-1: *Statistics – Vocabulary and symbols.* ISO, Geneva, 1996.
17. Burns D.J., Townshend A. and Danzer K., *Recommendation for the term recovery in analytical procedures*, IUPAC, Draft, 2001.

y la incertidumbre asociada al sesgo se obtiene con la expresión:

$$u(SESGO) = \sqrt{\frac{(C_{obt})^2}{\Re^4} \cdot u^2(\Re) + \left(1 - \frac{1}{\Re}\right)^2 \cdot u^2(C_{obt})} \qquad \text{(IV-7)}$$

siendo u(ℜ) la incertidumbre asociada a la recuperación, la cual depende de la tolerancia del material de referencia, u(tolerancia), y de la desviación estándar de la recuperación dividida por la raíz del número de réplicas, u(rec):

$$u(\Re) = \sqrt{u^2(\text{tolerancia}) + u^2(\text{rec})} \qquad \text{(IV-8)}$$

El test estadístico de significación del sesgo se plantea, de forma general, utilizando como valor de k el correspondiente a los grados de libertad efectivos asociados u_{sesgo}, que usualmente deberá ser el valor 2:

$$\frac{SESGO}{u(SESGO)} \leq k \quad \Rightarrow \quad \textit{No significativo}$$

$$\frac{SESGO}{u(SESGO)} > k \quad \Rightarrow \quad \textit{Significativo}$$

Cuando el test concluye que el sesgo no es significativo, quiere decir que su valor es indistinguible dentro la propia dispersión de valores característicos de dicha estimación.

Dependiendo del resultado obtenido, pueden ocurrir dos situaciones:

- **Sesgo no significativo "NS":** la corrección de los resultados no es necesaria y el término u(ℜ) será incluido en la ecuación de la incertidumbre:

$$C_{NS} = C_{obt} \quad \Leftrightarrow \quad u_{rel}(C_{NS}) = \sqrt{u_{rel}^2(C_{obt}) + u_{rel}^2(\Re)} \qquad \text{(IV-9)}$$

- **Sesgo significativo**: en este caso será necesario decidir entre corregir el resultado obtenido con la recuperación o no realizar corrección, así tendremos que:

  - *Si el resultado es corregido "C"*, la desviación estándar relativa de la recuperación será incluida en la ecuación global:

$$C_C = \frac{C_{obt}}{\Re} \quad \Leftrightarrow \quad u_{rel}(C_C) = \sqrt{u_{rel}^2(C_{obt}) + u_{rel}^2(\Re)} \qquad \text{(IV-10)}$$

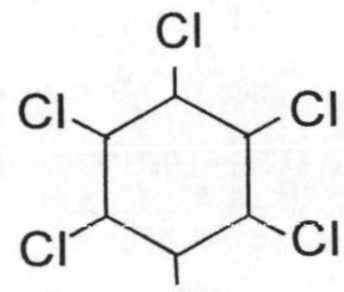
☞ *Si el resultado no es corregido "NC",* el valor relativo del sesgo se considera como una contribución a la incertidumbre.

$$C_{NC} = C_{obt} \quad \Leftrightarrow \quad u_{rel}(C_{NC}) = \sqrt{u_{rel}^2(C_{obt}) + (SESGO)_{rel}^2} \qquad \text{(IV-11)}$$

5. INCERTIDUMBRE ASOCIADA AL CONTENIDO DE LINDANO EN PIMIENTO

En este apartado vamos a establecer una sencilla metodología para estimar la incertidumbre, según las indicaciones dadas en las guías GUM[1] y EURACHEM[2], asociada al contenido de Lindano en muestras de pimiento, basada en el análisis multiresiduos de plaguicidas por cromatografía de gases[13].

Este plaguicida contiene el isómero gamma del hexaclorociclohexano (γ-HCH) en una cantidad superior al 99%. Según la nomenclatura de la IUPAC es el (1α, 2α, 3β, 4α, 5α, 6β)-1,2,3,4,5,6-hexacloro-ciclohexano. El γ-HCH es un sólido cristalino incoloro que se aísla por cristalización selectiva de la mezcla de isómeros del HCH, producidos por cloración del benceno bajo luz ultravioleta. Su punto de fusión de 113 °C y presión de vapor de 5,6 mPa a 20 °C. Este compuesto es muy estable a la luz, aire, temperatura de hasta 180 °C y a los ácidos mientras que es inestable en presencia de medio alcalino. Es un insecticida de elevada persistencia, con actividad por ingestión, contacto e inhalación.



Lindano

5.1. Determinación de Lindano en pimiento por CG

5.1.1. Reactivos y materiales

Los patrones de Lindano y estándar interno (dieldrin) ambos de una pureza del 99,4% y 99,9%, respectivamente y una tolerancia del 0,10 % se obtuvieron de Dr. Ehrenstorfer. El disolvente utilizado para la extracción fue diclorometano y el utilizado para la preparación de las disoluciones patrón fue ciclohexano y n-hexano. Además se utilizó sulfato sódico anhidro para deshidratar las muestras. Todos ellos fueron proporcionados por Panreac.

5.1.2. Equipos

Los análisis se llevaron a cabo por cromatografia de gases utilizando para ello un cromatógrafo Hewlett-Packard (Modelo 5890) equipado con un detector de captura electrónica (ECD ^{63}Ni). El cromatógrafo disponía de una columna capilar HP-1 de fase no polar (100% dimetilpolisiloxano) sobre sílice fundida de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0.22 μm de espesor de fase, suministrado por Hewlett-Packard.

Las temperaturas fueron optimizadas en cada sección del cromatógrafo: 250ºC para el inyector (se seleccionó el modo splitless con un tiempo de 2 min que proporcionaba la mejor señal sin que las columnas llegaran a saturarse) y 350ºC para el detector. Para la temperatura del horno se utilizó una rampa de temperatura empezando con 180ºC durante 5 min., aumentado 3ºC por minuto hasta 250ºC y a esta temperatura se mantuvo constante durante 2 min. El gas del portador fue N_2 de alta pureza a un flujo de 10 ml por minuto.

En el proceso de extracción de Lindano en la muestra, se utiliza un homogeneizador Polytron a 10000 rpm.

Las características del material volumétrico, micropipetas y balanzas utilizadas en todo el procedimiento figuran en la tabla 1 del Anexo C1.

5.1.3. Extracción de Lindano

El método de extracción utilizado consiste en mezclar 50 g de muestra picada ($m_{muestra}$) con 100 g de sulfato sódico anhidro y 105 ml de diclorometano. La mezcla es homogeneizada durante 2 min y entonces filtrada a través de un papel de filtro en un matraz esférico de 250 ml y a continuación lavada dos veces con una cantidad de 20 ml de diclorometano.

La mezcla fue introducida en un baño de agua a 40 °C y acoplada a un rotavapor para llevarla casi a sequedad terminando de secar el extracto con una corriente de N_2. Una vez que el extracto esta totalmente seco se disuelve con 5 ml de ciclohexano ($V_{muestra}$). Se toma 1 ml (VP_3) y se diluye con 3 ml de n-hexano (VP_4). En un matraz de 2 ml se añade 0,1 mg/l de estándar interno (dieldrin), se enrasa con la solución anterior y 1 µl de esta disolución se inyecta en el cromatógrafo.

5.1.4. Procedimiento analítico

La medida del porcentaje de recuperación de los plaguicidas en la matriz analizada, exige reproducir en los estudios realizados las mismas condiciones en que se van a encontrar dichos analitos en los extractos procedentes de muestras reales. En el estudio realizado se ha llevado un calibrado con patrón interno (IC) aunque, en todo momento, nos referiremos a la calibración con patrón externo (EC) utilizando la metodología de patrón interno, que es la utilizada para cuantificar la concentración de Lindano en la muestras y determinar la extensión de la influencia de la matriz.

Para ello en primer lugar se prepara la disolución madre de Lindano pesando 12,5 mg (m_p) y llevándolo a un volumen final de 50 ml (VM_1), C_{madre} = 250 mg/l, a continuación se realiza una dilución para obtener una disolución con todos los plaguicidas. En el caso de Lindano se toman 2 ml (VP_1) de la disolución madre y se llevan a 50 ml (VM_2).

El procedimiento de calibración se lleva a cabo preparando disoluciones que contengan cantidades crecientes de patrón de Lindano al que se le añade el estándar interno en una concentración de 0,1 mg/l. Se preparan cuatro patrones de calibrado, con tres réplicas cada uno, tomando los volúmenes de 50, 100, 150 y

200 µl (VP_2) y enrasando con n-hexano en un matraz de 2 ml (VM_3), con lo que se obtiene concentraciones de 0,25, 0,50, 0,75 y 1,00 mg/l.

Para el estudio de recuperación se adiciona a la matriz de pimiento, Lindano de concentración 0,5 mg/l antes de la extracción. Las muestras adicionadas se extraen usando el procedimiento descrito en el apartado anterior.

5.2. Componentes de incertidumbre

El contenido de analito, CONT, vendrá dado por la expresión:

$$\text{CONT} = \frac{C_{est} \cdot F_{vol}}{C_{muestra}} \cdot \Re \qquad \text{(IV-12)}$$

donde C_{est} es la concentración de analito estimada a partir del calibración establecido; $C_{muestra}$ es la concentración de muestra de la disolución original, $\Re$ es la recuperación (que no se considera a priori) y F_{vol} es el factor volumétrico debido al tratamiento de muestra, definido como:

$$F_{vol} = \frac{\text{Volumen final}}{\text{Volumen inicial}} = \frac{VP_3 + VP_4}{VP_3} \qquad \text{(IV-13)}$$

La incertidumbre global de la determinación del contenido de analito en una muestra, según el procedimiento general descrito, se obtiene combinando las incertidumbres relativas correspondientes a las tres componentes asociadas:

- a la estimación de la concentración de Lindano a partir del calibrado, $u(C_{est})$;
- al cálculo del factor volumétrico de la disolución de muestra, $u(F_{vol})$;
- al cálculo de la concentración de muestra a analizar, $u(C_{muestra})$.

$$u_{rel}(\text{CONT}) = \sqrt{u_{rel}^2(C_{est}) + u_{rel}^2(F_{vol}) + u_{rel}^2(C_{muestra})} \qquad \text{(IV-14)}$$

Una representación de las contribuciones individuales a la incertidumbre puede obtenerse a través de un diagrama causa-efecto o *Diagrama de Ishikawa*[18] (Figura IV.1):

18. Ellison S.L.R. and Barwick V.J., *Analyst*, 123, 1387, 1998.

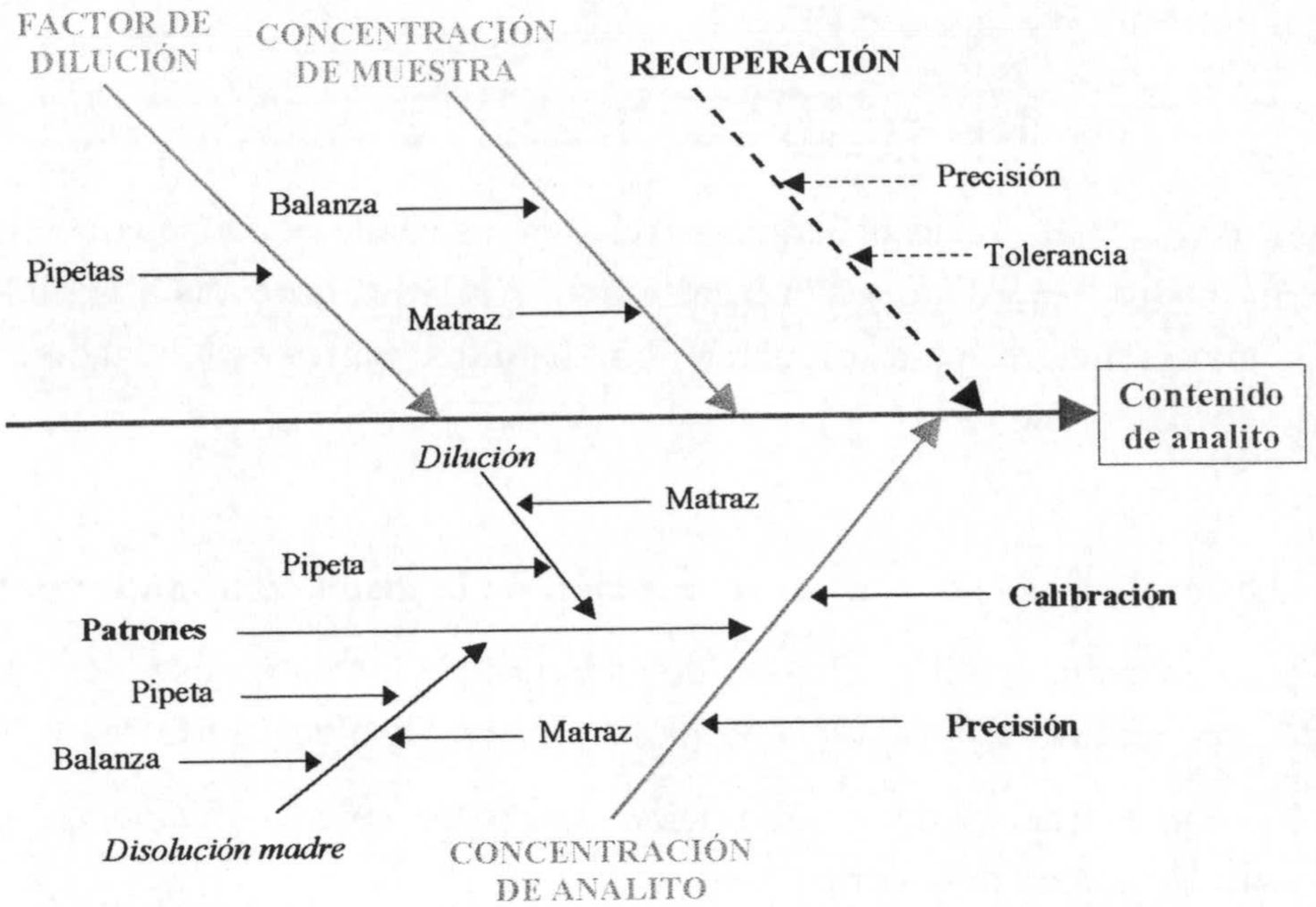


Figura IV.1
Diagrama causa-efecto *(Diagrama de Ishikawa)*

5.2.1. Incertidumbre asociada a la estimación de la concentración de Lindano a partir del calibrado

Esta incertidumbre es una combinación de la debida a la asignación de la concentración de patrón, u(patrón), a la asociada a la transformación de señales en concentraciones, es decir al establecimiento de la ecuación de calibrado, u(func), y a la precisión del análisis, u(prec). En forma esquemática:

$$u(C_{est}) = \sqrt{u^2(\text{patrón}) + u^2(\text{func}) + u^2(\text{prec})} \qquad \text{(IV-15)}$$

❑ Incertidumbre asociada al patrón

La incertidumbre asociada al patrón es característica del valor de cada uno de ellos. Se puede calcular para el más próximo a la muestra (para un cálculo particular) o, en general, calcularla para todos los patrones.

De cualquier forma se obtiene (sí sólo se realiza una única dilución del patrón) a partir de la ecuación:

$$u(\text{patrón}) = C_{\text{patrón}} \cdot \sqrt{u_{rel}{}^2(C_{\text{madre}}) + u_{rel}{}^2(\text{diluc})} \qquad \text{(IV-16)}$$

donde $u_{rel}(C_{madre})$ es la incertidumbre relativa asociada a la separación de la disolución madre y $u_{rel}(diluc)$ es la incertidumbre relativa asociada a la dilución de esta disolución madre para preparar los distintos patrones utilizados con el calibrado correspondiente.

➢ **Incertidumbre asociada a la preparación de la disolución madre patrón**

Ésta es característica del valor de cada uno de los patrones y depende de la incertidumbre relativa asociada a la preparación de la disolución madre.

La concentración de la disolución madre se calcula dividiendo la masa pesada por el volumen del matraz:

$$C_{\text{madre}} = \frac{m_p}{VM_1} = \frac{12{,}5 \text{ mg}}{0{,}05 \text{ l}} = 250 \text{ mg/l} \qquad \text{(IV-17)}$$

La incertidumbre se calcula por tanto como contribución de la incertidumbre debida al uso de la balanza analítica (u(m) = U/2) y la debida a las características del matraz de 50 ml ($u(VM_1)$ = TOLERANCIA/$\sqrt{3}$).

$$u_{rel}(C_{\text{madre}}) = \sqrt{u_{rel}^2(m_p) + u_{rel}^2(VM_1)} = \sqrt{\left(\frac{1/2}{12{,}5}\right)^2 + \left(\frac{0{,}05/\sqrt{3}}{50}\right)^2} = 0{,}040 \qquad \text{(IV-18)}$$

➢ **Incertidumbre asociada a la dilución**

A partir de la disolución madre, se realizan dos diluciones, la primera para obtener una disolución con todos los plaguicidas y la segunda para obtener la concentración final del patrón en la curva de calibración.

La incertidumbre asociada a las micropipetas, dado que no tenemos el correspondiente valor de tolerancia, se calcula como: ***corrección/√3 + u***.

Así para el primer volumen tomado con micropipeta (VP_1 = 2000 µl) será:

$$u(VP_1)_{2000} = 2 \cdot u(VP_1)_{2000} = 4{,}3$$

$$u(VP_1)_{1000} = \frac{\text{corrección}}{\sqrt{3}} + CV \cdot \text{nominal} = \frac{-1{,}47}{\sqrt{3}} + 0{,}003 \cdot 1000 = 2{,}15$$

En el caso del segundo volumen tomado con micropipeta, vamos a considerar el segundo punto del calibrado ($C_{patrón}$ = 0,5 mg/l, VP_2 = 100 µl), pues es el que más se aproxima al valor estimado. Extrapolando entre los dos valores más cercanos se obtiene:

$$u(VP_2) = \frac{\text{corrección}}{\sqrt{3}} + CV \cdot \text{nominal} = \frac{-0{,}35}{\sqrt{3}} + 0{,}0023 \cdot 100 = 0{,}028$$

Por lo tanto el factor de dilución y su incertidumbre asociada valen:

$$\text{diluc} = \frac{VP_1}{VM_2} \cdot \frac{VP_2}{VM_3} = \frac{2}{50} \cdot \frac{0{,}1}{2} = 0{,}002 \qquad \text{(IV-19)}$$

$$u_{rel}(\text{dil}) = \sqrt{u_{rel}^2(VP_1) + u_{rel}^2(VM_2) + u_{rel}^2(VP_2) + u_{rel}^2(VM_3)} =$$

$$= \sqrt{\left(\frac{4{,}3}{2000}\right)^2 + \left(\frac{0{,}05/\sqrt{3}}{50}\right)^2 + \left(\frac{0{,}028}{100}\right) + \left(\frac{0{,}025/\sqrt{3}}{2}\right)^2} = 0{,}008$$

Combinando ambas contribuciones se obtiene que la incertidumbre asociada a la preparación de los patrones para el calibrado EC es:

$$u_{rel}(\text{patrón}) = \sqrt{u_{rel}^2(C_{madre}) + u_{rel}^2(\text{dil})} = \sqrt{(0{,}040)^2 + (0{,}008)^2} = 0{,}041$$

$$u(\text{patrón}) = 0{,}041 \cdot 0{,}331 \text{ mg/l} = 0{,}014 \text{ mg/l}$$

❑ Incertidumbre asociada a la calibración

Ésta se calcula aplicando la ecuación característica del análisis de la regresión lineal simple por mínimos cuadrados [19] (LSR), los datos experimentales y los parámetros de regresión aparecen en la tabla 2 del Anexo C1:

$$u(\text{func}) = \frac{1}{b} \cdot \sqrt{s_{res}^2 \cdot \frac{1}{n} + d_C{}^2 \cdot s(b)^2} = 0{,}020 \text{ mg/l} \qquad \text{(IV-20)}$$

19. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M. and Bosque Sendra J.M., *Analytical Letters*, 29, 1231, 1996.

donde b es la pendiente de la curva de calibrado, s(b) es la desviación estándar asociada a la pendiente, s_{res} es la desviación estándar residual, n el número de datos experimentales y $d_C = (C_{est} - \overline{C})$ siendo $C_{est} = 0{,}331$ mg/l la concentración estimada (valor medio de las concentraciones dadas en la tabla 3 del Anexo C1) y $\overline{C}$ el valor medio de las concentraciones.

❑ **Incertidumbre asociada a la precisión**

Esta incertidumbre, calculada a partir de las señales analíticas de 9 alícuotas de muestras adicionadas a una concentración de 0,5 mg/l analizadas en condiciones de repetibilidad (Tabla 3 del Anexo C1):

$$u(prec) = \frac{s_r}{\sqrt{n_r}} = \frac{0{,}044}{\sqrt{1}} = 0{,}044 \text{ mg/l} \qquad \text{(IV-21)}$$

siendo s_r la desviación estándar asociada a la concentración estimada de las 9 réplicas y n_r el número de réplicas de cada muestra en análisis de rutina.

Por lo tanto, combinando las tres contribuciones se obtiene que la incertidumbre asociada a la concentración estimada por el calibrado EC es:

$$u(C_{est}) = \sqrt{u^2(\text{patrón}) + u^2(\text{func}) + u^2(\text{prec})} = 0{,}025$$

$$u_{rel}(C_{est}) = \frac{0{,}025 \text{ mg/l}}{0{,}331 \text{ mg/l}} = 0{,}075$$

5.2.2. Incertidumbre asociada al factor volumétrico

El factor volumétrico, definido en la ecuación IV-13, depende de los volúmenes tomados con la micropipeta de 1000 µl, por lo que se obtiene:

$$F_{vol} = \frac{VP_3 + VP_4}{VP_3} = \frac{1000 + 3000}{1000} = 4 \qquad \text{(IV-22)}$$

Igual que en el caso anterior, la incertidumbre asociada a las micropipetas se calcula a partir de:

$$u(VP_3) = \frac{\text{corrección}}{\sqrt{3}} + CV \cdot \text{nominal} = \frac{-1,47}{\sqrt{3}} + 0,003 \cdot 1000 = 2,15$$

$$u(VP_4) = 3 \cdot u(VP_3) = 6,45$$

Por lo tanto, la incertidumbre relativa asociada al factor volumétrico se calcula como:

$$u_{rel}(F_{vol}) = \sqrt{u_{rel}^2(VP_3 + VP_4) + u_{rel}^2(VP_3)} =$$

$$= \sqrt{\left(\frac{\sqrt{(2,15)^2 + (6,45)^2}}{4000}\right)^2 + \left(\frac{2,15}{1000}\right)^2} = 0,003 \qquad \text{(IV-23)}$$

5.2.3. Incertidumbre asociada a la concentración de la disolución de muestra

Puesto que la concentración de muestra viene dada por el cociente entre la muestra pesada y el volumen en el que se disuelve y su incertidumbre por la contribución de ambas componentes:

$$C_{muestra} = \frac{m_{muestra}}{V_{muestra}} = \frac{50\ g}{5\ ml} = 10\ g/ml = 10\ Kg/l \qquad \text{(IV-24)}$$

$$u_{rel}(C_{muestra}) = \sqrt{u_{rel}^2(m_{muestra}) + u_{rel}^2(V_{muestra})} =$$

$$= \sqrt{\left(\frac{(0,033/\sqrt{3})}{50}\right)^2 + \left(\frac{(0,015/\sqrt{3})}{5}\right)^2} = 0,002$$

5.3. Incertidumbre combinada

En la tabla IV.1 se recoge los valores de las incertidumbres de todas las contribuciones. El contenido de Lindano en muestra, así como su incertidumbre asociada valen:

$$CONT = \frac{C_{est} \cdot F_{vol}}{C_{muestra}} = \frac{0,330\ mg/l \cdot 4}{10\ Kg/l} = 0,132\ mg/Kg$$

$$u_{rel}(CONT) = \sqrt{u_{rel}{}^2(C_{est}) + u_{rel}{}^2(F_{vol}) + u_{rel}{}^2(C_{muestra})} = 0{,}075$$

Como se muestra la figura IV.2, la contribución más significativa es la debida a la estimación de la concentración de Lindano a partir del calibrado y dentro de ésta, la debida a los patrones y a la propia función.

Tabla IV.1

Contribuciones a la incertidumbre combinada

Componente	Incertidumbre (mg/l)	Incertidumbre relativa
C_{est}	—	0,075
Patrón	0,014	0,027
Función	0,020	0,041
Precisión	0,044	0,009
F_{vol}	—	0,003
$C_{muestra}$	—	0,002

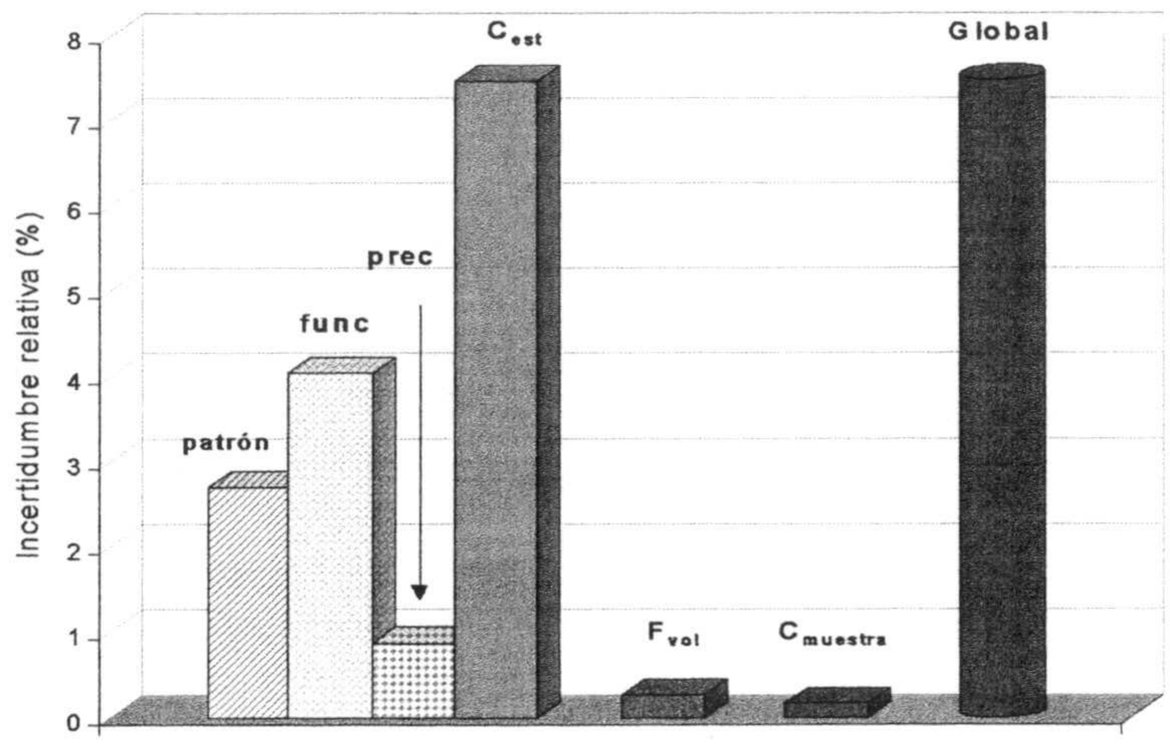


Figura IV.2.

Contribuciones a la incertidumbre asociada al contenido de Lindano en pimiento

5.4. Corrección de los resultados por recuperación

Una vez calculada la incertidumbre global como suma de las tres contribuciones consideradas anteriormente, hay que precisar que el valor así calculado parte del supuesto que no existe sesgo en la determinación. Sin embargo, este hecho hay que constatarlo para lo cual es necesario comprobar la significación del sesgo asociado a la determinación, a través de la recuperación encontrada (Tabla 3, Anexo C1).

Como ya vimos, el sesgo puede ser expresado como:

$$\text{SESGO} = \left(1 - \frac{1}{\Re}\right) \cdot \text{CONT} = \left(1 - \frac{1}{0{,}661}\right) \cdot 0{,}132 = -0{,}068 \text{ mg / Kg}$$

siendo $\Re$ = 66,1% ($s_{\Re}$ = 1,0%) el valor medio de los datos que se recogen en la tabla 3 del Anexo C1.

La incertidumbre asociada al sesgo depende de las incertidumbres asociadas a la recuperación y al contenido de Lindano, obteniéndose mediante la expresión:

$$u(\text{SESGO}) = \sqrt{\frac{\text{CONT}^2}{\Re^4} \cdot u^2(\Re) + \left(1 - \frac{1}{\Re}\right)^2 \cdot u^2(\text{CONT})} = 0{,}006$$

siendo:

$$u(\Re) = \sqrt{u^2(\text{tolerancia}) + u^2(\text{rec})} = \sqrt{\frac{0{,}001^2}{\sqrt{3}} + \frac{0{,}009^2}{\sqrt{1}}} = 0{,}009$$

Para comprobar la veracidad, se comprueba la significación del sesgo, y para k =2 se concluye que el sesgo es significativo:

$$\frac{|\text{SESGO}|}{u(\text{SESGO})} = 11{,}8 \quad > \quad k = 2 \quad \Rightarrow \quad \textit{Significativo}$$

por lo tanto, tendremos dos opciones para expresar el resultado:

☞ *Si corregimos el resultado*, obtenemos que la desviación estándar relativa de la recuperación será incluida en la ecuación global:

$$CONT_C = \frac{CONT}{\Re} = 0{,}2 \text{ mg/Kg}$$

$$u_{rel}(CONT)_C = \sqrt{u^2_{rel}(CONT) + u^2_{rel}(\Re)} = 0{,}075$$

El contenido de Lindano en pimiento será por tanto:

CONT = 0,20 ± 0,03 mg/Kg (k = 2)

☞ *Si no corregimos el resultado*, el valor relativo del sesgo se considera como una contribución a la incertidumbre.:

$$CONT_{NC} = CONT = 0{,}13 \text{ mg/Kg}$$

$$u_{rel}(CONT)_{NC} = \sqrt{u^2_{rel}(CONT) + (SESGO)^2_{rel}} = 0{,}518$$

El contenido de Lindano en pimiento será:

CONT = 0,13 ± 0,14 mg/Kg (k =2)

6. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en el apartado anterior, no corregir el resultado aumenta considerablemente la incertidumbre (Figura IV.3), esto es debido a que la diferencia entre el valor estimado y el valor real (sesgo) es muy elevado, es decir la cuantificación con el calibrado EC proporciona valores muy alejados del contenido real de Lindano en la muestra que se reflejan en la incertidumbre.

Por lo tanto, una corrección del contenido de Lindano en la muestra proporciona una incertidumbre expandida relativa, $U_{rel}(CONT)_C$ = 15,1 % mientras que si el contenido en la muestra no es corregido con la recuperación se obtiene una incertidumbre superior al 100% ($U_{rel}(CONT)_{NC}$ = 103,7 %), por lo

que en este caso será necesario corregir el resultado, proporcionando valores aceptables, tanto del contenido de Lindano como de su incertidumbre asociada.

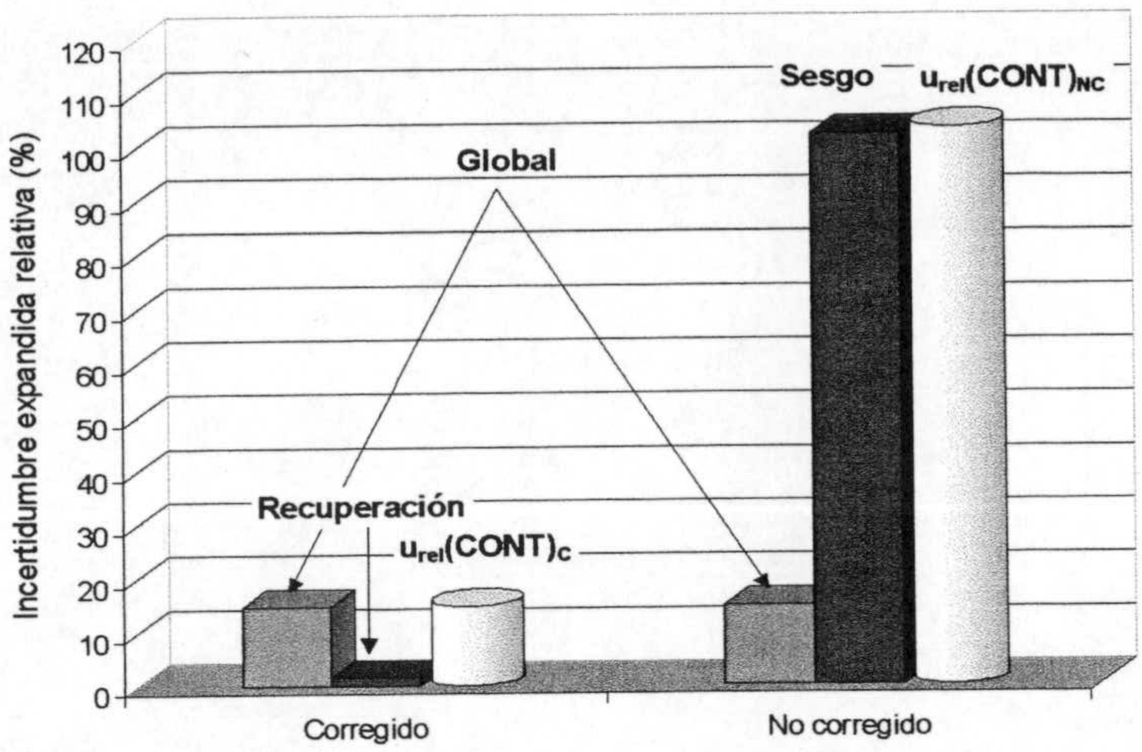


Figura IV.3.

Comparación de las incertidumbres expandidas relativas asociada al contenido de Lindano en pimiento mediante corrección del resultado por recuperación

Este efecto puede incrementarse si las muestras tienen una concentración o contenido de Lindano cercano al punto de calibración más bajo, el cual se establece sobre la base de los requisitos de los límites máximos permitidos de residuos de plaguicidas (MRLs), ya que se ha observado que para niveles bajos de concentración, la incertidumbre aumenta considerablemente dado que una de las componentes más significativas es la debida a la función de calibración.

Bloque II

ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo V

ESTABLECIMIENTO DE LA FUNCIÓN DE CORRECCIÓN

1. ANTECEDENTES

En general, dependiendo de la relación entre las magnitudes de los valores implicados y del objetivo de la calibración, pueden definirse dos tipos de calibración[1]:

- *Calibración directa.* Cuando el patrón y el valor medido se expresan en las mismas unidades. El propósito principal es conocer la desviación de la medida respecto al instrumento o al proceso en relación al patrón. Si esta diferencia o desviación es constante, entonces normalmente se aplica una *Corrección*[2] de la medida (*valor del patrón – valor medido*), pero si esta desviación es proporcional al valor medido debe aplicarse un *Factor de la Corrección* (valor de referencia / valor medido).

- *Calibración indirecta.* El objetivo tradicional de la calibración[2,3] en Química Analítica implica el establecimiento de una relación funcional entre la respuesta instrumental y un valor dado correspondiente a un patrón. El instrumento proporciona una magnitud diferente que el correspondiente patrón. La calibración consiste en una translación de la respuesta a la cantidad determinada; esta translación se establece mediante una relación matemática entre ambas variables como un *Factor de Calibración*[1] (*repuesta / valor del patrón*).

La Corrección, Factor de Corrección o Factor de Calibración, estimados de una calibración directa o indirecta, se deben referir solamente al punto de calibración al cual ha sido establecido. En este sentido, para conocer el comportamiento del equipo o del proceso analítico a lo largo de un rango específico de valores, es necesario establecer una calibración mediante diferentes patrones y estimarlo para cada uno de ellos. La calibración para cualquier otro

1. *International vocabulary of basic and general terms in Metrology* (VIM). ISO, Geneva, 1997.
2. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E. and Laso Sánchez J., *Trends Anal. Chem.*, 20, 195-206, 2001.
3. ISO 11095: *Linear calibration using reference materials.* ISO, Geneva, 1996.

punto, incluido en este rango, se obtiene por interpolación de los valores obtenidos experimentalmente utilizando el apropiado algoritmo matemático o por medio de una regresión (lineal, polinómica, exponencial, etc.).

Los estudios de recuperación[4,5] se pueden considerar como un ejemplo de calibración directa de procesos analíticos y normalmente se llevan a cabo para comprobar la veracidad, pero en raras ocasiones se utilizan para corregir los valores obtenidos. La recuperación es una estimación del error sistemático del proceso global, pero sin considerar si este error es una consecuencia de los cambios en la cantidad de analito (perdido o contaminado) o es debido al efecto matriz (que afecta a la respuesta analítica). Por tanto, como hemos visto en el capítulo anterior, se puede utilizar para corregir los resultados analíticos obtenidos al nivel de concentración seleccionado, no pudiéndose extrapolar a otros niveles, dado que normalmente la recuperación varía a lo largo del rango estudiado en el método analítico.

En el caso de una calibración indirecta es usual establecer una *Función de Calibración*[1] (Respuesta = función matemática de los valores del patrón), siendo los métodos estadísticos de regresión los más utilizados para obtener la mejor función de calibración (o curva de calibrado) mediante ajuste de los datos experimentales a un modelo matemático teórico previamente seleccionado[6,7]. La curva de calibrado seleccionada permite explicar la variabilidad de los datos y realizar interpolaciones dentro del rango estudiado. Además, seleccionando una metodología de calibración apropiada[8] en la calibración analítica de un instrumento, es posible resolver varios problemas relacionados con el efecto matriz, considerado como la perturbación producida por componentes de la muestra diferentes al analito en el sistema de la medida o en la respuesta analítica, que produce un error sistemático en la medida.

---

4. *Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement.* IUPAC Technical Report, Pure Appl. Chem., 71, 337-348, 1999.
5. *Recommendation for the term "recovery" in analytical procedures.* IUPAC current project. Draft 2001.
6. ISO 8466-1: *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*. ISO, Geneva, 1990.
7. *Guidelines for calibration in analytical chemistry, Part 1: Fundamentals and single component calibration.* Pure Appl. Chem., 70, 993-1014, 1998.
8. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E. and Bosque Sendra J.M., *Trends Anal. Chem.*, 20, 620-636, 2001.

Como consecuencia, el efecto matriz puede aumentar el nivel de errores aleatorios disminuyendo la resolución analítica y/o puede introducir errores sistemáticos constantes (si afectan al blanco analítico) o proporcionales a la concentración del analito (si modifican la sensibilidad del método). Éstos influyen en la exactitud de los resultados porque se modifica la precisión (primer caso) y/o la veracidad (segundo caso) y conlleva que se obtengan resultados sesgados.

Cuando el efecto matriz no es significativo, es aceptable realizar una calibración de patrón externo (EC), mientras si el efecto matriz es significativo, es necesario, para corregir el error sistemático introducido por el efecto matriz, corregir el resultado por recuperación o establecer, para cada muestra particular, una curva de calibración con patrón en matriz (MC) utilizando materiales de referencia tipo matriz, de composición similar a las muestras[9] pero libre de analito.

Una alternativa a las dos metodologías mencionadas es la que proponemos en este capítulo, basado en el establecimiento de una **Función de Corrección**[10] **(CF)** que implica dos calibraciones; por un lado una calibración indirecta mediante el uso de un calibrado con patrones externos y por otro la aplicación de dicha Función de Corrección, que es una calibración directa, para corregir los resultados cuando el efecto matriz es significativo.

La Función de Corrección permite obtener el valor real del analito a partir de la medida obtenida, junto con su incertidumbre, proporcionando validez a las correcciones realizadas cuando ésta es aplicada. La incertidumbre[11] asociada a la estimación de la concentración al aplicar esta Función de Corrección, se calcula de la estimación de una desviación estándar que engloba todas las diferentes fuentes de variabilidad (componentes aleatorios y sistemáticos) que afectan al proceso de la medida, recogidos en la guía GUM[12] y documentos análogos[13,14,15].

---

9. ISO GUIDE 32: *Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials*, Geneva, 1997.
10. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Almansa López E.M., Egea Gonzalez F.J., Castro Cano M.L., Garrido Frenich A. and Martínez Vidal J.L., *Anal. Chim. Acta*, aceptado en 2002.
11. EAL-R2: *Expression of the uncertainty of measurement in calibrations*. European Cooperation for Accreditation Laboratory, 1997
12. *Guide to the expression of uncertainty in measurement*, 1st ed. BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. Geneva, 1995.

La estrategia propuesta para el establecimiento de la Función de Corrección y su incertidumbre asociada, en procesos analíticos afectados por errores sistemáticos debido al efecto matriz, utiliza experiencias de calibración indirecta llevadas a cabo con:

- ✗ patrones químicos, constituidos por el analito puro disuelto en el disolvente de trabajo o calibración con patrón externo (EC)
- ✗ materiales de referencia tipo matriz elaborados al incorporar la matriz a la disolución anterior o calibración con patrón en matriz (MC)

Esta metodología implica un primer paso en el que se verifica la presencia del efecto matriz mediante el Análisis de Covarianza (ANCOVA), y, en caso positivo, se establece una CF entre EC y MC con el propósito de simplificar el proceso analítico. Esta CF corresponde a una calibración directa del proceso de medida analítico y se aplica a las concentraciones estimadas directamente de EC para obtener los valores de concentración corregidos. Finalmente, la CF se valida mediante estudios de recuperación realizados usando la metodología tradicional.

2. FUNCIÓN DE CORRECCIÓN

El modelo que se aplica a una regresión lineal sigue una ecuación de la forma: $R = a + b\,C + e$, donde la variable predictora, C, sería la concentración de analito y R, la variable respuesta, mientras que e es el error aleatorio que afecta a la respuesta experimental.

Una vez obtenidos la serie de pares de valores experimentales (C_i, R_i), si se quiere obtener la ecuación de la línea recta que modela tales puntos, la utilización de la regresión lineal por mínimos cuadrados (LSR) es el método adecuado para la estimación de la pendiente, b, y del término independiente, a, de la recta. Esto es

13. NIST Technical Note 1297: *Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results*. National Institute of Standards and Technology, 1994.
14. EAL-G23: *The expression of uncertainty in quantitative testing*. European Cooperation for Accreditation of Laboratories, 1996.
15. EURACHEM/CITAC Guide: *Quantifying uncertainty in analytical measurements*, 2nd ed. EURACHEM, 1999.

debido a que cuando los errores aleatorios siguen una distribución normal, además de ser independientes de la variable predictora, C, y presentar homocedasticidad, este método permite la estimación de los parámetros (a y b) más exactos y de menor varianza. Para ello, los valores estimados, a y b, deben ser tales que la suma de cuadrados de la diferencia entre la señal analítica y el valor predicho por el modelo sea mínima.

En el análisis cuantitativo, las muestras reales pueden ser cuantificadas utilizando curvas de calibrado establecidas en diferentes condiciones, por ejemplo, un calibrado preparado utilizando analito en disolvente o calibrado con patrón externo (EC) o bien usando el disolvente que contiene coextractos de la matriz (MC). Si existe efecto matriz, las pendientes y/o términos independientes de estos calibrados serán estadísticamente diferentes y por lo tanto la cuantificación de una muestra real con ambos calibrados producirá diferentes resultados (Figura V.1).

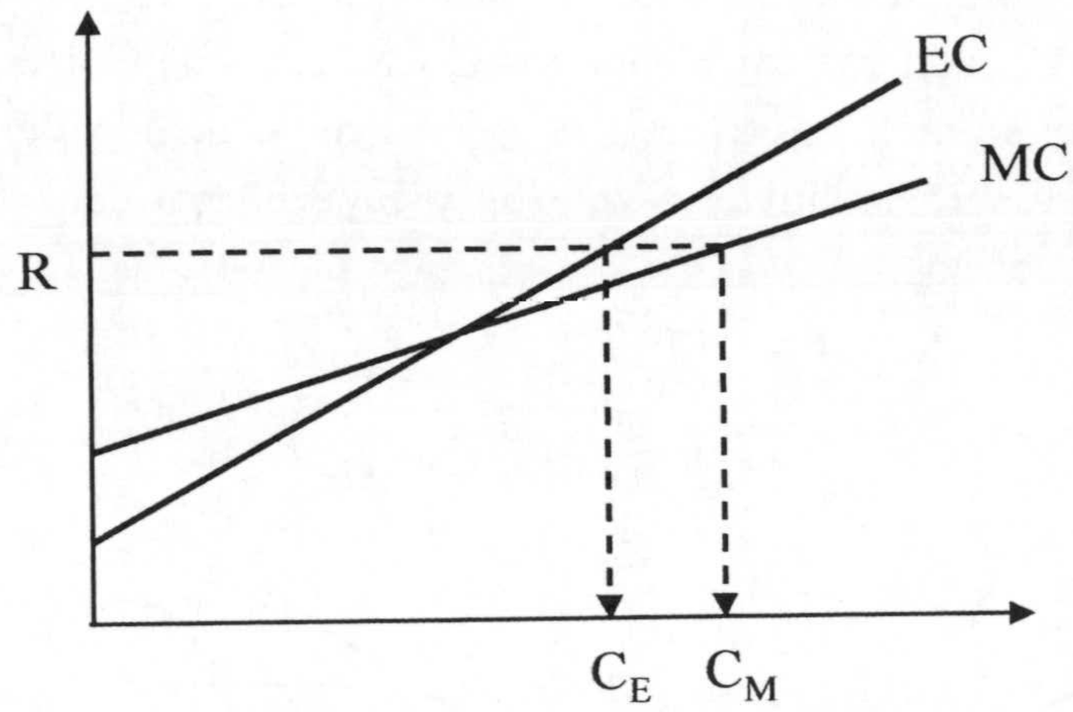


Figura V.1
Comparación de dos curvas de calibrado

En estos casos, nosotros proponemos establecer una **Función de Corrección**[10] **(CF)** cuya aplicación nos permite estimar el contenido de analito en la matriz a partir de EC (C_E) siendo igual al obtenido si la estimación se hubiese realizado a partir de MC (C_M). La CF es obtenida a partir de las rectas de regresión EC ($R = a_E + b_E \cdot C_E$) y MC ($R = a_M + b_M \cdot C_M$), igualando las respuestas

y despejando la concentración C_M en función de la concentración C_E, de modo que se obtiene la siguiente ecuación:

$$C_M = \frac{a_E - a_M}{b_M} + \frac{b_E}{b_M} \cdot C_E \qquad \text{(V-1)}$$

Esta nueva función linea se caracteriza por dos coeficientes (A y B) denominados **Coeficientes de Corrección** y calculados como:

$$B = \frac{b_E}{b_M} \qquad A = \frac{a_E - a_M}{b_M} \qquad \text{(V-2)}$$

A y B representan las componentes constante y proporcional, respectivamente, del error sistemático debido al efecto matriz. Por lo tanto, CF se puede expresar como:

$$C^*_M = A + B \cdot C_E \qquad \text{(V-3)}$$

que nos permite obtener fácilmente la concentración corregida C^*_M, a partir de la concentración C_E, una vez calculados los Coeficientes de Corrección (Figura V.2). A puede tomar valores positivos o negativos dependiendo del valor de a_E y a_M pero B siempre será positivo ya que b_E y b_M siempre deberán tener el mismo signo.

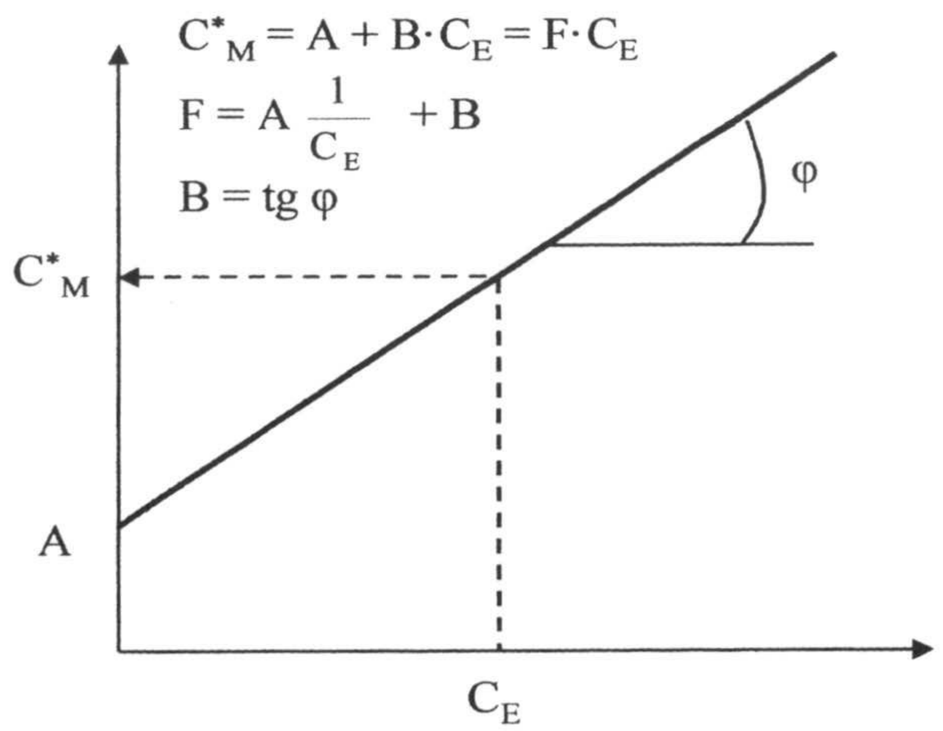


Figura V.2
Representación de C^*_M frente a C_E.

La incidencia del efecto matriz sobre la CF implica la aparición de tres situaciones geométricas diferentes (Figura V.3) entre EC y MC, así:

- Solamente existen errores sistemáticos constantes si el Coeficiente de Corrección B no difiere de la unidad, por lo que la Función de Corrección que se obtiene es: $C^*_M = A + C_E$.
- Si solamente existen errores sistemáticos proporcionales (el Coeficiente de Corrección A no difiere de cero) la Función de Corrección adoptará la forma: $C^*_M = B \cdot C_E$.
- Y por último, en el caso en que las dos componentes de error sistemático (constante y proporcional) estén presentes, la Función de Corrección será la siguiente: $C^*_M = A + B \cdot C_E$.

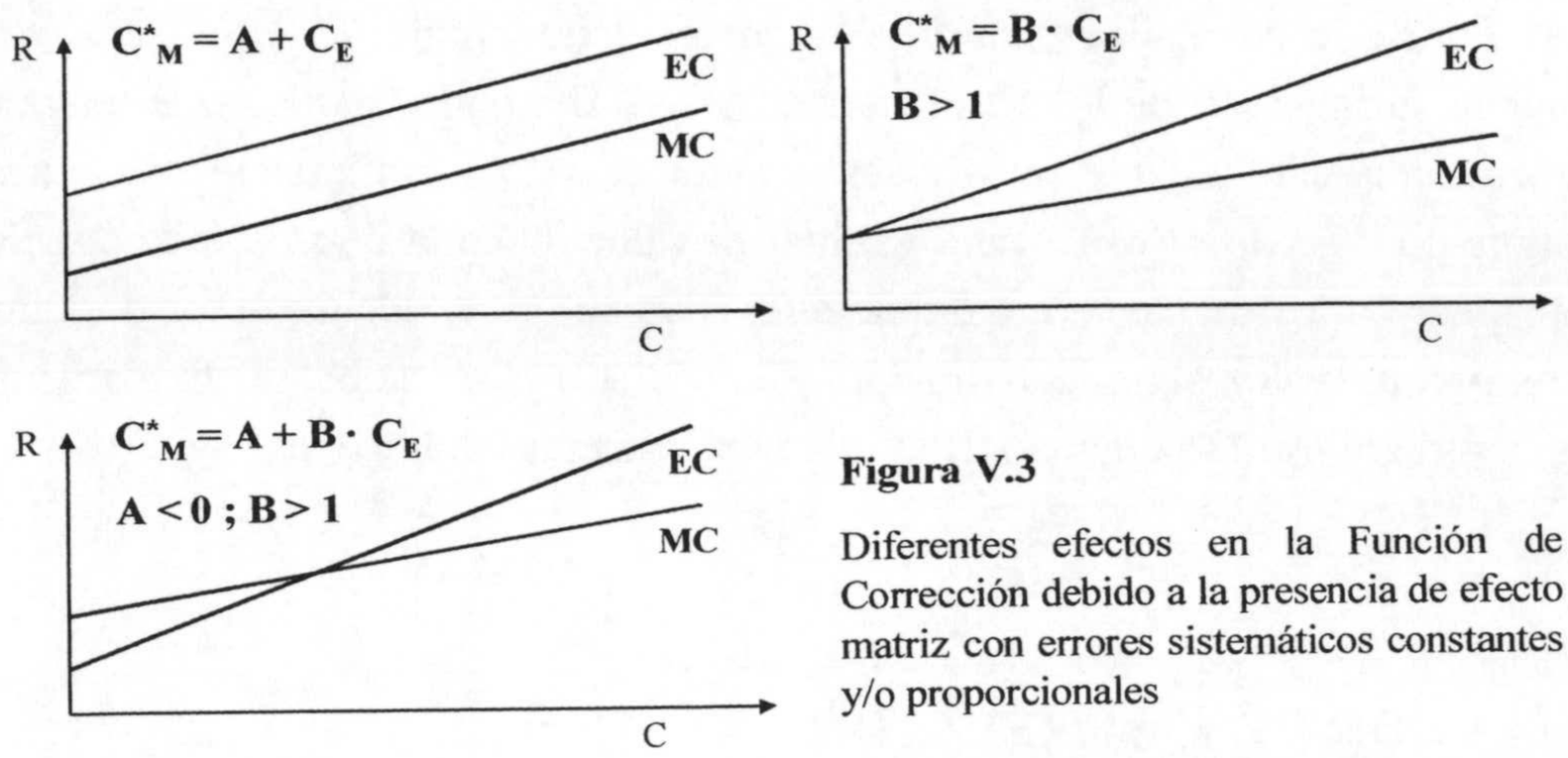


Figura V.3

Diferentes efectos en la Función de Corrección debido a la presencia de efecto matriz con errores sistemáticos constantes y/o proporcionales

Para poder obtener una Función de Corrección que pueda ser utilizada en el análisis de rutina, es necesario llevar a cabo distintas experiencias que recojan cambios en las condiciones experimentales, sobre todo aquellos cambios que suelen ser frecuentes, tales como: muestras, días, reactivos, instrumentos, analistas, etc. Para cada caso o experiencia se debe calcular una CF, obteniendo, a partir de los valores medios de los coeficientes una Función de Corrección final:

$$A = \frac{\sum A_k}{r} \quad ; \qquad B = \frac{\sum B_k}{r} \tag{V-4}$$

siendo A_k y B_k los Coeficientes de Corrección para cada una de las Funciones de Corrección establecidas y r el número de CF.

Dado que estos Coeficientes de Corrección se han realizado bajo distintas condiciones experimentales, es necesario verificar que estas variaciones no afectan significativamente a los coeficientes y por tanto a la Función de Corrección. En caso de que algún coeficiente sea estadísticamente diferente debe ser considerado como anómalo. Para llevar a cabo este estudio se ha adoptado el criterio de la Guía AOAC[16] de ensayos colaborativos para la validación de métodos analíticos, por lo que una CF será declarada anómala cuando la varianza o variabilidad asociada a cada uno de los coeficientes o los mismos Coeficientes de Corrección difieran significativamente del resto.

Para ello se realiza en primer lugar el denominado *Test de Bartlett* para evaluar la variabilidad de los Coeficientes A y B, de modo que los que tengan una varianza significativamente mayor serán eliminados. A continuación se realiza el denominado *Test de Dixon*[17] para evaluar el valor de cada uno de los coeficientes con respecto a los demás e, igual que en el caso anterior, decidir si los coeficientes que tengan un valor significativamente distinto son eliminados. El fundamento de estos tests será tratado en el apartado de herramientas estadísticas.

3. FACTOR DE CORRECCIÓN

Otra forma de obtener una relación entre las concentraciones C^*_M y C_E a partir de las rectas de regresión EC ($R = a_E + b_E \cdot C_E$) y MC ($R = a_M + b_M \cdot C_M$) sería despejar de las rectas de regresión EC y MC las correspondientes concentraciones y establecer la relación entre ellas realizando el cociente de ambas expresiones, de forma que se obtiene:

16. AOAC International Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis, *Journal of AOAC International*, 78, 143ª, 1995.
17. Dixon W.J., *Ann. Math. Stat.*, 21, 488, 1950.

$$\frac{C^*_M}{C_E} = \frac{(R - a_M)/b_M}{(R - a_E)/b_E} \Rightarrow C^*_M = \frac{R - a_M}{R - a_E} \cdot \frac{b_E}{b_M} \cdot C_E \qquad \text{(V-5)}$$

Por tanto la concentración C^*_M se puede obtener multiplicando la concentración C_E por un factor F, llamado **Factor de Corrección** que es igual a:

$$F = \frac{R - a_M}{R - a_E} \cdot \frac{b_E}{b_M} \qquad \text{(V-6)}$$

La ecuación $C^*_M = F \cdot C_E$ nos permite obtener el contenido de analito a partir de C_E una vez calculado el Factor de Corrección (Figura V.2). Además es posible obtener una relación entre los Coeficientes de Corrección A y B el Factor de Corrección F (Figura V.4):

$$\frac{C^*_M}{C_E} = F = A\frac{1}{C_E} + B \qquad \text{(V-7)}$$

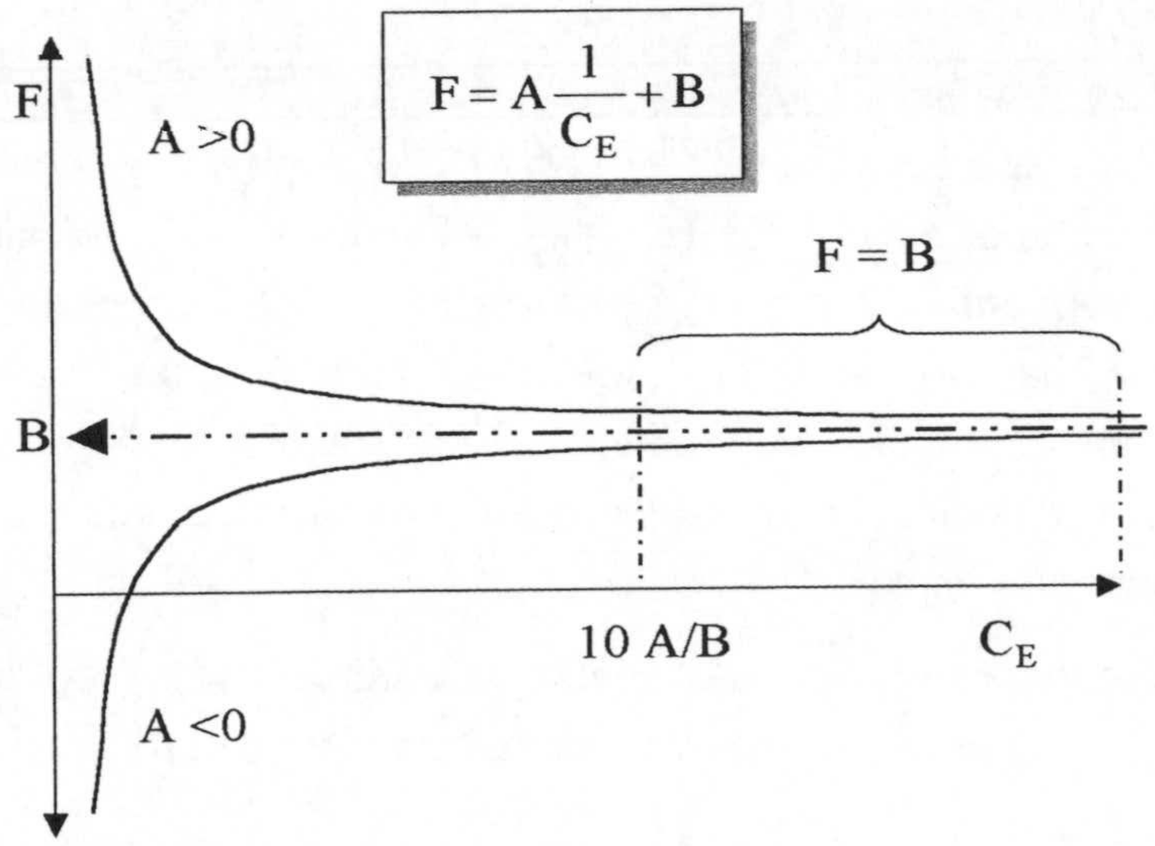


Figura V.4

Representación del factor de corrección frente a C_E.

Representando el Factor de Corrección frente a C_E se obtiene una curva (Figura V.4) que depende del signo de A (positivo o negativo). F tiende a tomar el valor del Coeficiente de Corrección B cuando la concentración C_E aumenta; cuando C_E es mayor que $10\cdot(A/B)$ se puede considerar que F es constante e igual a B. Esto implica que F no es constante excepto cuando el Coeficiente de Corrección A es cero que entonces será igual a B e independiente de C_E.

4. HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

Los pasos a seguir en el protocolo propuesto para establecer la Función de Corrección y suprimir los errores en la cuantificación debido a la existencia de efecto matriz implican el uso de diversas herramientas estadísticas.

4.1. Comparación de líneas de regresión. Análisis de la covarianza (ANCOVA)

El análisis de la covarianza[18] (ANCOVA) combina aspectos relativos a la regresión por mínimos cuadrados (LSR) y al Análisis de la Varianza (ANOVA), siendo una herramienta estadística de comparación de curvas de calibrado. Esta herramienta se ha utilizado en Análisis Químico para comparar diversos calibrados, con el objeto de minimizar el trabajo experimental[19], o para diagnosticar los posibles errores aleatorios y/o sistemáticos predecibles en el análisis de matrices complejas[20].

Para comparar dos o más rectas y comprobar si son estadísticamente diferentes es necesario comparar tanto la pendiente como el término

18. Snedecor G.W. and Cochran W.G., *Statistical Methods,* 6th Ed., Iowa State Univ. Press, Spanish Translation, Editorial Continental S.A., Mexico, 1st Ed., pp. 513-543, 1971.
19. González Casado A., García Campaña A.M., Cuadros Rodríguez L., Víchez Quero J.L and Blanc García M.R., *LC·GC Inter.*, 11, 726, 728, 730, 732-735, 1998.
20. García Campaña A.M., Cuadros Rodríguez L., Aybar Muñoz J., Alés Barrero F., Román Ceba M. and Baeyens W.R.G., *Biomed. Chromatog.*, 13, 151-154, 1999.

independiente[21,22]. Para ello, en primer lugar, se debe calcular, para cada curva de regresión, las sumas de cuadrados corregidas de la variable predictora y de la variable respuesta así como del producto entre ambas:

$$Q_{C^2} = \sum_{i=1}^{n} C_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^{n} C_i)^2}{n} \qquad Q_{R^2} = \sum_{i=1}^{n} R_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^{n} R_i)^2}{n} \qquad \text{(V-8)}$$

$$Q_{RC} = \sum_{i=1}^{n} C_i R_i - \frac{(\sum_{i=1}^{n} C_i)(\sum_{i=1}^{n} R_i)}{n}$$

donde i = 1, ..., n corresponde a cada una de las concentraciones o variable respuesta y n es el número total de datos experimentales.

La suma de cuadrados residual, SS_{res} (*Sum of Square)* y la varianza residual, MS_{res}, (*Mean of Square)* se calcularían a partir de los parámetros anteriores:

$$SS_{res} = Q_{R^2} - \frac{Q_{RC}^2}{Q_{C^2}} \qquad MS_{res} = s_{res}^2 = \frac{SS_{res}}{n-2} \qquad \text{(V-9)}$$

donde n – 2 representan los grados de libertad asociados a cada curva de calibrado. Estos dos parámetros evalúan la desviación existente entre los datos experimentales y los valores predichos por la recta de regresión.

Para realizar una correcta aplicación de ANCOVA, se debe llevarse a cabo una comprobación de la homogeneidad de varianzas, como paso previo a la comparación de las rectas de regresión. El siguiente paso sería la comparación de las pendientes de las rectas y si existen diferencias significativas entre ellas podemos concluir que las rectas son estadísticamente diferentes. En caso contrario es necesario realizar una comparación de los términos independientes.

Cuando se comparan más de dos rectas, ANCOVA no proporciona suficiente información para conocer cual de ellas difiere del resto y es necesario

21. García-Campaña, A.M., Cuadros-Rodríguez, L., Aybar-Muñoz, J. and Ales-Barrero, F., *Journal of AOAC International*, 80, 657-664, 1997.
22. Bosque-Sendra, J., Cuadros Rodríguez, L. and García-Campaña, A.M., *Pure & Applied Anal. Chem.*, 1, 115-131, 1998.

realizar una comparación por parejas. Además es cierto que ANCOVA es una herramienta general de comparación de rectas de regresión, cuando se comparan solamente dos rectas es más sencillo aplicar el convencional test t-Student[23] para la comparación de dos pendientes.

A partir de los datos experimentales correspondientes a los calibrados a comparar, se deben realizar dos regresiones diferentes para aplicar ANCOVA:

- Una **regresión completa** *(Full regression),* donde se consideran los calibrados independientes. Por lo tanto, la suma de cuadrados residual completa será la suma de cuadrados de todos los residuos con respecto a su recta de regresión, SS_{res}^{F}, y los grados de libertad completos, ν^{F} será la suma de los grados de libertad de cada una de las rectas:

$$SS_{res}^{F} = \sum_{j=1}^{m} (SS_{res})_j \qquad \nu^{F} = \sum_{j=1}^{m} \nu_j \tag{V-10}$$

donde el índice j = 1,..., m hace referencia a las m rectas de regresión que se desean comparar. La varianza residual completa, MS_{res}^{F}, sería por tanto el cociente entre la suma de cuadrados residual completa y los grados de libertad completos:

$$MS_{res}^{F} = \frac{SS_{res}^{F}}{\nu^{F}} \tag{V-11}$$

- Una **regresión reducida** *(Reduced regression),* donde se considera una única regresión con una pendiente que establece la desviación a un modelo teniendo en cuenta todos los datos experimentales. Para ello se establece una pendiente promedio, b_{prom} como:

$$b_{prom} = \frac{\sum_{j=1}^{m} (Q_{RC})_j}{\sum_{j=1}^{m} (Q_{C^2})_j} \tag{V-12}$$

23. Martín Andrés, A. and Luna del Castillo, J.D., *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*, Ediciones Norma, S.A., Madrid, Spain, 4ª Ed., pp 235-296, 1994.

Con esta pendiente promedio se recalculan los términos independientes de cada una de las rectas de calibrado ($a_{j,corregida} = \overline{R} + b_{prom} \cdot \overline{C}$) y se estiman los residuos correspondientes a cada una de las nuevas rectas como diferencia de cada señal analítica con el valor predicho por el nuevo modelo. La suma de cuadrados residual reducida, SS_{res}^{R}, se calcula a partir de los nuevos residuos o bien a partir de los parámetros de los antiguos de calibrados, obteniendo la siguiente expresión junto con los grados de libertad reducidos:

$$SS_{res}^{R} = \sum_{j=1}^{m} (Q_{R^2})_j - \frac{\left(\sum_{j=1}^{m} (Q_{RC})_j\right)^2}{\sum_{j=1}^{m} (Q_{C^2})_j} \qquad \nu^R = \sum_{j=1}^{m} \nu_j - (m+1) \qquad \text{(V-13)}$$

La varianza residual reducida, MS_{res}^{R}, sería ahora el cociente entre la suma de cuadrados residual reducida y los grados de libertad reducidos:

$$MS_{res}^{R} = \frac{SS_{res}^{R}}{\nu^R} \qquad \text{(V-14)}$$

4.1.1. Comprobación de la homogeneidad de las varianzas

ANCOVA requiere que todas las curvas de calibrado que intervienen en el estudio muestren una varianza residual homogénea. Esta premisa no es muy restrictiva, por lo que ANCOVA proporciona resultados aceptables aun cuando existe una moderada heterocedasticidad.

La homocedasticidad de las curvas de calibrado puede ser comprobada utilizando el *test de Cochran*[24]. Ahora bien, este test necesita que el número de datos experimentales (n_j) en cada una de las curvas comparadas sea el mismo, aunque cuando la diferencia no es muy grande puede ser aplicado. En caso contrario es mejor aplicar el *test de Bartlett*[25]. Pero cuando solamente tenemos dos

---

24. Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P. and Smeyers-Verbeke J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 132-133, 1997.
25. Farrant T., *Practical Statistics for the Analytical Sciences*, The Royal Society of Chemistry, London, U.K., p. 19, 1997.

varianzas a comparar, como resultado de dos calibrados, es más sencillo aplicar el *test de Snedecor*[23].

4.1.2. Comparación de las pendientes.

Para la comparación de las pendientes de las rectas se realiza un test F donde se calcula un estadístico como cociente de dos varianzas:

$$F_{exp} = \frac{S_N^2}{S_D^2} = \frac{\dfrac{SS_{res}^R - SS_{res}^F}{m-1}}{\dfrac{SS_{res}^F}{\nu^F}} \qquad \text{(V-15)}$$

S_N^2 es una medida de la contribución de la diferencia observada entre las pendientes de las curvas de calibrado a la suma de cuadrados de las desviaciones del modelo lineal. S_D^2 es una medida de la contribución de las desviaciones del modelo lineal considerando los calibrados independientemente. Los superíndices R y F hacen referencia al tipo de regresión (reducida o completa) y m es el número de rectas a comparar.

Este valor de F_{exp} se compara con un valor tabulado (Tablas 2, 3 y 4 del Anexo D) para un nivel de confianza (generalmente el 95%) y los grados de libertad del numerador y del denominador, de forma que se establece la región crítica si se cumple que $F_{exp} > F_{tab}$ para el nivel de confianza establecido.

En el caso en el que la conclusión de este test sea que las pendientes difieren significativamente, es necesario realizar una comparación por parejas de pendientes para comprobar qué pendiente o pendientes difieren de las demás, para lo cual se utiliza el *Test de Bonferroni*[23].

4.1.3. Comparación de los términos independientes

Para la comparación de los términos independientes de las rectas también se realiza un test F como cociente de dos varianzas:

$$F_{exp} = \frac{S'^{2}_{N}}{S'^{2}_{D}} = \frac{\frac{SS^{R}_{res} - SS^{F}_{res}}{\nu^{R} - \nu^{F}}}{\frac{SS^{F}_{res}}{\nu^{F}}} \qquad \text{(V-16)}$$

S'^{2}_{N} y S'^{2}_{D} tienen el mismo significado que en el caso de la comparación de las pendientes. Los parámetros de la regresión reducida se calculan considerando una única regresión con todos los datos experimentales.

Si el valor del estadístico F calculado es menor que el estadístico tabulado para un nivel de confianza del 95%, con ν^{R} - ν^{F} y ν^{F} grados de libertad del numerador y denominador, respectivamente, se puede concluir que los términos independientes no son estadísticamente diferentes para ese nivel de confianza (Tablas 2, 3 y 4 del Anexo D).

Igual que en el caso de la comparación de pendientes, si la conclusión del ANCOVA es que los términos independientes son diferentes, es necesario realizar una comparación por parejas. Para ello se realiza nuevamente el *Test de Bonferroni* para comparación de parejas de términos independientes.

4.2. Tests de hipótesis

4.2.1. Test de Snedecor.

Este test es aplicado para comprobar la homogeneidad de dos varianzas siendo el caso más sencillo. El estadístico F se calcula mediante la ecuación:

$$F_{exp} = \frac{s_1^{2}}{s_2^{2}} \quad s_1^{2} > s_2^{2} \qquad \text{(V-17)}$$

donde s_i^2 son las varianzas a comparar. Este estadístico es comparado con otro tabulado para un nivel de confianza α, ν_1 (asociados a s_1^2) y ν_2 (asociados a s_2^2) grados de libertad (Tablas 2, 3 y 4 del Anexo D).

4.2.2. Test de Cochran.

Este test es aplicado para comprobar la homogeneidad de las varianzas cuando los tamaños muestrales son iguales ($n_1 = ... = n_j = ... = n_m$). El estadístico G se calcula mediante la ecuación:

$$G = \frac{\max(s_{res}{}^2)}{\sum_{j=1}^{m}\left(s_{res}{}^2\right)_j} \qquad \text{(V-18)}$$

donde $s_{res}{}^2$ son las varianzas residuales de cada uno de los calibrados comparados.

Este estadístico es comparado con otro tabulado para un nivel de confianza α, n – 1 grados de libertad y m curvas de calibrado, siendo n el número de datos experimentales (Tabla 8 del Anexo D).

4.2.3. Test de Bartlett.

Este test también es aplicado para comprobar la homogeneidad de las varianzas pero en este caso para tamaños muestrales diferentes. Se calcula un estadístico χ^2 mediante la siguiente ecuación:

$$\chi_{exp}{}^2 = \frac{\left(\sum_{j=1}^{m}\nu_j\right)\cdot \mathrm{Ln}\, s^2 - \sum_{j=1}^{m}\nu_j \cdot \mathrm{Ln}\left(s_{res}{}^2\right)_j}{C} \qquad \text{(V-19)}$$

donde s^2 y C son dos parámetros calculados a partir de las ecuaciones:

$$s^2 = \frac{\sum_{j=1}^{m}\left[\nu_j \cdot \left(s_{res}{}^2\right)_j\right]}{\sum_{j=1}^{m}\nu_j} \qquad C = 1 + \frac{1}{3(r-1)}\left(\sum_{j=1}^{m}\frac{1}{\nu_j} - \frac{1}{\sum_{j=1}^{m}\nu_j}\right) \qquad \text{(V-20)}$$

donde ν_j son los grados de libertad para cada una de las curvas de calibrado, r sería el número de varianzas a contrastar y $s_{res}{}^2$ sería cada una de las varianzas residuales estimadas para cada curva de calibrado.

Este estadístico sigue una distribución χ^2 teórica (Tabla 6 del Anexo D). Por lo tanto si $\chi_{exp}^2 < \chi_{tab}^2$ para una valor de α y m-1 grados de libertad se concluye que no hay diferencia significativa entre las varianzas residuales comparadas.

NOTA. Este test también es aplicado en la comparación de las varianzas de los Coeficientes de Corrección, para lo cual habrá que sustituir las varianzas residuales, s_{res}^2, por la varianza de los Coeficientes de Corrección, s_k^2, los subíndices j por k = 1,..., r que hacen referencia a cada una de la CF obtenidas, además hay que tener en cuenta que los grados de libertad asociados a cada uno de los Coeficientes de Corrección deben ser calculados mediante la ecuación de Welch[26]–Satterthwaite[27]:

$$\nu_k = \frac{\sum \left(s_k^2 / n_k\right)^2}{\sum \left(\frac{\left(s_k^2 / n_k\right)^2}{n_k - 1} \right)} \qquad \text{(V-21)}$$

4.2.4. Test de Dixon

Se utiliza para detectar valores anómalos o discrepantes de una serie de datos. Para realizar este test se calcula un estadístico Q_{exp} que se compara con una valor tabulado (Tabla 7 del Anexo D) para un nivel α (generalmente 5%) y k experiencias. El valor Q_{exp} adopta distinta expresión dependiendo del número de datos que estemos estudiando, así si ordenamos los datos en orden creciente $X_1 > X_2 > ... > X_{k-1} > X_k$ obtenemos las siguientes expresiones:

$$\text{Para } 3 \le k \le 7 \quad \Rightarrow \quad Q_{exp} = \frac{X_2 - X_1}{X_k - X_1} \quad \text{ó} \quad Q_{exp} = \frac{X_k - X_{k-1}}{X_k - X_1}$$

$$\text{Para } 8 \le k \le 12 \quad \Rightarrow \quad Q_{exp} = \frac{X_2 - X_1}{X_{k-1} - X_1} \quad \text{ó} \quad Q_{exp} = \frac{X_k - X_{k-1}}{X_k - X_2} \qquad \text{(V-22)}$$

---

26. Welch B.L, *J.R. Stat. Soc. Suppl.*, 3, 29-48, 1936, *Biometrika*, 29, 350-362, 1938, *ibid.*, 34, 28-35, 1947.
27. Satterthwaite F.E., *Psychometrika*, 6, 309-316, 1941, *Biometrics Bull*, 2, 110-114, 1946.

$$\text{Para } k \geq 13 \quad \Rightarrow \quad Q_{exp} = \frac{X_3 - X_1}{X_{k-2} - X_1} \quad \text{ó} \quad Q_{exp} = \frac{X_k - X_{k-2}}{X_k - X_3}$$

donde X_1 o X_k serán los posibles valores anómalos o discrepante (normalmente se considera aquel valor que dista más del valor medio de los datos). De tal forma que si $Q_{exp} > Q_{tab}$ el valor se considera anómalo y se rechaza, rehaciendo el test para el siguiente valor.

4.2.5. Test de Bonferroni

El test se utiliza para la comparación de pendientes o términos independientes por parejas formando tantas parejas diferentes como sea posible. Así, si el número de rectas de regresión es m, el número de parejas a comparar sería: $p = m(m-1)/2$ y se calcula un estadístico $t_{exp}(b)$ o $t_{exp}(a)$ para cada una de las parejas que se quiere comparar, como:

$$t_{exp}(b) = \frac{|b_1 - b_2|}{S_D \sqrt{\frac{1}{(Q_{C^2})_1} + \frac{1}{(Q_{C^2})_2}}} \qquad \text{(V-23)}$$

$$t_{exp}(a) = \frac{|a_1 - a_2|}{S'_D \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{|\bar{C}_1 - \bar{C}_2|^2}{(Q_{C^2})_1 + (Q_{C^2})_2}}} \qquad \text{(V-24)}$$

donde $\bar{C}$ sería el valor medio de las concentraciones de la recta correspondiente.

El estadístico $t_{exp}(b)$ o $t_{exp}(a)$ se compara con una valor tabulado (Tabla 5 del Anexo D) para una probabilidad α/p donde α generalmente se considera al 5% y p sería el número de comparaciones posibles, y ν^F grados de libertad.

5. VALIDACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CORRECCIÓN

La Función de Corrección se valida basándonos en la **Recuperación**[28,29] ($\Re$), definida como el cociente entre la concentración encontrada o estimada y la concentración de referencia. Para ello es necesario utilizar matriz exenta de analito que será dopada, a uno o más niveles de concentración incluidos en el rango de concentraciones estudiados, antes de ser sometida al tratamiento de la muestra. En este momento se obtiene la correspondiente señal analítica y a partir de las curvas EC y MC se estiman las concentraciones C_E y C_M, respectivamente.

Existen dos posibilidades equivalentes para validar la eficacia de la Función de Corrección, como puede verse en los diagramas de flujo descritos en las Figuras V.5 y V.6, respectivamente. Previo a estas metodologías de validación es necesario verificar la existencia de efecto matriz y/o evaluar si hay pérdidas de analito (por ejemplo, debido a algunos pasos en el tratamiento de la muestra, comportamiento diferente de las muestras adicionadas, etc.), para lo cual, pueden aplicarse dos procedimientos:

⇨ Para verificar ambos efectos conjuntamente (efecto matriz y pérdidas de analito), se cuantifica la concentración de analito, C_E, de las muestras dopadas con EC. A partir de C_E y de la concentración de referencia (C_{refer}) se calcula una recuperación "global" ($\Re_E$) según la expresión:

$$\Re_E = \frac{C_E}{C_{refer}} \qquad \text{(V-25)}$$

La presencia de sesgo es verificada por comparación de esta recuperación con 100%, utilizando el test t-Student convencional. Si hay una diferencia significativa, es posible obtener una nueva estimación para la concentración de referencia considerada a partir de C_E, aplicando la Función de Corrección ($C^*_M = A + B \cdot C_E$). Sin embargo, si no existe diferencia significativa, C_E estima correctamente C_{refer}, es decir no hay ni efecto matriz ni pérdidas de analito y la Función de Corrección no es necesaria.

---

28. Barwick V.J. and Ellison S.L.R., *The Analyst*, 124, 981-990, 1999.
29. Barwick V.J. and Ellison S.L.R., *Protocol for uncertainty evaluation from validation data*, LGC/VAM/1998/088. 2000.

⇨ Para verificar las pérdidas de analito, se aplica MC para estimar la concentración de analito (C_M) y se obtiene una recuperación ($\Re_M$) que representa la proporción de analito estimado al usar MC:

$$\Re_M = \frac{C_M}{C_{refer}} \qquad \text{(V-26)}$$

Una diferencia no significativa de $\Re_M$ respecto al 100% implica que C_{ref} se estima correctamente con la curva MC y no existe pérdida de analito.

Una vez verificados estos efectos, pueden llevarse a cabo dos alternativas para validar el uso de la Función de la Corrección y comprobar si su aplicación origina resultados exactos:

Metodología de validación 1 (Figura V.5).

A partir de C^*_M y C_{refer} se calcula una recuperación ($\Re^*_M$) que representa la proporción de analito corregida, estimada usando la Función de Corrección. Esto es equivalente a obtener la recuperación a partir EC y corregir esta recuperación usando F. La recuperación $\Re^*_M$ es una estimación del sesgo del proceso completo (cuantificación a partir de EC y corrección por medio de CF).

CF corrige el efecto matriz, y sólo evalúa las pérdidas de analito por el tratamiento de la muestra de una manera similar que $\Re_M$, expresándose como:

$$\Re^*_M = \Re_E \cdot F = \frac{C^*_M}{C_{refer}} \qquad \text{(V-27)}$$

La validación debe llevarse a cabo mediante del *test t-Student de muestras apareadas* que compara $\Re^*_M$ con $\Re_M$. Si la diferencia no es estadísticamente significativa ($P \geq 5\%$), la CF puede aplicarse para estimar el contenido de analito en muestras reales. Sin embargo, si existe una diferencia significativa ($P < 5\%$), CF se aplicará cuando la desviación entre ambas recuperaciones pueda asumirse para un uso particular del método analítico. Si este valor no se ajusta para el propósito requerido, CF no podría aplicarse.

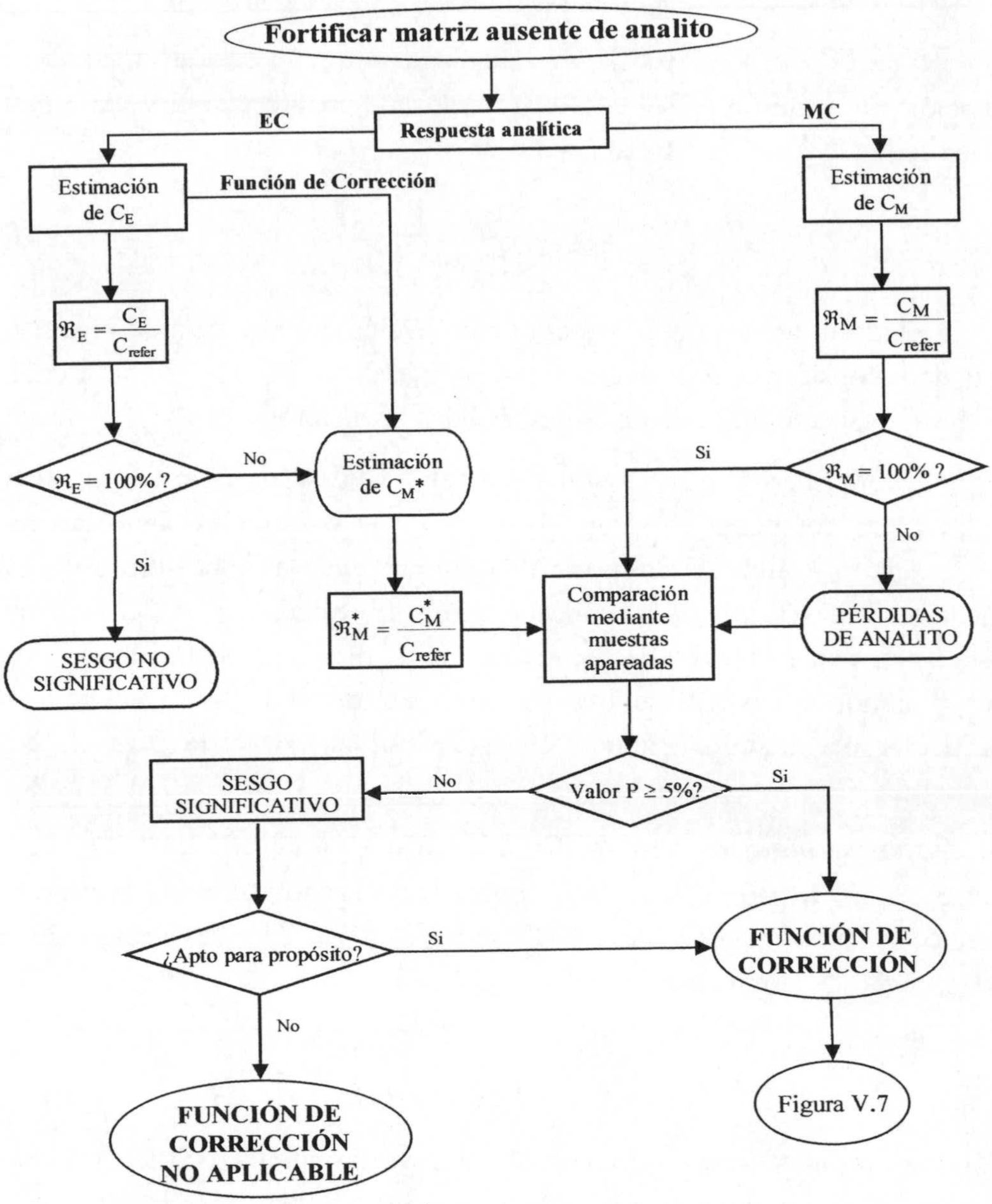


Figura V.5

Diagrama de flujo para la validación de la Función de Corrección usando la Metodología 1

Metodología de validación 2 (Figura V.6).

A partir de C^*_M y C_E se calcula una recuperación aparente[5] o de calibración ($\Re^*_E$) que representa la proporción de analito cuantificada antes de la aplicación de CF y puede estimarse como:

$$\Re^*_E = \frac{1}{F} = \frac{C_E}{C^*_M} \qquad \text{(V-28)}$$

Debido a que esta recuperación sólo evalúa la existencia de efecto matriz, se pueden considerar dos alternativas para validar el uso de la Función de Corrección respecto a la existencia de pérdidas de analito:

a) *Si no existen pérdidas de analito.* El test t-Student de muestras apareadas se aplica para comparar $\Re^*_E$ con $\Re_E$. Si no hay diferencias significativas ($P \geq 5\%$), CF es válida y es posible asegurar que la concentración estimada mediante CF (C^*_M) y la concentración de referencia (C_{refer}) no difieren estadísticamente. Sin embargo, si hay una diferencia significativa existe un sesgo importante y CF se usará si este sesgo puede asumirse para un uso particular del método analítico. Si este valor no se ajusta para el propósito requerido, CF no podría aplicarse.

b) *Si existen pérdidas de analito.* En este caso es necesario calcular el cociente entre $\Re_E$ y $\Re_M$ que evalúa la proporción de sesgo debido a la presencia de efecto matriz y no considera la existencia de pérdidas de analito durante el tratamiento de la muestra:

$$\frac{\Re_E}{\Re_M} = \frac{C_E}{C_M}$$

Este cociente se compara con $\Re^*_E$ por medio del test t-Student de muestras apareadas. Si no existe diferencia significativa ($P \geq 5\%$), CF es válida y es posible asegurar que la concentración obtenida por aplicación de la CF, C^*_M y C_M no difieren estadísticamente. Al igual que la metodología 1, si existe una diferencia significativa, el sesgo será significativo y la Función de Corrección se usará si este sesgo puede asumirse para un uso particular del método analítico. Si este valor no se ajusta para el propósito requerido, CF no podría aplicarse.

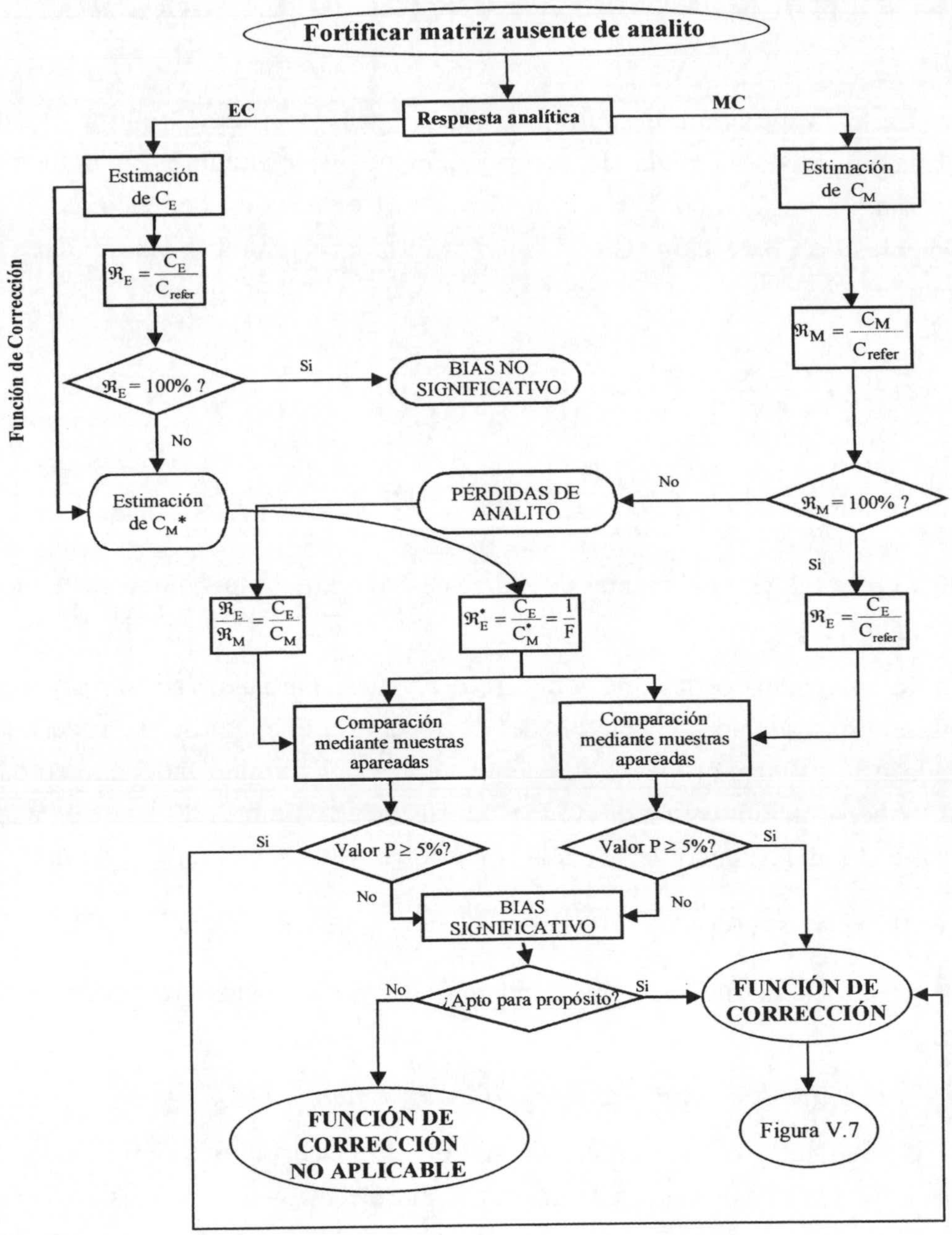


Figura V.6

Diagrama de flujo para la validación de la Función de Corrección usando la Metodología 2

6. INCERTIDUMBRE DE LA FUNCIÓN DE CORRECCIÓN.

La concentración C^*_M lleva asociada una incertidumbre que puede ser calculada aplicando la regla de propagación de incertidumbres a la función de corrección. Considerando la Función de Corrección dependiente de los Coeficientes de Corrección ($C^*_M = A + B\ C_E$) la incertidumbre vendrá dada por la ecuación general:

$$u^2(C^*_M) = \left(\frac{\partial C^*_M}{\partial A}\right)^2 u^2(A) + \left(\frac{\partial C^*_M}{\partial B}\right)^2 u^2(B) + \left(\frac{\partial C^*_M}{\partial C_E}\right)^2 u^2(C_E) + \\ + 2\, r_{A,B}\left(\frac{\partial C^*_M}{\partial A}\right)\left(\frac{\partial C^*_M}{\partial B}\right) u(A)u(B) \qquad \text{(V-30)}$$

donde $r_{A,B}$ sería el coeficiente de correlación entre la pendiente y el término independiente.

Resolviendo cada una de las derivadas parciales se obtiene que la incertidumbre asociada al factor de corrección depende de la incertidumbre asociada a la estimación de la pendiente, u(B), y al término independiente, u(A), de la concentración estimada C_E y de su incertidumbre $u(C_E)$, de la propia pendiente B y del término debido a la covarianza entre A y B ($r_{A,B}\ u(A)\ u(B)$):

$$u^2(C^*_M) = u^2(A) + C_E{}^2\ u^2(B) + (B)^2\ u^2(C_E) + 2\, r_{A,B}\, C_E\, u(A)\, u(B) \qquad \text{(V-31)}$$

por lo tanto habrá que calcular cada uno de los términos que componen esta incertidumbre:

- *Incertidumbre debida al término independiente, u(A).*

Se calcula como contribución de la incertidumbre derivada de la estimación de la CF, $u(A)_{func}$, y la incertidumbre derivada de la precisión, $u(A)_{prec}$:

$$u(A) = \sqrt{u^2(A)_{func} + u^2(A)_{prec}} \qquad \text{(V-32)}$$

Para el cálculo de la incertidumbre derivada de la estimación de la CF es necesario aplicar la regla de propagación de incertidumbres a la expresión del término independiente (Ecuaciones V-2 y V-4)

$$u^2(A)_{func} = \frac{\sum u^2(A)_{k,func}}{r} \qquad \text{(V-33)}$$

$$u^2(A)_{k,func} = u^2\left(\frac{a_E - a_M}{b_M}\right)_k = \left(\frac{a_E - a_M}{b_M}\right)_k^2 \left(\frac{u^2(a_E)_k + u^2(a_M)_k}{(a_E - a_M)_k^{\,2}} + \frac{u^2(b_M)_k}{(b_M)_k^{\,2}} + \right.$$

$$\left. + \frac{2}{(a_E - a_M)_k (b_M)_k} r_{a_M, b_M} u(a_M)_k \, u(b_M)_k \right)$$

donde a_E, a_M son los términos independientes de la recta EC y MC, respectivamente y b_M sería la pendiente de la recta MC, $u(a_E)$, $u(a_M)$ y $u(b_M)$ serían las desviaciones estándar asociadas a los términos independientes y a la pendiente en las rectas EC y MC y $r_{a,b}$ es el coeficiente de correlación entre la pendiente y el término independiente de MC. En todos los casos el subíndice k indica cada una de las parejas de curvas de calibrado utilizadas en el cálculo de A y B

La estimación de la incertidumbre asociada a la precisión viene dada por el valor medio de las desviaciones estándar de las réplicas de A obtenidas en diferentes regresiones:

$$u^2(A)_{prec} = \frac{s^2(A)}{r} = \frac{\sum_{k=1}^{r} (A_i - \overline{A})^2 \Big/ (r-1)}{r} \qquad \text{(V-34)}$$

donde r sería el número de réplicas de A y $\overline{A}$ sería el valor medio de todas las réplicas.

- *Incertidumbre debida a la pendiente, u(B).*

u(B) también se calcula como contribución de la incertidumbre derivada de la estimación de la CF, $u(B)_{func}$, y la incertidumbre derivada de la precisión, $u(B)_{prec}$:

$$u(B) = \sqrt{u^2(B)_{func} + u^2(B)_{prec}} \qquad \text{(V-35)}$$

Ambas componentes se calculan de forma similar que u(A), siendo:

$$u^2(B)_{func} = \frac{\sum u^2(B)_{k,func}}{r}$$

$$u^2(B)_{k,func} = u^2\left(\frac{b_E}{b_M}\right)_k = \left(\frac{b_E}{b_M}\right)_k^2\left[\frac{u^2(b_E)_k}{(b_E)_k^{\,2}} + \frac{u^2(b_M)_k}{(b_M)_k^{\,2}}\right] \qquad \text{(V-36)}$$

y:

$$u^2(B)_{prec} = \frac{s^2(B)}{r} = \frac{\sum (B_k - \bar{B})^2 / (r-1)}{r} \qquad \text{(V-37)}$$

donde todos los términos tienen el mismo significado que en las ecuaciones V-33 y V-34

- *Incertidumbre debida al término de covarianza*[30].

La covarianza entre la pendiente y el término independiente se calcula mediante el coeficiente de correlación, $r_{A,B}$ y la incertidumbre u(A) y u(B). El coeficiente de correlación $r_{A,B}$ se calcula mediante la expresión:

$$r_{A,B} = \frac{Q_{AB}}{\sqrt{Q_{A^2} \cdot Q_{B^2}}} \qquad \text{(V-38)}$$

donde Q_{AB} es la suma corregida del producto de A y B, Q_{A^2} es la suma de cuadrados corregida del coeficiente A y Q_{B^2} es la suma de cuadrados corregida del coeficiente B. Todos ellos ya definidos en la ecuación V-8.

- *Incertidumbre debida a la estimación de C_E, $u(C_E)$.*

La incertidumbre de la concentración estimada a partir de EC debe establecerse previamente y es consecuencia de la incertidumbre asociada al procedimiento analítico llevado a cabo (ver capítulo IV)

30. Bremser W. and Hässelbarth W., *Accred. Qual. Assur.*, 3, 106-110, 1998.

7. INCERTIDUMBRE DEL FACTOR DE CORRECCIÓN.

Como ya hemos indicado anteriormente, la función de corrección se puede expresar en función del Factor de Corrección ($C^*_M = F \cdot C_E$), así la incertidumbre asociada a la concentración C^*_M aplicando la regla de propagación de errores es:

$$u^2(C^*_M) = C_E{}^2\, u^2(F) + F^2\, u^2(C_E) \qquad \text{(V-39)}$$

y depende de la concentración C_E, de su incertidumbre $u(C_E)$, del Factor de Corrección F y de la incertidumbre asociada al Factor de Corrección u(F).

Si igualamos las ecuaciones V-30 y V-38 y se despeja la incertidumbre del factor de corrección se obtiene:

$$u^2(F) = \frac{1}{C_E{}^2}\left[u^2(A) + (B^2 - F^2)\, u^2(C_E)\right] + u^2(B) + 2\, r_{A,B}\, \frac{1}{C_E}\, u(A)\, u(B) \qquad \text{(V-39)}$$

Esta incertidumbre, u(F), depende del Coeficiente de Corrección B, del Factor de Corrección F y de la concentración C_E, así como de la incertidumbre asociada a los Coeficientes de Corrección, u(A) y u(B), la incertidumbre asociada a la concentración, $u(C_E)$ y del coeficiente de correlación entre A y B. Todos estos términos se calculan de la misma forma que en el caso de la Función de Corrección (ecuaciones V-31 a V-37).

8. PROTOCOLO PROPUESTO

El procedimiento para aplicar la metodología propuesta conlleva varios pasos (Figura V.7), a partir de los cuales podemos obtener el contenido de analito en una muestra directamente de una calibración externa EC aplicando la Función de la Corrección validada y establecer su incertidumbre asociada, obteniéndose resultados exentos de errores producidos por el efecto matriz.

Estos pasos pueden resumirse en los siguientes:

1. Establecer la calibración con patrones externos (EC) y la calibración con patrones en matriz (MC). Preparar muestras dopadas que contengan los mismos niveles de concentración que los añadidos al preparar el calibrado MC y calcular las recuperaciones obtenidas usando EC ($\Re_E$) y MC ($\Re_M$). Estas recuperaciones se usarán en el proceso de validación.
2. Aplicar el análisis de la covarianza (ANCOVA) para comparar las pendientes y los términos independientes de las curvas del calibrado (EC y MC).
   2.1. Si estas pendientes son estadísticamente diferentes es posible asegurar que existe efecto matriz con un error sistemático proporcional.
   2.2. Si la diferencia significativa sólo existe entre los términos independientes, entonces el efecto matriz sólo se debe a un error sistemático constante.
   2.3. En el caso en que no haya diferencia significativa entre las pendientes y entre los términos independientes, es posible concluir que el efecto matriz no es significativo y no es necesario realizar una corrección de los resultados obtenidos de EC.
3. Establecer la correspondiente Función de Corrección (CF) de acuerdo a la decisión tomada en el paso 2. ($C^*_M = A + B \cdot C_E$, en el caso de las pendientes y los términos independientes sean significativamente diferentes a 1 y 0, respectivamente; $C^*_M = A + C_E$ si sólo las pendientes son significativamente diferentes; y $C^*_M = B \cdot C_E$, si no existe ninguna diferencia significativa entre los términos independientes).
4. Validar la Función de Corrección siguiendo uno de las dos alternativas posibles (Figuras V.5 y V.6).
5. Calcular la incertidumbre asociada al uso de CF para C^*_M a partir de C_E.
6. Aplicar la CF correspondiente para obtener la concentración real, C^*_M a partir de C_E. Este valor de la concentración deberá tener una incertidumbre asociada previamente calculada en el paso 5.

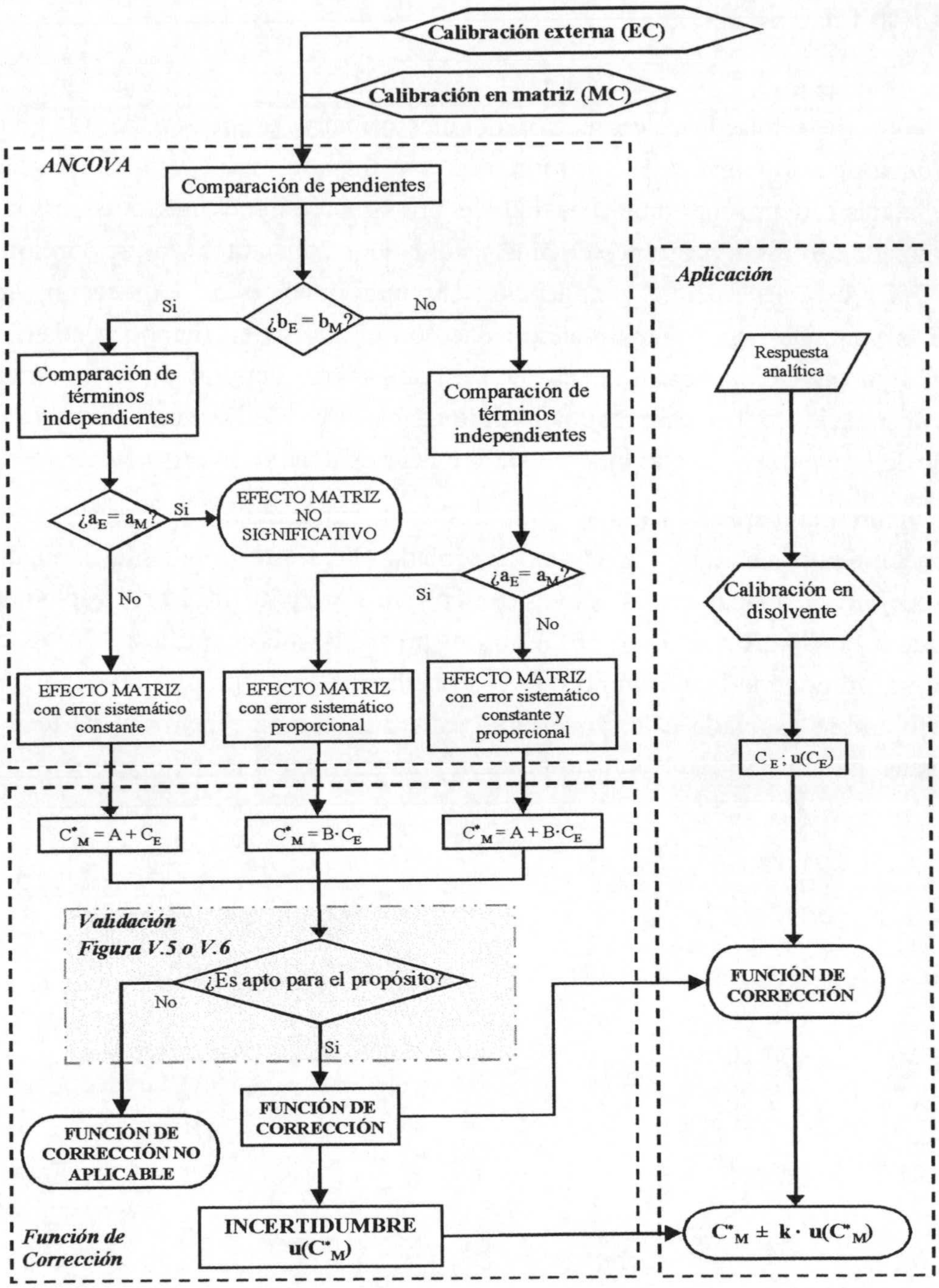


Figura V.7

Diagrama de flujo para el establecimiento y la validación de la Función de Corrección en el análisis de rutina

9. CONCLUSIONES

La metodología de corrección del efecto matriz propuesta, basada en el uso de Funciones de Corrección, proporciona una manera rápida y barata de llevar a cabo análisis de rutina sin necesidad de preparar calibraciones con patrones en matriz, cuando están presentes errores sistemáticos constantes y/o proporcionales.

El establecimiento y aplicación de una Función de Corrección supone algunas ventajas importantes relacionadas con el ahorro en tiempo y coste de los análisis ya que se elimina la necesidad de realizar una depuración de la muestra o utilizar matriz en las calibraciones. Además se evita el realizar correcciones a partir de la recuperación, lo cual puede implicar estimaciones erróneas.

Sin embargo, supone un trabajo experimental intenso para su establecimiento, aunque una vez calculada la correspondiente Función de Corrección su aplicación es muy sencilla y nos permite utilizar directamente el calibrado con patrón externo (EC) con el propósito de cuantificar. Su aplicación aumenta un poco la incertidumbre de los resultados en un grado que depende de la incertidumbre asociada a la corrección y además genera recelo en los técnicos o analistas que no "confían" en la aplicación práctica de técnicas quimiométricas.

Bloque II

ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo VI

APLICACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CORRECCIÓN I: CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE LINDANO EN PIMIENTO

1. ANTECEDENTES

Un campo importante para la protección de la salud es el control de residuos de plaguicidas en frutas y verduras, entre los que se encuentra Lindano[1]. El Nivel de Residuo de Máximo (MRL) para cada plaguicida y matriz, que puede encontrarse en los alimentos, está regulado para la Unión europea (EU) mediante la Directiva 93/58/CEE de 1993 adaptada a cada país por la Real Orden 280/1994.

La principal dificultad en el análisis de residuos de plaguicidas en frutas y verduras es, entre otros, la necesidad de usar métodos multiresiduo (MRM) para cubrir una gran variedad de analitos con diferentes propiedades fisico-químicas en diferentes matrices con distintas cantidades de agua, grasa y composición bioquímica y en niveles de concentración cercanos al nivel de cuantificación (LOQ).

Una de las principales fuentes de error que afecta a la fiabilidad de la información analítica[2] es la varianza derivada de la heterogeneidad de la muestra y la diversidad de matrices debido a la adsorción y/o descomposición de los analitos en el sistema[3,4]. El extracto de la matriz puede modificar la resolución analítica, aumentando el nivel de errores aleatorios e introduciendo un efecto sistemático (constante o proporcional) en los resultados analíticos[5]. Además hay que tener en cuenta el efecto matriz como una de las fuentes principales de incertidumbre en los métodos analíticos multiresiduo[6] (MRMs), incluyendo aquéllos derivados de la contaminación y otros componentes de la matriz.

---

1. Tomlin C., *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 10th Ed., British Crop Protection Council, Croyton, 1994.
2. Erney D.R., Gillespie A.M. and Gilvydis D.M., *J. Chromatogr. A,* 638, 57, 1993.
3. Schenck F.J. and Lehotay S.J., *J. Chromatogr. A*, 868, 51, 2000.
4. Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Deming S.N., Michotte Y. and Kaufman L., *Chemometrics: A Textbook*, 3rd Ed., Elsevier, Amsterdam, 1990.
5. Valcarcel M. and Rios A., *Anal. Chim. Acta*, 400, 425, 1999.
6. Hajslova J., Godula M., Kocourek V., Alterova K. and Koivankova J., presented at the 3rd European Pesticide Residue Workshop, York, 2000.

El efecto de matriz se considera un punto importante en la validación de métodos analíticos. La EU proporciona una guía[7] donde se dan los requisitos mínimos para validar métodos analíticos en análisis de residuos que pueden ser esenciales para validar métodos a gran escala, es decir con un gran número de niveles de concentración adicionados. Esta guía establece que la recuperación debe ser establecida con matrices de muestra representativas, y se debe distinguir entre las diferentes cosechas dependiendo del contenido en agua, grasa o acidez validando cada grupo de matrices por separado.

Recientes trabajos relacionados con el análisis de pesticidas[8,9] en diferentes campos han sido realizados incluyendo el efecto matriz en la calibración preparando las disoluciones con extractos de las muestras sin analito. Estas son consideradas como una forma efectiva de evitar errores derivados de la matriz en la cuantificación de los analitos sin una magnitud del efecto matriz e introduciendo un incremento en el coste y tiempo del análisis.

En validación, la presencia o ausencia de efecto matriz debe ponerse de manifiesto dentro del rango de concentraciones de interés usando calibración en presencia de matriz (MC) para obtener el valor verdadero, a menos que se demuestra que no es necesario[10,11]. La intensidad del efecto matriz puede diferir de una matriz a otra y de un nivel a otro de concentración de muestra, por lo que podemos afirmar que los resultados más fiables pueden obtenerse con calibración MC, o con el método de adición de patrón si no se dispone de matriz libre de analito, pero ésta es sólo una manera de compensar los efectos de la matriz no eliminando la causa subyacente. Así en la mayoría de los casos, si los métodos utilizados no están libres de tales efectos, debe utilizarse, en análisis de rutina, la

---

7. Hill A.R.C. and Reynolds S.L., *Analyst*, 124, 953, 1999.
8. Egea González F.J., Castro Cano M.L., Martínez Vidal J.L., Glass R.C. and Cruz Márquez M., *Chromatographia*, 50, 293-298, 1999.
9. Martínez Vidal J.L., Egea González F.J., Delgado Cobos P., Machera K., Capri E., Tuomainen A. and Glass C.R., 2nd European Pesticide Residue Workshop, Almería, 1998.
10. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Almansa López E., Egea González F.J., Castro Cano M.L., Garrido Frenich A. and Martínez Vidal J.L., 23rd International symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC '99), Granada, 1999.
11. Hajslova J., Holadova K., Kocourek V., Poustka J., Godula M., Cuhra P. and Kempny M., *J. Chromatogr. A*, 800, 283-295, 1998.

calibración MC, a menos que se presente un procedimiento alternativo para proporcionar una exactitud equivalente o superior[12,13,14].

2. PROCEDIMIENTO

El objetivo de esta aplicación es establecer una función de corrección para corregir la concentración de lindano utilizando el calibrado EC, para lo cual se va a estudiar la influencia de la matriz vegetal en la cuantificación y evaluación del plaguicida. Para esto se van a establecer dos curvas de calibración: calibración con patrón externo (EC) y calibración con patrón en matriz vegetal (VMC, *Vegetable Matrix-matching Calibration*).

Se ha realizado un estudio sistemático de los dos calibrados a lo largo del tiempo, la primera experiencia se lleva a cabo en Diciembre de 1999 y las siguientes en meses consecutivos de Marzo a Mayo 2000 utilizando un equipo diferente en la experiencia de Abril, hecho que se pondrá de manifiesto en el desarrollo de esta aplicación.

2.1. Reactivos y materiales

Los patrones de Lindano y estándar interno (dieldrin) ambos de una pureza mayor del 99,9% se obtuvieron de Dr. Ehrenstorfer.

El disolvente utilizado para la extracción fue diclorometano y el utilizado para la preparación de las disoluciones patrón fue ciclohexano y n-hexano. Además se utilizó sulfato sódico anhidro para deshidratar las muestras. Todos ellos fueron proporcionados por Panreac.

---

12. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E. and Laso Sánchez J., *Trends Anal. Chem.*, 20, 195-206, 2001.
13. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E. and Bosque Sendra J.M., *Trends Anal. Chem.*, 20, 620-636, 2001.
14. Cuadros Rodríguez L., Almansa López E.M., Egea González F.J., García Campaña A.M. and Martínez Vidal J.L., Euroanalysis XI, Lisboa, 2000.

2.2. Equipos

Los análisis se llevaron a cabo por cromatografia de gases utilizando para ello un cromatógrafo Hewlett-Packard (Modelo 5890) equipado con un detector de captura electrónica (ECD ^{63}Ni). El cromatógrafo disponía de una columna capilar HP-1 de fase no polar (100% dimetilpolisiloxano) sobre sílice fundida de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0.22 μm de espesor de fase, suministrado por Hewlet–Packard.

Todos los análisis fueron realizados en este cromatógrafo, excepto los realizados en Marzo del 00 que se levaron a cabo en un cromatógrafo Perkin-Elmer (Modelo 8500) equipado con un detector de captura electrónica (ECD ^{63}Ni) y una columna capilar HP-1 de fase no polar (100% dimetilpolisiloxano) sobre sílice fundida de 25 m de longitud, 0,53 mm de diámetro interno y 1,0 μm de espesor de fase, suministrado por Hewlet–Packard.

Las temperaturas fueron optimizadas en cada sección del cromatógrafo: 250ºC para el inyector (se seleccionó el modo splitless con un tiempo de 2 min que proporcionaba la mejor señal sin que las columnas llegaran a saturarse) y 350ºC para el detector. Para la temperatura del horno se utilizó una rampa de temperatura empezando con 180ºC durante 5 min., aumentado 3ºC por minuto hasta 250ºC y a esta temperatura se mantuvo constante durante 2 min. El gas del portador fue N_2 de alta pureza a un flujo de 10 ml por minuto.

2.3. Extracción de lindano

El método de extracción utilizado consiste en mezclar 50 g de muestra picada con 100 g de sulfato sódico anhidro y 105 ml de diclorometano. La mezcla es homogeneizada con un Polytron a 10000 rpm durante 2 min y entonces filtrada a través de un papel de filtro en un matraz esférico de 250 ml y a continuación lavada dos veces con una cantidad de 20 ml de diclorometano.

La mezcla fue introducida en un baño de agua a 40 ºC y acoplada a un rotavapor para llevarla casi a sequedad terminando de secar el extracto con una corriente de N_2. Una vez que el extracto esta totalmente seco se disuelve con 5 ml de ciclohexano. Se toma 1 ml y se diluye con n-hexano hasta 4 ml. En un matraz

de 2 ml se añade 0,1 mg/l de estándar interno (dieldrin), se enrasa con la solución anterior y 1 µl de esta disolución se inyecta en el cromatógrafo.

2.4. Procedimiento analítico

La medida del porcentaje de recuperación de los plaguicidas de las matrices que se analizan, exige reproducir en los estudios realizados las mismas condiciones en que se van a encontrar dichos analitos en los extractos procedentes de muestras reales. En los estudios realizados se han llevado a cabo dos tipos de calibrado para determinar la extensión de la influencia de estas matrices. Para ello en primer lugar se prepara la disolución madre de Lindano pesando 12,5 mg de patrón sólido y llevándolo a un volumen final de 50 ml (C_{madre} = 250 mg/l), a continuación se realizan una dilución para obtener una disolución con todos los plaguicidas, que en el caso de lindano se toma 2 ml de la disolución madre y se lleva a 50 ml.

- *Calibrado con patrón externo (EC)*. Se prepararon disoluciones que contenían cantidades crecientes de patrón de lindano al que se le añade el estándar interno en una concentración de 0,1 mg/l. Se prepararon cuatro puntos tomando los volúmenes y enrasando en un matraz de 2 ml, con lo que se obtiene concentraciones de 0,25, 0,50, 0,75 y 1,00 mg/l con n-hexano.

- *Calibrado con patrón en matriz vegetal (VMC)*. Las disoluciones de la calibración se prepararon utilizando una matriz de pimiento libre de plaguicida al que se le aplica el procedimiento de extracción anteriormente citado y una vez obtenido el extracto se diluye con 20 ml de n-hexano. En cuatro matraces de 2 ml se añade 0,1 mg/l de dieldrin y 50, 100, 150 y 200 µl de lindano enrasando con el extracto diluido de pimiento para obtener las siguientes concentraciones: 0,25, 0,50, 0,75 y 1,00 mg/l

Cada calibrado se realiza tres veces a lo largo del día inyectándolo secuencialmente en el GC-ECD en las mismas condiciones y obtiene tres calibrados en cada matriz con una diferencia de 24 horas entre el primero y el último calibrado.

Para el estudio de recuperación se procede a adicionar con lindano de concentración 0,5 mg/l a la matriz de pimiento antes de la extracción. Las muestras adicionadas se extraen usando el procedimiento descrito anteriormente.

3. COMPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRADO. ANCOVA

El objetivo de plantear una Función de Corrección es poder calcular el contenido de analito (Lindano) de una muestra vegetal, en este caso pimiento, y evaluar su aplicabilidad utilizando un calibrado en disolvente corrigiendo este contenido de analito al valor real, es decir al que se obtendría al utilizar el método de adición de patrón para cuantificar la muestra correctamente.

Para establecer esta Función de Corrección se realizan tres réplicas de cada calibrado al día, tanto para el calibrado de patrón externo (EC) como para el calibrado en presencia de matriz vegetal (VMC).

Estas experiencias se realizaron repetidamente durante un periodo de 6 meses (desde diciembre de 1999 hasta mayo de 2000) donde una de las experiencias fue realizada en un equipo diferente a las demás experiencias. En total tendremos 4 experiencias diferentes repetidas tres veces para cada metodología (EC y VMC). Todas las rectas de calibrado se realizan en presencia de un estándar interno (Dieldrín) representando el cociente, R, entre la altura del patrón, A_L (Lindano) y la altura de estándar interno, A_D (Dieldrín) frente a la concentración de patrón.

3.1. Estudio de repetibilidad: intra-comparación de calibrados

Estas experiencias se realizaron estableciendo tres réplicas en cada calibrado (EC y VMC) con el objeto de evaluar la repetibilidad de cada calibrado en un día. La reproducibilidad de EC y VMC fue estudiada realizando réplicas para cada una de ellas (Diciembre 99, Marzo, Abril y Mayo 00). Los datos experimentales aparecen en la Tabla 1 del Anexo C2.

Una vez realizas las experiencias, los datos experimentales se ajustan a una línea recta mediante regresión por mínimos cuadrados (LSR) obteniendo a partir de ella los parámetros de la regresión (Tabla 2 del Anexo C2).

Para comparar las curvas de calibrado mediante ANCOVA es necesario realizar, en primer lugar, una comprobación de la homogeneidad de las varianzas mediante el **test de Cochran**. Una vez calculado el estadístico G (G_{SC} y G_{VMC} en Tabla 3 del Anexo C2), este se compara con un tabulado G_{tab} (95%, 3, 3) = 0,8709, obteniéndose que no existe diferencia significativa en ninguno de los casos, por lo que podremos asegurar que existe homogeneidad de varianzas.

La *comparación de las pendientes* de los calibrados (réplicas de cada metodología) se lleva a cabo calculando el estadístico F (Tabla VI.1) como cociente de las varianza s_N^2 y s_D^2 calculadas a partir de la regresión reducida y completa. Este estadístico se compara con un tabulado para un nivel de confianza de 95% y 2 y 6 grados de libertad (F_{tab} = 5,143) se obtiene que en todos los casos las pendientes no difieren significativamente con una probabilidad mayor de 90%.

Tabla VI.1.

Resultados para ANCOVA en la intra-comparación de las calibraciones EC y VMC.

	EC		VMC	
	F_{cal} (b) (P %)	**F_{cal} (a) (P %)**	**F_{cal} (b) (P %)**	**F_{cal} (a) (P %)**
Diciembre 1999	0,0001 (99,9)	0,003 (99,7)	0,002 (97,7)	0,023 (97,7)
Marzo 2000	0,001 (99,9)	0,016 (98,4)	0,001 (99,4)	0,006 (99,4)
Abril 2000	0,003 (99,7)	0,071 (93,2)	0,029 (97,2)	0,104 (90,2)
Mayo 2000	0,011 (98,9)	0,102 (90,4)	0,003 (99,7)	0,007 (99,3)

Con el fin de realizar la *comparación de los términos independientes* es necesario hacer una única recta con todas las réplicas de una misma experiencia (Tabla 4 del Anexo C2). El estadístico F (Tabla VI.1) se obtiene como cociente de las varianzas $S'_N{}^2$ y $S'_D{}^2$ que se compara con un tabulado para un 95% de confianza y 2 y 8 grados de libertad (F_{tab} = 4.459). Al igual que en el caso de las

pendientes todas las réplicas presentan un valor de P > 5%, por lo que podemos afirmar que no existe diferencia significativa entre los términos independientes.

Todas las réplicas de cada experiencia, dado que no presentan diferencias significativas, se utilizarán para hacer un único calibrado (cuatro calibrados para EC y cuatro para VMC) y cada uno de los calibrados constará de 12 datos experimentales (Tabla 4 del Anexo C2).

3.2. Estudio de similitud entre los calibrados EC y VMC: inter-comparación de calibrados.

El segundo paso es comparar las curvas de calibrado correspondientes a cada metodología; es decir para cada experiencia (Diciembre 99 a Mayo 00) vamos a comparar si la curva obtenida con la metodología EC difiere significativamente de la obtenida con VMC. Esta comparación es llevada a cabo mediante el test t-Student dado que solamente tenemos dos curvas que comparar.

Al igual que en el apartado anterior, comprobamos que existe homogeneidad de varianzas mediante el **test de Snedecor,** obteniendo que no existe diferencia significativa pues, en todos los casos, el estadístico F_{global} (Tabla 3 del Anexo C2) es inferior a F_{tab} (95%, 10, 10) = 2,978.

Ahora bien, en la *comparación de las pendientes* observamos que todas las pendientes difieren significativamente (P < 5%) (Tabla VI.2), esto es indicio de que existen errores sistemáticos proporcionales debidos al efecto matriz.

En la *comparación de los términos independientes* (Tabla VI.2) observamos que excepto en la experiencia de Abril 00 todos los valores de P < 5% por lo que además hay indicios de que existen errores sistemáticos constantes. Por lo tanto los calibrados de patrón externo (EC) son estadísticamente diferentes a los calibrados realizados en matriz de pimiento (VMC) como muestra la Figura VI.1.

Tabla VI.2.

Resultados para el test t-Student en la inter-comparación de las calibraciones EC y VMC

	t_{exp} (b)	P(b) %	t_{exp} (a)	P(a) %
Diciembre 1999	5,41	0,0	0,57	57,1
Marzo 2000	6,58	0,0	1,10	28,2
Abril 2000	33,8	0,0	21,96	0,0
Mayo 2000	10,70	0,0	1,32	20,1

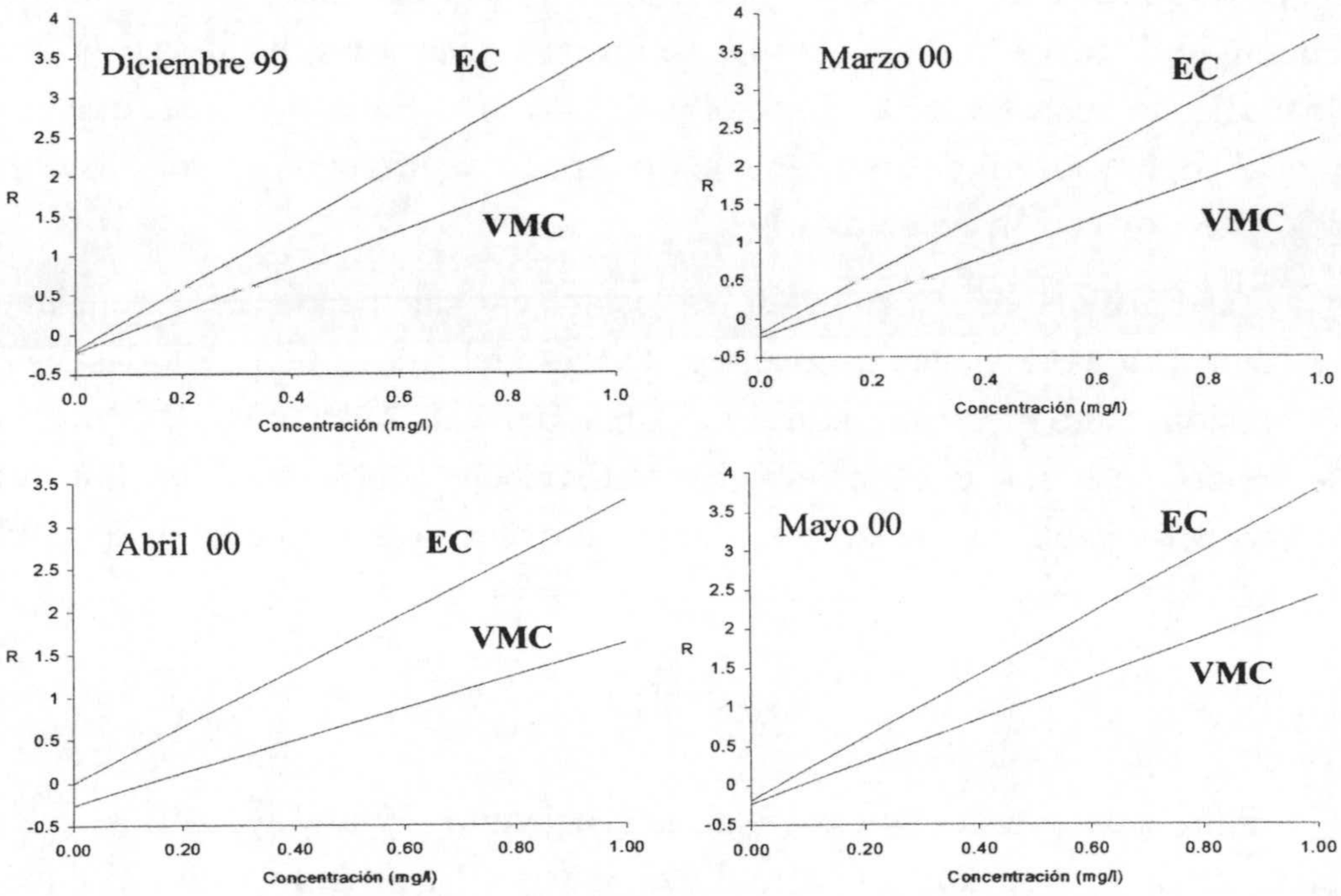


Figura VI.1

Comparación de los calibrados EC y VMC

4. FUNCIÓN DE CORRECCIÓN

En todas las experiencias realizadas se consideran dos tipos de calibrados: calibrado con patrón externo (EC) y calibrado en presencia de matriz vegetal (VMC). Dado que en todas ellas las pendientes de los calibrados EC y VMC son diferentes entre sí y no existe diferencia significativa entre los términos independientes, a excepción de la experiencia de Abril que más tarde demostraremos que puede ser considerada como anómala ya que se realizó con un equipo diferente, es posible establecer una Función de Corrección, $CF_{E\text{-}VM}$, entre el calibrado EC y el VMC.

Es necesario destacar que una de las principales ventajas del uso de las Funciones de Corrección es que aunque las características de las calibraciones puedan variar con el tiempo o por cambios instrumentales, estas variaciones afectarán, en la mayoría de los casos, de forma similar a las distintas calibraciones permaneciendo constante la relación entre ellas. Este provoca que incluso pequeñas operaciones de mantenimiento aplicadas al equipo no afecten a la Función de Corrección obtenida.

La Función de Corrección se establece calculando el Coeficiente de Corrección B a partir de las pendientes (Tabla 4 del Anexo C2) de todas las rectas de regresión tanto del calibrado EC como del calibrado VMC. Como hemos considerado que no existen errores sistemáticos constantes la Función de Corrección se simplifica haciendo el Coeficiente de Corrección A igual a cero:

$$C^{*}_{E-VM} = \underbrace{\overline{\frac{a_E - a_{VM}}{b_{VM}}}}_{0} + \overline{\frac{b_E}{b_{VM}}} \cdot C_E = \overline{B} \cdot C_E \qquad \text{(VI-1)}$$

Para cada una de las experiencias (Diciembre 99 a Mayo 00) se calcula el Coeficiente de Corrección B (Tabla 6 del Anexo C2). En la Figura VI.2, donde se representan todas las $CF_{E\text{-}VM}$ se observa que la experiencia de Abril 00 es diferente a las demás por lo que vamos a aplicar los **tests de Bartlett** y **Dixon** para probar que esta experiencia es, en efecto, diferente a las demás.

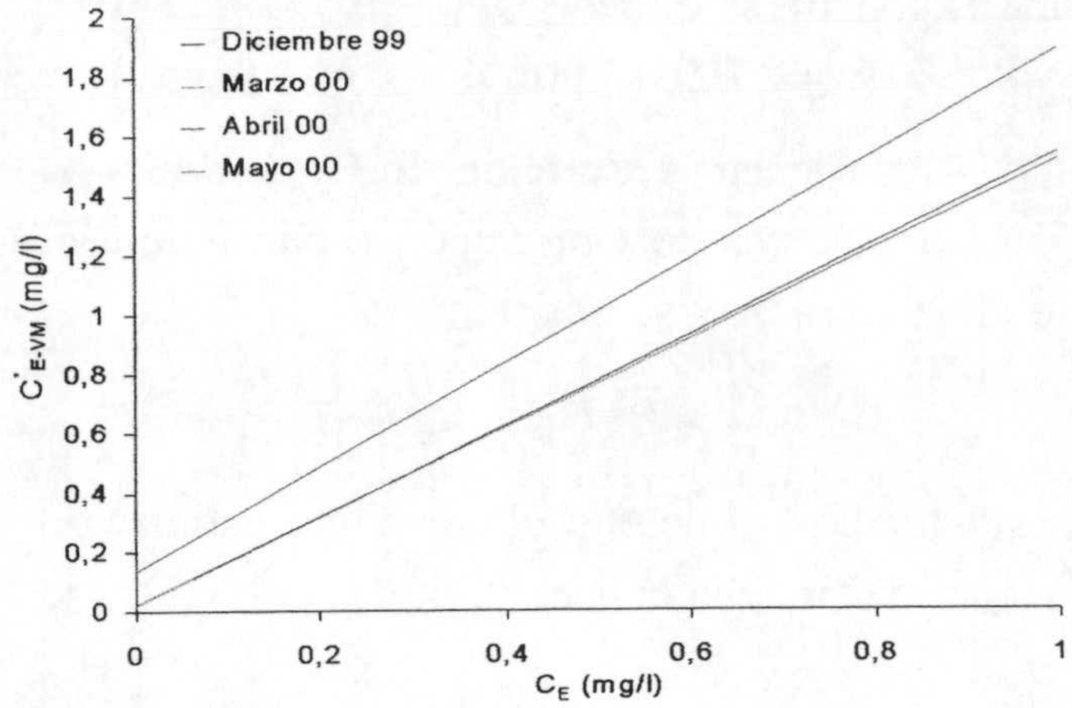


Figura VI.2.

Función de Corrección $CF_{E\text{-}VM}$ para todas las experiencias.

❑ *Test de Bartlett* es aplicado para evaluar la variabilidad entre los coeficientes, para lo cual se deben calcular los grados de libertad asociados a los coeficientes mediante la ecuación de Welch-Satterthwaite. Estos grados de libertad son calculados a partir de varianza asociada a cada Coeficiente de Corrección (Tabla 8 del Anexo C2). El estadístico χ^2 es calculado para el coeficiente B obteniendo:

$$\chi^2(\mathrm{B}) = 18{,}030$$

Este estadístico sigue una distribución χ^2 teórica. Por lo tanto como tanto el estadístico calculado es menor que el tabulado $\chi^2_{tab} = 9{,}348$ para una valor de $\alpha = 2{,}5$ % y 3 grados de libertad (P = 0,04%) se concluye que no hay diferencia significativa entre las varianzas comparadas.

❑ *Test de Dixon* se utiliza para evaluar si existe algún Coeficiente de Corrección discrepante o anómalo. Para ambos coeficientes se utilizará una de las la segunda expresión para $3 \leq k \leq 7$ dado que el valor más alejado de la media es el mayor correspondiente a la experiencia de Abril 99 (B = 1,7482). Aplicando el test se obtiene que $Q_{exp} = 0{,}885$ es mayor que el tabulado al 95% y k = 4 (Q_{tab} = 0,765) por lo tanto, como ya habíamos predicho anteriormente, este valor se considera como anómalo y habrá que rechazarlo. A continuación se realiza otra vez el test para el siguiente valor discrepante que ahora sería (B = 1,5237),

utilizando la misma expresión se obtiene $Q_{exp} = 0,8959$ que es menor que el valor tabulado al 95% y k = 3 ($Q_{tab} = 0,941$) por lo que este valor debe ser aceptado.

Por lo tanto para calcular la **Función de Corrección** se estima a partir del valor medio de los Coeficientes de Corrección a partir de todas las experiencias realizadas excepto el de Abril 00 y se obtiene:

$$C^*_{E-VM} = \overline{B} \cdot C_E = 1,504 \cdot C_E \qquad \text{(VI-2)}$$

Así, con esta función podemos obtener una estimación del valor real de concentración C^*_{E-VM} a partir de la concentración C_E estimada del calibrado EC.

5. VALIDACIÓN

Como paso previo a la validación de la Función de Corrección antes obtenida es necesario llevar a cabo dos pasos previos para evaluar la presencia de efecto matriz, recordamos que ya habíamos puesto de manifiesto su existencia mediante ANCOVA, y la ausencia de pérdidas de analito en el proceso de extracción.

Las muestras adicionadas, para el test de Recuperación, son analizadas junto con las de calibración, obteniendo la señal cromatográfica de Lindano (y Dieldrin como estándar interno), las muestras fueron cuantificadas utilizando los diferentes calibrados. Dependiendo del método de calibración aplicado para la cuantificación, se han obtenido diferentes concentraciones (Tabla 7 del Anexo C2):

- C_E si se utiliza el calibrado EC para cuantificar.
- C_{VM} si se utiliza VMC.

A partir de estas concentraciones se obtienen las correspondientes Recuperaciones ($\Re_E$ y $\Re_{VM}$), en tanto por ciento, dividiendo la concentración estimada (C_E y C_{VM}) por la concentración de referencia o concentración añadida (Tabla 7 del Anexo C2).

En primer lugar se aplica el **test de Dixon** a los valores de recuperación obtenidos para evaluar la posible presencia de valores anómalos en las concentraciones estimadas. Recordamos que hay que seleccionar la expresión de Q_{exp} con el número de muestras entre 8 y 12 puesto que tenemos 9 recuperaciones, estas han sido obtenidas para una concentración añadida de 0,5 mg/l. El valor tabulado para 9 datos y un nivel de confianza del 95% sería $Q_{tab} = 0,512$:

- *Calibrado EC*. El valor sospechoso es $\Re = 67,8$ %, el valor del estadístico es $Q_{exp} = 0,406$ y por tanto no hay valores anómalos ($Q_{exp} < Q_{tab}$).

- *Calibrado VMC*. El valor sospechoso es $\Re = 98,2$ %, el estadístico es $Q_{exp} = 0,359$. Por tanto como $Q_{cal} < Q_{tab}$ el valor considerado como discrepante debe ser aceptado.

Para poner de manifiesto la presencia de efecto matriz se realiza un test para comprobar si el valor medio de la recuperación difiere significativamente del 100% en cada uno de los métodos establecidos y para cada nivel de concentración (Tabla 8 del Anexo C2). Este valor se compara con uno tabulado para $n_{\Re} - 1 = 8$ grados de libertad y un nivel de confianza $\alpha = 95\%$ ($t_{tab} = 2,306$) obteniendo que para el calibrado EC el valor $P < 5\%$ por lo que la concentración estimada proporciona valores mucho menores que el valor real o añadido debido a la presencia de matriz vegetal.

Para verificar la ausencia de pérdidas de analito se comprueba que el valor de recuperación obtenido con el calibrado VMC ($\Re_{VM}$) no difiere significativamente del 100 % para el nivel de concentración estudiado, obteniendo un valor de P superior al 5% ($P = 12,2$). Esto implica que no existen pérdidas de analito en el proceso de tratamiento de la muestra.

5.1. Metodología de validación 1

La aplicabilidad de la Función de Corrección se valida comparando las recuperaciones obtenidas a partir de las muestras adicionadas analizadas en cada experiencia mediante el calibrado VMC ($\Re_{VM}$) con las recuperaciones obtenidas aplicando la correspondiente Función de Corrección a los resultados obtenidos

usando directamente el calibrado EC para la cuantificación ($\Re^*_{E\text{-}VM}$) (Tabla 9 del Anexo C2).

Estas recuperaciones son comparadas utilizando un **test de muestras apareadas** que consiste en comprobar si hay diferencia significativa entre el valor medio de las diferencias de ambos métodos ($\Re_{VM}$ y $\Re^*_{E\text{-}VM}$) y cero. Como muestra la Tabla 10 del Anexo C2, no existe diferencia significativa entre las recuperaciones comparadas (P > 5%) por lo que podemos concluir que la CF es válida permitiéndonos obtener una estimación correcta del valor real sin necesidad de usar matriz vegetal en la calibración.

5.2. Metodología de validación 2

En este caso, considerando las concentraciones estimadas a partir de la Funciones de Corrección, $C^*_{E\text{-}VM}$ podemos calcular una recuperación "aparente" ($\Re^*_E$) (Tabla 9 del Anexo C2). Se obtiene dividiendo la concentración $C^*_{E\text{-}VM}$ por la concentración estimada por el calibrado EC (C_E). Estas recuperaciones "aparentes" se denominan también recuperaciones de calibración y representan la relación de analito cuantificado antes de la aplicación de la correspondiente Función de Corrección.

Como no hay pérdidas de analito, la aplicabilidad de las Funciones de Corrección son validadas comparando estas recuperaciones "aparentes" ($\Re^*_E$) con las correspondientes recuperaciones globales, obtenidas directamente de cuantificar las muestras adicionadas con el calibrado EC, ($\Re_E$). Estas recuperaciones son comparadas utilizando un **test de muestras apareadas** y como muestra la Tabla 10 del Anexo C2, no existe diferencia significativa entre las recuperaciones comparadas (P > 5%).

Así, podemos concluir que la metodología propuesta, que implica el establecimiento y aplicación de $CF_{E\text{-}CFM}$ a los resultados obtenidos directamente con los calibrados EC es apropiada para la estimación de la concentración real de analito, mostrando recuperaciones que no difieren del 100%, sin incluir la matriz vegetal para el análisis de rutina, lo cual reduce el coste del análisis y el tiempo del mismo.

6. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE LINDANO EN PIMIENTO

El contenido de Lindano en una muestra de pimiento, CONT, puede ser estimado mediante dos metodologías diferentes. Por un lado, mediante una calibración indirecta, el cual que puede ser un calibrado con patrones en matriz vegetal o un calibrado con patrones externos con una corrección posterior por recuperación (metodología aplicada en el capítulo IV).

Por otro lado, el contenido de Lindano puede ser estimado aplicando la Función de Corrección, estimando previamente la concentración mediante un calibrado con patrones externos (EC), que es la opción adoptada en este capítulo. Así el contenido de Lindano viene dado por la expresión:

$$CONT = \frac{C^*_{E-VM} \cdot F_{vol}}{C_{muestra}} = \frac{(B \cdot C_E) \cdot F_{vol}}{C_{muestra}} \qquad \text{(VI-3)}$$

donde $C_{muestra}$ = 10 Kg/l es la concentración de muestra de la disolución original y F_{vol} = 4 es el factor volumétrico debido al tratamiento de muestra. Así obtenemos que el contenido de Lindano en la muestra es:

$$CONT = \frac{(1{,}504 \cdot 0{,}330\ mg/l) \cdot 4}{10\ Kg/l} = 0{,}20\ mg/Kg$$

7. INCERTIDUMBRE ASOCIADA AL CONTENIDO DE LINDANO EN PIMIENTO

La incertidumbre asociada al contenido de analito se calcula aplicando la regla de propagación de varianzas a la ecuación VI-3 (Figura VI.3):

$$u_{rel}(CONT) = \sqrt{u_{rel}{}^2(C^*_{E-VM}) + u_{rel}{}^2(F_{vol}) + u_{rel}{}^2(C_{muestra})} \qquad \text{(VI-4)}$$

y por tanto depende de la incertidumbre asociadas a:

- la concentración de Lindano estimada a partir de $CF_{E\text{-}VM}$, $u(C^*_{E\text{-}VM})$;
- factor volumétrico de la disolución de muestra, $u(F_{vol})$;
- concentración de muestra a analizar, $u(C_{muestra})$.

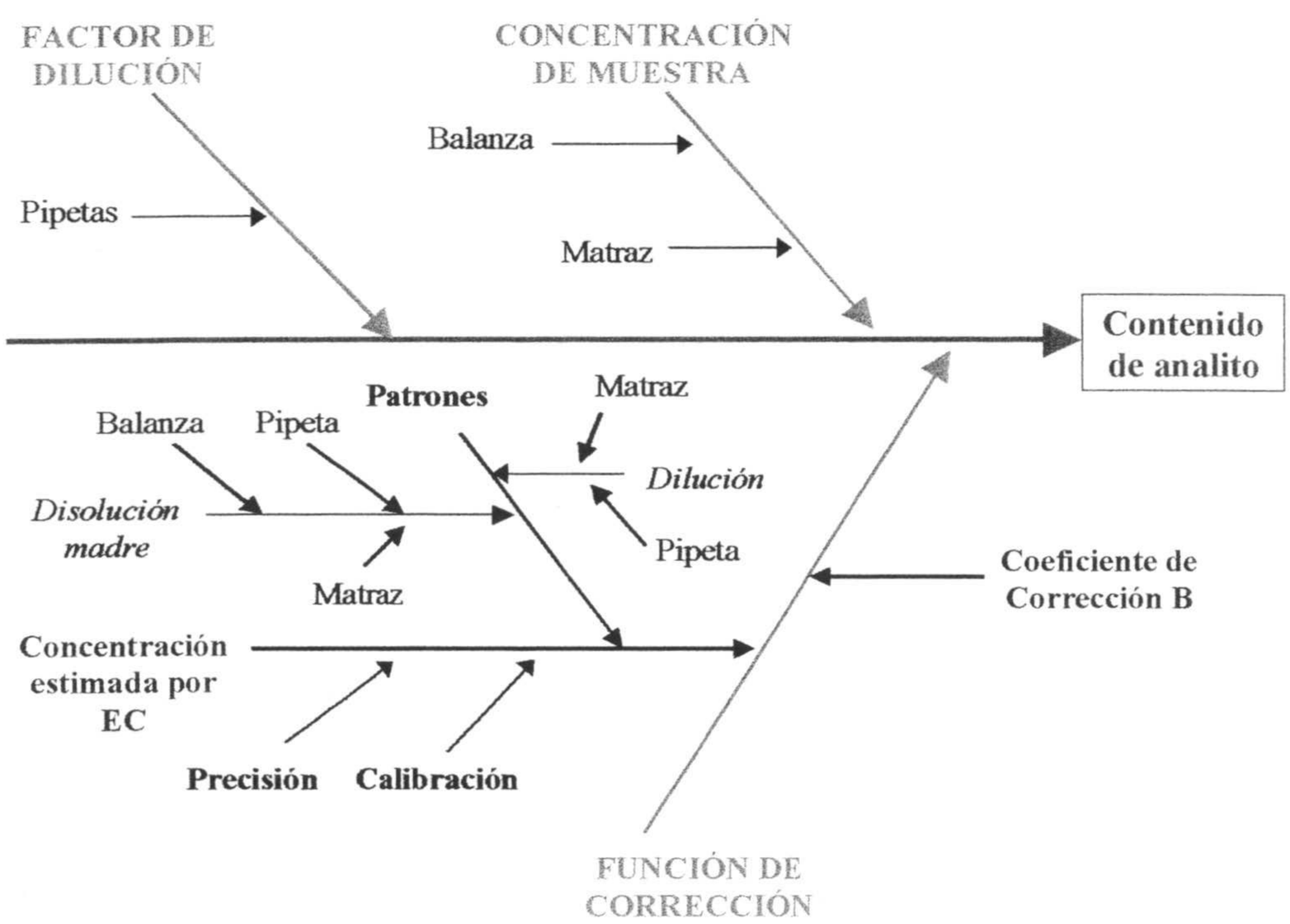


Figura VI.3
Diagrama cuasa-efecto *(Diagrama de Ishikawa)*

7.1. Incertidumbre asociada al uso de la Función de Corrección

Para calcular la incertidumbre asociada a la concentración $C^*_{E\text{-}VM}$ aplicamos la regla de propagación de varianzas y covarianzas a la Función de Corrección $CF_{E\text{-}VM}$ dada por la ecuación VI-2. Esta CF depende de:

- El Coeficiente de Corrección B, y
- La concentración estimada mediante EC

Por lo que debemos calcular cada una de estas contribuciones.

La incertidumbre debida a la pendiente o ***coeficiente de corrección B***, u(B), se calcula como contribución de la incertidumbre derivada de la función estimada, $u(B)_{func}$, y la incertidumbre derivada de la precisión, $u(B)_{prec}$.

La incertidumbre derivada de la función estimada se calcula a partir de las pendientes de cada una de las rectas de calibrado y de las correspondientes desviaciones estándar asociadas a cada uno de ellos. Para cada experiencia se obtiene un valor diferente por lo que la incertidumbre asociada al coeficiente de corrección B derivada de la función vendrá dado por el valor medio de todas las incertidumbres:

$$u^2(B)_{func} = 8{,}17 \cdot 10^{-3}$$

La incertidumbre derivada de la precisión se estima a partir de la varianza de los distintos Coeficientes de Corrección B para las distintas experiencias realizadas:

$$u^2(B)_{prec} = 8{,}70 \cdot 10^{-5}$$

Por lo tanto la incertidumbre asociada al coeficiente de corrección B, u(B), se calcularía como la suma de cuadrados de la contribución de la regresión y la correspondiente precisión:

$$u(B) = \sqrt{8{,}17 \cdot 10^{-3} + 8{,}70 \cdot 10^{-5}} = 0{,}091$$

La incertidumbre relativa asociada a la **estimación de la concentración de lindano mediante el calibrado EC** ha sido calculada en el capítulo IV.

Recordemos que la incertidumbre asociada al contenido de residuo de Lindano en pimiento del resultado depende fundamentalmente de tres componentes (Ecuación IV-15): una derivada de la preparación de los patrones ($u^2(patrón)$), una derivada de la calibración ($u^2(func)$) y una derivada de la precisión ($u^2(prec)$). Considerando las tres contribuciones, la incertidumbre asociada a la concentración estimada mediante el calibrado EC vale:

$$u(C_E) = \sqrt{u^2(\text{patrón}) + u^2(\text{func}) + u^2(\text{prec})} = 0{,}025 \text{ mg/l}$$

$$u_{rel}(C_E) = \frac{0{,}025 \text{ mg/l}}{0{,}331 \text{ mg/l}} = 0{,}075 \quad \rightarrow \quad 7{,}5\ \%$$

Por lo tanto, la incertidumbre asociada al uso de la Función de Corrección para las contribuciones calculadas es:

$$u(C^*_{E-VM}) = \sqrt{C_E{}^2\ u^2(B) + (B)^2\ u^2(C_E)} = 0{,}048\ mg/l$$

$$u_{rel}(C^*_{E-VM}) = \frac{0{,}048}{0{,}331} = 0{,}145 \quad \rightarrow \quad 14{,}5\ \%$$

7.2. Incertidumbres asociadas al factor volumétrico y a la concentración de la disolución de muestra

Estos términos fueron calculados en el capítulo IV (Ecuaciones IV-23 y IV-24) y valen:

$$u_{rel}(F_{vol}) = 0{,}003 \qquad u_{rel}(C_{muestra}) = 0{,}002$$

7.3. Incertidumbre combinada

La incertidumbre asociada al contenido de Lindano en la muestra vale, por tanto:

$$u_{rel}(CONT) = \sqrt{u_{rel}{}^2(C^*_{E-VM}) + u_{rel}{}^2(F_{vol}) + u_{rel}{}^2(C_{muestra})} = 0{,}145 \rightarrow 14{,}5\ \%$$

Como se muestra la figura IV.4, la contribución más significativa es la debida al uso de la Función de Corrección y dentro de esta las dos contribuciones son prácticamente iguales.

Por tanto se obtiene que el contenido de Lindano en pimiento estimado aplicando la Función de Corrección con su incertidumbre asociada vale (k=2):

CONT = 0,20 ± 0,06 mg/Kg (k = 2)

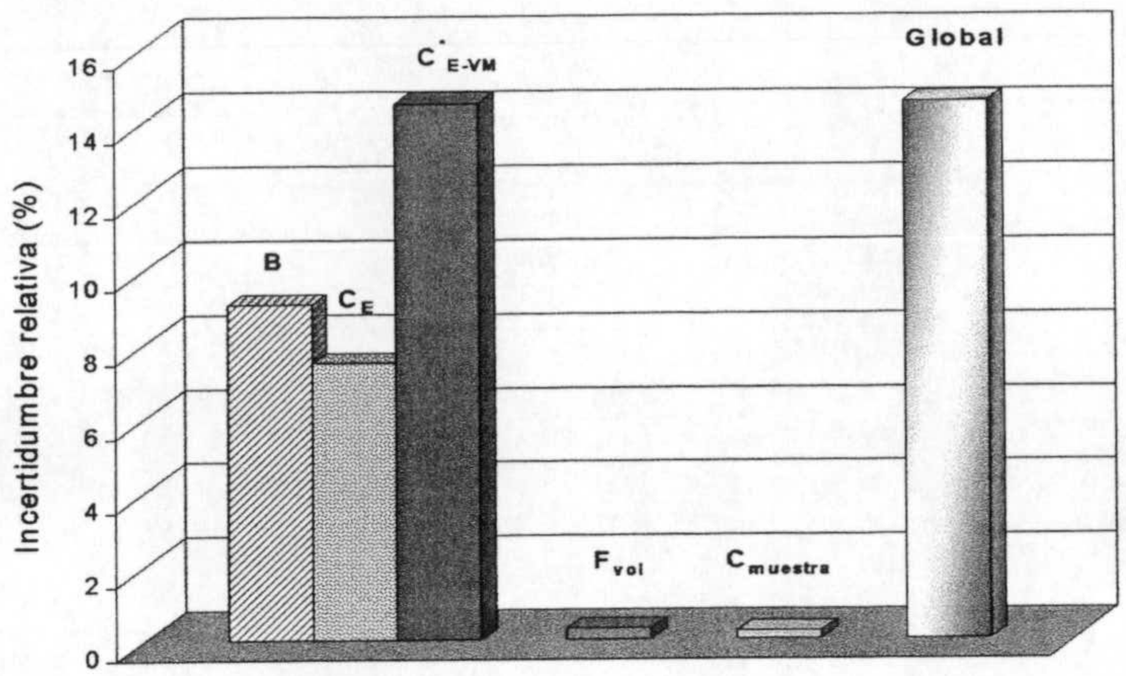


Figura VI.4.

Contribuciones de incertidumbre al contenido de Lindano en pimiento

8. CONCLUSIONES

La metodología propuesta de corrección del efecto matriz mediante el uso de Funciones de Corrección presenta algunas ventajas para su utilización en análisis en rutina ya que supone un ahorro en material consumible, mano de obra y tiempo de análisis del 50 %.

Así, un experimento realizado con calibración externa, EC, implica un costo de aproximadamente € 5,3 derivado del coste del disolvente (€ 0,5), patrones (€ 1,2), otros materiales consumibles (€ 0,6) y tiempo y mano de obra (€ 3,0). Mientras que en una calibración con patrones en matriz vegetal, VMC, el coste por análisis es aproximadamente € 10,5, ya que el gasto en disolvente es unas tres veces superior (€ 1,5) y el tiempo necesario para la extracción es dos veces superior (€ 6), además del material fungible que supone € 0,6. Por lo que el coste final por análisis es casi el doble que en EC. Sin embargo, esta disminución en el costo implica un aumento de incertidumbre, que en este caso es en la misma proporción (Figura VI.5).

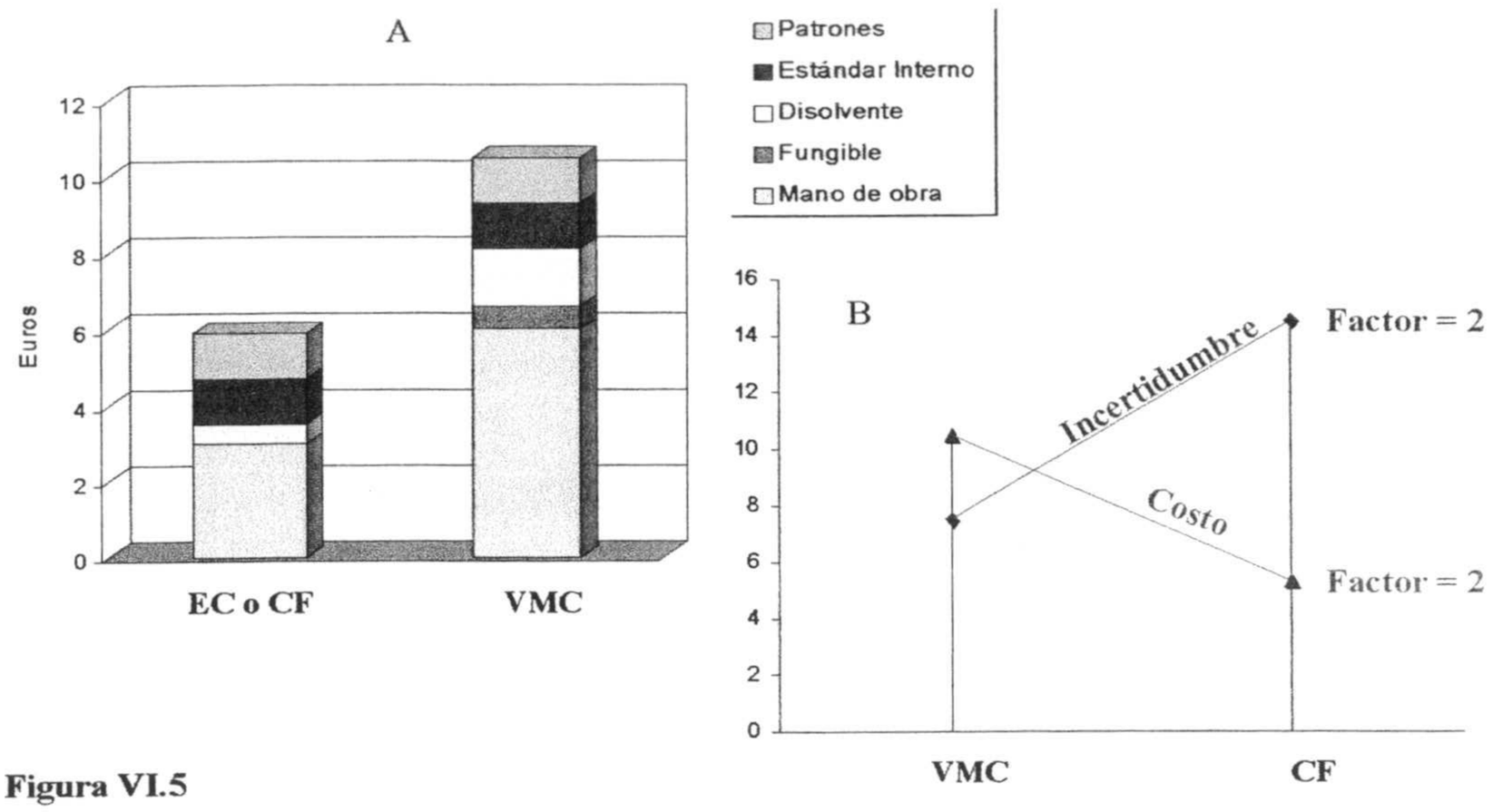


Figura VI.5

A) Coste de los componentes utilizados en los calibrados EC y VMC

B) Comparación entre el costo y la incertidumbre asociada a la metodología aplicada

Bloque II

ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo VII

APLICACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CORRECCIÓN II: CUANTIFICACIÓN DE LA EXPOSICIÓN DÉRMICA A PROCIMIDONA DE TRABAJODORES DE INVERNADERO

1. ANTECEDENTES

La Reglamentación Técnico–Sanitaria (RTS) para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, Real Decreto 3349/1983, está en armonía con la Directiva 78/631/CEE sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos (plaguicidas) y establece las normas de fabricación, almacenamiento, comercialización y utilización de plaguicidas, así como las bases para la fijación de los límites máximos de residuos admitidos en productos de alimentación.

El uso de pesticidas para la protección de plantas está regulado a través de procedimientos oficiales para la evaluación de riesgos. La base legal para dicha regulación en la UE es la directiva 91/414/CEE[1], la cual establece en su Anexo VI[2], la necesidad de obtener datos fiables de exposición, siendo la exposición dérmica la que más contribuye al total en condiciones de trabajo normales[3].

Los métodos correspondientes a la medida de la exposición dérmica emplean todos ellos sustitutos de la piel como medio de muestreo y consisten, en general, en situar un medio de colección de la especie que se va a medir. Entre los métodos más utilizados está el método del Parche y el del cuerpo completo.

El método del Parche[4,5,6,7] usa un número variable de parches, que actúan como medio de muestreo, adheridos a diferentes áreas del cuerpo. El método se

---

1. Council Directive 91/414/EEC. Official Journal of the European Communities n° L230, 19.8.1991, p 1. Commission of the European Communities, Luxembourg, 1991.
2. Council Directive 94/43/EC establishing Annex VI to Directive 91/414/EEC. Official Journal of the European Communities n° L227, 1.9.1994, p 31. Commission of the European Communities, Luxembourg, 1994.
3. Fenske R.A.and Elkner K.P., *Toxicology and Industrial Health*, 6, 349-371, 1990.
4. World Health Organisation, *Survey of exposure to organophosphorous pesticides in agriculture*, Standard protocol, VBC/75.9 WHO, Geneva, 1975.
5. World Health Organisation, *Field surveys of exposure to pesticides*, standard protocol, Toxicology Letters, 33, 223-235, 1986.
6. Environmental Protection Agency, Pesticide assessment guidelines, Subdivision U, Applicator exposure monitoring, 1987.
7. OCDE/GD(97)148: Guidance document for the conduct of studies of occupational exposure to pesticides during agriculture application, 1997.

basa en la suposición de que el plaguicida se distribuya uniformemente sobre ciertas áreas del cuerpo, es decir que la deposición del plaguicida sobre el parche es representativa de la deposición sobre la parte del cuerpo donde este está situado.

El método del cuerpo completo consiste en el uso de trajes protectores como medio de muestreo y el posterior análisis de éste, ya sea de forma íntegra, lo que proporciona la cantidad total de plaguicida en contacto con la persona expuesta, o cortándolo en trozos y analizando cada uno por separado de forma que es posible estudiar la distribución del plaguicida sobre el cuerpo.

Si en el pasado, los datos obtenidos con un método estándar o un método escrito en legislación se consideraba como válido sin otras consideraciones, hoy en día existe un mayor interés en incorporar procedimientos de aseguramiento de la calidad en los métodos analíticos. Este interés es de especial relevancia en la evaluación de la exposición dérmica a pesticidas donde importantes implicaciones sobre la salud, económicas y sociales pueden derivarse de los datos obtenidos.

En este contexto varios autores indican la necesidad de realizar una investigación sistemática sobre métodos de muestreo y análisis para la evaluación de exposición dérmica[8, 9,10]. Un primer paso para obtener datos analíticos viables es validar el método analítico estableciendo parámetros característicos como limites de detección y determinación, rangos lineales, porcentajes de recuperación y exactitud (precisión y veracidad). Pero no sólo es necesario validar la etapa instrumental sino los procedimientos de muestreo, el procesado de las muestras, el rango de concentraciones de analito y el rango de matrices en el que el método puede ser aplicado[11]. Una vez validado el método analítico incorporando un procedimiento de calidad que asegure que las medidas están bajo control estadístico, se debe calcular la incertidumbre de los datos que se generan.

En general, hasta el momento la influencia de la matriz de la muestra no está bien establecida. Los coextractos pueden modificar la resolución analítica aumentando el nivel de errores aleatorios y/o introduciendo un error sistemático

8. Chester G., *Ann. Occup. Hyg*, 37, 509-523, 1993.
9. Fenske R.A, *Ann. Occup. Hyg.*, 37, 687-706, 1993.
10. Van Hemmen J.J. and Brouwer D.H., *The Science of the Total Environment*, 168, 131-141, 1995.
11. Egea González F.J., Castro Cano M.L., Martínez Vidal J.L., Glass R.C. and Cruz Márquez M., *Chromatographia*, 50, 293-298, 1999.

constante que afecte a la señal del blanco o proporcional si afecta a la sensibilidad analítica[12,13].

En este sentido el proceso de calibración contribuye a la incertidumbre de las medidas analíticas en una importante extensión, existiendo un importante vacío en la información acerca de la contribución de los coextractos de la matriz en dicha incertidumbre. Artículos recientes en diferentes campos de los análisis de pesticidas[11,14,15] incluyen el efecto de la matriz en la etapa de calibración preparando las disoluciones de calibración con extractos procedentes de muestras sin contaminar o calibración en matriz (*Matrix-matched Calibration*)[16,17]. Esto está considerado como una forma efectiva de evitar errores derivados de los efectos de la matriz en la cualificación de los analitos. Sin embargo, este procedimiento no proporciona datos sobre la magnitud del efecto de la matriz e introduce un importante aumento en el coste y tiempo del análisis.

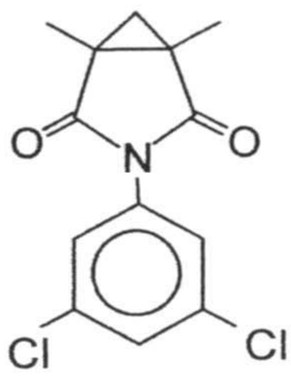
En la evaluación de la exposición dérmica existen dos tipos de matrices que pueden afectar a la cuantificación de los analitos: la matriz procedente del medio de muestreo (el traje protector o parche) y la matriz procedente del caldo de aplicación, que contiene el ingrediente activo y el excipiente de formulaciones de pesticidas, como disolventes, surfactantes, etc. La valoración de la exposición normalmente se lleva a cabo seccionando el traje y extrayendo los pedazos (o parches) con el disolvente apropiado y cuantificando con curvas de calibración estándar preparadas en disolvente o utilizando extracto de la matriz de muestra. En la mayoría de los casos no es posible incorporar la matriz de la formulación del

---

12. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Almansa López E., Egea González F.J., Castro Cano M.L., Garrido Frenich A. and Martínez Vidal J.L., 23rd International symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC '99), Granada (Spain), 1999.
13. Cuadros Rodríguez L., Almansa López E.M., Egea González F.J., García Campaña A.M. and Martínez Vidal J.L., Euroanalysis XI, Lisboa (Portugal), 2000.
14. Martínez Vidal J.L., Egea González F.J., Delgado Cobos P., Machera K., Capri E., Tuomainen A. and Glass C.R., 2nd European Pesticide Residue Workshop, Almería (Spain), 1998.
15. Hajslova J., Holadova K., Kocourek V., Poustka J., Godula M., Cuhra P., Kempny M., *J. Chromatogr. A*, 800, 283-295, 1998.
16. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E. and Laso Sánchez J., *Trends Anal. Chem.*, 20, 195-206, 2001.
17. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E. and Bosque Sendra J.M., *Trends Anal. Chem.*, 20, 620-636, 2001.

pesticida comercial a la calibración porque es difícil obtener formulaciones comerciales sin el ingrediente activo (formulaciones del placebo).

Uno de los plaguicidas más utilizado es Procimidona[18]. Su nombre común es (N–(3,5–dicloro-fenil)–1,2–dimetilciclopropano–1,2–dicarboximida).



Procimidona

Forma cristales incoloros con punto de fusión de 166 ºC y presión de vapor de 10,5 mPa a 20 ºC. Este compuesto es estable en condiciones normales de almacenamiento a la luz, temperatura y humedad e inestable en condiciones alcalinas. Es un fungicida sistemático con actividad preventiva y curativa. Puede ser absorbido por las raíces, tronco, ramas y hojas con translación a las flores y a toda la planta. Aparece en el mercado con clortalonil, maneb, zineb y tiram.

2. PROCEDIMIENTO

El objetivo de esta aplicación es establecer una función de corrección para corregir la concentración de procimidona utilizando el calibrado EC, para lo cual se va a estudiar la influencia de la matriz de traje y de la formulación comercial del plaguicida en la cuantificación y evaluación de Procimidona utilizando el método del cuerpo entero (traje Tyvek Pro-Tech).

Para esto se han llevado a cabo tres tipos de curvas de calibración: calibración de patrón externo (EC, *External standard Calibration*), calibración en matriz de traje Tyvek (CMC, *Coverall Matrix-matching Calibration*) y calibración en matriz de traje Tyvek y formulación comercial (CFMC, *Coverall and Formulation Matrix-matching Calibration)*, estableciendo una función de corrección entre las distintas curvas de calibración y estimando la incertidumbre asociada a esta función establecida.

18. Tomlin C., *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 10th Ed., British Crop Protection Council, Croyton, 1994.

Un estudio sistemático de tres tipos de calibración que podrían usarse para cuantificar las muestras se ha llevado a cabo repetidamente a lo largo del tiempo, la primera experiencia se lleva a cabo en Mayo de 2000 y las siguientes en meses consecutivos desde Enero a Julio de 2001 exceptuando Abril y mayo. Durante este tiempo se ha introducido cambios instrumentales (cambio de detector y cambio de columna cromatográfica) que proporcionan una variabilidad en los calibrados producidos pero no en la función de corrección estimada.

2.1. Reactivos y materiales

Los patrones de Procimidona y estándar interno (dieldrin) ambos de una pureza mayor del 99.9% se obtuvieron de Dr. Ehrenstorfer.

El disolvente utilizado para el extracto fue n-hexano (calidad de análisis de residuo, Panreac, Barcelona, España.).

El placebo de formulación comercial de procimidona fue proporcionado por CYANAMID y el surfactante Sufrevit por INAGRA.

Los trajes Tyvek Pro-Tech (DuPont Engineering Productos S.A., L-2984 Luxemburgo) era el equipo de la protección personal (PPE), cuyos extractos fueron filtrados usando una membrana whatman 0,45 μm.

Para la extracción del traje se utilizó un agitador de volteo de 11 de capacidad.

2.2. Equipos

Todos los análisis se llevaron a cabo por cromatografia de gases utilizando para ello un cromatógrafo Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.) Modelo 5890 equipado con un detector de captura electrónica (ECD ^{63}Ni). El ECD fue reemplazado por uno nuevo de las mismas características después del primer experimento (Mayo de 2000) debido a la observación de una frecuencia demasiado alta.

El cromatógrafo disponía de dos columnas unidas:

- Una columna capilar HP-1 de fase no polar (100% dimetilpolisiloxano) sobre sílice fundida de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.22 μm de espesor de fase, suministrado por Hewlet–Packard.

- Una columna capilar HP-1701 con una fase de polaridad intermedia que contiene el 14% de cianopropilfenil y el 86% de dimetilsiloxano, sobre sílice fundida, de longitud 60 m, diámetro interno 0,25 mm y espesor de fase 0,15 μm. Suminstrada por Hewlet–Packard.

Las inyecciones se realizaron con un auto-muestrador HP 7673.

El GC–ECD fue controlado por el software Chemstation HP 3365 instalado en un ordenador personal Hewlet–Packard Vectra–486. Este programa permite desde el control del instrumento hasta el calibrado y cuantificación.

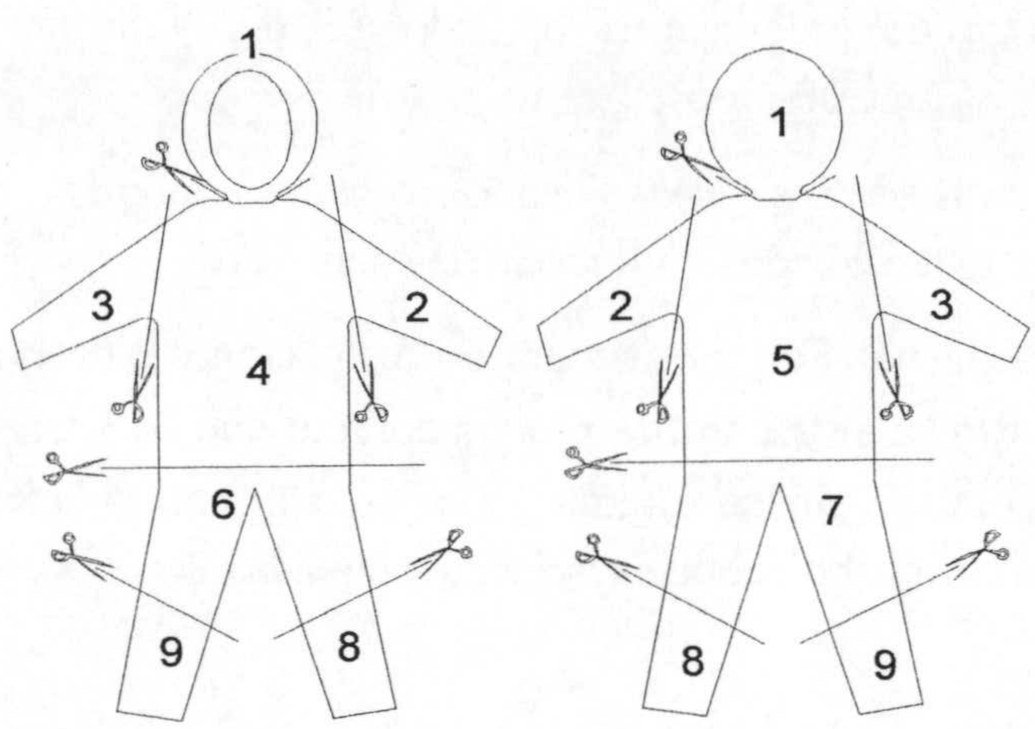
Las temperaturas fueron optimizadas en cada sección del cromatógrafo: 250°C para el inyector (se seleccionó el modo splitless con un tiempo de 2 min. que proporcionaba la mejor señal sin que las columnas llegaran a saturarse) y 300°C para el detector. Para la temperatura del horno se utilizó una rampa de temperatura empezando con 105°C durante 2 min., aumentando 20°C/min hasta 150°C, 10°C/min hasta 250°C y a esta temperatura se mantuvo constante durante 15 min.

El gas del portador fue N_2 de alta pureza a un flujo de 0,85 ml por minuto (flujo correspondiente a una presión en cabeza de columna de 150 KPa) y como gas auxiliar para el detector se utilizó el mismo nitrógeno a un flujo de 60 ml por minuto.

2.3. Extracción de procimidona

La exposición potencial dérmica se ha determinado según el método del "cuerpo completo". Como se ha descrito anteriormente, este consiste básicamente en determinar todo el plaguicida que se deposita sobre el traje utilizado por el trabajador, dividiéndolo en varias secciones y analizándolas por separado. El número de trozos en que se secciona el traje se establece teniendo en cuenta que debe ser un número suficiente para aportar información acerca de la distribución de los plaguicidas por el cuerpo, pero no debe ser un excesivo número de trozos ya que se amplía el coste y tiempo de análisis.

El traje fue seccionado en 9 trozos de tamaño $T_{muestra}$ = 30 x 30 cm^2 como muestra la siguiente figura:



1. Capucha
2. Brazo izquierdo
3. Brazo derecho
4. Torso
5. Espalda
6. De cintura hasta rodillas (muslos frontal)
7. De cintura hasta rodillas (muslos detrás)
8. Pierna izquierda, de rodilla hacia abajo
9. Pierna derecha, de rodilla hacia abajo

A continuación se les somete al procedimiento de extracción colocando cada trozo de traje en una botella de 1l de capacidad y añadiendo una volumen de disolvente n-hexano suficiente para asegurar un buen contacto con el trozo de traje. Los trozos de traje se extraen con $V_{muestra}$ = 250 ml de n-hexano. Se cierra bien la botella comprobando que no se produzcan pérdidas de disolvente y se disponen en un agitador de volteo durante media hora a 30 rpm. Después de la extracción se transfiere una alícuota de cada muestra a un matraz de10 ml al que se le añade 0,5 ml de Dieldrín de 2 mg/l como estándar interno y se inyecta 1 µl en el GC-ECD. Con trozos de traje no contaminado se sigue el mismo procedimiento anterior.

2.4. Procedimiento analítico

La medida del porcentaje de recuperación de los plaguicidas de las matrices que se analizan, exige reproducir en los estudios realizados las mismas condiciones en que se van a encontrar dichos analitos en extractos procedentes de muestras reales.

El extracto de una muestra real está afectado por dos matrices:

- La correspondiente al traje protector
- La correspondiente al caldo de aplicación que ha contaminado al traje protector y que contiene la formulación comercial del plaguicida y otros productos que se añaden como pueden ser tensoactivos.

La disolución madre de procimidona pesando 25 mg y llevándolo a un volumen final de 50 ml (C_{madre} = 500 mg/l).

En los estudios realizados se han llevado a cabo diferentes curvas de calibrado para determinar la extensión de la influencia de estas matrices:

- *Calibrado de patrón externo (EC)*. Se prepararon disoluciones patrón añadiendo 10, 15, 20 y 30 µl de la disolución madre de procimidona al que se le añade 0,5 ml de Dieldrín de 2 mg/l como estándar interno y enrasando con n-hexano como disolvente en matraces de 10 ml. Las concentraciones obtenidas son 500, 750, 1000 y 1500 µg/l.
- *Calibrado conteniendo matriz del traje (CMC)*. Las disoluciones de la calibración se prepararon como se describe anteriormente y se prepararon puntos de la calibración a los mismos niveles de concentración pero usando un extracto de la matriz de traje Tyvek.
- *Calibrado conteniendo matriz de traje y formulación del placebo (CFMC)*. Se prepararon disoluciones con patrón de procimidona (500 mg/l) al que se agrega formulación del placebo y surfactante para obtener una concentración equivalente a 1% y 0,1% p/v respectivamente. Se prepararon soluciones de la calibración diluyendo éstos a 500, 750, 1000 y 1500 µg/l con extracto de la matriz de traje Tyvek. Estas disoluciones contienen los componentes similares a las muestras reales.

Cada calibrado (EC, CMC, CFMC) se realiza tres veces a lo largo del día inyectándolo secuencialmente en el GC-ECD en las mismas condiciones y obtiene tres calibrados en cada matriz con una diferencia de 24 horas entre el primero y el último calibrado. La reproducibilidad de los coeficientes de regresión se probó llevando a cabo el experimento seis veces, en un periodo de 14 meses que corresponde a Mayo de 2000, Enero, Febrero, Marzo, Junio y Julio de 2001. Los experimentos realizados entre Mayo de 2000 y Marzo de 2001, se realizó usando la misma columna cromatográfica HP-1 pero después del primer experimento (Mayo de 2000) el ECD se reemplazó. El experimento de Junio se llevó a cabo usando la

columna HP-1701 y para el experimento de Julio una nueva columna HP-1 fue utilizada, así que los datos y conclusiones obtenidas incluyen las variaciones producidas por estos cambios instrumentales.

Para el estudio de recuperación se procede a adicionar a los trozos de traje una disolución preparada a partir de la disolución madre de procimidona (500 mg/l) en n-hexano a dos niveles de concentración de procimidona (750 y 1500 µg/l) y formulación del placebo de procimidona y surfactante en una concentración equivalente a 1% y 0,1% p/v respectivamente, que son similares al tanque de rocío que se usaron en las aplicaciones del campo. Las muestras adicionadas se extrajeron usando el procedimiento descrito anteriormente.

3. COMPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRADO. ANCOVA

Al igual que en la aplicación anterior (Lindano en matriz de Pimiento) el objetivo es plantear una Función de Corrección para calcular el contenido de Procimidona, en presencia de efecto matriz, de una muestra utilizando para ello un calibrado de analito puro en disolvente y poder corregirlo al contenido que tendría si se utilizase un calibrado con la propia matriz de traje o incluso con la matriz de traje añadiendo el formulado.

Para establecer esta Función de Corrección se realizan distintos calibrados (tres rectas por día) tanto del calibrado de patrón externo (EC) como del calibrado en presencia de matriz de traje (CMC) y el calibrado en presencia de matriz de traje y formulado (CFMC).

Estas experiencias se realizaron repetidamente durante un periodo de 1 año (desde Mayo de 2000 hasta Julio de 2001) incluyendo en este tiempo un cambio de detector y dos cambios de columna cromatográfica. Por lo que en total tendríamos seis experiencias diferentes y en cada una de ellas se habría realizado las tres rectas de regresión para cada uno de los métodos (EC, CMC y CFMC). Todas las rectas de calibrado se realizan en presencia de un estándar interno (Dieldrín) representando el cociente, R, entre la altura del patrón, A_P

(Procimidona) y la altura de estándar interno, A_D (Dieldrín) frente a la concentración de patrón.

3.1. Estudio de repetibilidad: intra-comparación de calibrados

Estas experiencias se realizaron estableciendo tres réplicas en cada calibrado (EC, CMC y CFMC) con el objeto de evaluar la repetibilidad de cada calibrado en un día. La reproducibilidad de EC, CMC y CFMC fue estudiada realizando réplicas para cada una de ellas (Mayo 00, Enero, Febrero, Marzo, Junio y Julio 01). Los datos experimentales aparecen en la tabla 1 del Anexo C3.

Una vez realizas las experiencias, los datos experimentales se ajustan a una línea recta mediante el LSR obteniendo así los parámetros de la regresión (Tabla 2 del Anexo C3).

Para comparar las curvas de calibrado mediante ANCOVA es necesario realizar, en primer lugar, una comprobación de la homogeneidad de las varianzas mediante el **test de Cochran**. Una vez calculado el estadístico G (G_{EC}, G_{CMC} y G_{CFMC} en Tabla 3 del Anexo C3), este se compara con un tabulado para un nivel de confianza del 95%, n – 1 = 3 datos experimentales y m = 3 calibrados (G_{tab} = 0,8709), obteniéndose que no existe diferencia significativa en ninguno de los casos, por lo que podremos asegurar que existe homogeneidad de varianzas.

La *comparación de las pendientes* de los calibrados (réplicas de cada metodología) se lleva a cabo calculando el estadístico F (Tabla VII.1) como cociente de las varianza s_N^2 y s_D^2 calculadas a partir de la regresión reducida y completa. Este estadístico se compara con un tabulado para un nivel de confianza de 95% y 2 y 6 grados de libertad (F_{tab} = 5.143) se obtiene que en todos los casos las pendientes no difieren significativamente con una probabilidad mayor de 11%.

Con el fin de realizar la *comparación de los términos independientes* es necesario hacer una única recta con todas las réplicas de una misma experiencia (Tabla 4 del Anexo C3). El estadístico F (Tabla VII.1) se obtiene como cociente de las varianzas S'^2_N y S'^2_D que se compara con un tabulado para un 95% de confianza y 2 y 8 grados de libertad (F_{tab} = 4.459). En esta ocasión todas las réplicas excepto una presentan un valor de P > 5%, por lo que podemos afirmar que no existe diferencia significativa entre los términos independientes. En la

experiencia EC en Julio 01 (P < 5%) hay que realizar una comparación por parejas para discernir cual de las réplicas es distinta a las demás y poder eliminarla.

Tabla VII.1.

Resultados para ANCOVA en la intra-comparación de las calibraciones EC, CMC y CFMC

	EC		CMC		CFMC	
	F_{exp} (b) (P %)	F_{exp} (a) (P %)	F_{exp} (b) (P %)	F_{exp} (a) (P %)	F_{exp} (b) (P %)	F_{exp} (a) (P %)
Mayo 2000	0,403 (68,5)	1,915 (20,9)	0,015 (97,8)	1,235 (34,1)	0,095 (91,1)	0,300 (78,8)
Enero 2001	0,471 (64,6)	3,311 (9,0)	0,149 (86,4)	2,230 (17,0)	0,036 (96,5)	1,161 (36,1)
Febrero 2001	0,023 (97,7)	0,079 (92,4)	0,226 (80,4)	1,916 (21,0)	0,121 (88,8)	1,638 (25,3)
Marzo 2001	0,230 (77,2)	2,272 (16,5)	0,051 (95,1)	0,439 (65,9)	0,027 (97,3)	0,065 (93,7)
Junio 2001	0,078 (92,6)	0,439 (65,9)	0,121 (88,8)	0,185 (83,5)	0,371 (70,5)	4,430 (5,1)
Julio 2001	4,239 (11,1)	19,647* (0,1)	0,140 (87,2)	0,909 (44,1)	0,729 (52,1)	3,365 (8,7)

* Los términos independientes son estadísticamente diferentes (P < 5%).

Para realizar la comparación por parejas de los términos independientes se utiliza el **test de Bonferroni**, el cual se calcula un estadístico t-Student (Tabla 5 del Anexo C3) para cada una de las comparaciones. El valor calculado se compara con uno tabulado al 95% de confianza, p = 3 parejas y ν^F = 8 grados de libertad

obteniendo que no hay diferencia significativa entre las parejas R_1 y R_3, por lo que la réplica 2 será eliminada de los demás cálculos.

Todas aquellas réplicas que no presenten diferencias se utilizarán para hacer un único calibrado en cada una de las experiencias, es decir nos quedarán seis calibrados para cada metodología (EC, CMC, CFMC) y cada uno de los calibrados constará de 12 datos experimentales excepto en el caso de EC en Julio que tan sólo tendrá 8 datos experimentales (Tabla 6 del Anexo C3).

3.2. Estudio de similitud entre los calibrados EC, CMC y CFMC: inter-comparación de calibrados

El segundo paso es comparar las curvas de calibrado correspondientes a cada metodología; es decir para cada experiencia (Mayo 00 a Julio 01) vamos a comparar si la cura obtenida con la metodología EC difiere significativamente de la obtenida con CMC o con CFMC. Esta comparación también es llevada a cabo con ANCOVA.

Al igual que en el apartado anterior, lo primeros que comprobamos es que existe homogeneidad de varianzas mediante el **test de Cochran**. En todos los casos, el estadístico G_{global} (Tabla 3 del Anexo C3) es inferior al valor tabulado para un nivel de confianza del 95%, 11 datos experimentales y m = 3 calibrados (G_{tab} = 0,6025), obteniéndose que no existe diferencia significativa en ninguno de los casos, por lo que podremos asegurar que existe homogeneidad de varianzas. En el caso de la experiencia de Julio 01 y dado que el tamaño muestral es distinto (recordamos que eliminamos una réplica), hemos optado por aplicar el **test de Bartlett** con el que se obtiene que tampoco existe diferencia significativa entre las varianzas ya que el valor tabulado (χ^2 (95%, 2 grados de libertad) = 5,991) es mayor que el experimental (χ^2_{exp} = 0,1955).

Ahora bien en la *comparación de las pendientes* observamos que al menos una de los calibrados difiere significativamente del resto (P < 5%) (Tabla VII.2), esto es indicio de que existen errores sistemáticos proporcionales debidos al efecto matriz. Por otro lado, en la *comparación de los términos independientes* (Tabla VII.2) vemos que los valores de P también son menores del 5% por lo que

ahora podríamos decir que además hay indicios de que existen errores sistemáticos constantes.

Tabla VII.2.

Resultados para ANCOVA en la inter-comparación de las calibraciones EC, CMC y CFMC

	F_{exp} (b)	P(b) %	F_{exp} (a)	P(a) %
Mayo 2000	160,0	0,0	624,0	0,0
Enero 2001	78,1	0,0	279,8	0,0
Febrero 2001	69,6	0,0	210,6	0,0
Marzo 2001	80,2	0,0	240,2	0,0
Junio 2001	11,5	0,0	50,0	0,0
Julio 2001	15,6	0,0	569,6	0,0

En consecuencia hemos realizado el **test de Bonferroni** para comparar por parejas tanto las pendientes como los términos independientes y discernir principalmente si los calibrados CMC y CFMC proporcionan los mimos resultados. Para ello se ha calculado el estadístico t-Student (Tabla 7 del Anexo C3) para la pendiente comparándolo con un tabulado al 95% de confianza (F_{tab}(30, 32 grados de libertad, α = 5%) = 3.316) y solamente dos de las parejas estudiadas CMC–CFMC en Junio y Julio 01 concluyen que no existe diferencia significativa entre ellas (P > 5%). En la comparación de los términos independientes es necesario hacer una calibrado con todos los datos cuyos parámetros aparecen en la Tabla 6 del Anexo C3 para poder calcular el estadístico F (Tabla 7 del Anexo C3). El valor tabulado al 95% de confianza vale F_{tab}(32, 34 grados de libertad, α = 5%) = 3.295, por lo que fijándonos en los valores de F_{exp} vemos que solamente 1 de las parejas comparadas (CMC–CFMC) en cuatro experiencias diferentes obtiene un valor inferior al tabulado (P > 5%), así

podemos decir que en estos cuatro casos los términos independientes difieren significativamente.

Por lo tanto podemos concluir que los calibrados de patrón externo (EC) son estadísticamente diferentes a los calibrados realizados en coextractos de matriz, independientemente de la presencia de formulado que en la mayoría de los casos también influye (Figura VII.1.).

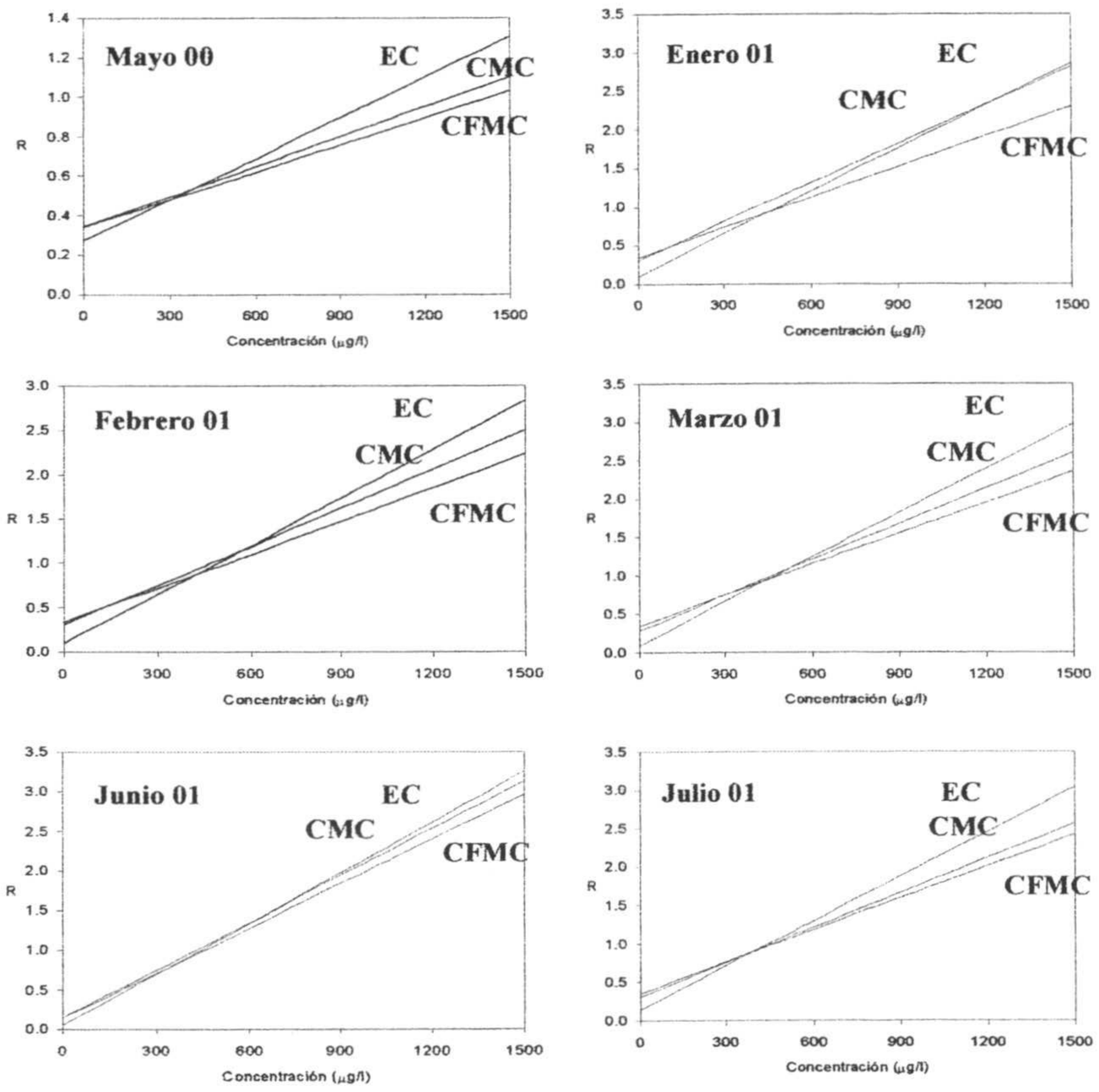


Figura VII.1.

Comparación de los calibrados EC, CMC y CFMC

4. FUNCIÓN DE CORRECCIÓN

En todas las experiencias realizadas se consideran tres tipos de calibrados: calibrado de patrón externo (EC), calibrado en presencia de matriz de traje (CMC) y calibrado en presencia de matriz de traje con adición de formulado (CFMC). Dado que en todas ellas los calibrados EC, CMC y CFMC son diferentes entre sí (tanto la pendiente como el término independiente) debido al efecto matriz, es posible establecer una función de corrección del calibrado EC al CFMC que englobe el efecto que se produce al añadir una matriz de traje y una matriz de formulado y otra Función de Corrección del calibrado CMC al CFMC que sólo engloba el efecto de la adición de formulado dado que en ambos calibrados hay presencia de matriz de traje.

4.1. Función de corrección de EC a CFMC, CF_{E-CFM}

La función de corrección se establece calculando los Coeficientes de Corrección (A y B) a partir de las pendientes y los términos independientes (Tabla 4 del Anexo C3) de todas las rectas de regresión tanto del calibrado de patrón externo (EC) como del calibrado en presencia de matriz con adición de formulado (CFMC).

Para cada una de estas experiencias (Mayo 00 a Julio 01) se calcula el Coeficiente de Corrección A y B (Tabla 8 del Anexo C3). En la Figura VII.2 que representa la CF_{E-CFM} de cada una de las experiencias se observa que la experiencia de Junio del 01 es considerablemente diferente a las demás por lo que vamos a aplicar los **tests de Bartlett** y **Dixon** para probar que esta experiencia es, en efecto, diferente a las demás.

❑ *Test de Bartlett* es aplicado para evaluar la variabilidad entre los coeficientes, para lo cual se deben calcular los grados de libertad asociados a los coeficientes mediante la ecuación de Welch–Satterthwaite. Estos grados de libertad son calculados a partir de varianza asociada a cada Coeficiente de Corrección (Tabla 8 del Anexo C3). El estadístico χ^2 es calculado para el coeficiente A y el B obteniendo:

$$\chi^2(B) = 12{,}045 \qquad \chi^2(A) = 10{,}819$$

Este estadístico sigue una distribución χ^2 teórica. Por lo tanto como tanto los dos estadísticos calculados (χ^2(B) y χ^2(A)) son menores que el valor tabulado χ^2_{tab} = 12,838 para una valor de α = 2,5 % y r–1 = 5 grados de libertad (P(B)= 3,4%, P(A)= 5,5%) se concluye que no hay diferencia significativa entre las varianzas comparadas.

❑ *Test de Dixon* se utiliza para evaluar si existe algún Coeficiente de Corrección discrepante o anómalo. Para ambos coeficientes se utilizará una de las dos expresiones para $3 \leq k \leq 7$.

Para el ***coeficiente B***, el valor que más alejado de la media es el menor correspondiente a la experiencia de Junio del 01 (B = 1,1336) por lo que se utiliza la primera expresión. Aplicando el test se obtiene que Q_{exp} = 0,719 es mayor que el tabulado al 95% y k = 6 (Q_{tab} = 0,560) por lo tanto este valor se considera como anómalo y habrá que rechazarlo. A continuación se realiza otra vez el test para el siguiente valor discrepante que ahora sería (B = 1,5007), este es el mayor por lo que la expresión utilizada es la segunda, y se obtiene Q_{exp} = 0,578 que es menor que el valor tabulado al 95% y k = 5 (Q_{tab} = 0,642) por lo que este valor debe ser aceptado como válido.

Para el ***coeficiente A***, el valor que más alejado de la media es el menor que también corresponde a la experiencia de Junio del 01 (A = – 47,1954). Aplicando el test se obtiene Q_{exp} = 0,739 mayor que Q_{tab} = 0.560 al 95% y k = 6 por lo tanto es anómalo y se rechaza. Igual que en el caso anterior se realiza otra vez el test para el siguiente valor que ahora es A = -151,9407 obteniendo Q_{exp} = 0,055 que es menor que el valor tabulado al 95% y k = 5 (Q_{tab} = 0,642) por lo que también en este caso será aceptado.

Por lo tanto para calcular la **Función de Corrección** ($C^*_{E\text{-}CFM} = A + B \cdot C_E$) se estiman los coeficientes de corrección A y B a partir de todas las experiencias realizadas excepto el valor correspondiente a la experiencia realizada en Junio 01. Para calcular estos coeficientes de corrección se toma el valor medio de las experiencias consideradas como válidas y se obtiene que la función de corrección toma la forma de una línea recta:

$$C^*_{E-CFM} = \overline{A} + \overline{B} \cdot C_E = -172{,}635 + 1{,}435 \cdot C_E \qquad \text{(VII-1)}$$

Esta función nos permite obtener una estimación de la concentración real $C^*_{E\text{-}CFM}$ a partir de la concentración C_E estimada del calibrado EC.

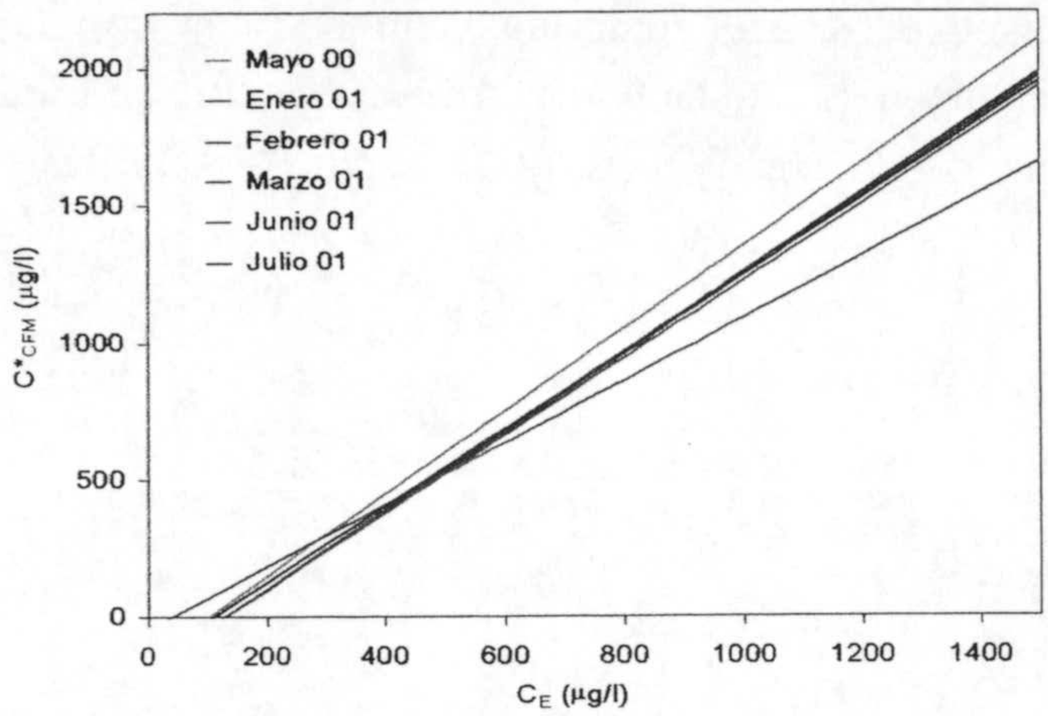


Figura VII.2.

Función de Corrección $CF_{E\text{-}CFM}$ para todas las experiencias.

4.2. Función de corrección de CMC a CFMC, CF_{CM-CFM}

Al comparar las rectas de calibrado en presencia de matriz (CMC) con las rectas de calibrado en presencia de matriz con adición de formulado (CFMC), en todas las experiencias se ha concluido que las pendientes son diferentes excepto en dos casos (Junio 01 con P = 5.1%) y Julio 01 con P = 15.8%). Dado que en ambos casos el valor P es inferior al 20% y que el resto de experiencias es inferior al 5% se puede considerar que existe efecto matriz debido a una componente proporcional de error sistemático, por lo que es posible realizar el cálculo de la Función de Corrección CF_{CM-CFM}. Con respecto a los términos independientes en cinco de las seis experiencias realizadas se concluye que no existe diferencia significativa entre los términos independientes por lo que podemos considerar que la componente constante de error sistemático es despreciable. Haciendo esta aproximación la **Función de Corrección** quedaría:

$$C^*_{CM-CFM} = \underbrace{\frac{\overline{a_{CM} - a_{CFM}}}{b_{CFM}}}_{0} + \frac{\overline{b_{CM}}}{b_{CFM}} \cdot C_{CM} = \overline{B} \cdot C_{CM} \qquad \text{(VII-2)}$$

La Función de Corrección se establece calculando el Coeficiente de Corrección B a partir de las pendientes (Tabla 4 del Anexo C3) de los calibrados obtenidos en todas las experiencias realizadas con CMC y con CFMC. Estos Coeficientes se presentan en la Tabla 9 del Anexo C3. En la Figura VII.3 se representa la Función de Corrección CF_{CM-CFM} para todas las experiencias realizadas

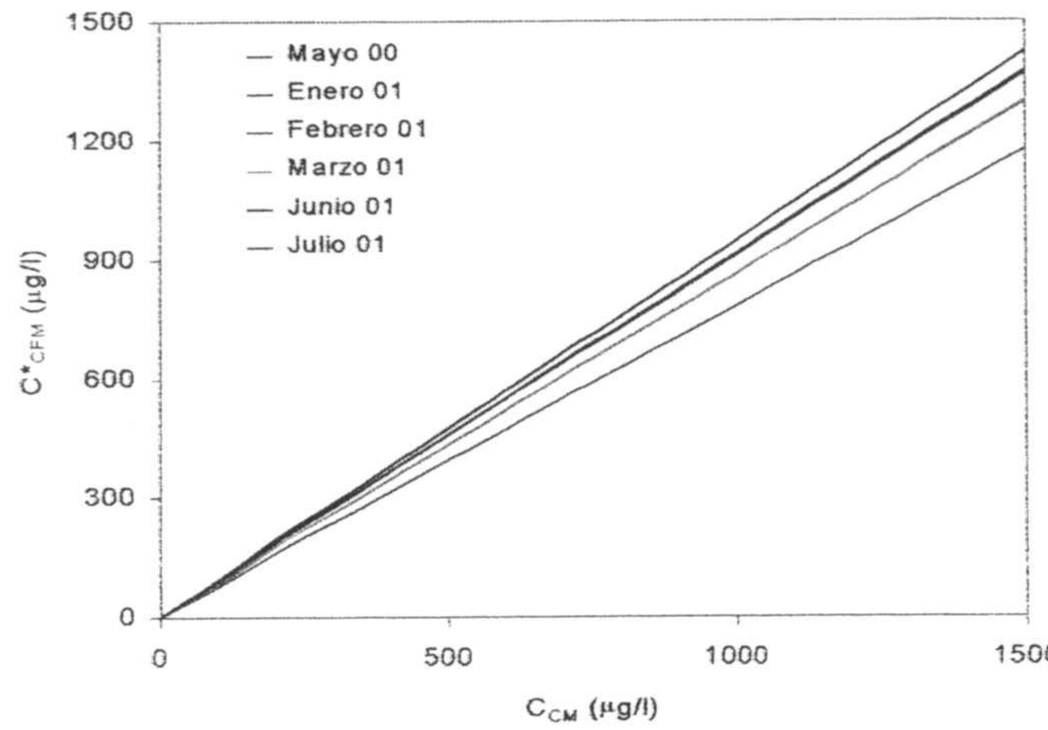


Figura VII.3.

Función de Corrección CF_{CM-CFM} para todas las experiencias.

❑ Al coeficiente de corrección B se les aplica en primer lugar el *Test de Bartlett* para evaluar la variabilidad de los coeficientes, para lo cual habrá que calcular los grados de libertad mediante la ecuación de Welch–Satterthwaite y la varianza asociada a estos Coeficientes (Tabla 9 del Anexo C3). Con estos valores se obtiene $\chi^2 = 12{,}59$ para el coeficiente B que es menor que el valor tabulado $\chi^2_{tab} = 12{,}838$ para una valor de $\alpha = 2{,}5$ % y 5 grados de libertad (P = 2,7%) se concluye que no hay diferencia significativa entre las varianzas comparadas.

❑ El *Test de Dixon* utilizado para evaluar si existe algún coeficiente discrepante o anómalo se aplica al Coeficiente B obteniendo que $Q_{exp} = 0{,}537$ es menor que el

valor tabulado al 95% y n = 6 (Q_{tab} = 0,560) y por lo tanto este valor debe ser aceptado.

La correspondiente Función de Corrección CF_{CM-CFM} se estima a partir del Coeficiente de Corrección B utilizando todas las experiencias (Mayo 00 a Julio 01). Para calcular este coeficiente de corrección se toma el valor medio de todas las experiencias:

$$C^*_{CFM} = \overline{B} \cdot C_{CM} = 1.139 \cdot C_{CM} \qquad \text{(VII-3)}$$

Así, representando la concentración C^*_{CFM} frente a la concentración C_{CM} se obtendría una línea recta de pendiente $\overline{B}$ y término independiente cero de forma que se obtiene una estimación del contenido de analito C_{CFM} a partir de la concentración C_{CM} estimada por el calibrado CMC.

5. FACTOR DE CORRECCIÓN

En el capítulo V se vio otra forma de obtener una relación entre las concentraciones C^*_M y C_E que sería mediante la aplicación del Factor de Corrección obtenido a partir de los Coeficientes de Corrección correspondientes.

5.1. Factor de corrección de EC a CFMC, F_{E-CFM}

Se puede obtener el Factor de Corrección a partir de los Coeficientes de Corrección estimados en el apartado 4.1:

$$C^*_{E-CFM} = F_E \cdot C_E = \left[\overline{A} \cdot \frac{1}{C_E} + \overline{B}\right] \cdot C_E = \left[\frac{-172{,}6349}{C_E} + 1{,}4351\right] \cdot C_E \qquad \text{(VII-4)}$$

Así, conforme se aumenta la concentración C_E el Factor de Corrección tiende al valor del Coeficiente de Corrección B ($C_E \rightarrow \infty \Rightarrow F \rightarrow 1{,}4351$) (Figura VII.4). Los datos del F_{E-CFM} se muestran en la Tabla VII.3 para el intervalo de concentración estudiado.

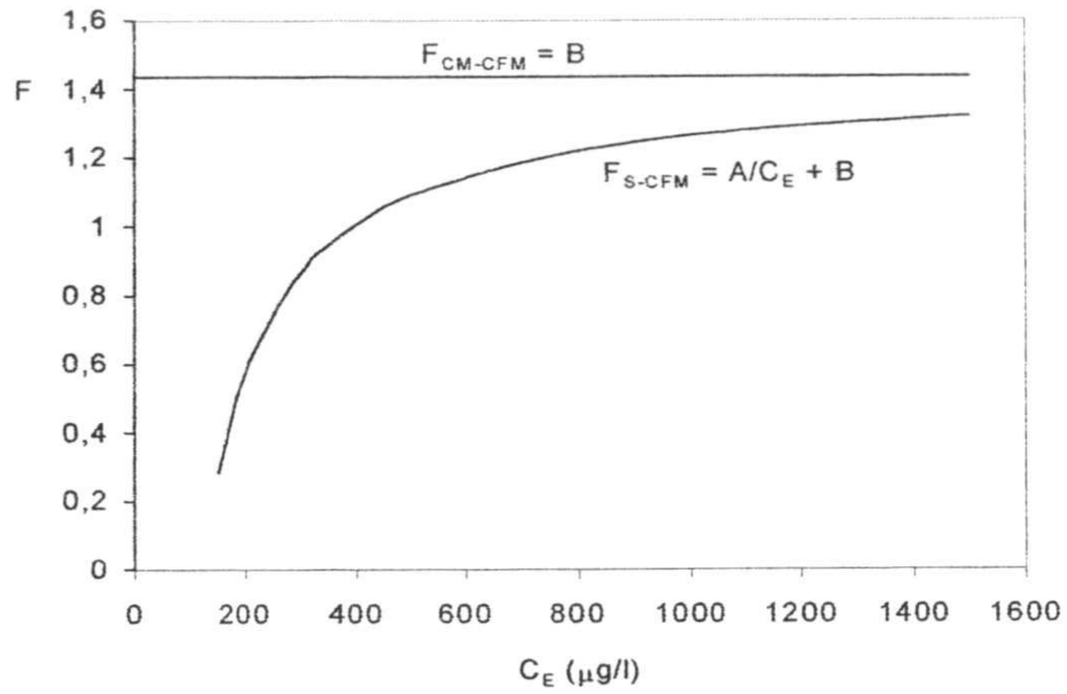


Figura VII.4.

Representación de los Factores de Corrección F_{E-CFM} y F_{CM-CFM} frente a C_E

Tabla VII.3.

Valores del Factor de Corrección en función de la concentración estimada mediante EC

C_E (µg/l)	F_{E-CFM}	C_E (µg/l)	F_{E-CFM}
300	0,8596	1000	1,2624
400	1,0035	1250	1,2970
500	1,0898	1500	1,3200
750	1,2049		

5.2. Factor de corrección de CMC a CFMC, F_{CM-CFM}

En este caso particular el Factor de Corrección coincide con la Coeficiente de Corrección B (Figura V.4) pues el Coeficiente de Corrección A es despreciable, obteniendo:

$$C^*_{CM-CFM} = F_{CM} \cdot C_{CM} = \overline{B} \cdot C_{CM} = 1{,}4351 \cdot C_{CM} \qquad \text{(VII-5)}$$

6. VALIDACIÓN

Como paso previo a la validación de las Funciones de Corrección antes obtenidas es necesario llevar a cabo dos pasos previos para evaluar la presencia de efecto matriz, recordamos que ya habíamos puesto de manifiesto su existencia mediante ANCOVA, y la ausencia de pérdidas de analito en el proceso de extracción.

Las muestras adicionadas para el test de Recuperación son analizadas junto con las de calibración. Obteniendo la señal cromatográfica de Procimidona (y Dieldrin como estándar interno), las muestras fueron cuantificadas utilizando los diferentes calibrados. Dependiendo del método de calibración aplicado para la cuantificación, se han obtenido diferentes concentraciones (Tabla 10 del Anexo C3):

- C_E si se utiliza el calibrado EC para cuantificar.
- C_{CM} si se utiliza CMC.
- C_{CFM} en el caso de utilizar CFMC.

A partir de estas concentraciones se obtienen las correspondientes Recuperaciones ($\Re_E$, $\Re_{CM}$ y $\Re_{CFM}$), en tanto por ciento, dividiendo la concentración estimada (C_E, C_{CM} y C_{CFM}) por la concentración de referencia o concentración añadida (Tabla 10 del Anexo C3).

En primer lugar se aplica el **test de Dixon** a los valores de recuperación obtenidos para evaluar la posible presencia de valores anómalos en las concentraciones estimadas.

× Para las recuperaciones (6 muestras) obtenidas cuando la concentración añadida es 750 µg/l, el valor tabulado para 6 datos y un nivel de confianza del 95% sería $Q_{tab} = 0{,}560$:

- *Calibrado EC*. El valor sospechoso es $\Re = 74{,}0$ %, el valor del estadístico es $Q_{exp} = 0{,}344$ y por tanto no hay valores anómalos ($Q_{exp} < Q_{tab}$).

- *Calibrado CMC.* El valor sospechoso es $\Re$ = 96,0 %, el del estadístico es Q_{cal} = 0,147. Por tanto como $Q_{cal} < Q_{tab}$ el valor considerado como discrepante debe ser aceptado.

- *Calibrado CFMC.* Valor sospechoso $\Re$ = 82,9 %, valor del estadístico Q_{cal} = 0,487. No hay valores anómalos.

× Para las recuperaciones (6 muestras) obtenidas cuando la concentración añadida es 1500 µg/l, el valor tabulado para 6 datos y un nivel de confianza del 95% sería Q_{tab} = 0,560:

- *Calibrado EC.* El valor sospechoso es $\Re$ = 84,6 %, el valor del estadístico es Q_{cal} = 0,307 y como $Q_{cal} < Q_{tab}$ el valor considerado como discrepante debe ser aceptado.

- *Calibrado CMC.* Valor sospechoso $\Re$ = 79,2 %, estadístico Q_{cal} = 0,498. No hay valores anómalos.

- *Calibrado CFMC.* El valor sospechoso es $\Re$ = 114,8 %, el estadístico es Q_{cal} = 0,407. Como $Q_{cal} < Q_{tab}$, no hay valores anómalos.

Para poner de manifiesto la presencia de efecto matriz se realiza un test para comprobar si el valor medio de la recuperación difiere significativamente del 100% en cada uno de los métodos establecidos y para cada nivel de concentración (Tabla 11 del Anexo C3). Este valor se compara con uno tabulado para $n_{\Re} - 1 = 5$ grados de libertad y un nivel de confianza α = 95% (t_{tab} = 2,571) obteniendo, tanto para el nivel de concentración de 750 µg/l como al nivel 1500 µg/l en los calibrados EC y CMC, que el valor P < 5% por lo que en estos dos casos la concentración estimada con la correspondiente recta de calibrado proporciona valores de concentración muy por debajo del valor verdadero o real debido a la presencia de matriz de traje (en el caso del calibrado EC) y matriz de formulado (para los dos calibrados (EC y CMC)).

Para verificar la ausencia de pérdidas de analito se comprueba que el valor de recuperación obtenido con el calibrado CFMC ($\Re_{CFM}$) no difiere significativamente del 100 % para los dos niveles de concentración obteniendo que ambos casos un valor de P superior al 5% (P = 98,9 % y P = 61,4 % respectivamente). Esto implica que no existen pérdidas de analito en la muestra y

que solamente el calibrado CFMC (al que se le adiciona los dos tipos de matrices, matriz de traje y matriz de formulado) es útil para cuantificar las muestras ya que proporciona el valor verdadero en contenido de analito.

6.1. Metodología de validación 1

La aplicabilidad de las Funciones de Corrección han sido validadas comparando las recuperaciones obtenidas a partir de las muestras adicionadas analizadas en cada experiencia mediante el calibrado CFMC ($\Re_{CFM}$) con las recuperaciones obtenidas aplicando la correspondiente Función de Corrección a los resultados obtenidos usando directamente el calibrado EC para la cuantificación ($\Re^*_{E\text{-}CFM}$) o el calibrado CMC ($\Re^*_{CM\text{-}CFM}$) (Tabla 12 del Anexo C3).

Estas recuperaciones son comparadas utilizando un **test de muestras apareadas** que consiste en comprobar si hay diferencia significativa entre el valor medio de las diferencias de ambos métodos y cero. En ambos casos, como muestra la Tabla 13 del Anexo C3, no existe diferencia significativa entre las recuperaciones comparadas ($P > 5\%$) por lo que podemos concluir que las CFs son válidas permitiéndonos obtener una estimación correcta del valor real sin necesidad de usar matriz y/o formulado en las calibraciones.

6.2. Metodología de validación 2

En este caso, considerando las concentraciones estimadas a partir de las Funciones de Corrección ($C^*_{E\text{-}CFM}$ y $C^*_{CM\text{-}CFM}$) podemos calcular dos recuperaciones "aparentes" ($\Re^*_E$ y $\Re^*_{CM}$) (Tabla 12 del Anexo C3) dividiendo estas concentraciones por la concentración estimada por el calibrado EC (C_E). Estas recuperaciones "aparentes" se denominan también recuperaciones de calibración y representan la relación de analito cuantificado antes de la aplicación de la correspondiente Función de Corrección y son además la inversa del correspondiente Factor de Corrección (F_E y F_{CM}).

Como no hay pérdidas de analito, la aplicabilidad de las Funciones de Corrección son validadas comparando estas recuperaciones "aparentes" ($\Re^*_E$ y $\Re^*_{CM}$) con correspondientes obtenidas directamente de cuantificar las muestras adicionadas con el calibrado EC ($\Re_E$) o con el calibrado CMC ($\Re_{CM}$). Estas recuperaciones son comparadas utilizando un **test de muestras apareadas** y como muestra la Tabla 13 del Anexo C3, no existe diferencia significativa entre las recuperaciones comparadas (P > 5%).

Así, podemos concluir que la metodología propuesta, que implica el establecimiento y aplicación de $CF_{E\text{-}CFM}$ o $CF_{CM\text{-}CFM}$ a los resultados obtenidos directamente con los calibrados EC o CMC respectivamente, es apropiada para la estimación de la concentración real de analito, mostrando recuperaciones que no difieren del 100%, sin incluir la matriz de coextratos en la calibración para el análisis de rutina, lo cual reduce el coste del análisis y el tiempo del mismo.

7. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE PROCIMIDONA

El contenido de Procimidona cuando se utiliza la Función de Corrección de EC a CFMC, expresado en $\mu g/cm^2$, viene dado por la expresión:

$$CONT = \frac{C^*_{E-CFM}}{T_{muestra}/V_{muestra}} = \frac{A + B \cdot C_E}{T_{muestra}/V_{muestra}} \qquad \text{(VII-6)}$$

donde $T_{muestra} = 900\ cm^2$ representa el tamaño del trozo del traje considerado y $V_{muestra} = 250$ ml es el volumen de muestra debido al tratamiento de muestra. Mientras que si se utiliza la Función de Corrección de CM a CFMC la expresión será:

$$CONT = \frac{C^*_{CM-CFM}}{T_{muestra}/V_{muestra}} = \frac{B \cdot C_{CM}}{T_{muestra}/V_{muestra}} \qquad \text{(VII-7)}$$

La tabla VII.4 muestra los valores obtenidos del contenido de Procimidona en la muestra a los dos niveles de concentración (750 y 1500 μg/l) mediante las dos Funciones de Corrección utilizadas.

Tabla VII.4.

Concentraciones estimadas y corregidas y contenido de procimidona aplicando $CF_{E\text{-}CFM}$ y $CF_{CM\text{-}CFM}$

	$C_{añadida}$ (μg/l)	750	1500
$CF_{E\text{-}CFM}$	C_E (μg/l)	630,5	1157,0
	$C^*_{E\text{-}CFM}$ (μg/l)	732,2	1487,7
	CONT (μg/cm²)	0,20	0,41
$CF_{CM\text{-}CFM}$	C_{CM} (μg/l)	651,4	1289,0
	$C^*_{CM\text{-}CFM}$ (μg/l)	741,7	1467,7
	CONT (μg/cm²)	0,21	0,41

8. INCERTIDUMBRE ASOCIADA AL CONTENIDO DE PROCIMIDONA APLICANDO $CF_{E\text{-}CFM}$

Considerando que la incertidumbre debida al tamaño de la muestra, $u(T_{muestra})$, es despreciable frente a los demás y no lo vamos a tener en cuenta la incertidumbre asociada al contenido de analito se calcula aplicando la regla de propagación de varianzas a la ecuación VII-6:

$$u_{rel}(CONT) = \sqrt{u_{rel}^{\ 2}(C^*_{E-CFM}) + u_{rel}^{\ 2}(V_{muestra})} \qquad \text{(VII-8)}$$

Por tanto las contribuciones asociadas a la estimación de la incertidumbre (Figura VII.5) son:

- la concentración de Procimidona estimada a partir de $CF_{E\text{-}CFM}$, $u(C^*_{E\text{-}CFM})$;
- volumen de muestra a analizar, $u(V_{muestra})$.

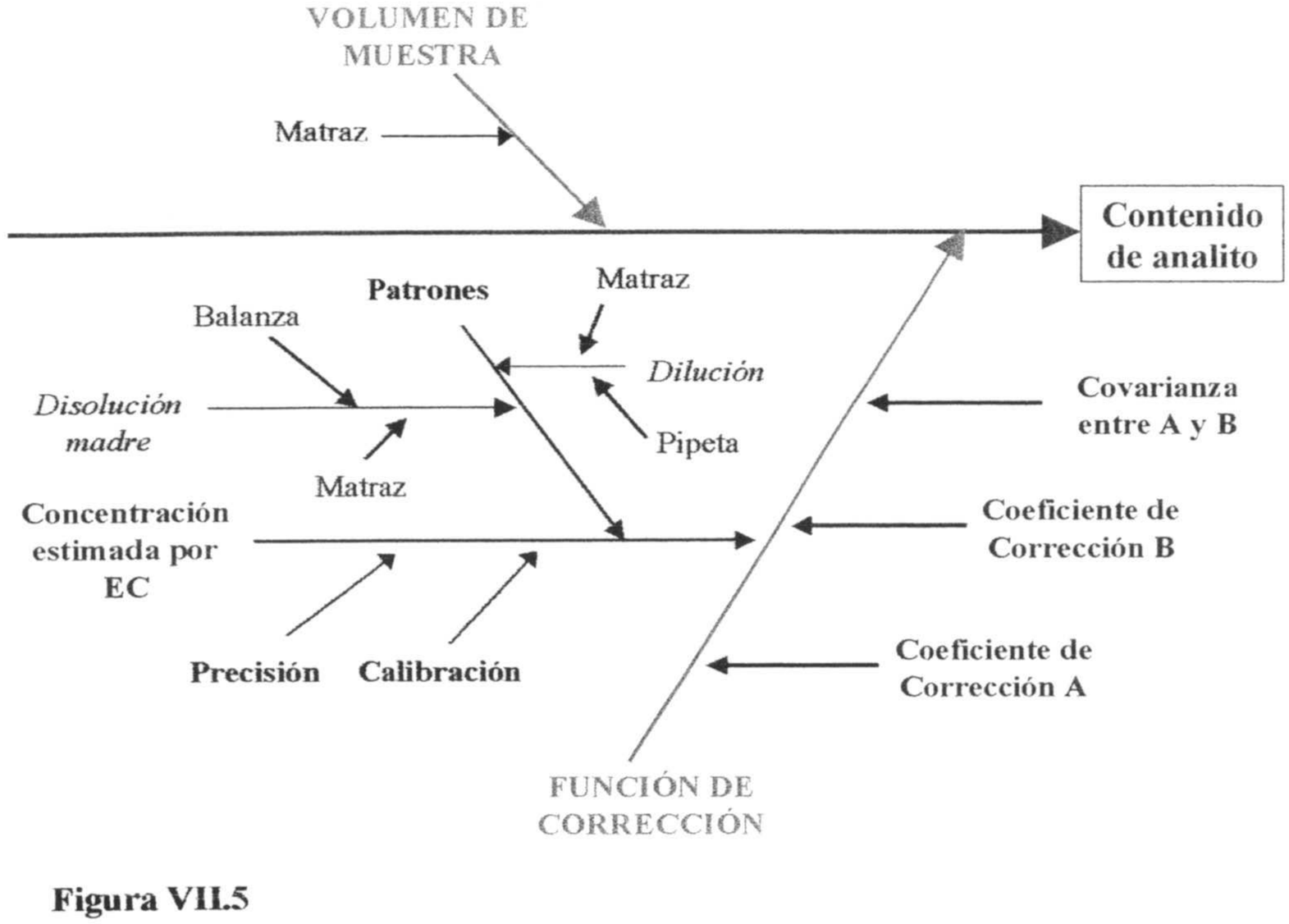


Figura VII.5
Diagrama cuasa-efecto *(Diagrama de Ishikawa)*

8.1. Incertidumbre asociada al uso de la Función de Corrección

La concentración $C^*_{E\text{-}CFM}$ lleva asociada una incertidumbre que puede ser calculada aplicando la regla de propagación de varianzas y covarianzas a la Función de Corrección $CF_{E\text{-}CFM}$ y habrá que estimar cada uno de los términos que componen la sumatoria de incertidumbres:

$$u^2(C^*_{E-CFM}) = u^2(A) + C_E{}^2\ u^2(B) + (B)^2\ u^2(C_E) + 2\,r_{A,B}\,C_E\,u(A)\,u(B) \qquad \text{(VII-9)}$$

8.1.1. Incertidumbre asociada al Coeficiente de Corrección A

La incertidumbre debida al término independiente o *Coeficiente de Corrección A*, u(A) se calcula como contribución de la incertidumbre debida a la estimación mediante la CF, $u(A)_{func}$, y la incertidumbre derivada de la precisión, $u(A)_{prec}$.

La incertidumbre derivada de la función se calcula como el valor medio de las varianzas estimadas para el Coeficiente de Corrección A para cada una de las experiencias realizadas obtenidas a partir de los parámetros de regresión utilizados en el cálculo de A y su correspondientes covarianza (Tabla 8 del Anexo C3):

$$u^2(A)_{func} = 1916{,}51$$

La incertidumbre derivada de la precisión se estima a partir de la varianza de los distintos Coeficientes de Corrección A para las distintas experiencias realizadas:

$$u^2(A)_{prec} = 66{,}09$$

Por lo tanto la incertidumbre asociada al coeficiente de corrección A, u(A), se calcularía como la suma de cuadrados del valor medio de la contribución de la regresión y la correspondiente precisión:

$$u(A) = \sqrt{1916{,}51 + 66{,}09} = 44{,}53$$

8.1.2. Incertidumbre asociada al Coeficiente de Corrección B

La incertidumbre debida a la pendiente o *coeficiente de corrección B*, u(B), también se calcula como contribución de la incertidumbre derivada de la función estimada, $u(B)_{func}$, y la incertidumbre derivada de la precisión, $u(B)_{prec}$.

La incertidumbre derivada de la función estimada se calcula a partir de las pendientes de cada una de las rectas de calibrado y de las correspondientes desviaciones estándar asociadas a cada uno de ellos. Para cada experiencia se obtiene un valor diferente por lo que la incertidumbre asociada al coeficiente de corrección B derivada de la función vendrá dado por el valor medio de todas las incertidumbres:

$$u^2(B)_{func} = 2{,}83 \cdot 10^{-3}$$

La incertidumbre derivada de la precisión se estima a partir de la varianza de los distintos Coeficientes de Corrección B para las distintas experiencias realizadas:

$$u^2(B)_{prec} = 6{,}74 \cdot 10^{-5}$$

Por lo tanto la incertidumbre asociada al coeficiente de corrección B, u(B), se calcularía como la suma de cuadrados de la contribución de la regresión y la correspondiente precisión:

$$u(B) = \sqrt{2{,}83 \cdot 10^{-3} + 6{,}74 \cdot 10^{-5}} = 5{,}38 \cdot 10^{-2}$$

8.1.3. Incertidumbre asociada al término de covarianza

La incertidumbre debida al *término de covarianza* entre los Coeficientes de Corrección A y B se calcula mediante el coeficiente de correlación $r_{A,B}$ y las incertidumbres u(A) y u(B).

$$\left.\begin{array}{l} Q_{A^2} = 1321{,}87 \\ Q_{B^2} = 6{,}74 \cdot 10^{-3} \\ Q_{AB} = 0{,}9067 \end{array}\right\} \Rightarrow \quad r_{A,B} = 0{,}3037$$

Por lo tanto sumando cada una de estas contribuciones se obtiene que la incertidumbre asociada a la Función de Corrección depende de la concentración estimada C_E y de la incertidumbre asociada a la estimación de esta concentración, $u(C_E)$:

$$u^2(C^*_{E-CFM}) = 1982{,}61 + 1{,}5222 \cdot C_E + 2{,}90 \cdot 10^{-3} \cdot C_E^2 + 2{,}0594 \cdot u^2(C_E) \qquad \text{(VII-10)}$$

Por lo tanto se obtiene una ecuación cuadrática, de tal forma que al aumentar la concentración C_E aumenta la incertidumbre asociada a esta concentración para un valor de incertidumbre asociada a esta concentración C_E constante, $u(C_E)$. Este aumento de incertidumbre es tanto mayor cuanto mayor sea la incertidumbre en la concentración estimada, $u(C_E)$. En la Figura VII.6 se representa la incertidumbre asociada a la función de corrección, $u(C^*_{E-CFM})$ frente a la concentración estimada C_E (en un intervalo de 0 – 1500 µg/l) para distintos valores de $u(C_E)$ (entre el 1 – 25% de la concentración C_E) donde se puede observar este aumento en la incertidumbre.

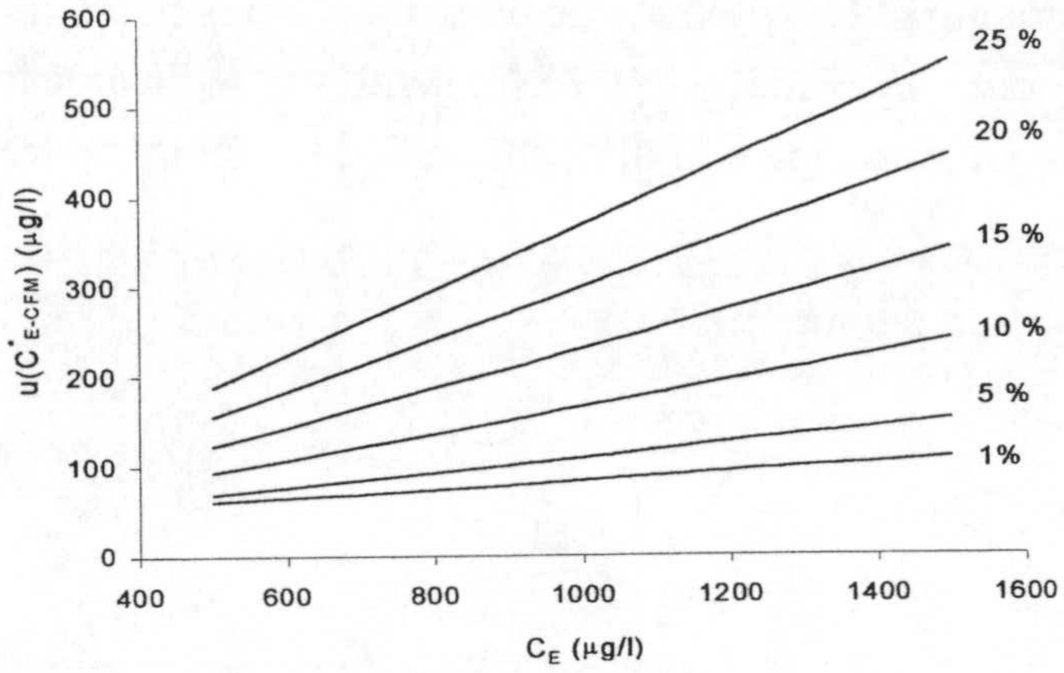


Figura VII.6.

Representación de la Incertidumbre $u(C^*_{CFM})$ frente a la concentración C_E para valores de $u(C_E)/C_E$ entre 1 – 25%.

De forma similar la incertidumbre del Factor de Corrección se puede expresar como:

$$u^2(F_E) = \left[1983{,}61 + 1{,}5222 \cdot C_E + 0{,}0029 \cdot C_E^2 + (2{,}0594 - F_E^2) \cdot u^2(C_E)\right] \cdot \frac{1}{C_E^2} \quad \text{(VII-11)}$$

Además es posible comprobar que si los valores de $u(C^*_{E\text{-}CFM})$ y de u(F) son calculados independientemente por las ecuaciones VII-6 y VII-7 proporciona el mismo resultado, hecho que aporta validez al protocolo propuesto dada la similitud entre los resultados obtenidos mediante Función de Corrección y Factor de Corrección.

8.1.4. Incertidumbre asociada a la concentración estimada mediante EC

Esta componente de incertidumbre es una combinación de las componentes debida a la preparación de los patrones ($u^2(patrón)$), la debida a la calibración ($u^2(func)$) y la debida de la precisión ($u^2(prec)$. En la tabla 14 del Anexo C3 figuran los valores de las características de los equipos utilizados.

❍ Incertidumbre asociada al patrón

Ésta es característica del valor de cada uno de los patrones y depende de la incertidumbre relativa asociada al establecimiento de la disolución madre y de la incertidumbre relativa asociada a la dilución de la disolución madre.

La concentración de la disolución madre se calcula dividiendo la masa pesada por el volumen del matraz:

$$C_{madre} = \frac{m}{VM_1} = \frac{25}{50} \cdot 10^3 = 500 \text{ mg/l}$$

La incertidumbre será por tanto:

$$u_{rel}(C_{madre}) = \sqrt{u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(VM_1)} = \sqrt{\left(\frac{1/2}{25}\right)^2 + \left(\frac{0{,}5/\sqrt{3}}{50}\right)^2} = 0{,}021$$

A partir de esta disolución madre, se realiza una dilución para obtener las concentraciones finales del patrón en la curva de calibración. Si consideramos los dos puntos donde se ha realizado la validación (750 y 1500 µg/l):

$$C_{añadida} = 750 \text{ µg/l} \quad \Rightarrow \quad Dil = \frac{VP_1}{VM_2} = \frac{0{,}015}{10} = 0{,}0015$$

$$C_{añadida} = 1500 \text{ µg/l} \quad \Rightarrow \quad Dil = \frac{VP_1}{VM_2} = \frac{0{,}030}{10} = 0{,}0030$$

La incertidumbre asociada a las micropipetas se calcula como:

$$u(VP_2)_{750} = \frac{\text{corrección}}{\sqrt{3}} + CV \cdot \text{nominal} = \frac{0{,}023}{\sqrt{3}} + 0{,}005 \cdot 15 = 0{,}088$$

$$u(VP_2)_{1500} = \frac{0{,}033}{\sqrt{3}} + 0{,}005 \cdot 30 = 0{,}169$$

Por lo tanto las incertidumbres asociadas valen:

$$u_{rel}(dil)_{750} = \sqrt{u_{rel}^2(VP_1) + u_{rel}^2(VM_2)} = \sqrt{\left(\frac{0{,}088}{15}\right)^2 + \left(\frac{0{,}025/\sqrt{3}}{10}\right)^2} = 0{,}006$$

$$u_{rel}(dil)_{1500} = \sqrt{u_{rel}^2(VP_1) + u_{rel}^2(VM_2)} = \sqrt{\left(\frac{0{,}169}{30}\right)^2 + \left(\frac{0{,}025/\sqrt{3}}{10}\right)^2} = 0{,}006$$

Ambas tienen el mismo valor por lo que, combinando ambas contribuciones se obtiene que la incertidumbre asociada a la preparación de los patrones para el calibrado EC es:

$$u_{rel}(\text{patrón}) = \sqrt{u_{rel}^2(C_{madre}) + u_{rel}^2(\text{dil})} = \sqrt{(0{,}021)^2 + (0{,}006)^2} = 0{,}022$$

$$u(\text{patrón})_{750} = 0{,}022 \cdot 750\ \mu g/l = 16{,}5\ \mu g/l$$

$$u(\text{patrón})_{1500} = 0{,}022 \cdot 1500\ \mu g/l = 33{,}0\ \mu g/l$$

❍ **Incertidumbre asociada a la calibración**

La incertidumbre debida a la transformación de la señal cromatográfica en concentración se calcula aplicando la ecuación IV-20 al calibrado EC. Los cálculos son aplicados a cada una de las experiencias realizadas, los valores medios de todas las experiencias son:

$$u(\text{func})_{750} = 6{,}8\ \mu g/l \qquad \text{y} \qquad u(\text{func})_{1500} = 10{,}9\ \mu g/l$$

❍ **Incertidumbre asociada a la precisión**

Esta incertidumbre es calculada a partir de los valores obtenidos en el proceso de validación, calculando la desviación estándar de las muestras adicionadas para el test de Recuperación (tabla 10 del Anexo C3):

Para 750 µg/l: $$u(\text{prec}) = \frac{s_r}{\sqrt{n_r}} = \frac{48{,}2}{\sqrt{1}} = 48{,}2\ \mu g/l$$

Para 1500 µg/l: $$u(\text{prec}) = \frac{s_r}{\sqrt{n_r}} = \frac{74{,}0}{\sqrt{1}} = 74{,}0\ \mu g/l$$

Considerando las tres contribuciones, la incertidumbre asociada a la concentración estimada mediante el calibrado EC vale:

Para 750 µg/l:

$$u(C_E) = \sqrt{u^2(\text{patrón}) + u^2(\text{func}) + u^2(\text{prec})} = 51{,}4\ \mu g/l$$

$$u_{rel}(C_E) = \frac{51{,}4\ \mu g/l}{750\ \mu g/l} = 0{,}068 \quad \rightarrow 6{,}8\ \%$$

Para 1500 µg/l:

$$u(C_E) = \sqrt{u^2(\text{patrón}) + u^2(\text{func}) + u^2(\text{prec})} = 81{,}8\ \mu g/l$$

$$u_{rel}(C_E) = \frac{81{,}8\ \mu g/l}{1500\ \mu g/l} = 0{,}054 \quad \rightarrow 5{,}4\ \%$$

8.2. Incertidumbre asociada al volumen de muestra

Puesto que el volumen de muestra ha sido tomado con matraz de 250 ml, su incertidumbre viene dada por las características del material utilizado:

$$u_{rel}(V_{muestra}) = \frac{\left(0{,}80/\sqrt{3}\right)}{250} = 0{,}002$$

8.3. Incertidumbre combinada

Como se muestra la figura VII.7, las contribuciones más significativas son las debidas al uso de la Función de Corrección siendo siempre mayor la debida a la estimación de la concentración mediante el calibrado EC y dentro de ésta la debida a la precisión de las medidas. Por lo tanto, la incertidumbre asociada al contenido de Procimidona en las muestras concentración vale, por tanto:

$$u_{rel}(CONT)_{750} = \sqrt{u_{rel}{}^2(C^*_{E-VM}) + u_{rel}{}^2(V_{muestra})} = 0{,}122 \rightarrow 12{,}2\ \%$$

$$u_{rel}(CONT)_{1500} = \sqrt{u_{rel}{}^2(C^*_{E-VM}) + u_{rel}{}^2(V_{muestra})} = 0{,}085 \rightarrow 8{,}5\ \%$$

Así se obtiene que el contenido de Procimidona vale:

$$\mathbf{CONT_{750} = 0{,}20 \pm 0{,}05\ \mu g/cm^2\ (k = 2)}$$

$$\mathbf{CONT_{1500} = 0{,}41 \pm 0{,}07\ \mu g/cm^2\ (k = 2)}$$

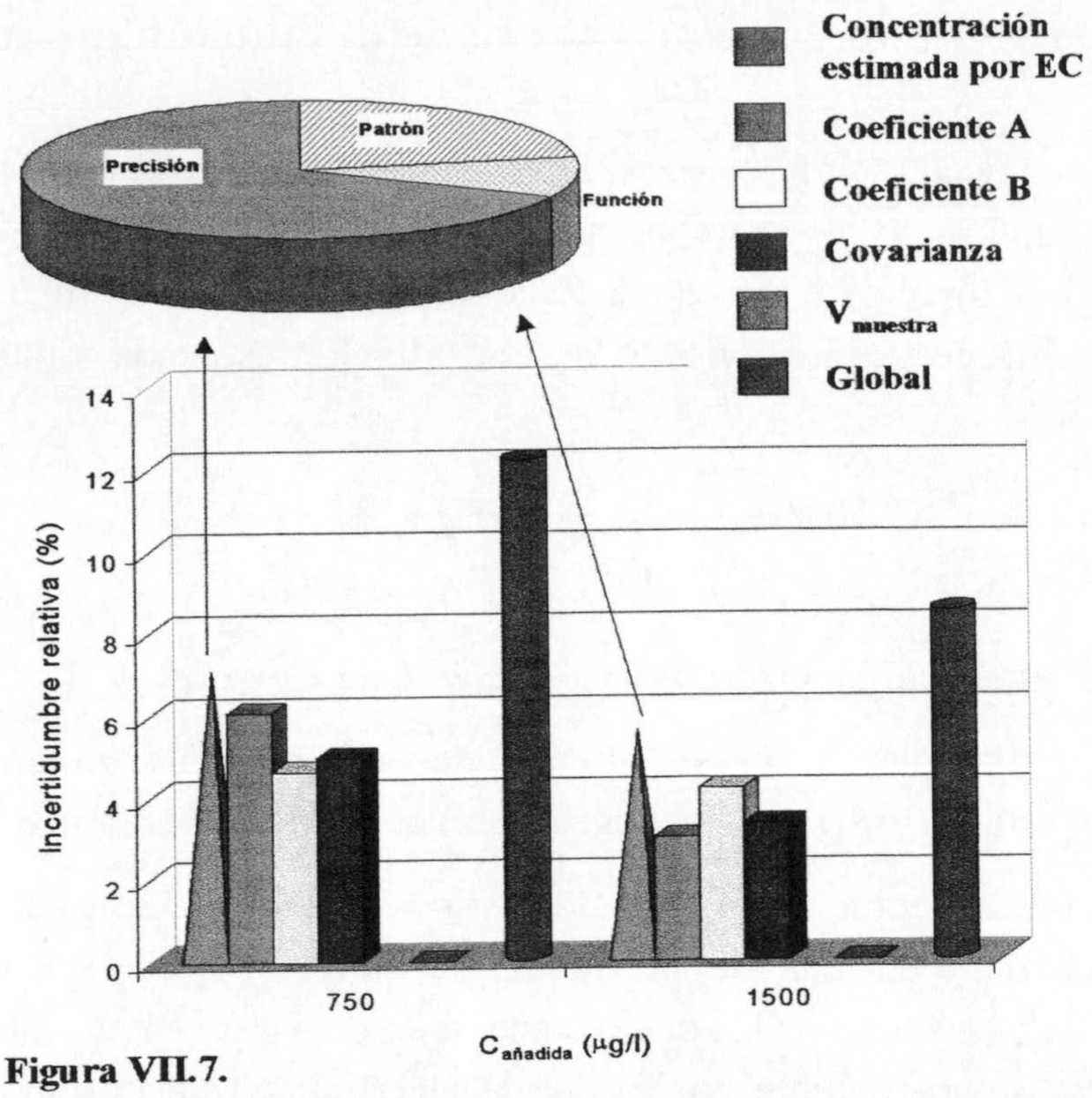


Figura VII.7.

Contribuciones de incertidumbre al contenido de Procimidona aplicando $CF_{E\text{-}CFM}$

9. INCERTIDUMBRE ASOCIADA AL CONTENIDO DE PROCIMIDONA APLICANDO $CF_{CM\text{-}CFM}$

En este caso, la incertidumbre asociada al contenido de analito se calcula aplicando la regla de propagación de varianzas a la ecuación VII-7:

$$u_{rel}(CONT) = \sqrt{u_{rel}{}^2(C^*_{CM-CFM}) + u_{rel}{}^2(V_{muestra})} \qquad \text{(VII-12)}$$

siendo las contribuciones asociadas a la estimación de la incertidumbre son:

- la concentración de Procimidona estimada a partir de $CF_{CM\text{-}CFM}$ y
- el volumen de muestra a analizar.

9.1. Incertidumbre asociada al uso de la Función de Corrección

La concentración $C^*_{CM\text{-}CFM}$ lleva asociada una incertidumbre que puede ser calculada aplicando la regla de propagación de varianzas y covarianzas a la Función de Corrección $CF_{CM\text{-}CFM}$. Recordemos que en esta Función sólo aparece el Coeficiente de Corrección B y la concentración estimada a partir del calibrado MC:

$$u^2(C^*_{CM-CFM}) = C_{CM}{}^2\ u^2(B) + (B)^2\ u^2(C_{CM}) \qquad \text{(VII-13)}$$

9.1.1. Incertidumbre asociada al Coeficiente de Corrección B

Al igual que en el caso anterior, depende de la incertidumbre derivada de la función estimada, $u(B)_{func}$, y la incertidumbre derivada de la precisión, $u(B)_{prec}$.

La incertidumbre derivada de la función estimada se calcula a partir de las pendientes de cada una de las rectas de calibrado y de las correspondientes desviaciones estándar asociadas a cada uno de ellos. Para cada experiencia se obtiene un valor diferente por lo que la incertidumbre asociada al coeficiente de corrección B derivada de la función vendrá dado por el valor medio de todas las incertidumbres:

$$u^2(B)_{func} = 1{,}73 \cdot 10^{-3}$$

La incertidumbre derivada de la precisión se estima a partir de la varianza de los distintos Coeficientes de Corrección B para las distintas experiencias realizadas:

$$u^2(B)_{prec} = 1{,}69 \cdot 10^{-4}$$

Por lo tanto la incertidumbre asociada al coeficiente de corrección B, u(B), se calcularía como la suma de cuadrados de la contribución de la regresión y la correspondiente precisión:

$$u(B) = \sqrt{1{,}73 \cdot 10^{-3} + 1{,}69 \cdot 10^{-5}} = 4{,}36 \cdot 10^{-2}$$

Este valor representa también la incertidumbre del Factor de corrección, $u(F_{CM}) = u(B)$.

La incertidumbre asociada a la Función de Corrección depende de la concentración estimada C_{CM} y de la incertidumbre asociada a la estimación de esta concentración, $u(C_{CM})$.

$$u^2(C^*_{CM-CFM}) = 1{,}90 \cdot 10^{-3} \cdot C^2_{CM} + 1{,}2962 \cdot u^2(C_{CM}) \qquad \text{(VII-14)}$$

9.1.2. Incertidumbre asociada a la concentración estimada mediante MC

Esta incertidumbre es la que necesitamos para el cálculo de la incertidumbre asociada a la Función de Corrección de CMC a CFMC que depende, al igual que en el caso anterior de las componentes debidas a la preparación de los patrones ($u^2(patrón)$), a la calibración ($u^2(func)$) y a la precisión ($u^2(prec)$. En la tabla 14 del Anexo C3 figuran los valores de las características de los equipos utilizados.

❑ Incertidumbre asociada al patrón

Dado que la disolución madre es la misma que en el calibrado EC, los resultados son los mimos que en el apartado anterior.

$$u_{rcl}(\text{patrón}) = 0{,}022$$
$$u(\text{patrón})_{750} = 0{,}022 \cdot 750\ \mu g/l = 16{,}5\ \mu g/l$$
$$u(\text{patrón})_{1500} = 0{,}022 \cdot 1500\ \mu g/l = 33{,}0\ \mu g/l$$

❑ Incertidumbre asociada a la calibración

La incertidumbre debida a la transformación de la señal cromatográfica en concentración se calcula aplicando la ecuación V-20 al calibrado EC. Los cálculos son aplicados a cada una de las experiencias realizadas, los valores medios de todas las experiencias son:

$u(func)_{750} = 10{,}2\ \mu g/l$ y $u(func)_{1500} = 16{,}3\ \mu g/l$

contemplado en el calibrado CMC y solamente habría que tener en cuenta el efecto del formulado que no está presente en el calibrado CMC.

Calculando los factores de costo e incertidumbre (Figura VII.9C), calculado como cociente entre los valores de las correpondientes metodologías, se observa que la aplicación de $CF_{E\text{-}CFM}$, provoca una aumento de incertidumbre del 5,4% (un factor 1,2), mientras el costo global de la calibración necesaria ha disminuido en 15,6 euros (un factor 3,9), por lo que el analista tendrá que pagar un aumento de incertidumbre de 0,2 % aproximadamente por cada euro que ha ahorrado. Pero para la Función de Corrección $CF_{CM\text{-}CFM}$, el aumento de incertidumbre y la disminución de costo tiene factores 1,2 y 1,0 respectivamente, así que el analista tendrá que pagar un aumento de incertidumbre de 1,2 % por cada euro, precio bastante elevado si tenemos en cuenta que sólo estamos corrigiendo el efecto de la presencia de formulación.

Bloque II

ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo VIII

MÉTODO DEL COCIENTE DE PENDIENTES (MOSR)

1. ANTECEDENTES

De los métodos propuestos para cuantificar el contenido de analito en una muestra en presencia de errores sistemáticos debidos al efecto matriz, el *Método de Adición de Patrón (MOSA, Method of Standard Addition)* es el más importante. Además, esta técnica aparece en bibliografía con los nombres Método de Adición, Método de Adición de Incrementos, Método de Autoestandarización, Método de sucesivas adiciones y Método mezcla. Incluso se le ha llamado como Método de patrón interno[1,2], nombre totalmente inapropiado. Este método puede ser utilizado en el análisis de muestras reales para evitar calibraciones sesgadas por el efecto de la matriz mediante un diagnóstico apropiado de los datos. Un requerimiento inicial para aplicar esta metodología es que todas las disoluciones preparadas para establecer el calibrado deben tener la misma concentración de muestra y el efecto del analito añadido a cada disolución debe ser igual al efecto del analito presente en la matriz[3]. La técnica es válida para la detección y eliminación del error sistemático proporcional[4,5]. La primera aplicación con este método fue realizada por Foster[6,7] y colaboradores en 1935. Otros autores han estudiado el método de adición de patrón realizado una estimación de la incertidumbre[8–11] del método o discutiendo la optimización[12] de los parámetros del sistema utilizando en ambos casos técnicas de regresión lineal o no lineal[13].

1. Chow T.J. and Thompson T.G., *Anal. Chem.*, 27, 18-21, 1955.
2. Chow T.J. and Thompson T.G., *Anal. Chem.*, 27, 910-913, 1955.
3. Bader M., *J. Chem Educ.*, 57, 703-706, 1980.
4. Cardone M.J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 1257-1282, 1983.
5. Cardone M.J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 1283-1294, 1983.
6. Foster J.S., Langstroth G.O. and McRae D.R., *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 153, 141-152, 1935.
7. Foster J.S. and Hprton C.A., *Proc. R. Soc. London, Ser. B*, 123, 422-430, 1937.
8. Larsen I.L., Hartman N.A. and Wagner J.J., *Anal. Chem.*, 45, 1511-1513, 1973.
9. Ratzlaff K.L., *Anal. Chem.*, 51, 232-235, 1979.
10. Nimura Y. and Carr M.R., *Analyst*, 115, 1589-1595, 1990.
11. Bruce G.R. and Gill P.S., *J. Chem. Educ.*, 76, 805-807, 1999.
12. Franke J.P. de Zeeuw R.A. and Hakkert, R., *Anal. Chem.*, 50, 1374-1379, 1978.
13. Kościelniak P., *Chem. Int. Lab. Syst.*, 47, 275-287, 1999.

Con respecto a los errores sistemáticos constantes producidos por la matriz de la muestra, éstos deben ser determinados en presencia tanto del analito como de la muestra. Este hecho fue establecido de forma independiente y simultánea en el mismo año por Kimball y Tufts[14] y Youden[15,16]. El método es denominado *Método de Youden*, y permite determinar el blanco verdadero por extrapolación a concentración cero estableciendo un calibrado con cantidades crecientes de muestra. El término independiente del calibrado de Youden es el denominado *Blanco Total de Youden (TYB)* y será la suma del *Blanco de Youden (YB)* y el *Blanco del Sistema (SB)*. El YB es la contribución al sesgo de la interacción matriz-analito y el SB que es la respuesta obtenida por el sistema para una disolución exenta de muestra calculada a partir del método de adición de patrón.

La utilidad y aplicabilidad de la metodología de adición de patrón para corregir el error sistemático debido al efecto matriz se ha puesto de manifiesto durante muchos años[17]. Esta metodología ha sido utilizada por muchos autores entre los que cabe destacar a Cuadros Rodríguez[18] y colaboradores que utilizan MOSA para validar la veracidad de un método analítico cuando no existen errores sistemáticos proporcionales, hecho que ponen de manifiesto comparando estadísticamente la pendiente del calibrado con patrón externo con la correspondiente del calibrado de adición de patrón. En el caso de que errores sistemáticos constantes y proporcionales estén presentes, existe un protocolo quimiométrico propuesto por García Campaña[19] y colaboradores basado en el Análisis de la Covarianza (ANCOVA) que busca un intervalo de muestra en el que se produzca una saturación[20,21] del error proporcional, es decir el intervalo donde el error proporcional se mantiene constante independientemente de la concentración de matriz[22].

---

14. Kimball R.H. and Tufts L.E., *Anal. Chem.*, 19, 946-950, 1947.
15. Youden W.J., *Anal. Chem.*, 19, 946-950, 1947.
16. Youden W.J., *Biometrics*, 3, 61, 1947.
17. Cardone M.J., *Anal. Chem.*, 58, 433-438, 1986.
18. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Alés Barrero F., Jiménez Linares C. and Román Ceba M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 78, 471-476, 1995.
19. García Campaña A. M., Cuadros Rodríguez L., Aybar Muñoz J. and Alés Barrero F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 80, 657-664, 1997.
20. Ferrus R. and Torrades F., *Anal. Chem.*, 60, 1281-1285, 1988.
21. Ferrús, R.; Torrades, F.; Quim. Anal. 1992, 11, 79-99.
22. Tyson J.F., *Analyst*, 109, 313-317, 1984.

MOSA es capaz de corregir errores sistemáticos proporcionales, pero por sí sóla no es capaz de corregir la influencia de interferencias directas[23] que deberán de eliminarse antes de utilizar el método de forma química o matemática mediante la utilización de la calibración multivariante. Así en 1979 surge el método de adición estándar generalizado (*GSAM, Generalized Standard Additions Method*), propueso por Saxberg y Kowalski[24] que auna los beneficios del método de adición de patrón con la calibración multivariante.

Otros métodos propuestos para corregir directamente los errores sistemáticos constantes y proporcionales producidos por la matriz son los denominados Método de adición de patrón en el punto H (*HPSAM, H-Point Standard Additions Method*)[25] y Método de adición de patrón en el punto H generalizado (*GHPSAM, Generalized H-Point Standard Additions Method*)[26] que son dos modificaciones de MOSA. Estos métodos permiten determinar concentraciones de analito insesgadas cuando existen interferencias directas pudiendo utilizar la técnica de análisis de componentes principales (PCA) para seleccionar las variables[27] necesarias. El HPSAM es un método para la resolución de mezclas binarias o ternarias cuando se conoce el interferente y permite determinar la concentración de interferente transformando el error no corregible debido a la presencia de interferencias directas en error sistemático constante. El GHPSAM se aplica para la resolución de muestras que contienen interferentes desconocidos.

En la actualidad y a pesar de la existencia de todas las variaciones existentes de MOSA, sigue habiendo en la literatura y entre los analistas una confusión tanto en sus características y su uso para diagnosticar la presencia de errores sistamáticos proporcionales, como en el concepto de blanco real, la forma correcta de cuantificarlo y su empleo en la determinación del contenido real de analito en una muestra en análisis de rutina. Por ello, en este capítulo, proponemos un modelo teórico bivariante para establecer la calibración de muestras reales para

---

23. Campins Falcó P. in Blanco M. and Cerdá V. Eds., *Quimiometría*, Publicaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona, Spain, pp. 37-82, 1988.
24. Saxberg B.E.H. and Kowalski B.R., *Anal. Chem.*, 51, 1031, 1979.
25. Bosch Reig F. and Campíns Falcó P.; *Analyst*, 113, 1011-1016, 1988.
26. Campíns Falcó P., Verdú Andrés J, Bosch Reig F. and Molíns Legua C., *Anal. Chim. Acta*, 302, 323-333, 1995.
27. Campíns Falcó P., Blasco Gómez F., Bosch Reig F. and Gallo Martínez L., *Talanta*, 53, 317-330, 2000.

cada matriz específica. Este modelo bivariante se traduce en una ecuación en la que la respuesta analítica puede descomponerse en una serie de términos que dependen del contenido de analito y matriz presente, así como de la interacción entre ambos. Dependiendo del tipo de error presente, el modelo general bivariante se reduce al correspondiente univariante, a partir del cual es posible la estimación del contenido de analito en la muestra a través del cociente de las pendientes de dos calibraciones, método que ya vislumbró Cardone[17], estimando la incertidumbre asociada al resultado analítico.

2. SISTEMA ANALITO-MUESTRA. MODELO BIVARIANTE

En química analítica instrumental es muy común la aplicación de la calibración con patrón externo (EC), siendo el modelo matemático univariante básico utilizado es:

$$R = a + b \cdot C_A + \varepsilon \qquad \text{(VIII-1)}$$

donde R es la respuesta analítica, a y b son los coeficientes de regresión, término independiente y sensibilidad del método o pendiente, respectivamente, C_A es la concentración de analito añadida en unidades de masa de analito dividida por volumen de disolución y ε es el error normal del modelo (en adelante, éste se omitirá para simplificar las ecuaciones). El término independiente es el denominado blanco del sistema (SB), además vamos a considerar que el analito no interacciona con el resto de reactivos presentes en la disolución, y por tanto el blanco del método (MB) y el blanco del sistema (SB) no difieren en su valor.

Si en vez de analito puro tenemos una muestra, como en el caso del calibrado de Youden, la expresión es:

$$R = a + b \cdot C_S \qquad \text{(VIII-2)}$$

donde C_S indica la concentración de analito "ficticia" que el sistema mide y que se atribuye a la concentración de analito en la muestra cuando no existe efecto matriz que perturbe la medida.

Así, cuando se agrega analito a una disolución de muestra, la respuesta analítica depende de dos concentraciones: la de analito añadida y la inicial de la muestra, por lo que las ecuaciones VIII-1 y VIII-2 puede generalizarse en:

$$R = a + b \cdot (C_A + C_S) \qquad \text{(VIII-3)}$$

En presencia de efecto matriz, el término C_S puede descomponerse en:

$$C_S = X \cdot S + K + P \cdot (C_A + X \cdot S) \cdot S \qquad \text{(VIII-4)}$$

donde cada término representa se define como:

$X \cdot S$, es la verdadera concentración de analito en la disolución de medida

X, es el verdadero contenido de analito en la muestra en unidades de masa de analito dividido por masa o volumen de muestra

S, es la concentración de muestra en unidades de masa o volumen de muestra dividido por volumen de disolución

K, es la componente de error sistemático constante debido a la interacción matriz – analito en unidades de masa de analito dividido por volumen de disolución

$P \cdot (C_A + X \cdot S) \cdot S$ representa una componente de error sistemático proporcional debido a la interacción matriz – analito

P es un factor de proporcionalidad en unidades de volumen de disolución dividido por masa de muestra

Evidentemente, si K y P son nulos, no hay efecto matriz y los resultados obtenidos de la calibración de patrón externo (EC) están libres de errores sistemáticos. Se ha realizado una simplificación considerando que el factor de proporcionalidad, P, afecta de la misma forma a la concentración C_A y $X \cdot S$.

Combinando las ecuaciones VIII-3 y VIII-4 y reagrupando términos, se obtiene la ecuación global:

$$\mathbf{R = (a + K \cdot b) + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot S\ (1 + P \cdot S) + P \cdot b \cdot C_A \cdot S} \qquad \text{(VIII-5)}$$

Este modelo bivariante nos indica la dependencia de la respuesta analítica con las variables analíticas: concentración de analito añadido, verdadero contenido de analito en la muestra y concentración de muestra en la disolución y

representa un modelo matemático que describe el comportamiento de un sistema analítico general cuando existe una interacción entre la matriz y el analito.

3. RELACIÓN ENTRE EL MODELO BIVARIANTE Y LOS CALIBRADOS UNIVARIANTES

Cuando la medida de la respuesta analítica se altera por el efecto matriz, en Química Analítica se podrían aplicar cuatro metodologías de calibración para diagnosticar y corregir la posible desviación entre el resultado estimado del análisis y el verdadero valor (o convencionalmente considerado como verdadero)[28]. Estas calibraciones[29] consideradas se denominan: calibración con patrón externo (EC), calibración con patrón en matriz (MC), calibración por adición de patrón (AC) y calibración de Youden (YC).

El modelo bivariante propuesto contiene la información general de los cuatro calibrados anteriores de forma que aplicando las restricciones convenientes se pueden deducir las correspondientes ecuaciones.

3.1. Calibrado con patrón externo, EC

La calibración de patrón externo se obtiene midiendo la respuesta analítica, R, de disoluciones que contienen solamente analito en disolvente, C_A. Por consiguiente, la componente constante de error sistemático, K, es nula dado que ésta sólo existe si tanto el analito como la matriz están presentes en el medio y se produce una interacción entre ambos.

Así que, considerando S = K = 0 en la ecuación VIII-5 se obtiene que la respuesta analítica sigue la expresión:

---

28. García Campaña A.M., Cuadros Rodríguez L., Aybar Muñoz J., Alés Barrero F., Román Ceba M. and Baeyens W.R.G., *Biomed. Chromatog.*, 13, 151-154, 1999.
29. Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E. and Bosque Sendra J.M., *Trends Anal. Chem.*, 20, 620-636, 2001.

$$R = a_E + b_E \cdot C_A \qquad \text{(VIII-6)}$$

que es la misma que la ecuación VIII-1. El término independiente, a_E, corresponde al *Blanco del Sistema* (SB = a_E), y la pendiente, b_E, es una medida de la sensibilidad del método analítico. A partir de ahora y para facilitar la nomenclatura los coeficientes a_E y b_E se notarán como a y b respectivamente.

3.2. Calibrado con patrón en matriz, MC

Es obtenida por adición de cantidades crecientes de analito y una cantidad constante de matriz, la cual esta exenta de analito (X = 0), por lo que, a partir de la ecuación VIII-5, considerando S constante, X = 0 y C_A variable, se obtiene:

$$R = [a + K \cdot b] + [b \cdot (1+P \cdot S)] \cdot C_A \qquad \text{(VIII-7)}$$

donde el término independiente y la pendiente, a_M y b_M respectivamente, se pueden expresar como:

$$a_M = a + K \cdot b$$

$$b_M = b \cdot (1+P \cdot S) \qquad \text{(VIII-8)}$$

Así, estableciendo los calibrados EC y MC se pueden obtener el valor de la componente constante de error sistemático (K) y el factor de proporcionalidad (P):

$$K = \frac{a_M - a}{b} \qquad P = \frac{b_M - b}{b} \cdot \frac{1}{S} \qquad \text{(VIII-9)}$$

3.3 Calibrado por adición de patrón, AC

Al igual que en el caso anterior, se obtiene por la adición de cantidades crecientes de patrón, pero en esta ocasión se añade una cantidad constante de muestra que contiene analito (X ≠ 0). Por lo que la ecuación vendrá dada por:

$$R = [a + K \cdot b + b \cdot X \cdot S \cdot (1+P \cdot S)] + [b \cdot (1+P \cdot S)] \cdot C_A \qquad \text{(VIII-10)}$$

Combinando la ecuación VIII-6 y VIII-10, se obtiene que el término independiente, a_A, y la pendiente, b_A, se pueden expresar como:

$$a_A = a + K \cdot b + b \cdot X \cdot S \cdot (1+P \cdot S)$$

$$b_A = b\cdot(1+P\cdot S) \qquad \text{(VIII-11)}$$

De estas expresiones no es posible obtener la componente constante de error sistemático (K) dado que el contenido de analito en la muestra (X) no es conocido de antemano, pero podemos obtener el factor de proporcionalidad, P:

$$P = \frac{b_A - b}{b} \cdot \frac{1}{S} \qquad \text{(VIII-12)}$$

El factor de proporcionalidad refleja la diferencia existente entre las pendientes de los calibrados EC y AC (o EC y MC en el caso anterior) debido al efecto matriz y se representa mediante una variación relativa por unidad de concentración de muestra. Como muestra la figura VIII.1, P puede ser positivo si la pendiente aumenta con la adición de muestra ($b_A > b$), negativo si disminuye ($b > b_A$) o cero si la pendientes no difieren significativamente ($b_A = b$) lo cual significa que no existe componente proporcional de error sistemático.

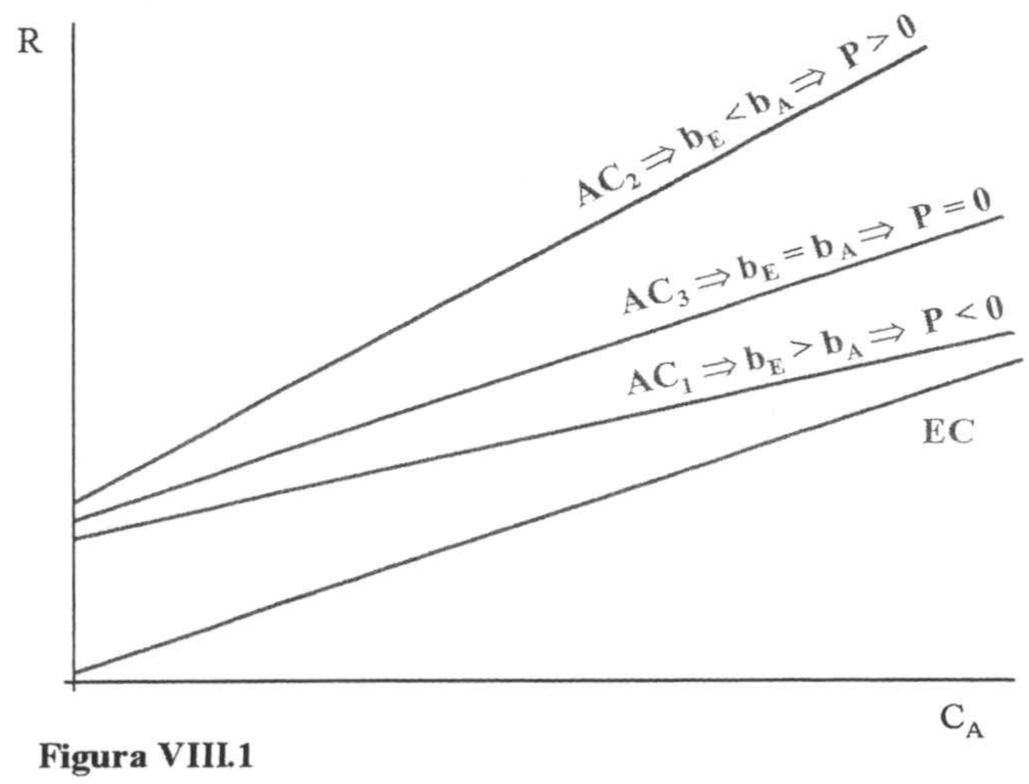


Figura VIII.1

Relación entre los calibrados EC y AC

Tanto EC, AC como MC son representaciones de la respuesta analítica frente a la concentración de analito añadido (C_A), pero con adición de muestra en el caso de AC y MC, siendo la diferencia entre estas dos que la muestra añadida al calibrado AC contiene el analito de interés y la de MC no. Desde este punto de

vista, la figura VIII.1 puede ser aplicada a los calibrados EC y MC (en vez de AC) pues lo que diferencia a ambos calibrados es el término independiente, que en el caso del calibrado AC tiene un componente adicional ($b \cdot X \cdot S \cdot (1+P \cdot S)$).

3.4. Calibrado de Youden, YC

Con método de Youden, se establece un calibrado utilizando porciones crecientes de una disolución de muestra tratada. La respuesta analítica considerando que la concentración añadida de analito es cero ($C_A = 0$), obedece a la expresión:

$$R = [a + K \cdot b] + [b \cdot X \cdot (1+P \cdot S)] \cdot S \qquad \text{(VIII-13)}$$

Esta ecuación es una función cuadrática, esto indica que el calibrado de Youden, en general, no tiene porqué seguir una tendencia lineal sino que puede presentar curvatura y podrá ser expresado como:

$$R = [a + K \cdot b] + [b \cdot X] \cdot S + [b \cdot X \cdot P] \cdot S^2 \qquad \text{(VIII-14)}$$

donde los tres términos entre corchetes indican el término independiente, a_Y, el coeficiente lineal, b_Y, y el coeficiente cuadrático, b^C_Y, respectivamente.

Por esta razón, cuando se establece un calibrado YC curvo, es posible diagnosticar la presencia de efecto matriz. De hecho, si $a_Y \neq a$ podemos afirmar que existe una componente constante de error sistemático ($K \neq 0$), mientras que si el coeficiente b^C_Y es significativo (YC curvo) entonces existe una componente proporcional de error sistemático ($P \neq 0$).

El término independiente (a_Y) se identifica con el *Blanco Total de Youden* ($TYB = a_Y$) y se expresa por el término:

$$a_Y = a + K \cdot b \qquad \text{(VIII-15)}$$

Los términos independientes dados por los calibrados MC (ecuació VIII-8) e YC (ecuación VIII-15) tienen la misma expresión, es decir que $a_Y = a_M$, lo cual nos proporciona una alternativa para la obtención del Blanco Total de Youden.

La diferencia entre el Blanco Total de Youden (TYB) y el Blanco del Sistema (SB) se denomina *Blanco de Youden* ($YB = TYB - SB = K \cdot b$) y

corresponde al blanco real de la matriz y por tanto la componente constante de error sistemático en unidades de respuesta analítica[5,30,31].

La componente constante de error sistemático (K) en unidades de concentración se obtiene, por tanto, del cociente entre el Blanco de Youden (YB) y la pendiente del calibrado de patrón externo de acuerdo a la ecuación:

$$K = \frac{a_Y - a}{b} \qquad \text{(VIII-16)}$$

4. RELACIÓN ENTRE CALIBRADOS UNIVARIANTES EN FUNCIÓN DEL TIPO DE ERROR SISTEMÁTICO

En función del tipo de error sistemático introducido por la matriz (constante y/o proporcional), la ecuación del modelo bivariante, expresada anteriormente con la ecuación VIII-5, puede particularizarse en 4 casos diferentes:

CASO A: Ausencia de errores sistemáticos

CASO B: Presencia de la componente constante del error sistemático

CASO C: Presencia de la componente proporcional del error sistemático

CASO D: Combinación de errores sistemáticos constante y proporcional

4.1. Ausencia de errores sistemáticos

Suponiendo que no hay efecto matriz y por tanto no existe componente constante (K = 0) ni proporcional (P = 0) de error sistemático, denominado **CASO A**, a partir de la ecuación VIII-5 se obtiene que la respuesta analítica sólo es función de los siguientes términos:

30. Torrades F., Riva M.C., Torres S., García Hortal J.A., Domènech X., Peral J. and Pérez M., *Anal. Chim. Acta*, 333, 139-146, 1996.
31. Torrades F. and Cecília E.; *Analyst*, 126, 127-130, 2001.

$$\mathbf{R = a + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot S} \qquad \text{(VIII-17)}$$

De los correspondientes parámetros de los calibrados EC, MC, AC y YC, presentados en la tabla VIII.1, se deduce que el calibrado de Youden presenta una tendencia lineal, es decir no hay contribución de la matriz al blanco (YB = 0 o TYB = SB). Por otro lado, las pendientes de los calibrados MC o AC no difieren de la pendiente del calibrado EC (son paralelas) que indica la ausencia de componente proporcional de error sistemático (Figura VIII.2). Además los términos independientes de EC y MC tampoco difieren del correspondiente a YC lo cual indica la ausencia de componente constante de error sistemático.

Tabla VIII.1

Ecuaciones correspondientes a los calibrados EC, MC, AC y YC en ausencia de errores sitemáticos

Calibrado	Ecuación	Término independiente	Pendiente
EC	$R = a + b \cdot C_A$	$a_E = a$	$b_E = b$
MC	$R = a + b \cdot C_A$	$a_M = a$	$b_A = b$
AC	$R = (a + b \cdot X \cdot S) + b \cdot C_A$	$a_A = a + b \cdot X \cdot S$	$b_A = b$
YC	$R = a + b \cdot X \cdot S$	$a_Y = a$	$b_Y = b \cdot X$

Como se deduce de las ecuaciones dadas en la tabla anterior, el contenido de analito en una muestra, X, se puede obtener a partir de los calibrados AC y EC que corresponde al tradicional MOSA, o bien mediante el cociente de las pendientes de YC y EC, que corresponde al método de cociente de pendientes *(MOSR, Method of Slope Ratio)*

4.2. Presencia de la componente constante de error sistemático

Si no existe la componente proporcional de error sistemático (P = 0) pero sí la componente constante (K ≠ 0), la ecuación general (**CASO B**), obtenida a partir de la ecuación VIII-5, sería:

$$\mathbf{R = (a + K \cdot b) + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot S} \qquad \text{(VIII-18)}$$

Los parámetros de los calibrados EC, MC, AC y YC se presentan en la tabla VIII.2. Todas las pendientes tienen la misma expresión que en el caso anterior, mientras que los términos independientes se ven incrementados por el término del Blanco de Youden (YB = $a_Y - a_E = K \cdot b_E$) que corresponde a la componente constante del error sistemático debido a la matriz (Figura VIII.2).

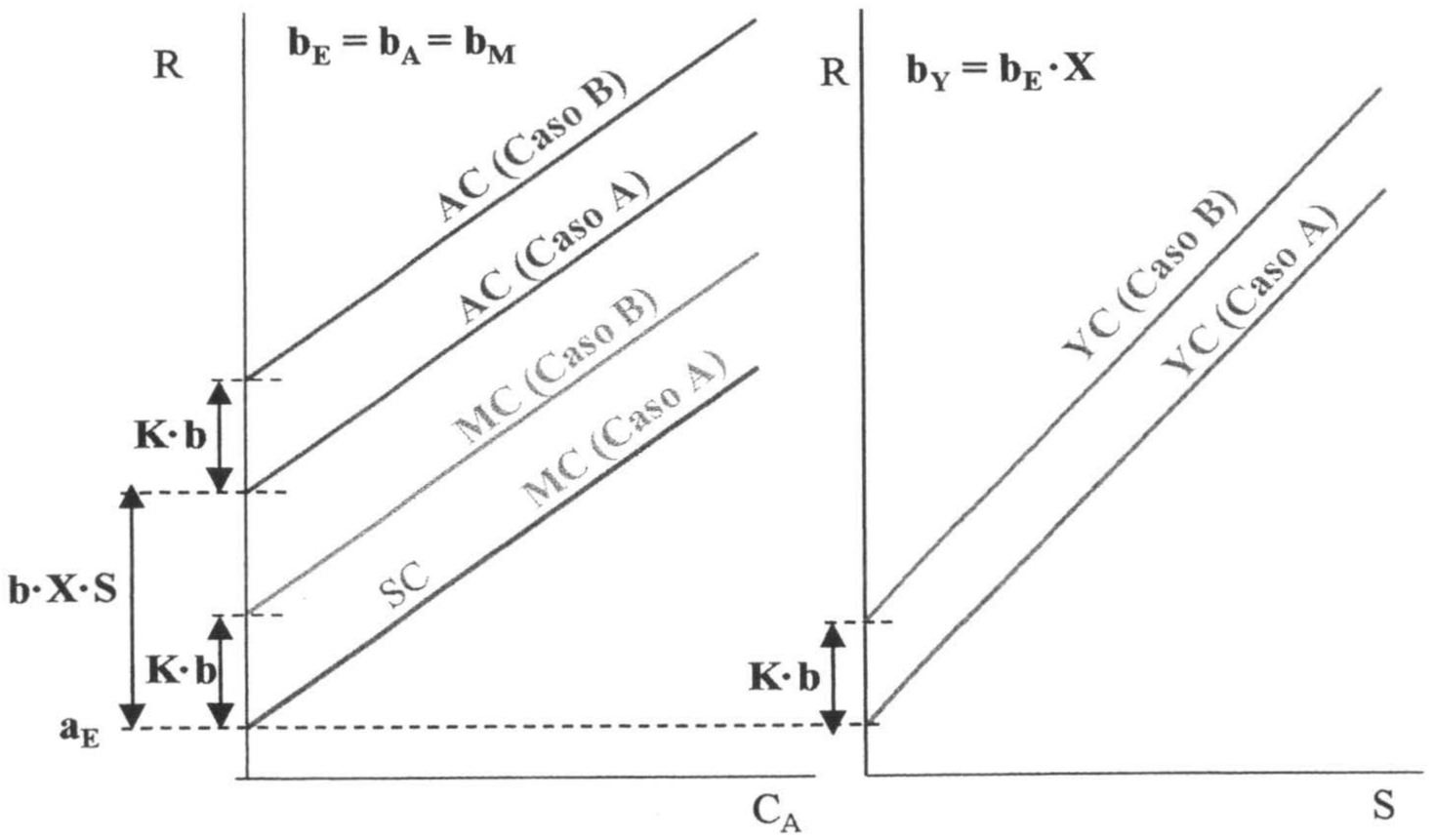


Figura VIII.2

Relación entre los calibrados EC, MC, AC y YC en los CASOS A (Ausencia de errores sistemáticos) y B (Presencia de sólo la componente constante de error sistemático)

Tabla VIII.2

Ecuaciones correspondientes a los calibrados EC, MC, AC y YC en presencia sólo de la componente constante de error sistemático

Calibrado	Modelo	Término independiente	Pendiente
EC	$R = a + b \cdot C_A$	$a_E = a$	$b_E = b$
MC	$R = (a + K \cdot b) + b \cdot C_A$	$a_M = a + K \cdot b$	$b_M = b$
AC	$R = (a + K \cdot b + b \cdot X \cdot S) + b \cdot C_A$	$a_A = a + K \cdot b + b \cdot X \cdot S$	$b_A = b$
YC	$R = (a + K \cdot b) + b \cdot X \cdot S$	$a_Y = a + K \cdot b$	$b_Y = b \cdot X$

En este caso, el contenido de analito en una muestra, X, se puede obtener de la combinación de los calibrados AC, YC y EC o bien, como en el caso anterior del cociente de las pendientes de YC y EC.

4.3. Presencia de la componente proporcional de error sistemático

En el caso en que no existan errores sistemáticos constantes (K = 0) pero estén presentes los proporcionales, podemos distinguir dos situaciones diferentes dependiendo de que la componente de error proporcional esté o no saturada en el intervalo de aplicación del método.

4.3.1. Componente de error proporcional no saturada

En este caso, denominado **CASO C.1**, La ecuación general es ajustada a la expresión:

$$\mathbf{R = a + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot S\ (1+P \cdot S) + P \cdot b \cdot C_A \cdot S} \qquad \text{(VIII-19)}$$

Los parámetros de los calibrados EC, MC, AC y YC se presentan en la tabla VIII.3. Como se aprecia, las pendientes de los calibrados MC y AC, iguales entre sí, no muestran un valor constante ya que son función del término (1+P·S),

es decir para cada concentración de muestra tendremos un valor de pendiente diferente (componente de error proporcional no saturada en el intervalo de aplicación) y además dependerán del signo de P. Esto implica que en función de la concentración de muestra añadida, se obtendrán calibrados AC o MC diferentes en forma del abanico (con pendientes diferentes). Pero el calibrado MC siempre tendrá el mismo término independiente que el calibrado EC (Figura VIII.3). De la conjunción de ambos calibrados (EC y MC o EC y AC) se puede deducir el factor de proporcionalidad.

Por otro lado, la curvatura mostrada por el calibrado YC será tanto mayor cuanto mayor sea el factor de proporcionalidad, siendo una parábola cóncava cuando $P > 0$ y convexa cuando $P < 0$.

Tabla VIII.3

Ecuaciones correspondientes a los calibrados EC, MC, AC y YC en presencia de la componente proporcional no saturada de error sistemático

Calibrado	Modelo	Término independiente	Pendiente
EC	$R = a + b \cdot C_A$	$a_E = a$	$b_E = b$
MC	$R = a + b \cdot (1 + P \cdot S) \cdot C_A$	$a_M = a$	$b_M = b \cdot (1 + P \cdot S)$
AC	$R = [a + b \cdot X \cdot S \cdot (1+P \cdot S)] + + b \cdot (1 + P \cdot S) \cdot C_A$	$a_A = a + + b \cdot X \cdot S \cdot (1+P \cdot S)$	$b_A = b \cdot (1 + P \cdot S)$
YC	$R = a + b \cdot X \cdot S \cdot (1+P \cdot S)$	$a_Y = a$	$b_Y = b \cdot X$ $b^C_Y = b \cdot X \cdot P$

El contenido de analito en una muestra, X, se puede obtener, como en el CASO A de la combinación de los calibrados AC y EC dado que no existen errores sistemáticos constantes y los términos independientes de los calibrados EC e YC son idénticos (aunque habrá que comprobarlo previamente) o bien, como en los casos anteriores del cociente de las pendientes de YC y EC.

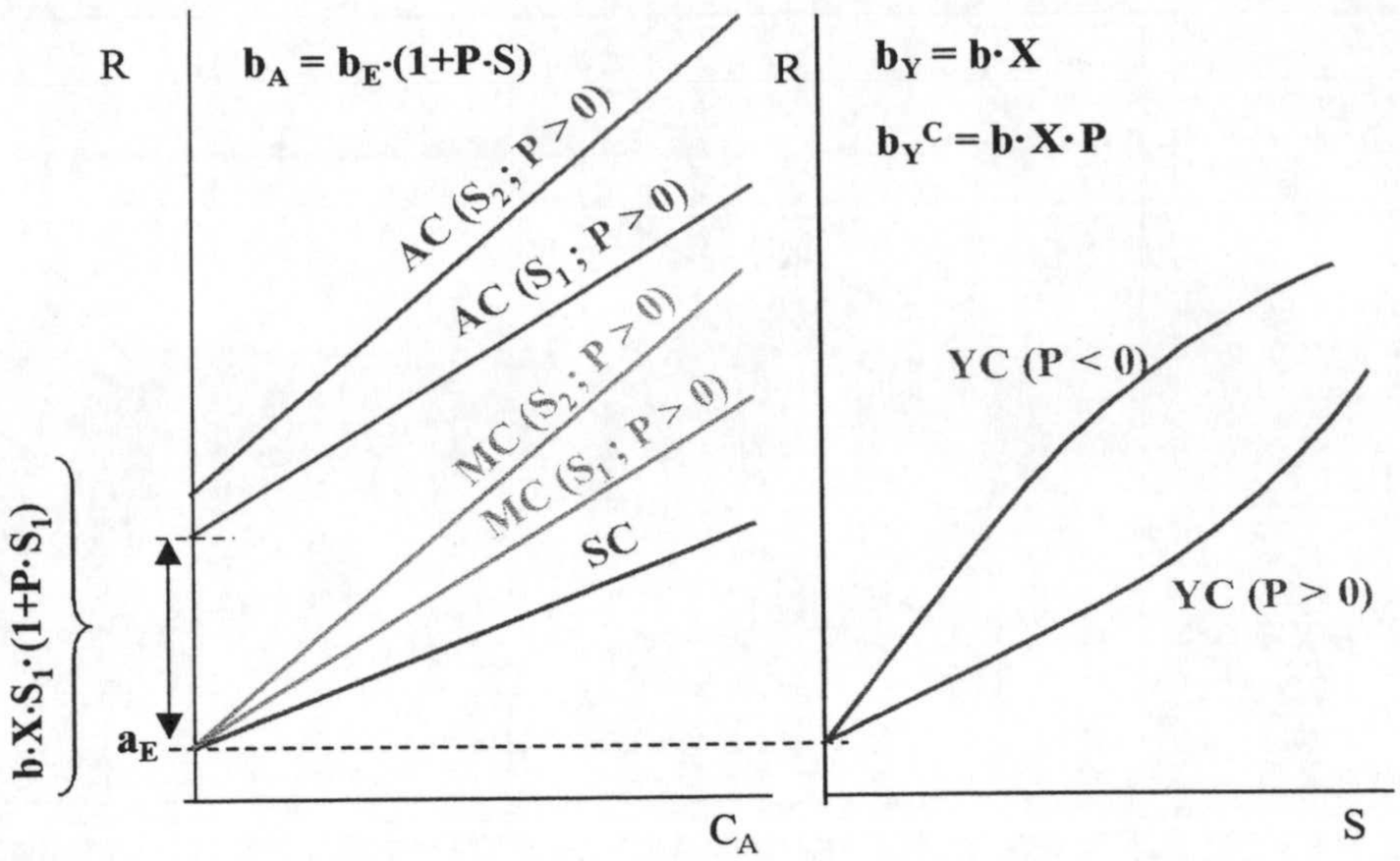


Figura VIII.3

Relación entre los calibrados EC, MC, AC y YC en el CASO C.1 (Presencia de la componente proporcional no saturada de error sistemático)

4.3.2. Componente de error proporcional saturada

En ciertos casos, puede producirse una saturación del error proporcional en un cierto intervalo de concentraciones de muestra permaneciendo la pendiente del calibrado AC constante. Este término se denomina **Factor de Saturación** (K_S) ($K_S = 1 + P \cdot S$ = constante). Por consiguiente, en este intervalo, la componente de error proporcional se vuelve una componente constante. Así, la ecuación general es ajustada a la expresión (**CASO C.2.**):

$$\mathbf{R = a + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot K_S \cdot S + P \cdot b \cdot C_A \cdot S} \qquad \text{(VIII-20)}$$

Los parámetros de los calibrados EC, MC, AC y YC se presentan en la tabla VIII.4. En este caso, las pendientes de los calibrados MC y AC se diferencian de la pendiente del calibrado EC en el término o Factor de Saturación S_F, siendo constantes en el intervalo de saturación, por lo tanto todas los calibrados MC o AC serán paralelos entre sí pero no respecto a EC. En cuanto al calibrado YC, en este caso, muestra una tendencia lineal (Figura VIII.3).

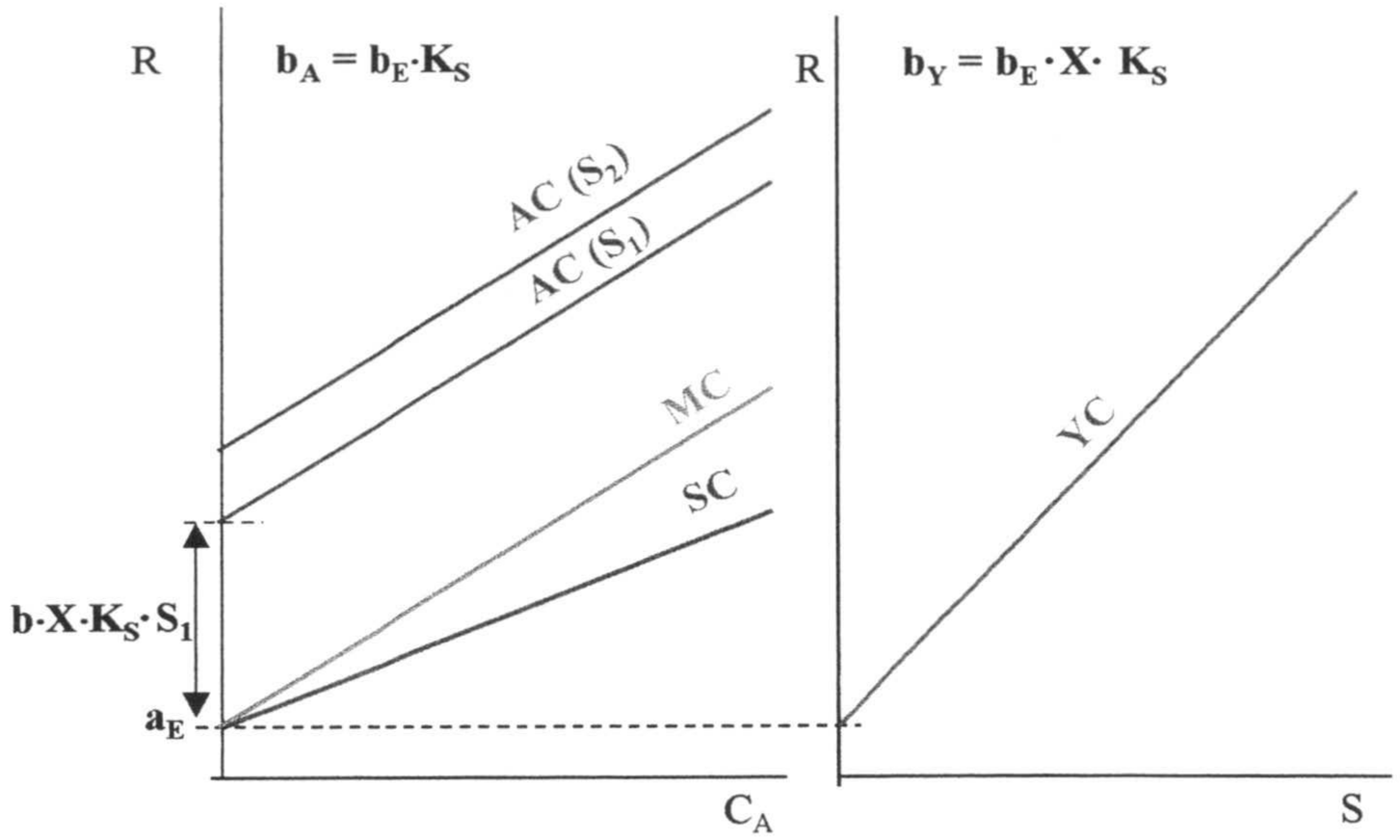


Figura VIII.4

Relación entre los calibrados EC, MC, AC y YC en el CASO C.2 (Presencia de la componente proporcional saturada de error sistemático)

Tabla VIII.4

Ecuaciones correspondientes a los calibrados EC, MC, AC y YC en presencia de la componente proporcional saturada de error sistemático

Calibrado	Modelo	Término independiente	Pendiente
EC	$R = a + b \cdot C_A$	$a_E = a$	$b_E = b$
MC	$R = a + b \cdot K_S \cdot C_A$	$a_M = a$	$b_M = b \cdot K_S$
AC	$R = (a + b \cdot X \cdot K_S \cdot S) + + b \cdot K_S \cdot C_A$	$a_A = a + b \cdot X \cdot K_S \cdot S$	$b_A = b \cdot K_S$
YC	$R = a + b \cdot X \cdot K_S \cdot S$	$a_Y = a$	$b_Y = b \cdot X \cdot K_S$

En este caso, aunque está presente el factor de saturación el contenido de analito en una muestra, X, se obtiene, como en el CASO A de la combinación de

los calibrados AC y EC o bien, mediante el cociente de las pendientes de los calibrados YC y AC o MC. Éste es el único caso en el que será necesario establecer un calibrado AC o MC para determinar el contenido de analito mediante MOSR.

4.4. Combinación de errores sistemáticos constantes y proporcionales

En el caso, también debemos distinguir dos situaciones diferentes dependiendo de que la componente de error proporcional esté o no saturada en el intervalo de aplicación del método.

4.4.1. Componente de error proporcional no saturada

Esta representa la situación más general (**CASO D.1**), siendo la ecuación del modelo idéntica a la ecuación VIII-5:

$$\mathbf{R = (a + K \cdot b) + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot S\ (1+P \cdot S) + P \cdot b \cdot C_A \cdot S} \qquad \text{(VIII-21)}$$

En la Tabla VIII.5 se recogen los parámetros de los calibrados EC, MC, AC y YC. Y al igual que en el caso C.1., las pendientes de los calibrados MC y AC están multiplicadas por el término (1+P·S), produciendo calibrados en forma de abanico a medida que aumenta la porción de muestra. Los términos independientes de los calibrados EC, MC y AC son diferentes entres sí. En cuanto al calibrado YC, también en este caso presenta curvatura que depende del factor de proporcionalidad P. (Figura VIII.5).

El contenido de analito en una muestra, X, se obtiene, como en el CASO B de la combinación de los calibrados AC, YC y EC o bien, mediante el cociente de las pendientes de los calibrados YC y EC.

Tabla VIII.5

Ecuaciones correspondientes a los calibrados EC, MC, AC y YC en presencia de las componentes constantes y proporcionales no saturadas de error sistemático

Calibrado	Modelo	Término independiente	Pendiente
EC	$R = a + b \cdot C_A$	$a_E = a$	$b_E = b$
MC	$R = (a + K \cdot b) + b \cdot (1 + P \cdot S) \cdot C_A$	$a_M = a + K \cdot b$	$b_M = b \cdot (1 + P \cdot S)$
AC	$R = [a + K \cdot b + b \cdot X \cdot S \cdot (1 + P \cdot S)] + b \cdot (1 + P \cdot S) \cdot C_A$	$a_A = a + K \cdot b + b \cdot X \cdot S \cdot (1 + P \cdot S)$	$b_A = b \cdot (1 + P \cdot S)$
YC	$R = (a + K \cdot b) + b \cdot X \cdot S \cdot (1 + P \cdot S)$	$a_Y = a + K \cdot b$	$b_Y = b \cdot X$ $b^C{}_Y = b \cdot X \cdot P$

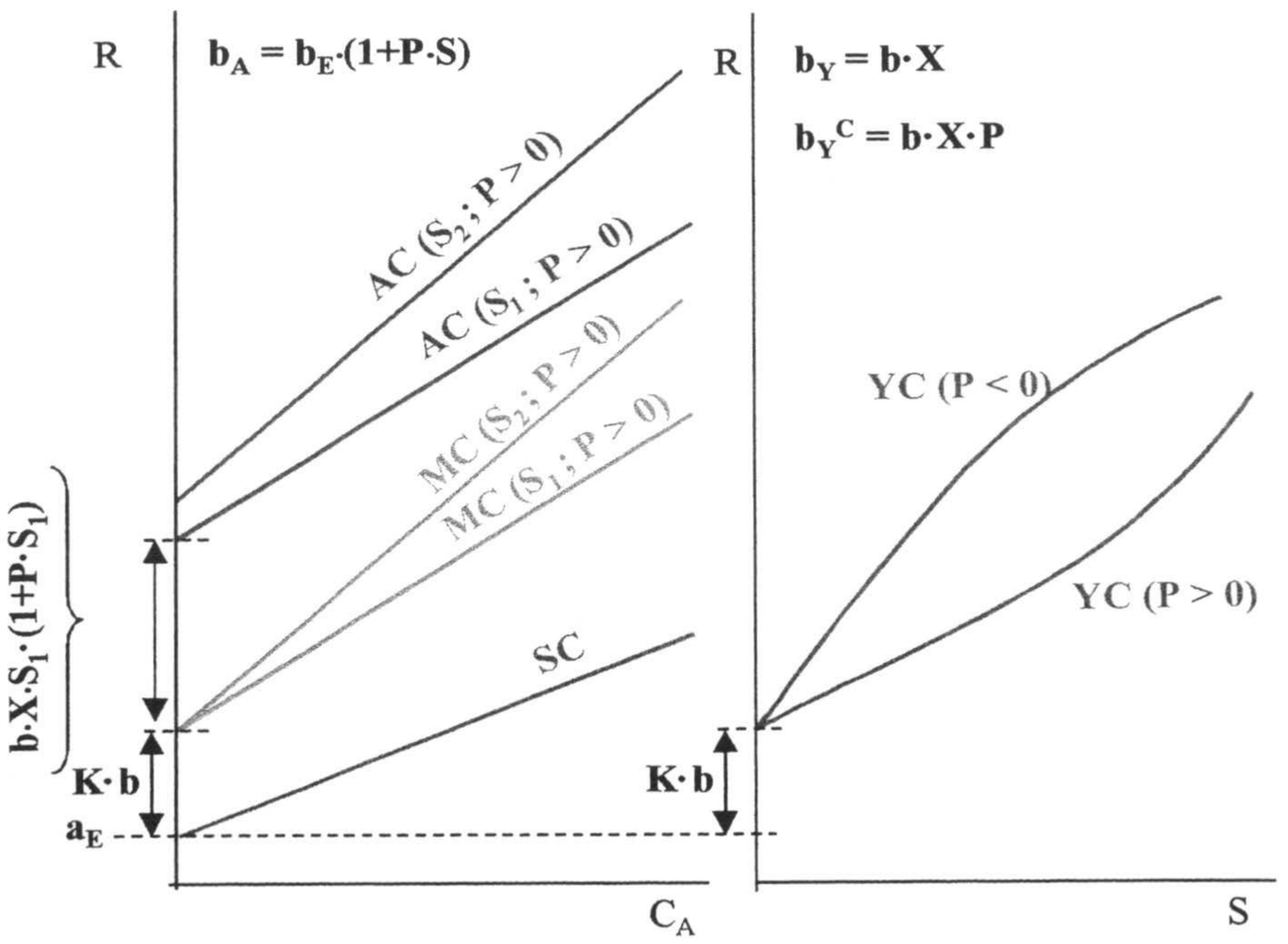


Figura VIII.5

Relación entre los calibrados EC, MC, AC y YC en el CASO D.1 (Combinación de errores sistemáticos constantes y proporcionales no saturados)

4.4.2. Componente de error proporcional saturada

Si se produce una saturación del error proporcional en un cierto intervalo de concentraciones de muestra, la ecuación general (**CASO D.2**) es ajustada a la expresión:

$$\mathbf{R = (a + K \cdot b) + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot K_S \cdot S + P \cdot b \cdot C_A \cdot S} \qquad \text{(VIII-22)}$$

Los parámetros de los calibrados EC, MC, AC y YC se presentan en la tabla VIII.6 que serán iguales que en el caso C.2. (Tabla VIII.4) pero añadiendo el término de componente constante de error proporcional (K·b) (Figura VIII.6).

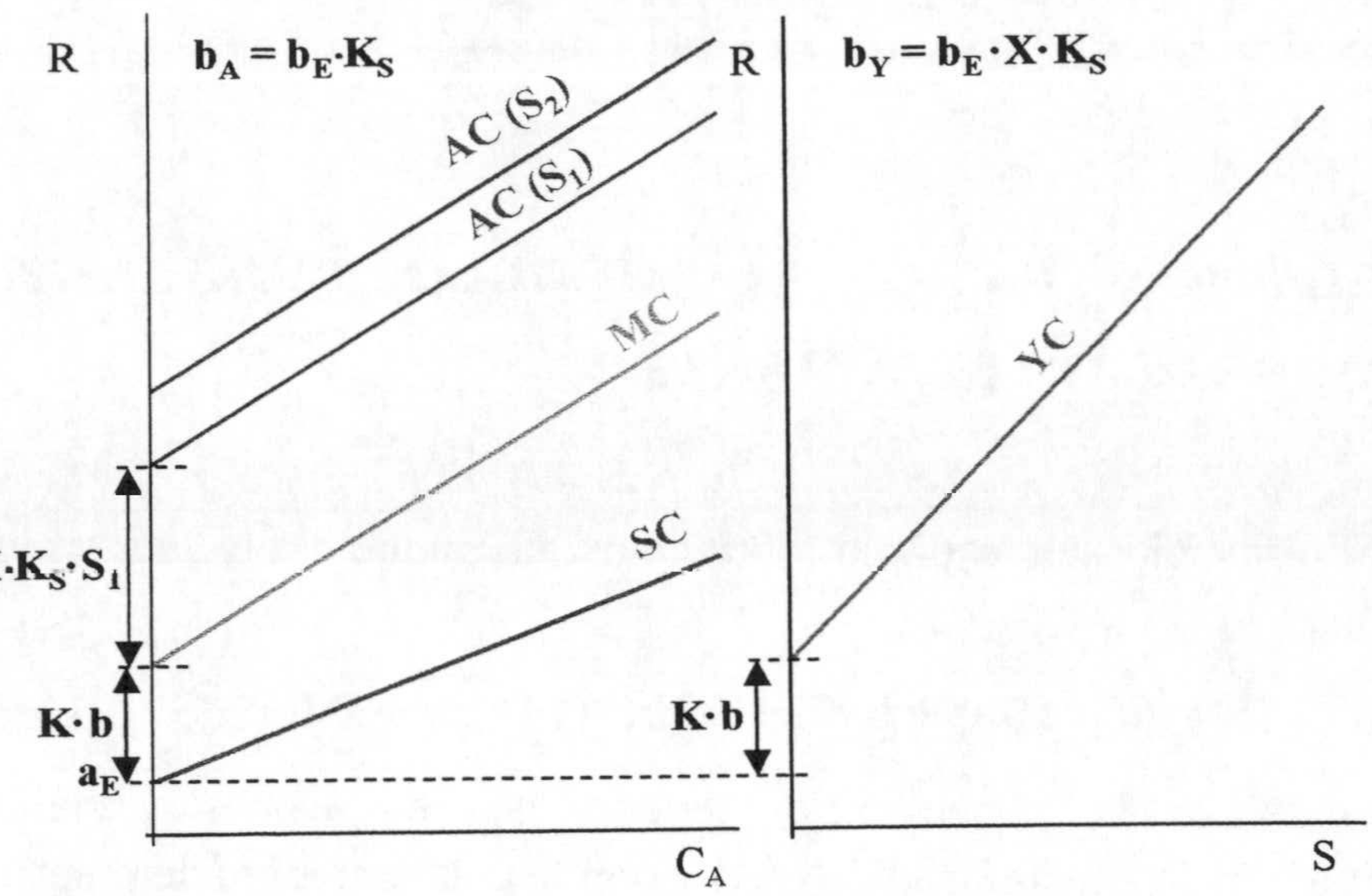


Figura VIII.6

Relación entre los calibrados EC, MC, AC y YC en el CASO D.2 (Combinación de errores sistemáticos constante y proporcionales saturados)

El contenido de analito en una muestra, X, se obtiene, como en el CASO B de la combinación de los calibrados AC, YC y EC o bien, mediante el cociente de las pendientes de los calibrados YC y EC.

Tabla VIII.6

Ecuaciones correspondientes a los calibrados EC, MC, AC y YC en presencia de las componentes constantes y proporcionales saturadas de error sistemático

Calibrado	Modelo	Término independiente	Pendiente
EC	$R = a + b \cdot C_A$	$a_E = a$	$b_E = b$
MC	$R = (a + K \cdot b) + b \cdot S_F \cdot C_A$	$a_M = a + K \cdot b$	$b_M = b \cdot K_S$
AC	$R = (a + K \cdot b + b \cdot X \cdot S_F \cdot S) + + b \cdot S_F \cdot C_A$	$a_A = a + K \cdot b + + b \cdot X \cdot K_S \cdot S$	$b_A = b \cdot K_S$
YC	$R = (a + K \cdot b) + b \cdot X \cdot S_F \cdot S$	$a_Y = a + K \cdot b$	$b_Y = b \cdot X \cdot K_S$

5. RELACIÓN ENTRE EL MODELO BIVARIANTE Y LA CALIBRACIÓN BIVARIANTE

Al principio del capítulo obtuvimos un modelo bivariante que seguía la ecuación:

$$\mathbf{R = (a + K \cdot b) + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot S\ (1 + P \cdot S) + P \cdot b \cdot C_A \cdot S} \qquad \text{(VIII-23)}$$

que representa la dependencia general de la respuesta analítica con la concentración de analito añadida (C_A) y con la concentración de muestra (S).

La calibración multivariante proporciona una herramienta que permite, al mismo tiempo, modelar el sistema analito-muestra, diagnosticar el tipo de error sistemático presente y cuantificar el contenido de analito en una muestra. Si consideramos el modelo anterior (una variable respuesta y dos variables predictoras C_A y S), el modelo matemático bivariante cuadrático más complejo que se puede obtener viene dado por la expresión:

$$R = b_0 + b_1 \cdot C_A + b_2 \cdot C_A^2 + b_3 \cdot S + b_4 \cdot S^2 + b_5 \cdot C_A \cdot S \qquad \text{(VIII-24)}$$

donde b_i son los coeficientes de regresión y C_A y S son las concentraciones de analito añadida y de muestra. Sin embargo, partimos de la base de que en ausencia de muestra el analito añadido tiene un comportamiento lineal en todo el rango de

concentraciones estudiado, por lo que a partir de ahora no consideraremos el término cuadrático en C_A. Así el modelo matemático bivariante viene dado por la expresión:

$$R = b_0 + b_1 \cdot C_A + b_2 \cdot S + b_3 \cdot S^2 + b_4 \cdot C_A \cdot S \qquad \text{(VIII-25)}$$

y representa la superficie de respuesta del sistema analito-muestra, es decir el perfil de la variable respuesta en función de las variables predictoras. La combinación de la calibración multivariante con el diseño experimental se conoce como Metodología de Superficie de Respuesta y es la metodología que utilizaremos para diagnosticar el tipo de error presente y cuantificar el contenido de analito en la muestra.

Dado la semejanza entre las ecuaciones VIII-23 y VIII-25, podemos identificar los términos o coeficentes de regresión con los obtenidos originalmente con el modelo bivariante, así obtenemos:

$$b_0 = a + K \cdot b; \quad b_1 = b; \quad b_2 = b \cdot X; \quad b_3 = b \cdot X \cdot P; \quad b_4 = P \cdot b \qquad \text{(VIII-26)}$$

En este caso, a diferencia de la metodología propuesta con calibrados univariantes, no es posible calcular la componente constante (K) de error sistemático y por tanto determinar la presencia de errores sistemáticos constantes pues sólo se dispone de una ecuación y el término independiente b_0 depende de tres parámetros (a, K y b) de los cuales dos no aparecen en ningún otro coeficiente. Sin embargo, generalemente, en el proceso de validación del método analítico, se establece un calibrado con patrón externo (EC) que se puede utilizar para cuantificar esta componente:

$$K = \frac{b_0 - a}{b} = \frac{b_0 - a}{b_1} \qquad \text{(VIII-27)}$$

siendo el coeficiente a el término independiente del calibrado con patrón externo (Ecuación VIII-6)

El factor de proporcionalidad (P) se puede calcular a partir del cociente de dos de los parámetros de la ecuación:

$$P = \frac{b_3}{b_2} = \frac{b_4}{b_1} \qquad \text{(VIII-28)}$$

Al establecer el calibrado bivariante, debemos evaluar qué coeficientes dados por el modelo global (Ecuación VIII-25) son realmente significativos. Así dependiendo de la presencia o ausencia de la componente proporcional (saturado o no) de error sistemático y sin tener en cuenta la presencia de la componente constante de error sistemático, puesto que no influye en la cuantificación del contenido de analito, podemos particularizar la ecuación general en tres casos, cuyo modelo y coeficientes se presentan en la Tabla VIII.7:

- *CASO B.* Ausencia de error sistemático proporcional (P = 0).
- *CASO D.1.* Componente de error proporcional no saturada en el intervalo de aplicación.
- *CASO D.2.* Componente de error proporcional saturada en el intervalo de aplicación ($K_S = 1+P\cdot S$ = cte.).

La nomenclatura utilizada se deriva de la correspondiente para los calibrados univariantes.

Tabla VIII.7

Modelos bivariantes y coeficientes de regresión

Casos	Modelo	Coeficientes
B	$R = a + K\cdot b + b\cdot C_A + b\cdot X\cdot S$	$b_0 = a + K\cdot b$ $b_1 = b$ $b_2 = b\cdot X$
D.1	$R = a + K\cdot b + b\cdot C_A + b\cdot X\cdot S +$ $+ b\cdot X\cdot P\cdot S^2 + P\cdot b\cdot C_A\cdot S$	$b_0 = a + K\cdot b$ $b_1 = b$ $b_2 = b\cdot X$ $b_3 = b\cdot X\cdot P$ $b_4 = P\cdot b$
D.2	$R = a + K\cdot b + b\cdot C_A + b\cdot X\cdot K_S\cdot S +$ $+ P\cdot b\cdot C_A\cdot S$	$b_0 = a + K\cdot b$ $b_1 = b$ $b_2 = b\cdot X\cdot K_S$ $b_4 = P\cdot b$

6. HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

Las herramientas estadísticas necesarias para llevar a cabo las metodologías propuestas son muy pocas y fáciles de aplicar:

☞ En el caso de los calibrados univariantes será necesario en primer lugar una comprobación de la linealidad del calibrado de Youden, y a continuación, previa comprobación de la homogeneidad de las varianzas (ver apartado de herramientas estadísticas en capítulo V) será necesario comparar estadísticamente las pendientes de los calibrados EC y AC o MC.

☞ En el caso de la calibración bivariante tan sólo será necesario comprobar qué coeficientes son significativos, hecho que se pone de manifiesto mediante el test de Snedecor (ver apartado de herramientas estadísticas en capítulo V).

6.1. Comprobación de la linealidad

Cuando se establece un calibrado, por ejemplo el calibrado de Youden, que es el que podría presentar curvatura, los datos experimentales se pueden ajustar a una linea recta mediante LSR (ecuación VIII-13) o a una parábola mediante LSPR (ecuación VIII-14). Existen diversas formas de comprobar la linealidad de un calibrado, entre los que podemos considerar el *test de linealidad* y el *análisis de los residuos*[32].

6.1.1. Test de linealidad

El test de linealidad se basa en comparar los resultados obtenidos cuando se aplica a los datos disponibles una regresión polinómica de grado dos, con los correspondientes a la regresión lineal. Existen tres versiones del mencionado test:

32. Miller J.N., *Analyst*, 116, 3-14, 1991.

Test de linealidad de MANDEL (recomendado por ISO) [33]. El estadístico experimental que se calcula tiene la forma siguiente:

$$F_{exp} = \frac{(n-2)\cdot s_{res(LIN)}{}^2 - (n-3)\cdot s_{res(POL)}{}^2}{s_{res(POL)}{}^2} \qquad \text{(VIII-29)}$$

donde n es el número de datos experimentales, y $s_{res(LIN)}{}^2$ y $s_{res(LIN)}{}^2$ son las varianzas residuales asociadas a los calibrados lineal y polinómico respectivamente. Éste estadístico se compara con un valor tabulado para un nivel de confianza α y con 1 y n – 3 grados de libertad (Tablas 2, 3 y 4 del Anexo D).

Test absoluto de linealidad o "a priori". El estadístico experimental, ahora se calcula como:

$$F_{exp} = \frac{s_{res(LIN)}{}^2}{s_{respuesta}{}^2} \quad ; \quad s_{respuesta}{}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{m_i}(y_{ij} - \overline{y}_i)^2}{n-p} \qquad \text{(VIII-30)}$$

donde m_i es el número de observaciones en cada punto de calibración p. Este valor se compara con un valor de la distribución F para un nivel de confianza α y con n – 2 y n – p grados de libertad (Tablas 2, 3 y 4 del Anexo D).

Test de linealidad o "a posteriori" (recomendado por IUPAC)[34]. El estadístico experimental, ahora se calcula como:

$$F_{exp} = \frac{s_{res(LIN)}{}^2}{s_{res(POL)}{}^2} \qquad \text{(VIII-31)}$$

que se compara con un valor de la distribución de F para un nivel de confianza α y con n–2 y n – 3 grados de libertad (Tablas 2, 3 y 4 del Anexo D).

---

33. ISO 8466-1: *Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the lineal calibration function*, ISO, Geneve, 1990.
34. *Guideline for calibration in analytical chemistry – Part 1: Fundamental on simple component calibration*, IUPAC recommendation elaborated for Danzer K. and Curry L.A., *Pure Appl. Chem.*, 70, 993-1014, 1998.

6.2. Análisis gráfico de los residuos

Los residuos representan una medida del error aleatorio experimental de la respuesta si el modelo estadístico seleccionado es correcto y son calculados como la diferencia entre el valor estimado por el modelo y el valor medido ($e_i = \hat{R}_i - R_i$). Para comprobar la linealidad, se pueden aplicar tests estadísticos[35] a los residuos, pero en análisis de rutina es a veces suficiente una representación de los residuos frente al valor predicho o frente a la variable independiente. En la práctica, se asume que los residuos tienen una distribución normal, por lo que sí el modelo (lineal o polinómico) ha sido seleccionado correctamente, la nube de puntos de los residuos deben estar distribuidos aleatoriamente alrededor de la línea cero (Figura VIII.7A). La figura VIII.7B y C indican la forma que adptarán los residuos si el modelo no es correcto. El primer caso, la nube de puntos muestra una tendencia a ser más ancha (mayor varianza) a valores bajos de la variable independiente que a valores altos por lo que sería indicativo de heterocodasticidad siendo la regresión lineal por mínimos cuadrados ponderados el modelo a aplicar. En el segundo caso, los residuos muestran de forma más acusada la curvatura de los datos por lo que la regresión polinómica es, en este caso, las más adecuadas.

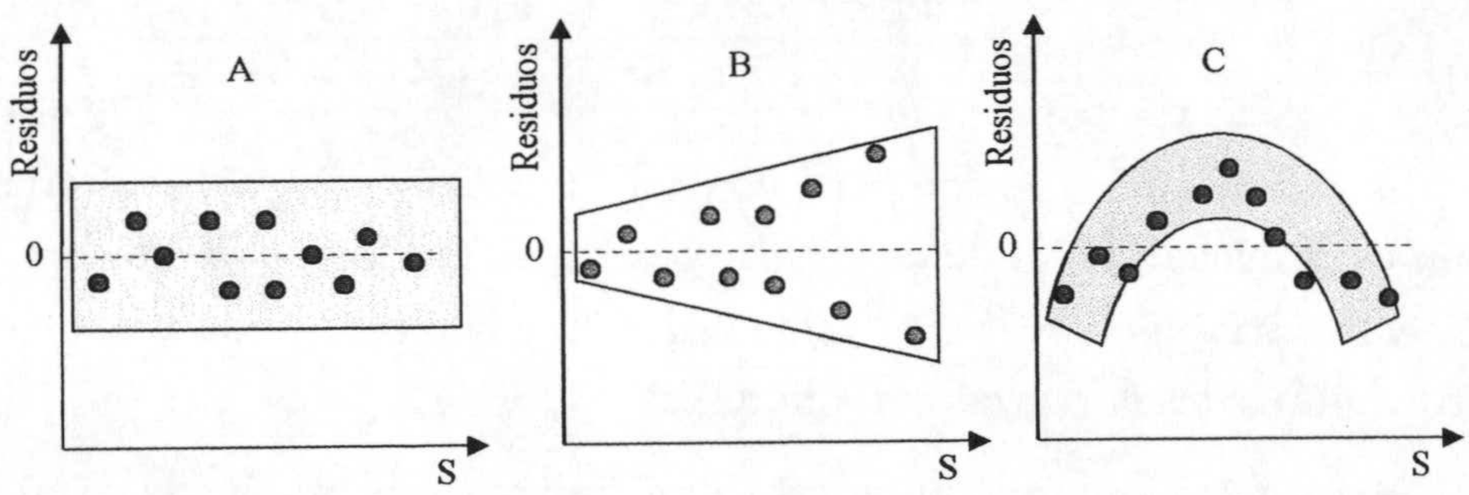


Figura VIII.7

Análisis de residuos, A) Modelo LSR correcto, B) indicios de heterocedasticidad y C) indicios de curvatura

35. Draper N.R., *Applied regression analysis*, Wiley, New York, 2nd Ed., 1981.

6.2. Comparación de las pendientes

Para comparar las pendientes se aplica el convencional test t-Student[36] y el estadístico que se calcula depende de que las varianzas de los calibrados sean iguales o no. Siendo:

$$\textit{Varianzas Igurales:}\quad t_{exp} = \frac{|b_1 - b_2|}{s_{pooled}\sqrt{\frac{1}{(Q_{C^2})_1} + \frac{1}{(Q_{C^2})_2}}} \qquad \text{(VIII-32)}$$

$$\textit{Varianzas Diferentes:}\quad t_{exp} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\left(\frac{s_{res}{}^2}{Q_{C^2}}\right)_1 + \left(\frac{s_{res}{}^2}{Q_{C^2}}\right)_2}} \qquad \text{(VIII-33)}$$

donde b es la pendiente de los calibrados a comparar, Q_{C^2} es la suma de cuadrados corregida de la variable predictora, s_{res} es la desviación estándar del correspondiente calibrado y s_{pooled} es la desviación estándar promedio calculada como:

$$s_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)\cdot(s_{res}{}^2)_1 + (n_2 - 2)\cdot(s_{res}{}^2)_2}{n_1 + n_2 - 4}} \qquad \text{(VIII-34)}$$

Éste estadístico se compara con uno tabulado (Tabla 5 del Anexo A10) para un determinado nivel de confianza y para los grados de libertad: $n_1 + n_2 - 4$ si las varianzas iguales o ν (calculados mediante la ecuación de Welch-Satterthwaite) si las varianzas son diferentes.

Si las pendientes no difieren significativamente, se puede establecer una pendiente promedio, b_{pooled} como:

$$b_{pooled} = \frac{(Q_{RC})_1 + (Q_{RC})_2}{(Q_{C^2})_1 + (Q_{C^2})_2} \qquad \text{(VIII-35)}$$

donde Q_{RC} es la suma corregida de productos cruzados de R y C.

---

36. Martín Andrés, A. and Luna del Castillo, J.D., *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*, Ediciones Norma, S.A., Madrid, Spain, 4ª Ed., 1994.

7. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE ANALITO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE ERROR SISTEMÁTICO

La expresión para el modelo teórico bivariante está condicionada por la presencia y tipo de errores sistemáticos en la determinación para ajustar la situación experimental a cada tipo de muestra. En general, a partir de los parámetros de los calibrados EC, MC, AC o YC, es posible obtener el contenido de analito en una muestra (X) siguiendo tres metodologías diferentes:

- ✓ Método de adición de patrón (MOSA), donde se utiliza el calibrado de adición de patrón (AC) o el calibrado en blanco matriz (MC)
- ✓ Método del cociente de pendientes (MOSR) con calibrados univariantes, donde se utiliza el calibrado de Youden (YC)
- ✓ Método del cociente de pendientes (MOSR) utilizando diseño experimental

7.1. Método de adición de patrón

Tradicionalmente, la forma más habitual de aplicar la metodología de adición de patrón (MOSA) para obtener el contenido de analito en una muestra es aplicando la ecuación:

$$X = \frac{a_A}{b_A} \cdot \frac{1}{S} \qquad \text{(VIII-36)}$$

Pero, tanto si se ha llevado a cabo una corrección del blanco del sistema sobre las respuestas experimentales, con anterioridad al análisis de los datos por regresión, como si no se ha realizado, ésta ecuación es errónea pues no se tiene en cuenta la presencia de errores sistemáticos constantes, dando por supuesto que son nulos.

La forma correcta de obtener el contenido de analito en una muestra es a partir del término independiente del calibrado AC (a_A, Ecuación VIII-11) teniendo en cuenta el Blanco Total de Youden (TYB, Ecuación VIII-15):

$$X = \frac{a_A - a_Y}{b_A} \cdot \frac{1}{S} \qquad \text{(VIII-37)}$$

Esta expresión implica el establecimiento del correspondiente calibrado de Youden. Este valor de X corresponde al corte con el eje de abscisas del calibrado AC corregido con el Blanco Total de Youden (TYB). Esta corrección del blanco es necesaria independientemente de la existencia de la componente proporcional de error sistemático, y si no se lleva a cabo, los resultados obtenidos estarán sesgados en un valor equivalente a YB/b_A unidades de concentración de analito en la disolución.

La corrección también será necesaria cuando los términos independientes de las curvas YC y EC sean iguales ($a_Y = a$), por ejemplo si la componente constante de error sistemático es nula (K = 0) (Tabla VIII-1, VIII-3 y VIII-4), pero la confirmación de esta condición debe ser verificada utilizando las técnicas estadísticas apropiadas[18,19]. Así, la ecuación VIII-37 puede escribirse de la forma:

$$X = \frac{a_A - a}{b_A} \cdot \frac{1}{S} \qquad \text{(VIII-38)}$$

7.2. Método del cociente de pendientes a partir de calibración univariante

Una forma equivalente de calcular el contenido de analito, X, es mediante el cociente de las pendientes de los calibrados YC y EC o YC y AC dependiendo de que la componente de error proporcional está o no saturada, e independientemente de la presencia de la componente de error constante. Éste método constituye la base del llamado **Método del cociente de pendientes**[17,29] **(MOSR).**

En los CASOS A (ausencia de errores sitemáticos, Tabla VIII.1), B (presencia de la componente constante de error sistemático, Tabla VIII.2), C.1 (presencia de la componente proporcional no saturada de error sistemático, Tabla VIII.3) y D.1 (combinación de errores sistemáticos constantes y proporcionales no saturados, Tabla VIII.5), combinando las ecuaciones de los calibrados YC y AC se obtiene que del cociente de las pendientes de estos dos calibrados (término

lineal del calibrado YC en los CASOS C.1 y D.1), el contenido de analito, X, viene dado por la expresión:

$$X = \frac{b_Y}{b_E} \qquad \text{(VIII-39)}$$

Cuando la componente proporcional de error sistemático está saturada, como en el CASO C.2 (presencia de la componente proporcional saturada de errores sistemático, Tabla VIII.4) y D.2 (combinación de errores constantes y proporcionales saturados, Tabla VIII.6), combinando las pendientes de los calibrados YC y AC o YC y MC se obtiene la expresión:

$$X = \frac{b_Y}{b_A} \qquad \text{(VIII-40)}$$

7.3. Método del cociente de pendientes a partir de calibración bivariante

La expresión para el modelo teórico bivariante está condicionada por la presencia del error sistemático proporcional. En los CASOS B (ausencia de errores sistemáticos proporcionales) y D.1 (componente de error proporcional no saturada en el intervalo de aplicación), es posible obtener el contenido de analito en la muestra (X) utilizando el método del cociente de pendientes (MORS):

$$X = \frac{b_2}{b_1} \qquad \text{(VIII-41)}$$

Pero cuando la componente de error proporcional se satura (caso D.2, tabla VIII.7), es necesario conocer el Factor de Saturación ($K_S = 1 + P \cdot S$), pues el contenido de analito en la muestra se calcula a partir de la expresión:

$$X = \frac{b_2}{b_1 \cdot K_S} \qquad \text{(VIII-42)}$$

Al igual que sucedía con la componente constante de error sistemático, K_S no se puede determinar con sólo una ecuación.

En el apartado 4.4.2 obtuvimos los coeficientes de regresión para los modelos univariantes cuando existían errores proporcionales saturados (Tabla VIII.6) y vemos que la pendiente del calibrado AC o MC proporciona el producto de $b_A = b_M = b \cdot K_S$. Así, dividiendo éste valor por el coeficiente $b_1 = b$ de nuestro modelo obtenemos el Factor de Proporcionalidad. Por lo tanto el contenido de analito en la muestra se puede calcular de la expresión:

$$X = \frac{b_2}{b_1 \cdot K_S} = \frac{b_2}{b_1 \cdot \frac{b_A}{b_1}} = \frac{b_2}{b_A} \qquad \text{(VIII-43)}$$

Para establecer éste nuevo calibrado AC, podemos actuar de dos formas:

1. Obtener nuevos datos experimentales y mediante LSR obtener el valor de la pendiente
2. Utilizar el diseño experimental para extraer los datos necesarios para establecer el calibrado AC y mediante LSR obtener el valor de la pendiente

Por consiguiente, la metodología del cociente de pendientes utilizando diseño experimental proporciona el contenido de analito en muestras reales en análisis de rutina de una manera directa, con muy pocas experiencias y sin necesidad de conocer a priori el tipo del error sistemático. Con esta metodología no se detectan los errores sistemáticos constantes debidos a la interacción matriz-analito, pero este hecho no afecta al resultado obtenido.

8. INCERTIDUMBRE ASOCIADA AL CONTENIDO DE ANALITO

En general, el intervalo de confianza (CI) en el resultado de un análisis (X) se puede calcular a partir de la incertidumbre asociada a la estimación de este resultado (u_X), aplicando:

$$CI = X \pm k \cdot u_X \qquad \text{(VIII-44)}$$

donde k es el factor de cobertura[37] (Tabla 1 del Anexo D) con ν grados de libertad obteniendo un intervalo de confianza simétrico con respecto al valor de la estimación. Sin embargo, esta simple ecuación no es de aplicación general, sino que requiere que las estimaciones se obtengan directamente de medidas experimentales con distribución normal.

Por consiguiente, cuando la estimación se obtiene indirectamente del cociente de parámetros normales, los intervalos de confianza no son simétricos respecto de su valor (intervalos laterales con extensión diferente) y el cálculo de éste está basado en la aplicación del *teorema de Fieller*[38,39]. Desde este punto de vista, el CI se define calculando los valores superior e inferior sobre un valor central que no coincide con el valor estimado.

En el caso del cálculo del contenido de analito en el análisis de una muestra, con la metodología clásica (MOSA) o con el nuevo método (MOSR), el intervalo obtenido no es simétrico con respecto al valor estimados, pues éste valor, en ambos caso, se obtiene de un cociente de parámetros de regresión y este cociente no tiene una distribución normal.

8.1 Método de adición de patrón

Existen varios artículos que discuten el cálculo de la incertidumbre asociada al resultado analítico cuando se utiliza MOSA en su forma clásica[8-11].

Si el valor de $a_Y = 0$ (Ecuación VIII-38), porque tanto el blanco del sistema (SB) como el blanco de Youden (YB) son cero o porque se realiza una corrección del blanco antes del análisis por regresión, el CI viene dado por la ecuación:

$$x_L, x_U = \left[\frac{a_A/b_A + \overline{C}_A}{1-g_A} - \overline{C}_A \pm \frac{k \cdot s_A}{b_A\,(1-g_A)} \sqrt{\frac{1-g_A}{n_A} + \frac{\overline{R}_A{}^2}{b_A^2 (Q_{c2})_A}} \right] \frac{1}{S} \quad \text{(VIII-45)}$$

37. ISO, *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, International Standards Organization, Geneva, 1993.
38. Fieller E.C., *J. R. Stat. Soc.*, 7, 1-64, 1940.
39. Finney D.J., *Statistical Methods in Biological Assay*, 3th ed.; Charles Griffin: High Wycombe, Chapter 4, p. 80, 1978.

donde x_L y x_U son los límites inferior y superior del intervalo; $\overline{C}_A$ y $\overline{R}_A$ son los valores medios de las concentraciones y respuestas analíticas utilizadas en el calibrado AC; s_A es la desviación estándar residual asociada al calibrado AC; n_A es el número de datos experimentales de AC; k es el factor de cobertura con $n_A - 2$ grados de libertad y g_A y $(Q_{c^2})_A$ son funciones estadísticas dadas por:

$$g_A = \frac{k^2 \cdot s_A^2}{b_A^2 \cdot Q_{C^2}} \qquad \left(Q_{C2}\right)_A = \sum \left(C_{A,i} - \overline{C}_A\right)^2 \qquad \text{(VIII-46)}$$

donde $C_{A,i}$ son cada una de las concentraciones en AC y el resto de parámetros son ya conocidos.

Podemos verificar que el valor central del intervalo no coincide con el contenido estimado de analito. Gráficamente este hecho es fácil de justificar recordando que los extremos del intervalo de confianza calculado, coinciden con el corte de las hipérbolas, que representan las bandas de confianza de AC, con el eje de concentraciones. Puesto que este eje no es ortogonal a la curva de calibrado, las distancias de estos valores al punto de intersección de AC con el eje son diferentes y ellos son los que definen el intervalo de confianza asimétrico.

La función g_A es una medida de la asimetría de la distribución del valor estimado (X) y depende de la linealidad "on-line"[40] del calibrado AC, por lo tato ésta función adopta la expresión:

$$g_A = k^2 \cdot RSD^2(b_A) \qquad \text{(VIII-47)}$$

donde $RSD(b_A) = b_A/s_{bA}$ es la desviación estándar asociada a la pendiente de AC.

Cuando g_A toma valores pequeños ($g_A < 0{,}05$), la ecuación anterior se puede simplificar en:

$$x_L, x_U = \left[\frac{a_A}{b_A} \pm \frac{k \cdot s_A}{b_A}\sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{\overline{R}_A^2}{b_A^2 (Q_{C2})_A}}\right]\frac{1}{S} \qquad \text{(VIII-48)}$$

Esta ecuación tiene una distribución simétrica con respecto al valor estimado ($x = a_A/b_A \cdot 1/S$). En este caso, cuando $g_A < 0{,}05$, las bandas de confianza

40. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M. and Bosque Sendra J.M., *Anal. Lett.*, 29, 1231-1239, 1996.

muestran una curvatura muy pequeña y, en una primera aproximación, pueden considerarse como paralelas a la curva de calibrado proporcionando un intervalo de confianza simétrico. En éste ecuación, el término que multiplica al factor de cobertura (k) representa la incertidumbre asociada al valor estimado (u_X) coincidiendo con el que se obtiene aplicando la regresión lineal por mínimos cuadrados (LSR) y corresponde a la desviación estándar asociada a la concentración (s_C/S) cuando la respuesta analítica es cero (R = 0).

En el caso general, cuando MOSA es aplicada correctamente (ecuación VIII-37), el uso del teorema de Fieller para calcular el intervalo de confianza es excesivamente tedioso. No obstante, se puede simplificarse si tenemos una estimación de a_Y suficientemente precisa, por ejemplo considerando que $s_Y << s_A$ (s_Y, desviación estándar residual de YC). Esto implica suponer que la diferencia ($a_A - a_Y$) tiene una desviación estándar que es sólo función de s_A y, dado que esto no es de fácil obtención, el resultado obtenido debe ser considerado como aproximado.

En este caso, el CI asociado al contenido de analito viene dado por:

$$x_L, x_U = \left(\frac{\frac{a_A - a_Y}{b_A} + \overline{C}_A}{1 - g_A} - \overline{C}_A \pm \frac{k \cdot s_A}{b_A (1 - g_A)} \sqrt{\frac{1 - g_A}{n_A} + \frac{\overline{R}_A{}^2}{b_A^2 (Q_{C^2})_A}} \right) \frac{1}{S} \quad \text{(VIII-49)}$$

Al igual que antes si g_A toma valores pequeños ($g_A < 0{,}05$), la ecuación se puede simplificar en:

$$x_L, x_U = \left[\frac{a_A - a_Y}{b_A} \pm \frac{k \cdot s_A}{b_A} \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{\overline{R}_A^2}{b_A^2 (Q_{C^2})_A}} \right] \frac{1}{S} \quad \text{(VIII-50)}$$

8.2. Método del cociente de pendientes a partir de calibración univariante

La aplicación del teorema de Fieller, para el cálculo del intervalo de confianza asociado al contenido del analito, calculado de la ecuación VIII-39, depende de que las curvas EC y YC tengan una varianza residual igual o diferente.

La homogeneidad de variaciones es comprobada aplicando el test Snedecor (distribución F de Fisher) y el resultado proporcionará dos opciones para el cálculo del intervalo de confianza[39]. El estadístico aplicado con ν_E y ν_Y grados de libertad:

$$F_{exp} = \frac{s_E^2}{s_Y^2} \qquad \left(s_E^2 > s_Y^2\right) \tag{VIII-51}$$

8.2.1. Varianzas homogéneas

En este caso, es posible obtener una varianza promedio de regresión (s_{pooled}) usando la expresión[41]:

$$s_{pooled} = \sqrt{\frac{\nu_Y \cdot {s_Y}^2 + \nu_E \cdot {s_E}^2}{\nu_Y + \nu_E}} \tag{VIII-52}$$

donde ν_Y y ν_E son los grados de libertad con YC y EC respectivamente. El intervalo de confianza del cociente de pendientes se obtiene de la expresión:

$$x_L, x_U = \frac{b_Y / b_E}{1 - g_E} \pm \frac{k \cdot s_{pooled}}{b_E (1 - g_E)} \sqrt{\frac{1 - g_E}{(Q_{C^2})_Y} + \frac{(b_Y / b_E)^2}{(Q_{C^2})_E}} \tag{VIII-53}$$

donde todos los términos son ya conocidos.

De forma similar, cuando la función g_A tiene un valor menor de 0,05, puede hacerse la aproximación $1 - g_A >> 1$, obteniendo la expresión simplificada:

$$x_L, x_U = \frac{b_Y}{b_E} \pm \frac{k \cdot s_{pooled}}{b_E} \sqrt{\frac{1}{(Q_{C^2})_Y} + \frac{(b_Y / b_E)^2}{(Q_{C^2})_E}} \tag{VIII-54}$$

donde, el término que multiplica al factor de cobertura se puede considerar la incertidumbre asociada al valor estimado (u_X).

41. Carter K.N., Scott D.M., Salmon J.K. and Zarcone G.S., *Anal. Chem.*, 63, 1270-1278, 1991.

8.2.2. Varianzas heterogéneas

Si en el test de Snedecord se concluye que existe diferencia significativa entre las variaciones residuales de YC y EC, la expresión del intervalo de confianza del cociente de pendientes viene dado por la expresión:

$$x_L, x_U = \frac{b_Y/b_E}{1-g_E} \pm \frac{k}{b_E(1-g_E)} \sqrt{(1-g_E)\cdot s_{b_Y}^2 + \left(\frac{b_Y}{b_E}\right)^2 s_{b_E}^2} \qquad \text{(VIII-55)}$$

donde el factor de cobertura (k) se utiliza con los grados de libertad (ν_{pooled}) promedio estimados por medio de la ecuación de Welch-Satterthwaite [42,43]:

$$\nu_{pooled} = \frac{(s_Y^2/n_Y + s_E^2/n_E)^2}{\frac{(s_Y{}^2/n_Y)^2}{\nu_Y} + \frac{(s_E{}^2/n_E)^2}{\nu_E}} \qquad \text{(VIII-56)}$$

De nuevo, si $g_E < 0{,}05$ se obtiene una expresión aproximada siendo el término que multiplica al factor de cobertura la incertidumbre asociada al resultado (u_X):

$$x_L, x_U = \frac{b_Y}{b_E} \pm \frac{k}{b_E} \sqrt{s_{b_Y}^2 + \left(\frac{b_Y}{b_E}\right)^2 s_{b_E}^2} \qquad \text{(VIII-57)}$$

En caso de que el componente de error proporcional no esté saturada (CASO C.1 y D.1), la discusión anterior es igualmente válida sólo habrá que sustituir los parámetros de EC por los de AC o MC.

8.3. Método del cociente de pendientes a partir de calibración bivariante

Como en los casos anteriores, la incertidumbre puede calcularse aplicando el teorema de Fieller al cociente de dos parámetros de regresión que provienen del mismo modelo (Ecuación VIII-41, $X = b_2/b_1$). Por lo tanto al aplicar el teorema de

42. Satterthwaite F.E., *Biom. Bull.*, 2, 110-115, 1946.
43. Welch B.L., *Biometrika*, 34, 28-35, 1947.

Fieller se obtienen los límites superior (X_U) e inferior (X_L) del contenido de analito en la muestra:

$$X_L, X_U = \frac{1}{1-g}\cdot\left[X - \frac{g\cdot cov(b_2,b_1)}{s_{b_1}{}^2} \pm \right.$$
$$\left. \pm \frac{k}{b_1}\left\{ s_{b_2}{}^2 - 2X\cdot cov(b_2,b_1) + X^2 s_{b_1}{}^2 - g\left(s_{b_2}{}^2 - \frac{cov^2(b_2,b_1)}{s_{b_1}{}^2}\right)\right\}^{1/2}\right] \quad \text{(VIII-58)}$$

donde $s_{b1}{}^2$, $s_{b2}{}^2$ y $cov(b_2,b_1)$ son las varianzas asociadas a los coeficientes b_2 y b_1 y su covarianza respectivamente, k es el factor de cobertura con ν grados de libertad y la función g es función de:

$$g_{b1} = k^2 \cdot RSD^2(b_1) \quad \text{(VIII-59)}$$

donde $RSD(b_1) = b_1/s_{b1}$ es la desviación estándar asociada al coeficiente de regresión b_1.

Al igual que en los casos anteriores, cuando g_{b1} toma valores pequeños ($g_{b1} < 0{,}05$), la ecuación se puede simplificar en:

$$X_L, X_U = X \pm k\left(s_{b_2}^2 - 2X\cdot cov(b_2,b_1) + X^2 s_{b_1}^2\right)^{1/2} / b_1 \quad \text{(VIII-60)}$$

siendo el término que multiplica al factor de cobertura la varianza de X:

$$u_X^2 = \frac{1}{b_1{}^2}\left(s_{b_2}^2 - 2X\cdot cov(b_2,b_1) + X^2 s_{b_1}^2\right) \quad \text{(VIII-61)}$$

En el caso de que estén presentes errores proporcionales saturados (ecuación VIII-43), la aplicación del teorema de Fieller es igual que en el apartado 8.2 pues en realidad tenemos dos calibrados y por tanto debemos, previamente, comprobar la homogeneidad de las varianzas para el cálculo de la incertidumbre.

9. PROTOCOLO PROPUESTO PARA LA CUANTIFICACIÓN A PARTIR DE CALIBRACIÓN UNIVARIANTE

El interés de MOSR está basado, fundamentalmente, en simplificar los cálculos necesarios para determinar el contenido de analito en muestras en análisis de rutina, en presencia de errores sistemáticos, una vez verificados, a priori, qué componentes de error están presentes en la determinación en función del tipo de muestra y de la posible interacción matriz-analito. Para ello, recomendamos el siguiente protocolo (Figura VIII.8):

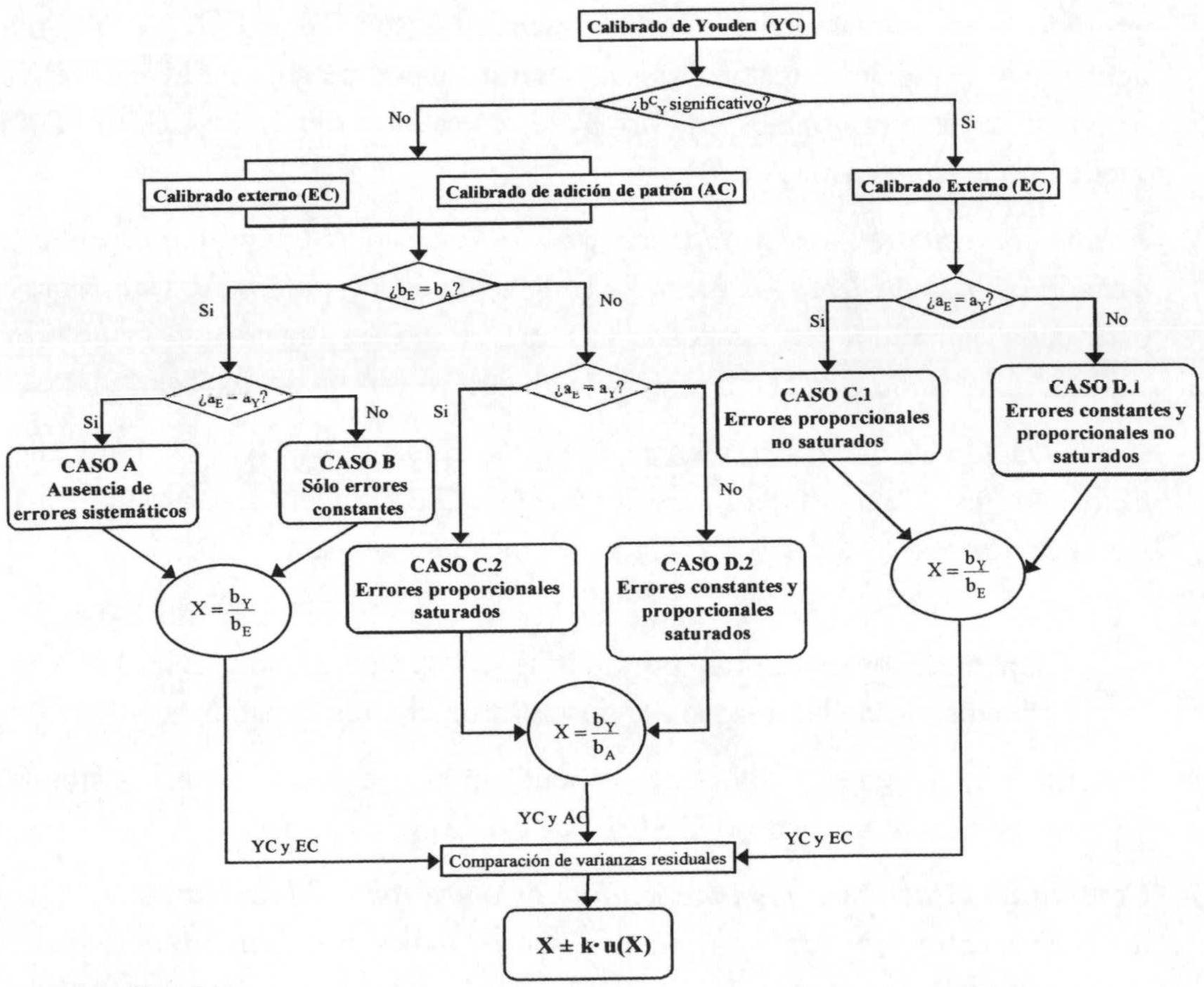


Figura VIII.8

Diagrama de flujo para diagnosticar el tipo de error sistemático presente usando metodología univariante

1. *Establecimiento del calibrado de Youden (YC).* Esta calibración debe realizarse antes de establecer los calibrados AC o MC, ya que nos proporcionará una indicación de la concentración de muestra necesaria para el análisis.

2. *Comprobación de la linealidad del calibrado YC.* Para lo cual es recomendable utilizar al menos dos réplicas de cada concentración de muestra[40], pero también es posible usar otros métodos estadísticos, por ejemplo la evaluación de los residuos o regresión por mínima mediana de cuadrados (LSMR).

   Si el término cuadrático (b^C_Y) es significativo para un 95% de confianza implica que existe una componente de error sistemático proporcionales no saturado y por consiguiente estaríamos en los casos C.1 o D.1. Pero si no es significativo, pueden existir, en la región experimental estudiada, errores sistemáticos proporcionales en forma de error saturado (casos C.2 o D.2) o pueden no existir (casos A o B).

3. *Establecimiento del calibrado con patrón externo (EC) y el calibrado por adición de patrón (AC).* Aplicando LSR obtener los parámetros de regresión para cada calibrado. En los casos C.1 o D.1, no será necesario establecer el calibrado AC dado que el contenido de analito se estima del calibrado EC.

4. *Comparación de pendientes entre los calibrados EC y AC*[18,36]. Para ello se utiliza el test de t-Student. La hipótesis nula se acepta para un nivel de significación mayor del 1% provocando dos situaciones:

   - ❇ Si las rectas son paralelas (pendientes similares), no existe error sistemático proporcional por lo que estaremos en los CASOS A o B, dependiendo de la presencia o ausencia de errores constantes

   - ❇ Si tienen diferentes pendientes, existe error sistemático proporcional saturado (CASOS C.2 o D.2).

5. *Comparación de términos independientes entre los calibrados EC y YC.* Una diferencia entre los términos independientes indica una componente de error sistemático constante debido al efecto matriz. Dado que ambos términos se obtienen de variables independientes diferentes (C_E para EC y S para YC), no es posible establecer un test de comparación. Sin embargo, estableciendo los intervalos de confianza para los términos independientes a_E y a_Y para un nivel

de confianza del 95% y verificando que éstos no se solapan, comprobaremos que existe diferencia significativa entre ambos términos y por consiguiente error sistemático constante:

$$\left.\begin{array}{rcl} a_Y + t(5\%, f_Y)\cdot s(a_y) & \in & a_S \pm t(5\%, f_S)\cdot s(a_S) \\ a_Y - t(5\%, f_Y)\cdot s(a_y) & \in & a_S \pm t(5\%, f_S)\cdot s(a_S) \end{array}\right\} \nexists \text{ error sistemático constante}$$

o

$$\left.\begin{array}{rcl} a_Y + t(5\%, f_Y)\cdot s(a_y) & \notin & a_S \pm t(5\%, f_S)\cdot s(a_S) \\ a_Y - t(5\%, f_Y)\cdot s(a_y) & \notin & a_S \pm t(5\%, f_S)\cdot s(a_S) \end{array}\right\} \exists \text{ error sistemático error.}$$

En caso de que exista error sistemático constante, se calcula el Blanco de Youden: $YB = a_Y - a_E = K \cdot b_E$

6. *Evaluación del tipo de error sistemático.* Se han considerado cuatro casos con sus subdivisiones correspondientes confirmándolos como sigue:

   CASE A $\Rightarrow b_Y{}^C$ no significativo, b_E y b_A similares y a_E y a_Y similares

   CASE B $\Rightarrow b_Y{}^C$ no significativo, b_E y b_A similares y a_E y a_Y diferentes

   CASE C.1 $\Rightarrow b_Y{}^C$ significativo y a_E y a_Y similares

   CASE C.2 $\Rightarrow b_Y{}^C$ no significativo, b_E y b_A diferentes y a_E y a_Y similares

   CASE D.1 $\Rightarrow b_Y{}^C$ significativo y a_E y a_Y diferentes

   CASE D.2 $\Rightarrow b_Y{}^C$ no significativo, b_E y b_A diferentes y a_E y a_Y diferentes

7. *Determinación del contenido de analito en una muestra* mediante el cociente de las pendientes de los correspondientes calibrados, según:

   CASE A, B, C.1 y D.1 $\Rightarrow \quad X = \dfrac{b_Y}{b_E}$

   CASE C.2 y D.2 $\Rightarrow \quad X = \dfrac{b_Y}{b_A}$

8. *Estimación de la incertidumbre asociada al contenido de analito.* El cálculo del intervalo de confianza, basado en la aplicación del teorema de Fieller, depende de que las varianzas de los calibrados EC y YC o AC y YC sean diferentes. La homogeneidad de estas variaciones comprueba aplicando el test de Snedecor.

10. PROTOCOLO PROPUESTO PARA LA CUANTIFICACIÓN A PARTIR DE LA CALIBRACIÓN BIVARIANTE

Para aplicar el método propuesta (MOSR) utilizando calibración bivariante, y determinar el contenido de analito en muestras en análisis de rutina, en presencia de errores sistemáticos (constantes o proporcionales), de una forma sencilla, podemos seguir el siguiente protocolo (Figura VIII.9):

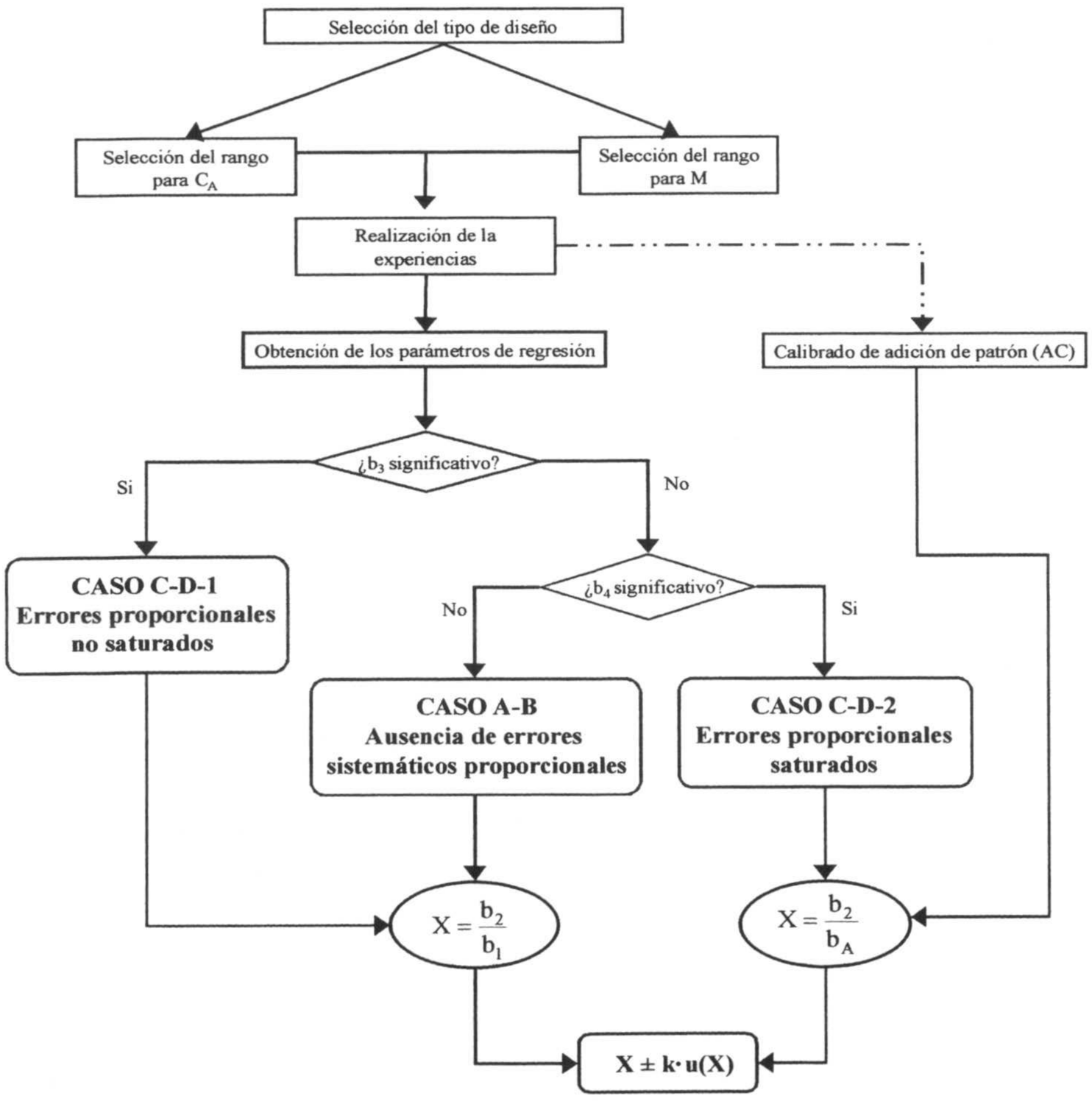


Figura VIII.9

Diagrama de flujo para diagnosticar el tipo de error sistemático presente usando diseño experimental

1. *Selección del tipo de diseño experimental.* Existen muchos tipos de diseños que se puedan aplicar a esta metodología pero preferiblemente se debe seleccionar un diseño ortogonal.
2. *Selección del rango de concentraciones de C_A y M.* Es necesario seleccionar los rangos de concentraciones para el analito añadido y para la muestra. Éstos pueden ser equivalentes a los rangos de concentraciones si se aplicase calibración de patrón externo y adición de patrón. Una vez seleccionados los rangos adecuados, se llevan a cabo las experiencias necesarias, en orden aleatorio, con el diseño experimental seleccionado.
3. *Establecimiento de los parámetros de regresión.* Es muy importante realizar un estudio de la significación de los parámetros, generalmente para un 95% de confianza, pues de ellos deduciremos el tipo de error sistemático proporcional presente en el sistema analito-muestra.
4. *Identificación del tipo de error sistemático proporcional.*
   - Si el coeficiente de regresión b_3 es significativo implica que existen errores sistemáticos proporcionales no saturados ($P \neq 0$ y $K_S \neq$ constante) que corresponde al caso más general (CASO C-D-1).
   - Si los coeficientes de regresión b_3 y b_4 no son significativos, estaremos en el CASO A-B, lo que implica que no existen errores sistemáticos proporcionales ($P = 0$).
   - Si el coeficiente de regresión b_3 no es significativo pero b_4 sí, existen errores sistemáticos proporcionales saturados ($P \neq 0$ y $K_S = 1 + P \cdot S =$ cte).
5. *Establecer un calibrado AC.* Solamente en el CASO C-D-2 será necesario establecer un calibrado AC bien a partir de nuevos datos o bien extraídos del propio diseño experimental.
6. *Determinación del contenido de analito en la muestra.* Una vez detectado la presencia y tipo de error sistemático proporcional se obtiene el contenido de analito mediante el cociente de los parámetros de regresión b_2 y b_1 o b_2 y b_A dependiendo del caso.
7. *Estimación de la incertidumbre asociada al contenido de analito.* El cálculo del intervalo de confianza se realiza aplicando el teorema de Fieller.

11. CONCLUSIONES

La metodología del cociente de pendientes a partir de calibración univariante presenta tres ventajas claras con respecto al tradicional MOSA:

- Cuando existe efecto matriz (constante y/o proporcional saturado), es posible estimar resultados analíticos libres de error estableciendo solamente un calibrado de Youden (YC) para cada muestra, pues el calibrado con patrón externo (EC) es válido para todas las muestras, mientras que la aplicación de MOSA requiere siempre el establecimiento de YC y AC para cada muestra. Por consiguiente, se produce una disminución considerable del trabajo experimental y del tiempo de análisis de cada muestra, factor muy importante en el análisis de rutina.

- Al contrario que en la aplicación de MOSA, es posible utilizar el calibrado con patrón en matriz (MC), cuando la componente proporcional de error sistemática está saturada en el intervalo de aplicación, pues, como ya hemos dicho previamente, siempre las pendientes de los calibrados AC y MC coinciden, pero los términos independientes no y estos son necesarios en el método de adición de patrón.

- La incertidumbre asociada a X es mucho más sencilla de obtener dado que sólo depende de las desviaciones estándar de las pendientes.

Por otro lado, la aplicación de MOSR a partir de calibración bivariente proporciona las mismas ventajas que MORS en cuanto a la simplicidad y rapidez de los cálculos asociados a la estimación del contenido de analito en una muestra, y a la disminución del trabajo experimental necesario para evidenciar las componentes de error sistemático. Sin embargo para cada muestra a analizar será necesario establecer un nuevo diseño experimental aunque el número de experiencias necesarias es pequeño, más grande que con la metodología univariante y en todo caso comparable al número de experiencias necesarias al aplicar MOSA.

Por consiguiente, MOSR en ambas modalidades genera resultados libre del error sistemático debido al efecto matriz y permite una estimación fácil y correcta de la incertidumbre.

Bloque II

ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo IX

APLICACIÓN DE MOSR A LA DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS EN AGUAS A PARTIR DE CALIBRADOS UNIVARIANTES

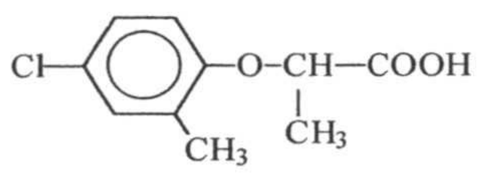
1. ANTECEDENTES

El control de los niveles residuales de substancias químicas usadas en agricultura intensiva, como los plaguicidas y productos antiparásitos en alimentos y muestras medioambientales, constituyen un aspecto prioritario en la regulación internacional. El uso de técnicas de fluorescencia directas, en estos casos, está limitado dado el poco número de estos compuestos que exhiben fluorescencia nativa. Sin embargo, compuestos que no presentan fluorescencia o la presentan débilmente, pueden convertirse en compuestos fluorescentes utilizando procedimientos de derivatización, como puede ser la derivatización química o fotoquímica, basada en la conversión de analitos no fluorescentes en sus fotoproductos fuertemente fluorescente, después de la irradiación directa con luz ultravioleta[1]. Esta técnica se denomina fluorescencia fotoquímicamente inducida a temperatura ambiente (*RT-PIF, Room Temperature Photochemically-Induced Fluorescence*) y la cuantificación está basada en la obtención de la respuesta PIF que es reproducible y directamente proporcional a la concentración de analito[2].

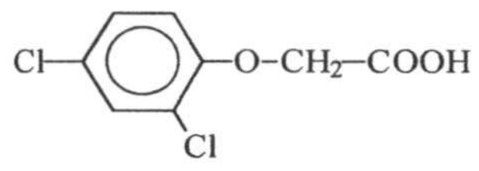
Los herbicidas clorofenoxiácidos son un tipo de compuestos ampliamente utilizados en agricultura pero debido a su contaminación potencial del agua requiere una regulación, como la Orden de aguas potables de la Comunidad europea que establece un límite superior de los plaguicidas a concentraciones de 0,1 ng/ml para una sola substancia y 0,5 ng/ml para el total de plaguicidas[3]. El uso del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) se ha restringido debido a la presencia del 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD) como impureza[4]. Durante la fabricación de este herbicida, se generan clorofenoles como precursor, que pueden reaccionar entre ellos para producir TCDD por substitución aromática nucleofílica[5]. Un estudio epidemiológico internacional del personal dedicado a la

1. Coly A. and Aaron J.J., *Talanta*, 46, 815-843, 1998.
2. Aaron J.J., in Schulman S.G. (Ed.), *Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications*, Wiley, New York, p. 85, 1993.
3. Barceló D., *J. Cromatogr.*, 643, 117, 1993.
4. Zimpleman J.M., *J. Chem. Ed.*, 76, 1662, 1999.
5. Spiro T.G. and Stigliani W.M., *Chemistry of Environment*, Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 304, 1996.

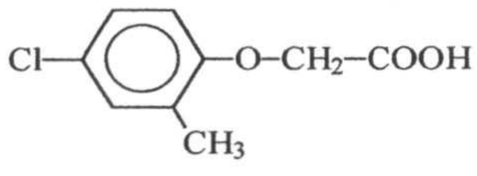
fabricación del 2,4,5-T muestra que poseen un alto riesgo de desarrollar cáncer debido a la exposición con TCDD[6,7]. Sin embargo, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 2-(2-metil-4-clorofenoxi)-propionico (MCPP o Mecoprop) y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) todavía se aplican ampliamente para la eliminación de plagas en cereales controlando, eso sí, sus niveles. En el caso de 2,4-D, el 1,3,6,8-TCDD, con menor toxicidad que el TCDD, puede aparecer como contaminante degradándose en la tierra.



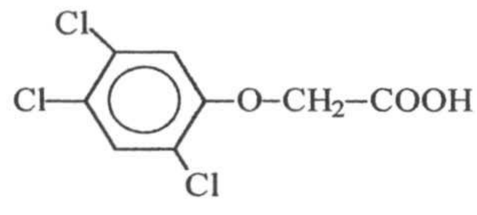
MCPP



2,4-D



MCPA



2,4,5-T

Los procedimientos analíticos para la determinación de estos herbicidas incluyen la preparación de muestras como un paso importante, particularmente en técnicas instrumentales para la extracción y limpieza de las muestras[8]. Otras técnicas, también utilizadas, son procedimientos "in sito" de derivatización y extracción de fluidos supercríticos[9,10], cromatografía de gases[11,12], cromatografía de gases acoplada con espectrometria de masas[13], cromatografía líquida con

6. Holmstedt B., *Arch. Toxicol.*, 44, 211, 1981.
7. Kogevinas M., Becher H., Benn T., Bertazzi P.A., Boffeta P., Bueno-de Mesquita H.B., Coggon D., Colin D., Flesh-Janys D., Fingerhut M., Green L., Kauppinen T., Littorin M., Lynge E., Mathews J.D., Neuberger M., Pearce N. and Saracci R., *Am. J. Epidemiol.*, 145, 1061, 1997.
8. López Avila V., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29, 195, 1999.
9. López Avila V., Benedicto J. and Beckert W.F., *ACS Symposium Series*, 630, 63, 1996.
10. Field J.A., *J. Chromatog. A*, 785, 239, 1997.
11. Hodgenson J., Collins J. and Bashe W., *J. Chromatogr. A*, 659, 395, 1994.
12. Taylor P.N., Scrimshaw M.D. and Lester J.N., *Int. J. Environm. Anal. Chem.*, 69, 141, 1998.
13. Catalina M.I., Dalluge J., Vreuls R.J.J. and Brickman U.A.T, *J. Chromatog. A*, 877, 153, 2000.

preconcentración selectiva en línea[14-17], electroforesis capilar[18,19], análisis de activación de neutrones[20], métodos electroquímicos[21] o métodos de inmunoensayo[22-28].

2. PROCEDIMIENTO

2.1. Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados son de calidad analítica, los herbicidas clorofenoxiácidos suministrados por Sigma o Merck, el metanol por Acros Organics y el surfactante, cloruro del cetiltrimetilamonio (CTAC) (solución acuosa al 25% en peso) por Aldrich y las soluciones reguladoras por Fluka. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo utilizando agua destilada.

14. Coquart V. and Hennion M.C., *Sci. Total Environ.*, 132, 349, 1993.
15. Vera Avila L.E., Padilla P.C., Hernández M.G. and Meraz J.L.L., *J. Chromatog. A*, 731, 115, 1996.
16. Wintersteiger R., Goger B. and Krautgarner H., *J. Chromatog. A*, 846, 349, 1999.
17. Lucas Delfa M.A., Pérez Arribas L.V., Navarro Villoslada F., León González F. and Polo Diez L.M., *J. Liq. Chromatog. Rel. Techn.*, 23, 755, 2000.
18. Spagone C., Dorazio C., Rossi M. and Rotilio D., *J. High Resol. Chromatog.*, 19, 647, 1996.
19. Hsieh Y.Z. and Huang H.Y., *J. Chromatog A*, 745, 217, 1996.
20. Martínez Miranda V., Martínez Gallegos S., Esteller M.V. and Bulbulia S., *J. Radioanal. and Nuclear Chem.*, 241, 323, 1999.
21. Oturan M.A., Aaron J.J., Oturan N. and Pinson J., *Pesticide Sci.*, 55, 558, 1999.
22. Knopp D., Nuhn P. and Dobberkau H.J., *Arch. Toxicol.*, 58, 27, 1985.
23. Rinder D.F. and Fleeker J.R., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26, 375, 1981.
24. Fleeker J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70, 847, 1987.
25. Hall J.C., Deschamps R.J.A. and Krieg K.K., *J. Agric. Food Chem.*, 37, 981, 1989.
26. Franek M., Kolar V., Granatova M. and Nevorankova Z., *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1369, 1994.
27. Eremin S.A., in Nelson J.O., Karu A.E. and Wong R.B. (Eds.), *Emerging Technologies in Immunoanalysis of Agrochemical*, ACS Symposium Series 586, American Chemical Society, Washington, DC, Chapter 16, p. 223, 1995.
28. Eremin S.A., Matveeva E.G., Gómez-Hens A. and Pérez-Bendito D., *J. Environ. Anal. Chem.*, 71, 137, 1998.

2.2. Equipos

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro, Kontron SFM-25, el cual poseía un programa de control y adquisición de datos. El voltaje seleccionado en la lámpara del equipo fue de 500 V.

Para la reacción de fotodegradación se utilizó una lámpara de mercurio de alta presión HBO Osram de 200 W conectada a una fuente Oriel modelo 8500. La cubeta para la reacción fue de cuarzo de 1 cm^2 modelo Hellma colocada a 45 cm de la lámpara.

2.3. Optimización

Se prepararon disoluciones madre de los herbicidas clorofenoxiácidos (100 mg/l) por disolución en metanol. Las disoluciones para la optimización de prepararon transfiriendo, a un matraz de 10 ml, 4 ml de una mezcla 50/50 v/v de metanol-disolución reguladora a pH 5 y las siguientes cantidades de CTAC (concentración micelar crítica, c.m.c. = $1{,}3 \cdot 10^{-3}$ M $\approx$ 0,042 %) y herbicida, enrasando con agua destilada

- 2,4-D: 1 – 5 ml de CTAC (1%), 0,5 ml de herbicida
- MCPP: 0,5 – 4,5 ml de CTAC (2%), 0,5 ml de herbicida
- MCPA: 0,25 – 4,5 ml de CTAC (2%), 0,4 ml de herbicida
- 2,4,5-T: 0,2 – 1,8 ml de CTAC (5%), 0,6 ml de herbicida.

2.4. Procedimiento analítico

Se prepararon disoluciones madre de los herbicidas clorofenoxiácidos por disolución en metanol y por dilución se obtuvieron las concentraciones siguientes: 140 mg/l para 2,4,5-T, 100 mg/l para 2,4-D y MCPP y 120 mg/l para MCPA. Las disoluciones de CTAC (4% para 2,4-D y MCPP, 5% para 2,4,5-T y 10% para MCPA) se prepararon por dilución con agua destilada.

Las muestras de agua de grifo y de río, tomadas al menos 24 h antes de su análisis, no han sido tratadas previamente. La disolución de muestra se preparó

diluyendo en agua destilada y añadiendo cantidades variables de las disoluciones de los herbicidas. Éstas concentraciones se muestran en la tabla 1 del Anexo C4.

Los calibrados necesarios para aplicar el método del cociente de pendientes (MOSR) se prepararon como sigue:

- *Calibrado con patrón externo, EC.* Seis puntos de calibración, con tres réplicas cada uno, se prepararon diluyendo la disolución madre. Los intervalos obtenidos son: de 0 a 6,5 mg/l para 2,4-D, de 0 a 7 mg/l para 2,4,5-T, de 0 a 6,875 mg/l para MCPP y de 0 a 7,5 mg/l para MCPA
- *Calibrado por adición de patrón, AC.* Estos calibrados se obtuvieron con seis niveles de concentración por adición de cantidades variables de las disoluciones patrón a un volumen constante de muestra. Los rangos de concentración y los factores de dilución de la muestra (volumen añadido/volumen final) se muestran en la tabla 2 del Anexo C4.
- *Calibrado de Youden, YC.* Éstos calibrados, cinco niveles de concentración, fueron establecidos con cantidades crecientes de muestra. Los rangos de concentración se muestran en la tabla 2 del Anexo C4.

Todas las disoluciones, además contienen 3 ml de una mezcla 50/50 v/v de metanol-disolución reguladora a pH 5 y las concentraciones de CTAC siguientes: 0,4% para 2,4-D, 1% para 2,4,5-T y 0,7% para MCPP y MCPA. El volumen final, en todos los casos fue 10 ml enrasando con agua destilada. Las disoluciones se agitaron ligeramente antes de la irradiación midiendo a continuación la señal PIF.

La reacción fotolítica fue realizada en una cubeta, irradiando con luz UV un volumen de 3 ml de la disolución del herbicida, con agitación magnética continúa a temperatura ambiente. Los tiempos de irradiación varían de un herbicida a otro siendo los valores utilizados los siguientes: 15 min. para 2,4-D, 2 min. para MCPP, 3 min. para MCPA y 13 min. para 2,4,5-T. Todos los herbicidas muestran un máximo de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 270 nm y de emisión de 298 nm.

3. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR Y EL TIEMPO DE IRRADIACIÓN

El tiempo de irradiación óptimo, definido como el tiempo de irradiación que produce la máxima intensidad de fluorescencia, depende de la cinética particular de fotodegradación de cada compuesto. En general, la intensidad de fluorescencia aumenta en gran medida con el tiempo de irradiación alcanzando un valor máximo al cual prácticamente permanece constante, en un amplio rango de tiempos, o incluso disminuye. Además, el uso de medios micelares refuerza significativamente la señal fluorescente cuando la concentración de surfactante aumenta alcanzando un máximo y permaneciendo constante en un intervalo ancho generalmente por encima de la concentración del micelar crítica, que indica que la naturaleza del aumento es debida a la interacción del fotoproducto con la micela cationica.

Para llevar a cabo la optimización del tiempo de irradiación (T) y la concentración micelar (MC) se ha utilizado el diseño Doehlert aplicando la metodología de superficie de respuesta secuencial.

3.1. Metodología de superficie de respuesta

Como ya hemos visto, la metodología de superficie de respuesta, RSM se utliza para analizar y modelar un problema, donde la respuesta es función de un conjunto de variables. RSM obtiene una estimación de una función (superficie de respuesta), por ajuste de los datos experimentales mediante regresión por mínimos cuadrados generalmente a una función polinómica cuadrada, que relaciona matemáticamente la respuesta instrumental con los factores o variables experimentales estudiadas[29,30,31].

29. Box G.E.P., Hunter W.G. and Hunter J.S., *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building,* John Wiley & Sons, Reverté, Barcelona, 1989.
30. Montgomery D.C., *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, Grupo Editorial Iberoamericano, Mexico, 1991.
31. Lawson J., Erjavec J. and Madrigal J.M., *Estrategias Experimentales para el Mejoramiento de la Calidad en la Industria*, Grupo Editorial Iberoamericano, Mexico, 1992.

De las respuestas analíticas obtenidas a partir de un diseño para dos variables, es posible estimar los coeficientes de regresión de la función de respuesta como:

$$R(X,Y) = a + b_X X + b_Y Y + c_X X^2 + c_Y Y^2 + d_{XY} XY$$

donde R es la respuesta analítica, X e Y son las variables a optimizar, a es el término independiente, b_i representan los coeficientes de los términos lineales y c_i y d_i son los coeficientes de los término cuadráticos.

Para evaluar el punto crítico (X_C, Y_C), obtenido mediante la segunda derivada de función respuesta, R(X,Y), es necesario aplicar el criterio de Lagrange[32] y caracterizar dicha función. Podemos encontrar cuatro situaciones diferentes:

- No existe punto crítico: $\Delta_1 = 0$
- Máximo relativo: $\Delta_1 < 0$; $\Delta_2 > 0$
- Mínimo relativo: $\Delta_1 > 0$; $\Delta_2 > 0$
- Punto de silla: Ninguna de las situaciones anteriores

donde Δ_2 es el denominado determinante *Hessiano* de la función y será:

$$\Delta_2 = H(X,Y) = \begin{vmatrix} R''_{XX} & R''_{XY} \\ R''_{YX} & R''_{YY} \end{vmatrix} > 0$$

y Δ_1 es la segunda derivada de la función con respecto a la variable X.

Las coordenadas del óptimo se obtienen resolviendo algebraicamente resolviendo el sistema de ecuaciones:

$$R'_X = b_X + 2 \cdot c_X \cdot X_C + d_{XY} \cdot Y_C = 0$$

$$R'_Y = b_Y + 2 \cdot c_Y \cdot Y_C + d_{XY} \cdot X_C = 0$$

Si la función muestra un máximo incluido dentro del dominio experimental, el proceso de optimización ha concluido, pero si la función muestra un máximo fuera del dominio experimental, se debe realizar un nuevo diseño alrededor del máximo calculado para confirmar su posición.

---

32. Valderrama M.J., Métodos Matemáticos Aplicados a las Ciencias Experimentales, Pirámide, Madrid, pp. 288-291, 1989.

En caso de que la función no presente un máximo, será necesario plantear otro diseño en la región donde se estima la respuesta óptima. Para localizar esta posición, es necesario buscar la dirección de máxima variación de respuesta calculando el vector gradiente a 2 o más puntos del diseño inicial:

$$[\text{grad } R]_X = [R'_X]_{Xi,Yi} = b_X + 2 \cdot c_X \cdot X_i + d_{XY} \cdot Y_i$$

$$[\text{grad } R]_Y = [R'_Y]_{Xi,Yi} = b_Y + 2 \cdot c_Y \cdot Y_i + d_{XY} \cdot X_i$$

La intersección de las líneas rectas, trazada en la dirección de los vectores gradientes, indicará la zona donde es posible encontrar el máximo de la función respuesta.

3.2. Diseños Doehlert

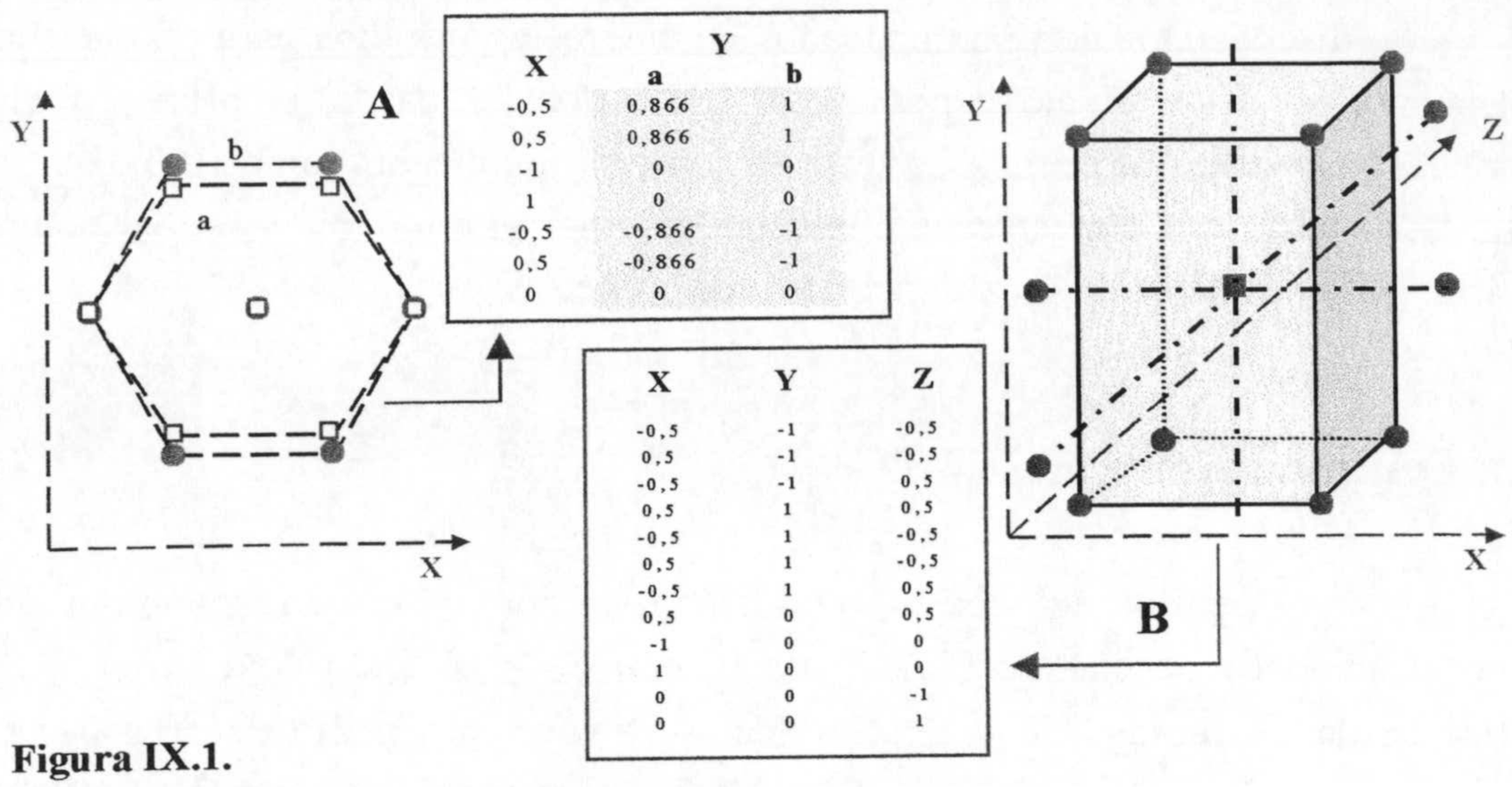
Los diseños Doehlert[33-36], poseen tres características fundamentales:

- ofrecen una distribución uniforme de puntos sobre la región experimental seleccionada, situados sobre una red romboidal;
- requiere un pequeño pero suficiente número de experimentos (alta eficacia);
- presentan la característica de que el número de niveles por variables no es uniforme, y así es posible elegir el número de niveles para cada variable en estudio, disminuyendo el trabajo experimental sin mermar la calidad de la información extraída.

Doehlert es un diseño experimental a tres y cinco niveles con una distribución uniforme de puntos en la región experimental, tiene forma romboidal (Figura IX.1), un hexágono en el caso de dos variables y un cuboctaedro para tres variables, y requiere menos experimentos ($N = k^2 + k + 1$, donde k es el número de variables experimentales) que los diseños centrales compuestos[29]. Aunque no son ortogonales no tienen una divergencia significativa de la calidad necesaria para su aplicación eficaz y fidedigna.

---

33. Doehlert D.H., *Appl Statist.*, 19, 231, 1970.
34. Yuzhu H. and Massart D.L., *J. Chromatogr.*, 485, 311, 1989.
35. Yuzhu H., *Trends Anal. Chem.*, 8, 126, 1989.
36. Tomás X., *Técnicas de optimización (método EVOP y diseños Doehlert), in Avances en Quimiometría Práctica*, Universidad de Santiago de Compostela, 1994.



X	Y a	Y b
-0,5	0,866	1
0,5	0,866	1
-1	0	0
1	0	0
-0,5	-0,866	-1
0,5	-0,866	-1
0	0	0

X	Y	Z
-0,5	-1	-0,5
0,5	-1	-0,5
-0,5	-1	0,5
0,5	1	0,5
-0,5	1	-0,5
0,5	1	-0,5
-0,5	1	0,5
0,5	0	0,5
-1	0	0
1	0	0
0	0	-1
0	0	1

Figura IX.1.

Representación y coordenadas de los diseños Doehlert de A) dos variables (a: con coeficiente √3/2 y b: con coeficiente 1) y B) tres variables

El diseño, originalmente regular, puede deformarse ligeramente cambiando los coeficientes √3/2 a 1 (Figura IX.1A) con el objetivo de adquirir los valores necesarios para llevar a cabo cada experiencia. Este tipo de diseños tienen una estructura adecuada para el uso de la metodología de superficie de respuesta ya que permite la estimación de los parámetros del modelo cuadrático, construcción de los diseños secuenciales, detección de falta de ajuste y utilización de bloques. La movilidad de estos diseños por el dominio experimental de las variables permite el uso de datos de un diseño anterior en el nuevo diseño, obtenidos fijando el valor de una variable y considerado la dirección de máxima respuesta para las otras dos variables. Esta metodología se ha utilizado para la optimización simultánea de dos[37,38] y tres variables[39].

37. Bosque Sendra J.M., Nechar M., Cuadros Rodríguez L. and Molina Molina M.F., *Anal. Proc.*, 32, 375, 1995.
38. Nechar M., Molina Molina M.F., Cuadros Rodríguez L. and Bosque Sendra J.M., *Anal. Chim. Acta*, 316, 185, 1995.
39. García-Campaña A.M., Cuadros Rodríguez L., Lupiañez González A., Alés Barrero F. and Román Ceba M., *Anal. Chim. Acta*, 348, 237-246, 1997.

Los diseños Doehlert son aplicados en valores codificados para obtener una normalización del intervalo experimental. En todos los casos, el primer diseño Doehlert se localiza alrededor de un nivel central, codificado como (0,0), que es establecido para una concentración micelar por encima del c.m.c y un del tiempo de irradiación establecido en ausencia de medio micelar[i]

3.3. Optimización para 2,4-D

El nivel central del diseño, codificado como (0,0), corresponde a una concentración de micelar de 0,3% y un tiempo de irradiación de 15 min. Cada variación de una unidad de valor codificado provoca un cambio de ±0,2% y ±5 min. en MC y T, respectivamente. La tabla 3 del Anexo C4 muestra la matriz de experiencias del diseño Doehlert propuesto y los resultados experimentales obtenidos. Estos datos se ajustan a la siguiente función:

$$PIF = 64{,}67 + 7{,}67 \cdot MC + 1{,}5 \cdot T - 10{,}67 \cdot MC^2 - 9 \cdot T^2 - 2 \cdot MC \cdot T$$

que muestra la relación encontrada entre PIF y las variables experimentales (Figura IX.2).

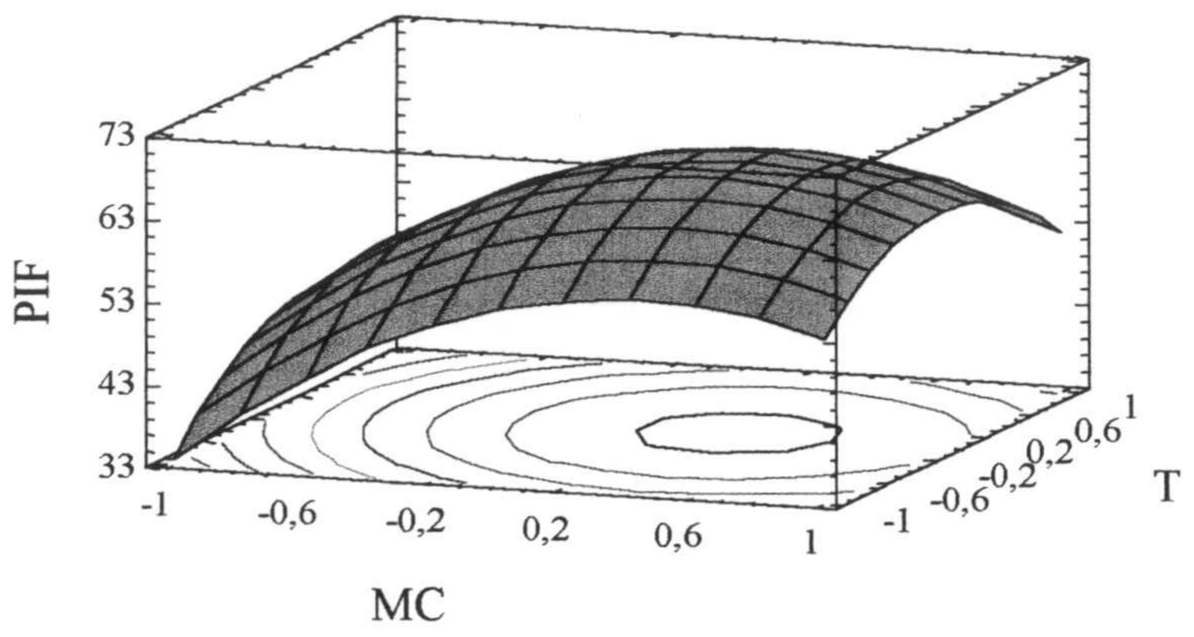


Figura IX.2.

Superficie de respuesta para la optimización de la concentración micelar (MC) y el tiempo de irradiación (T) del 2,4-D

La ecuación se ajusta bien a los datos experimentales siendo ésta evaluada mediante el coeficiente de determinación (R^2 = 98,4%) y el test de falta de ajuste (P = 39,7%). La aplicación del criterio de Lagrange ($PIF''_{MC,MC}$ = – 21,3; H(MC,T) = 384) indica la presencia de un máximo, que, como puede verse en la Figura IX.2, corresponde a una concentración de micelar de 0,37% y un tiempo de irradiación de 15 min.

3.4. Optimización para MCPP

En este caso, se han aplicado dos diseños Doehlert, mostrados en Figura IX.3A. El punto central (0,0) del diseño corresponde a una MC de 0,3% y un T de 10 min. siendo cada variación de una unidad un cambio de ±0.2% y ±5 min. en la MC y T, respectivamente.

La tabla 4 del Anexo C4 muestra el diseño propuesto y los resultados experimentales obtenidos. La función de respuesta obtenida, con un coeficiente de determinación R^2 = 94,8% y P = 12,4% del test de falta de ajusta, se ajusta a la ecuación:

$$PIF = 70{,}07 + 8{,}65 \cdot MC - 11{,}67 \cdot T - 1{,}42 \cdot MC^2 + 9{,}61 \cdot T^2 - 7{,}95 \cdot MC \cdot T$$

La aplicación del criterio de Lagrange indica la presencia de un punto de silla ($PIF''_{MC,MC}$ = – 2,8; H(MC,T) = –117,7). La representación correspondiente se muestra en la Figura IX.3B.

Cuando no se obtiene un máximo, la dirección de máxima variación de la intensidad se puede estimar a partir de los puntos del diseño que corresponden al tiempo de irradiación mínimo (0,5; -1) y (-0,5; -1), pues es la dirección en que aumenta la respuesta analítica. Éstas direcciones corresponde a –66,5° y –56,2°, respectivamente y de la intersección de las líneas rectas trazadas en la dirección de los vectores gradientes se obtiene el punto de coordenadas (2,36;–5,3) que corresponde a 0,78% para MC y –16,5 min para T.

Obviamente, el tiempo de irradiación no puede ser menos que 2 (0 min), así que construimos el segundo diseño por encima de la intersección de las líneas rectas (Figura IX.2(C)) entre los valores codificados –1 y –1,8 (5 y 1 min). El segundo diseño junto con los resultados experimentales se muestra en la tabla 4

del Anexo C4. La ecuación ajustada a los datos experimentales es (R^2 = 97,5%; P = 36,9%):

$$PIF = -3{,}54 + 25{,}72 \cdot MC - 125{,}62 \cdot T - 6{,}13 \cdot MC^2 - 41{,}72 \cdot T^2 + 0{,}63 \cdot MC \cdot T$$

La aplicación del criterio de Lagrange ($PIF''_{MC,MC}$ = –12,26, H(MC,T) = 1023,4) indica la presencia de un máximo de coordenadas (2,01;–1,50) que corresponde a 0,7% para MC y 2,48 min. para T. La representación de la superficie de respuesta se muestra en la Figura IX.3C incluyendo el valor óptimo dentro del área experimental.

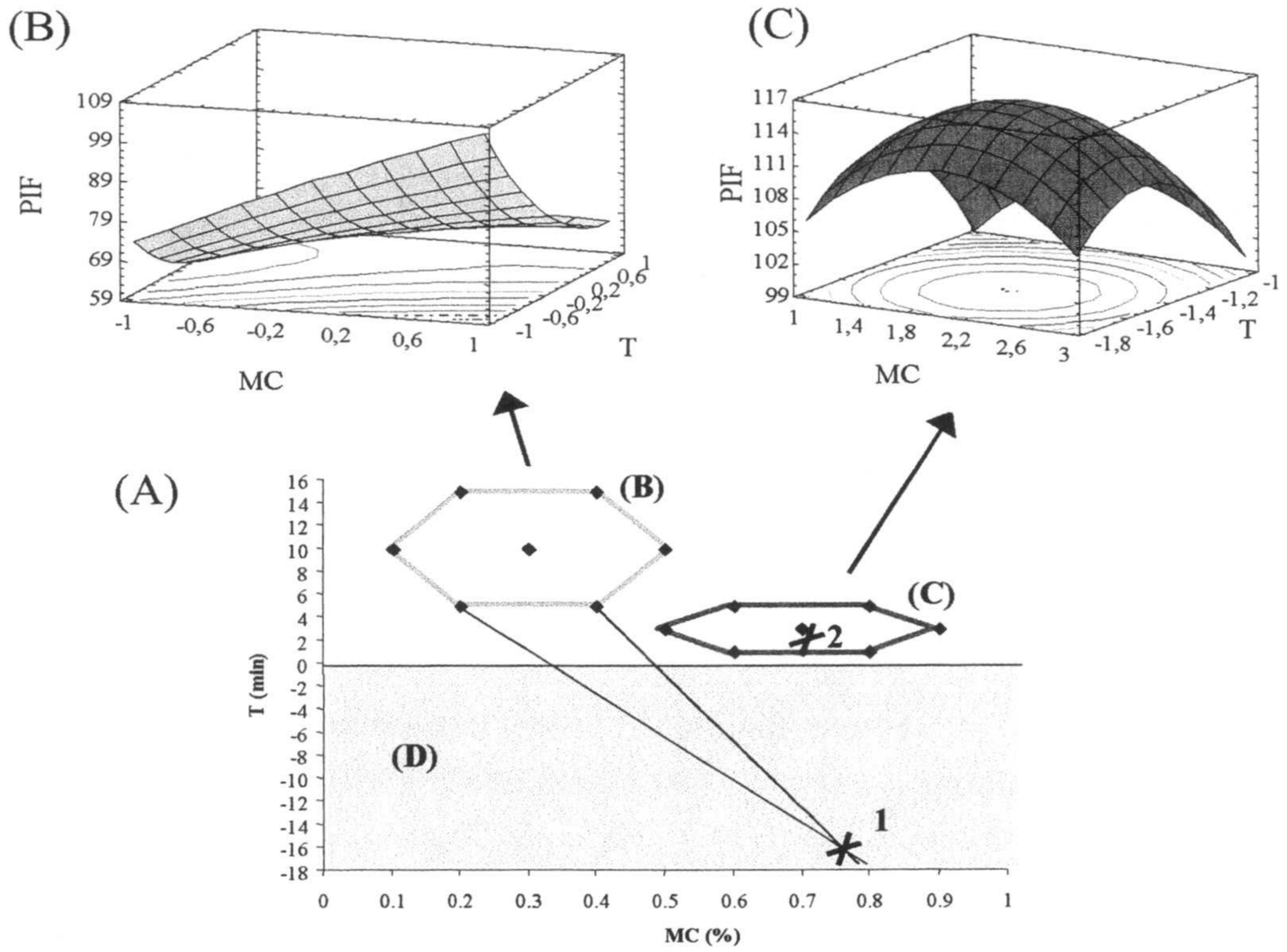


Figura IX.3..

Diseños utilizados en la optimización de la concentración micelar (MC) y del tiempo de irradiación (T) para MCPP. (A) Metodología planteada, (B) Diseño 1 y su superficie de respuesta; (C) Diseño 2 y su superficie de respuesta; (D) Áre no válida; (1) Máximo obtenido del diseño 1, (2) Máximo obtenido del diseño 2.

3.5. Optimización para MCPA

En este caso, el punto central (0,0) del diseño Doehlert corresponde a una MC de 0,7% y un T de 3 min. Cada variación de una unidad en los valores codificados corresponde a un cambio de ±0.2% y ±2 min para MC y T, respectivamente. La tabla 5 del Anexo C4 muestra el Doehlert propuesto y los resultados experimentales obtenidos. Estos datos experimentales se ajustan a la función (R^2 = 99,8%; P = 21,0%):

$$PIF = 103,5 + 7,02 \cdot MC - 5,37 \cdot T - 30,72 \cdot MC^2 - 4,55 \cdot MC \cdot T - 20,21 \cdot T^2$$

La aplicación del criterio de Lagrange ($PIF''_{MC,MC}$ = –61,4, H(MC,T) = 246,2) indica la presencia de un máximo, como muestra la Figura IX.4, que corresponde a una concentración de MC de 0,73% y un T de 2,7 min.

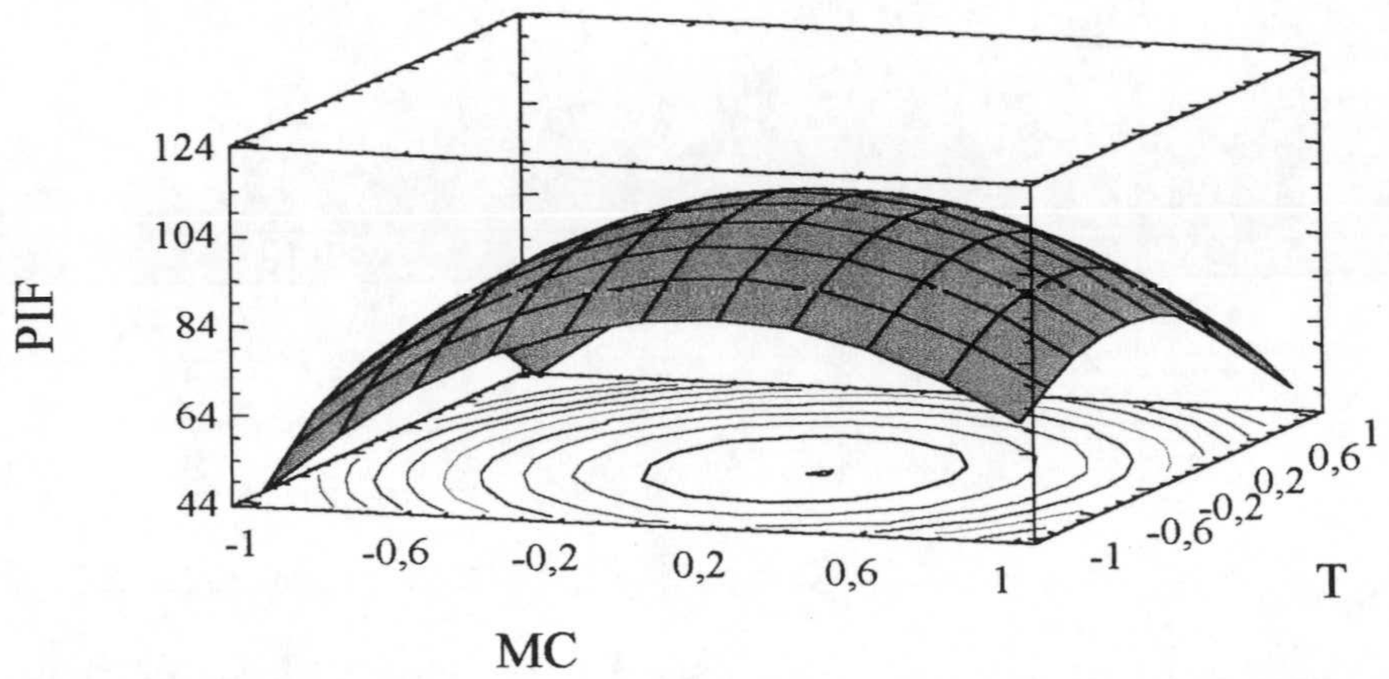


Figura IX.4.

Superficie de respuesta para la optimización de la concentración micelar (MC) y el tiempo de irradiación (T) del MCPA

3.6. Optimización para 2,4,5-T

En este caso, se han usado dos diseños Doehlert (Figura IX.5A), con un punto central (0,0) que corresponde a una MC de 0,5% y un T de 10 min. Cada variación de una unidad de valor codificado corresponde a un cambio de ±0,2% y

±5 min. en MC y T, respectivamente. La tabla 6 del Anexo C4 muestra los diseños propuestos y los resultados experimentales obtenidos. La función ajustada a los datos experimentales es:

$$PIF = 43,45 + 10,33 \cdot MC + 10,05 \cdot T - 4,85 \cdot MC^2 - 6,69 \cdot T^2 - 0,40 \cdot MC \cdot T$$

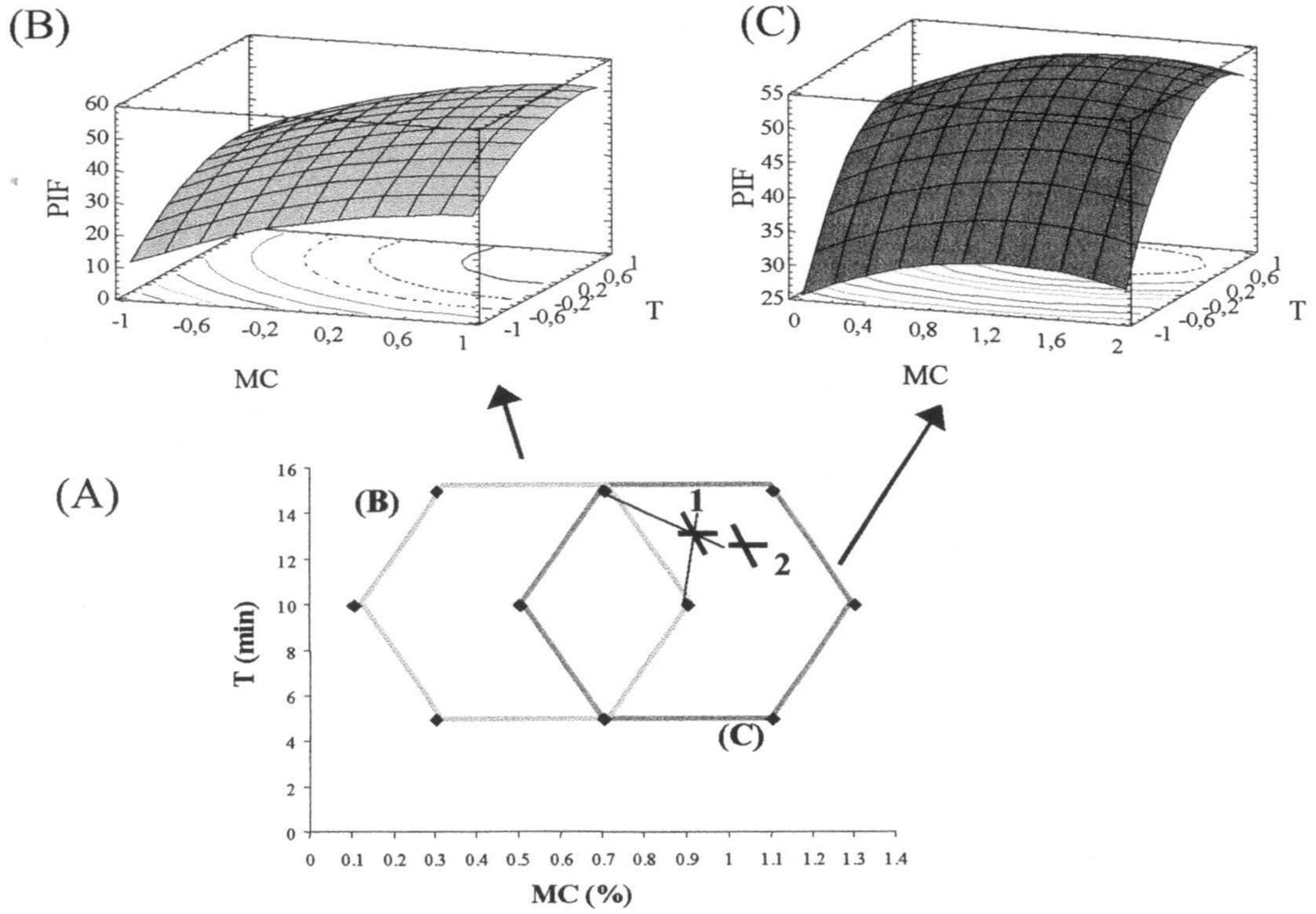


Figura IX.5..

Diseños utilizados en la optimización de la concentración micelar (MC) y del tiempo de irradiación (T) para 2,4,5-T. (A) Metodología planteada, (B) Diseño 1 y su superficie de respuesta; (C) Diseño 2 y su superficie de respuesta; (1) Máximo obtenido del diseño 1, (2) Máximo obtenido del diseño 2.

Los valores experimentales se ajustan bien a la ecuación obtenida con coeficiente de determinación $R^2 = 97,9\%$ y P = 23,5% del test de fallo de ajuste. La aplicación del criterio de Lagrange ($PIF''_{MC,MC} = -9,7$, $H(MC,T) = 129,6$) indica la presencia de un máximo (Figura IX.5B) localizada fuera del dominio experimental, en la posición 1,03 (0,92%) para MC y 0,625 (13 min) para T.

Con el segundo diseño, creado alrededor del óptimo inicialmente calculado, se obtiene la ecuación:

$$PIF = 44,13 + 11,02 \cdot MC + 9,63 \cdot T - 4,15 \cdot MC^2 - 9,09 \cdot T^2 + 0,45 \cdot MC \cdot T$$

El valor de $R^2 = 99,8\%$ y $P = 42,5\%$ del test de fallo de ajuste nos indica que los datos experimentales se ajustan correctamente a la ecuación obtenida. La aplicación del criterio de Lagrange ($PIF''_{MC,MC} = -8,3$, $H(MC,T) = 150,6$) indica la presencia de un máximo localizado en la posición 1,36 (1,04%) en MC y 0,56 (12,8 min) en T cuya representación de superficie de respuesta se muestra en la Figura IX.5C, estando el óptimo dentro de la región experimental estudiada.

La tabla IX.1 recoge los valores óptimos, al aplicar MSR a diseños Doehlert para la optimización de MC y T para los herbicidas estudiados.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
31 OCT. 2002
COMISION DE DOCTORADO

Tabla IX.1.

Valores óptimos y codificados (entre paréntesis) para las variables utilizando SRSM

Herbicida	Concentración micelar (%)	Tiempo de irradiación (min)
2,4-D	0,37 (0,36)	15 (0)
MCPP	0,70 (2,01)	2,48 (-1,50)
MCPA	0,73 (0,13)	2,70 (-0,15)
2,4,5-T	1,04 (1,36)	12,8 (0,56)

4. CALIBRADOS UNIVARIANTES

El método del cociente de pendientes (MOSR) utilizando calibrados univariantes se ha aplicado a la determinación de 4 herbicidas en aguas (Figura IX.6). En todos los casos se preparó el calibrado EC a seis niveles de concentración con 3 réplicas a cada nivel, el calibrado de Youden a 5 niveles y el calibrado AC se obtuvo añadiendo la concentración de muestra (S), indicada en

cada caso, a 5 niveles. Las tablas 7, 8, 9 y 10 del Anexo C4 muestra los datos experimetales y los parámetros de regresión para la determinación de:

- 2,4-D en agua de grifo (S = 160 g/l) y de río (S = 160 g/l)
- MCPP en agua de grifo (S = 180 g/l) y de río (S = 60 g/l)
- MCPA en agua de grifo (S = 200 g/l) y de río (S = 210 g/l)
- 2,4,5-T en agua de grifo (S = 160 g/l) y de río (S = 160 g/l)

Las pendientes y los términos independientes de cada uno de los calibrados (EC, AC y YC) para los cuatro herbicidas en los dos tipos de matrices se muestran en la tabla IX.2

Tabla IX.2

Pendientes y términos independientes para los calibrados EC, YC y AC en la determinación de los cuatro herbicidas en agua de grifo y de río

		Agua grifo			***Agua río***	
		EC	**YC**	**AC**	**YC**	**AC**
2,4-D	**a**	5,303	5,620	14,740	3,630	36,740
	b	9,534	0,066	9,521	0,206	10,054
MCPP	**a**	9,375	4,810	41,360	6,760	43,340
	b	19,354	0,189	19,050	0,635	18,000
	b^C				– 0,0012	
MCPA	**a**	9,768	– 22,120	44,040	– 12,050	43,200
	b	19,371	0,296	17,000	0,259	17,000
2,4,5-T	**a**	6,403	5,670	19,880	3,190	24,880
	b	6,322	0,089	6,700	0,111	6,378

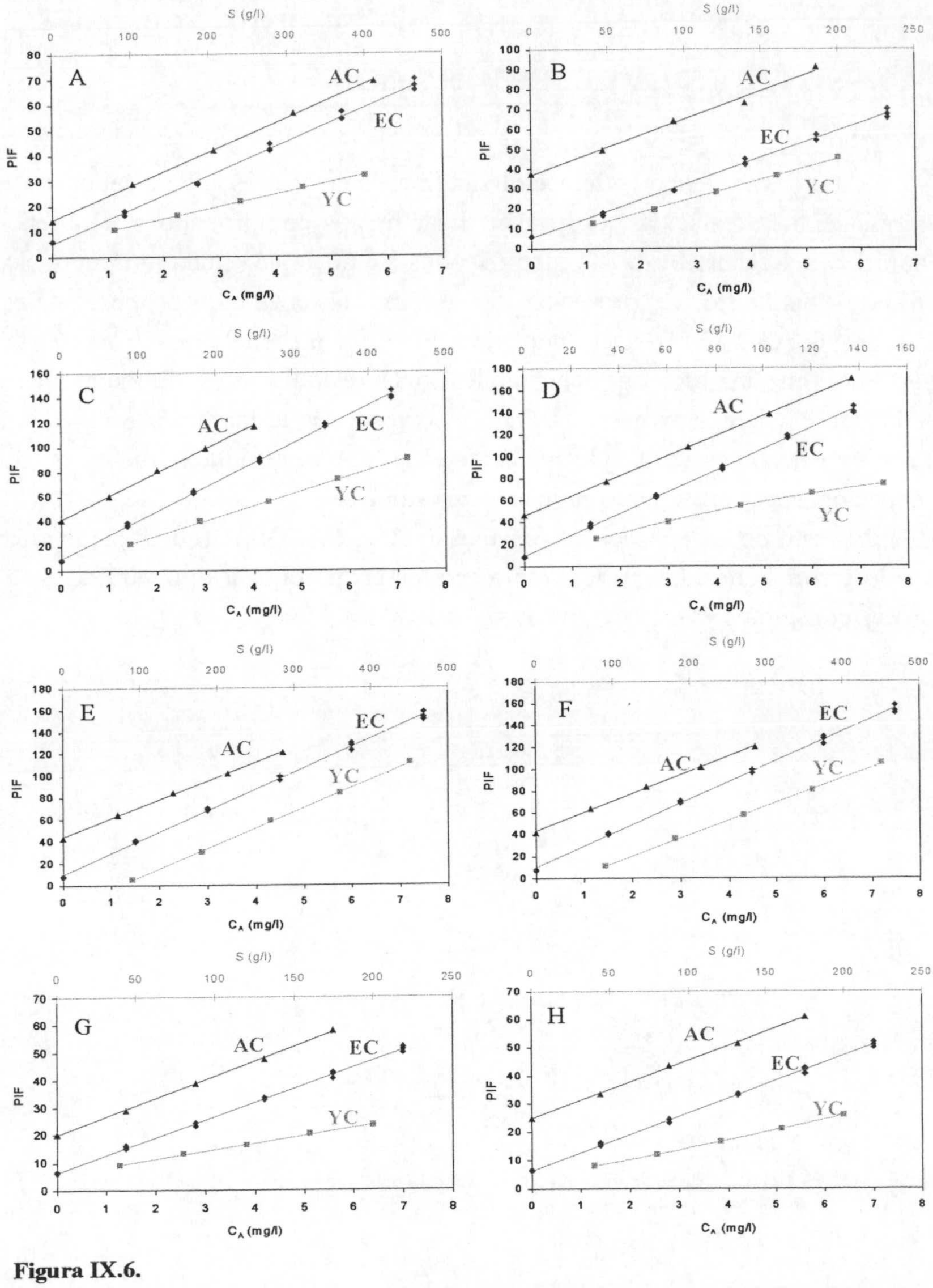


Figura IX.6.

Representación de los calibrados EC, AC y YC para A) 2,4-D en agua de grifo; B) 2,4-D en agua de río; C) MCPP en agua de grifo; D) MCPP en agua de río; E) MCPA en agua de grifo; F) MCPA en agua de río; G) 2,4,5-T en agua de grifo y H) 2,4,5-T en agua de río

5. DETECCIÓN DEL TIPO DE ERROR SISTEMÁTICO PRESENTE EN LA DETERMINACIÓN

Para llevar a cabo la detección del tipo de error presente en cada una de las determinaciones realizadas, en primer lugar hemos comprobado si el coeficiente cuadrático del calibrado de Youden (b^C_Y) es significativo, calibrado curvo, lo que pone de manifiesto la presencia de errores sistemáticos proporcionales no saturados (CASO C.1 o D.1, dependiendo de la presencia de error constante). Solamente en una de las ocho aplicaciones estudiadas se obtiene que éste coeficiente es significativo (P = 3,4%) y corresponde al herbicida MCPP en agua de río; éste hecho es verificado mediante el gráfico de residuos, que en el caso de la ecuación lineal presentan una clara curvatura con respecto a línea cero (Figura IX.7). El resto de las aplicaciones se ajustan a los CASOS A (ausencia de errores), B (sólo errores constantes), C.2 (sólo errores proporcionales no saturados) o D.2 (errores constantes y proporcionales no saturados).

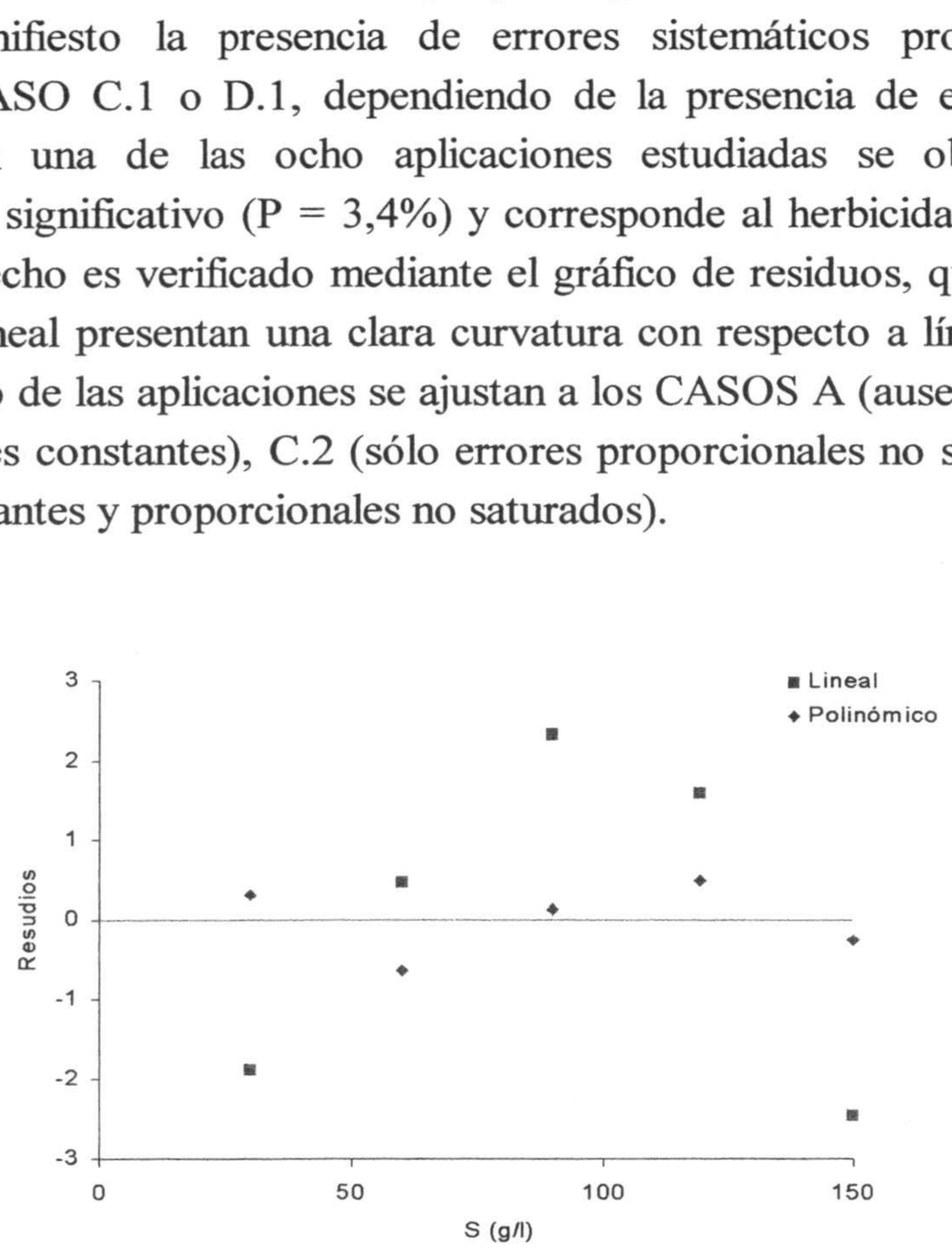


Figura IX.7.

Gráfico de residuos para los modelos lienal y polinómico del herbicida MCPP en agua de río

El siguiente paso sería la aplicación del test t-Student para comprobar si las pendientes de los calibrados EC y AC difieren significativamente, con lo que

se aseguraría la presencia de errores sistemáticos proporcionales no saturados. Dos, de las ocho aplicaciones, presentan éste tipo de error y corresponde al herbicida MCPA en los dos tipos de aguas (P = 0,3 % en ambos casos). Los resultados del test se muestran en la tabla 11 del Anexo C4, Así este herbicida estaría incluido en el CASO C.2 o D.2, dependiendo de la componente constante, mientras que el resto estarían englobados en los CASOS A o B

Por último, y para poner de manifiesto la presencia de errores sistemáticos constantes, es decir diferenciar los casos A y B, C.1 y D.1 y C.2 y D.2, se comparan los términos independientes de los calibrados EC y YC estimando los intervalos de confianza asociados a éstos y comprobando si se solapan. En el caso de que los intervalos se solapen implica que no existe diferencia significativa entre los términos independientes y por tanto no existe error sistemático constante. Los intervalos de confianza asociados a los términos independientes de los calibrados EC y YC se muestran en la tabla 11 del Anexo C4 y Figura IX.8.

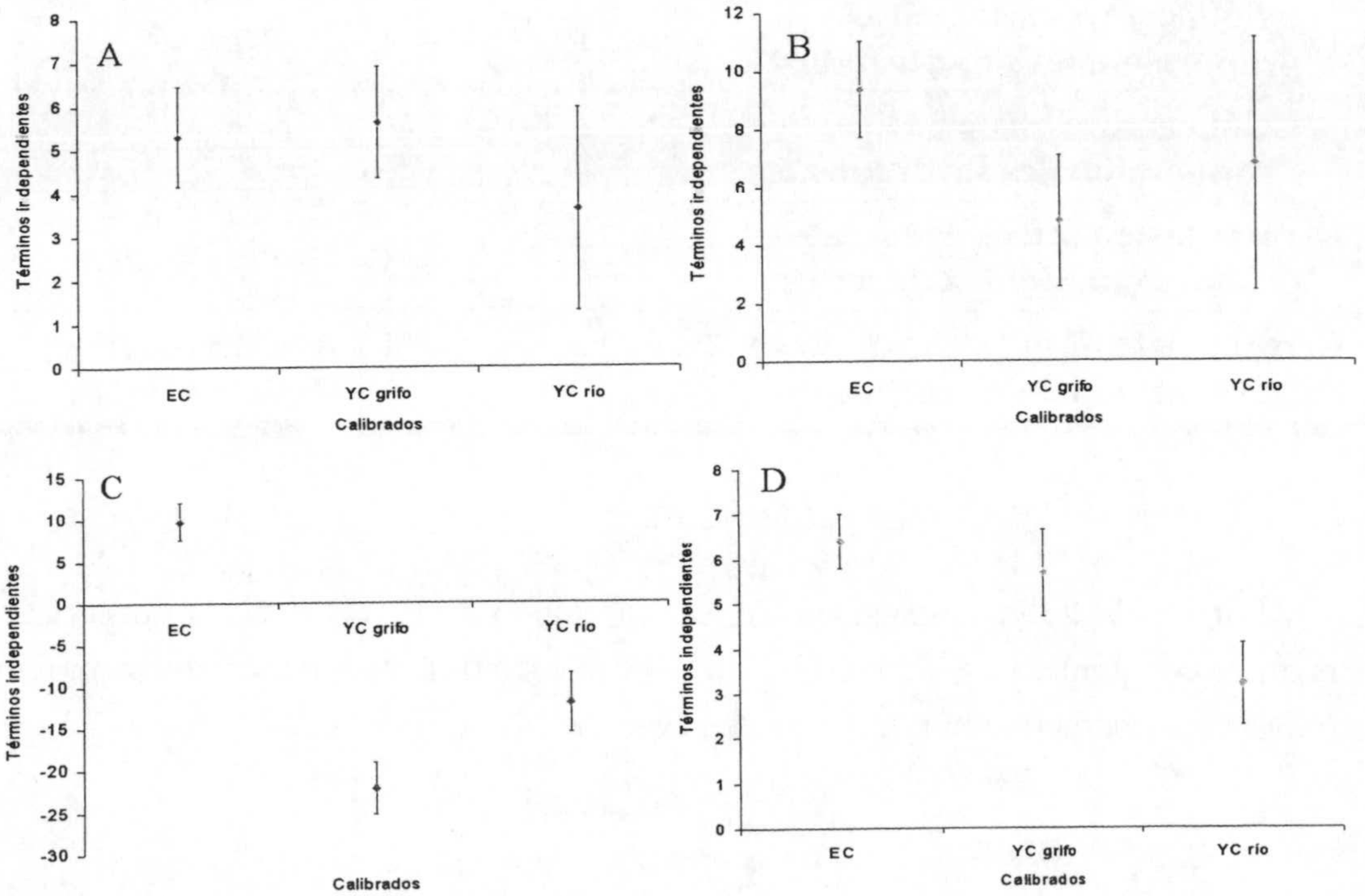


Figura IX.8.

Representación de los término independientes para los calibrados EC y YC en los dos tipos de matrices para A) 2,4-D; B) MCPP;C) MCPA y D) 2,4,5-T

Las aplicaciones de los herbicidas MCPP en agua de grifo, MCPA en las dos matrices y 2,4,5-T en agua de río, presentan errores constantes y por tanto son emplazados en los CASOS B, D.2, D.2 y B respectivamente. Los herbicidas 2,4-D en las dos matrices, MCPP en agua de río y 2,4,5-T en agua de grifo no presentan éste tipo de error y son englobados en los siguientes CASOS: A, A, C.1 y A, respectivamente. La tabla IX.3 muestra un resumen de los casos encontrados.

Tabla IX.3.

Asignación del caso correspondiente a cada aplicación

CASOS		Aplicaciones
Ausencia de errores	**A**	2,4-D en agua de grifo 2,4-D en agua de río 2,4,5-T en agua de grifo
Sólo errores sistemáticos constantes	**B**	2,4,5-T en agua de río MCPP en agua de grifo
Sólo errores sistemáticos proporcionales no saturados	**C.1**	MCPP en agua de río
Sólo errores sistemáticos proporcionales saturados	**C.2**	——
Errores sistemáticos constantes y proporcionales no saturados	**D.1**	——
Errores sistemáticos constantes y proporcionales saturados	**D.2**	MCPA en agua de grifo MCPA en agua de río

Para cada aplicación, si existe, se ha calculado el valor de la componente de errores constante (K), el factor de proporcionalidad y el factor de saturación. Éstos valores aparecen en la tabla 12 del Anexo C4.

6. ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE ANALITO Y SU INCERTIDUMBRE

6.1. Método de adición de patrón (MOSA)

Como hemos visto en el capítulo VIII, la forma correcta de aplicar la metodología de adición de patrón (MOSA), para obtener el contenido de analito en una muestra, es a partir del calibrado de adición de patrón teniendo en cuenta el Blanco Total de Youden (TYB). Ésta corrección del blanco es necesaria independientemente de la existencia de la componente proporcional de error sistemático.

Para cada aplicación estudiada, se ha calculado el contenido de analito en la muestra (X), con su incertidumbre asociada aplicando el teorema de Fieller, cuando $g_A < 0,05$ (Tabla 13 del Anexo C4). Los resultados se muestran en la tabla IX.4 junto con las recuperaciones ($\Re$), calculadas como el cociente entre el contenido de analito encontrado, X, y el real o añadido, X_{real} y la precisión (RSD) asociada a cada determinación, calculada como la desviación estándar relativa.

Tabla IX.4

Contenido de analito, incertidumbre asociada, recuperación y precisión para las aplicaciones estudiadas utilizando MOSA

Aplicación	$X_{añadido}$ (μg/g)	X (μg/g)	u(X) (μg/g)	$\Re$ (%)	RSD (%)
2,4-D (grifo)	7,20	5,99	0,38	83,2	6,4
2,4-D (río)	21,60	20,58	2,21	95,3	10,7
MCPP (grifo)	10,00	10,66	0,56	106,6	5,2
MCPP (río)	34,00	36,65	0,92	107,8	2,5
MCPA (grifo)	18,00	19,46	0,49	108,1	2,5
MCPA (río)	16,00	15,48	0,57	96,7	3,7
2,4,5-T (grifo)	14,50	13,26	0,62	91,4	4,6
2,4,5-T (río)	17,50	21,25	0,78	103,5	4,3

6.2. Método del cociente de pendientes (MOSR)

En la aplicación de MOSR, el contenido de analito en la muestra se calcula mediante el cociente de dos pendientes (YC y EC, para los CASOS A, B, C.1 y D.1 y YC y AC, para los CASOS C.2 y D.2). Por lo tanto sólo para el herbicida 2,4,5-T en las dos matrices se aplica MOSR como cociente de las pendientes de los calibrados YC y AC, pues son los únicos que se encuadran en el CASO D.2.

En cuanto a la incertidumbre asociada al contenido de analito, en primer lugar es necesario comparar las varianzas residuales de los calibrados implicados, ya que dependiendo de que éstas sean diferentes o no, la aplicación del teorema de Fieller será distinta. Como muestra la tabla 14 del Anexo C4, todas las varianzas residuales difieren significativamente ($P < 5\%$). Por lo tanto el cálculo de la incertidumbre, aplicando el teorema de Fieller, será para varianzas heterogéneas considerando que, en todos los casos, el parámetro g_E o g_A es menor que 0,05 (Tabla 13 del Anexo C4).

Los contenidos de analito junto con su incertidumbre asociada, las recuperaciones ($\Re$) y la precisión (RSD) asociada a cada determinación se muestran en la tabla IX.5.

Tabla IX.5.

Contenido de analito, incertidumbre asociada, recuperación y precisión para las aplicaciones estudiadas utilizando MOSR

Aplicación	$X_{añadido}$ (µg/g)	X (µg/g)	u(X) (µg/g)	$\Re$ (%)	RSD (%)
2,4-D (grifo)	7,20	6,97	0,19	96,9	2,7
2,4-D (río)	21,60	21,58	0,66	99,9	3,0
MCPP (grifo)	10,00	9,78	0,16	97,9	1,6
MCPP (río)	34,00	32,79	1,82	96,4	5,5
MCPA (grifo)	18,00	17,42	0,38	96,8	2,2
MCPA (río)	16,00	15,28	0,42	95,5	2,8
2,4,5-T (grifo)	14,50	14,11	0,40	97,3	2,8
2,4,5-T (río)	17,50	17,59	0,39	100,5	2,2

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos reflejan que las dos metodologías proporcionan un intervalo de confianza que incluye el valor verdadero (Figura IX.9), siendo éstos, en la mayoría de los casos, mayores con el método de MOSA que con MOSR. En ésta figura, la línea continua representa el valor real o añadido en cada caso. Este hecho, también se pone de manifiesto en la figura IX.10A donde se representa las recuperaciones (en porcentaje) de cada una de las aplicaciones mediante MOSA y MOSR; aunque todas las recuperaciones están próximas al 100%, sólo con MOSR se obtiene que las recuperaciones están dentro de un intervalo entre 95 – 105 %.

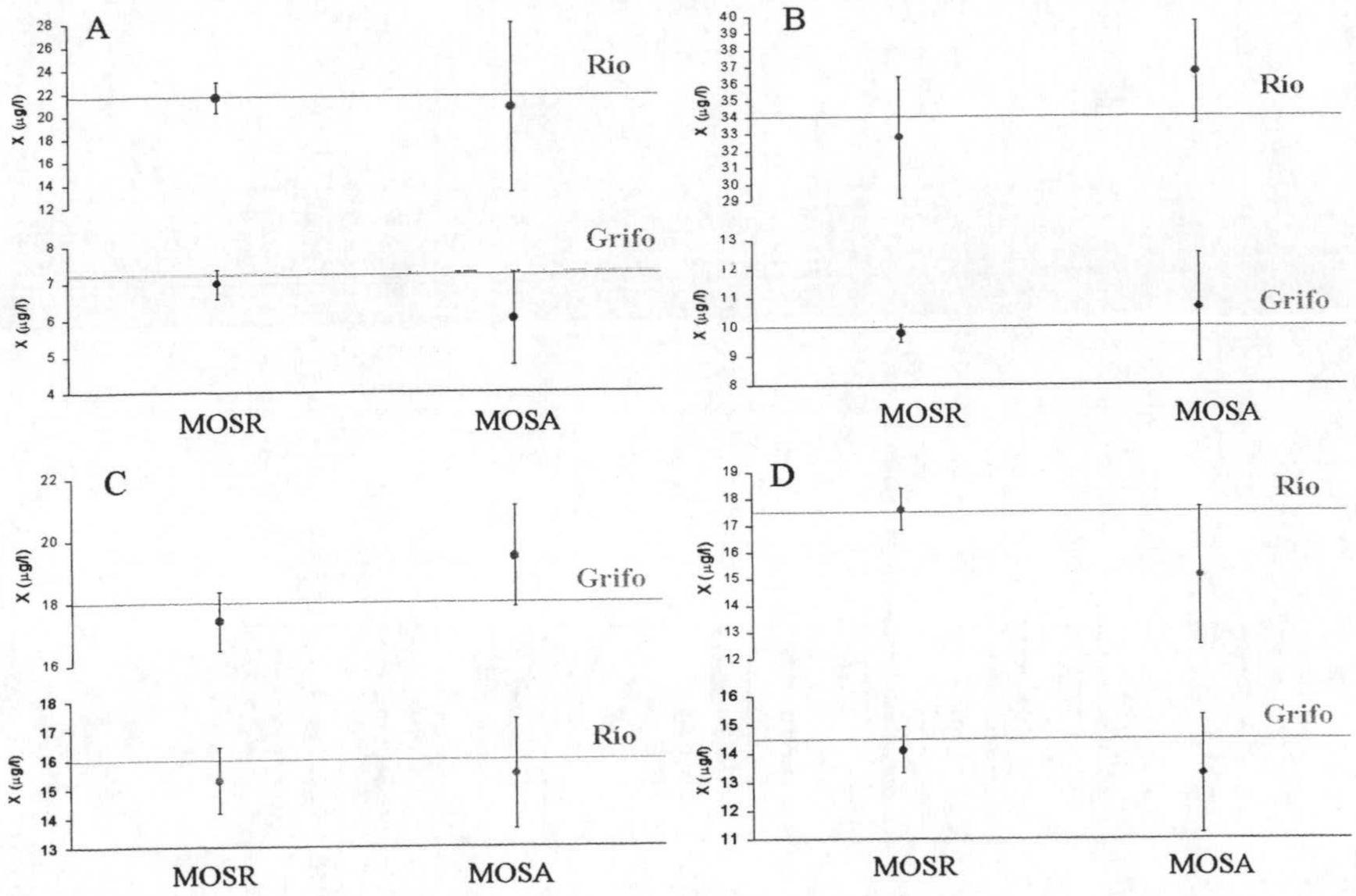


Figura IX.9.

Intervalos de confianza para el contenido de analito en las muestras (X) mediante MOSA y MOSR para: A) 2,4-D; B) MCPP, C) MCPA y D) 2,4,5-T

En cuanto a la precisión, como muestra la Figura IX.10B, en MOSA tres de las ocho aplicaciones (2,4,-D en las dos muestras y MCPP en agua de grifo), superan el nivel del 5%, incluso una de ellas supera el 10%; sin embargo en MOSR solamente una de las aplicaciones (MCPP en agua dc río) supera éste límite, siendo en el resto de los casos menor que en MOSA.

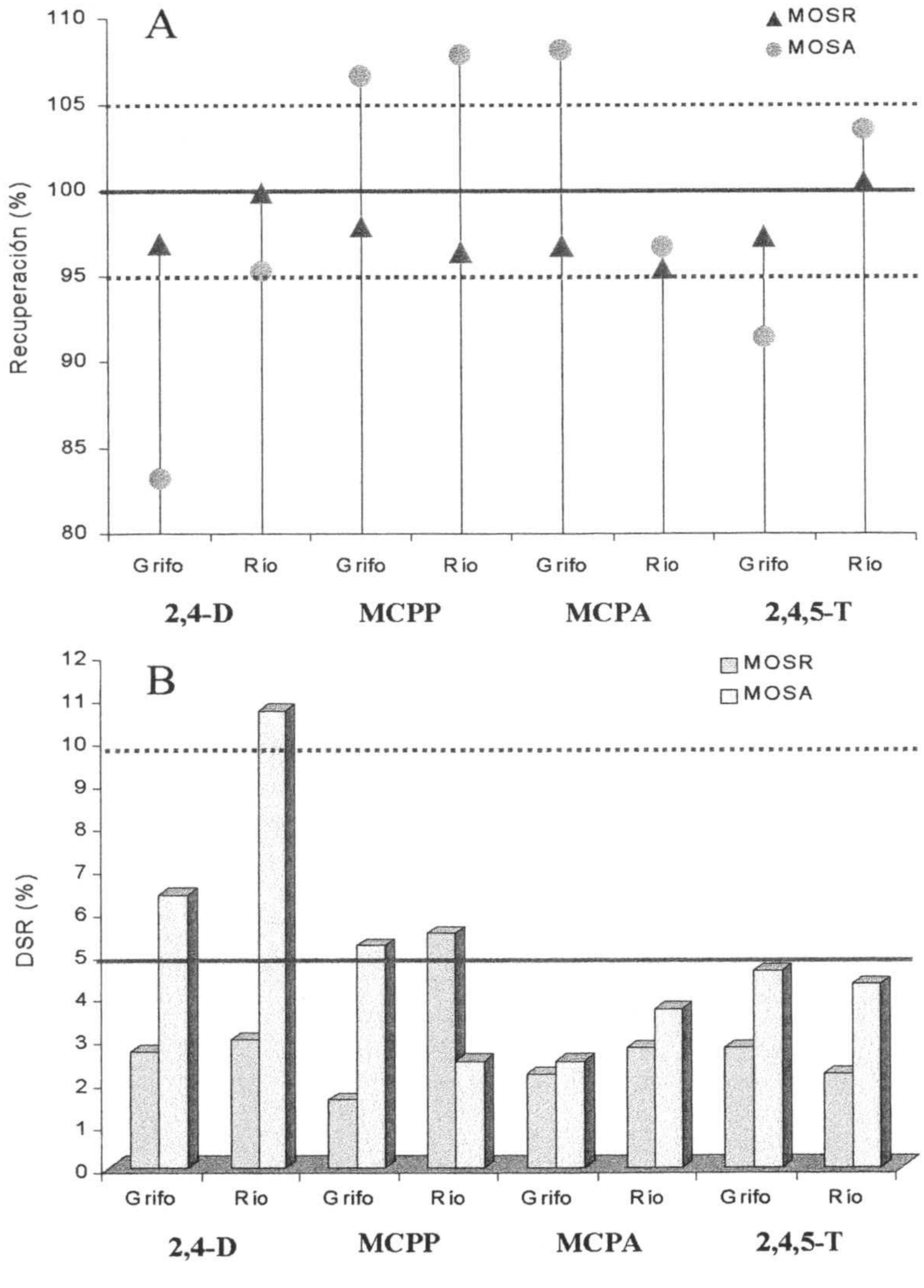


Figura IX.10.

Comparación de las recuperaciones (A) y las DSR (B) obtenidas mediante MOSA y MOSR.

Bloque II

ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo X

APLICACIÓN DE MOSR A LA DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS EN AGUAS A PARTIR DE CALIBRACIÓN BIVARIANTE

1. ANTECEDENTES

En la actualidad no se ha encontrado ningún antecedente de la aplicación de la metodología de cociente de pendientes (MOSR) utilizando calibrados bivariantes. Por ello, en este capítulo, vamos a aplicar esta metodología a la determinación de los 4 herbicidas (2,4-D, MCPP, MCPA y 2,4,5-T) estudiados en el capítulo anterior, en las mismas muestras. Los resultados obtenidos serán comparados con las estrategías de MOSA y MOSR a partir de calibrados univarientes.

2. PROCEDIMIENTO

2.1. Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados son de calidad analítica, los herbicidas clorofenoxiácidos suministrados por Sigma o Merck, el metanol por Acros Organics y el surfactante, cloruro del cetiltrimetilamonio (CTAC) (solución acuosa al 25% en peso) por Aldrich y las soluciones reguladoras por Fluka. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo utilizando agua destilada.

2.2. Equipos

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro, Kontron SFM-25, el cual poseía un programa de control y adquisición de datos. El voltaje seleccionado en la lámpara del equipo fue de 500 V.

Para la reacción de fotodegradación se utilizó una lámpara de mercurio de alta presión HBO Osram de 200 W conectada a una fuente Oriel modelo 8500. La cubeta para la reacción fue de cuarzo de 1 cm^2 modelo Hellma colocada a 45 cm de la lámpara.

2.3. Procedimiento analítico

Se prepararon disoluciones madre de los herbicidas clorofenoxiácidos por disolución en metanol y por dilución se obtuvieron las concentraciones siguientes: 140 mg/l para 2,4,5-T, 100 mg/l para 2,4-D y MCPP y 120 mg/l para MCPA. Las disoluciones de CTAC (4% para 2,4-D y MCPP, 5% para 2,4,5-T y 10% para MCPA) se prepararon por dilución con agua destilada.

Las muestras de agua de grifo y de río, tomadas al menos 24 h antes de su análisis, no han sido tratadas antes del análisis. La disolución de muestra se preparó diluyendo en agua destilada y añadiendo cantidades variables de las disoluciones de los herbicidas. Éstas concentraciones se muestran en la tabla 1 del Anexo C5 y son las mismas disoluciones que las utilizadas en el capítulo anterior.

Todas las disoluciones, además contienen 3 ml de una mezcla 50/50 v/v de metanol-disolución reguladora a pH 5 y las concentraciones de CTAC siguientes: 0,4% para 2,4-D, 1% para 2,4,5-T y 0,7% para MCPP y MCPA. El volumen final, en todos los casos fue 10 ml enrasando con agua destilada. Las disoluciones se agitaron ligeramente antes de la irradiación midiendo a continuación la señal PIF.

La reacción fotolítica fue realizada en una cubeta, irradiando con luz UV un volumen de 3 ml de la disolución del herbicida, con agitación mágnetica continúa a temperatura ambiente. Los tiempos óptimos de iiradiación son 15 min para 2,4-D, 13 min para 2,4,5-T, 2 min para MCPP y 3 min para MCPA. Todos los herbicidas muestran un máximo de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 270 nm y de emisión de 298 nm.

3. CALIBRACIÓN BIVARIANTE

El método del cociente de pendientes (MOSR) ha sido aplicado a la determinación de 4 herbicidas en aguas, para lo cual, en primer lugar, se seleccionó el tipo de diseño experimental para cada herbicida en cada una de las matrices a estudiar, que en éste caso fue el diseño central compuesto (2^2) con estrella. Dependiendo de la distancia del vertice de la estrella al punto central exiten tres variedades de estrella (Figura X.1): *Estrella Rotatable* con una distancia de 1,414, *Estrella Ortogonal* con una distancia de 1,078 y *Estrella Centrada* en las caras con una distancia de 1.

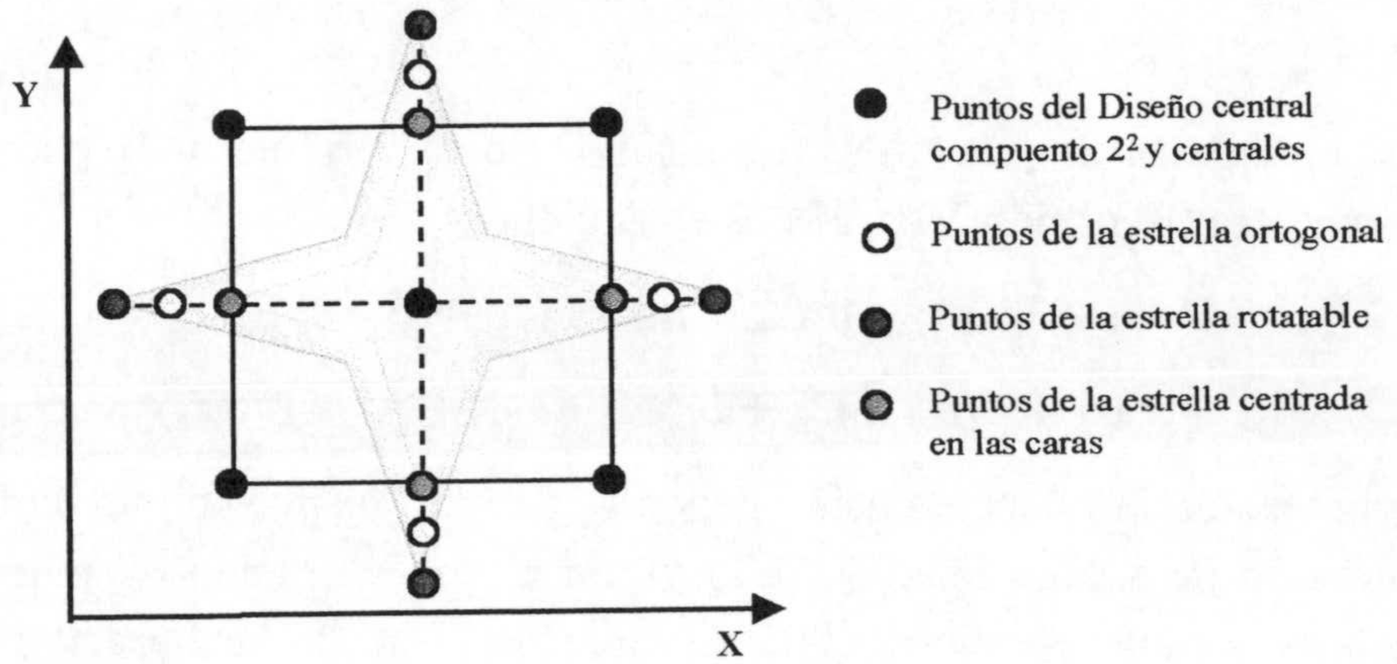


Figura X.1.

Diferencias entre el las estrellas rotatable, ortogonal y centrada en las caras del diseño central compuesto

Para llevar a cabo las experincias se han elegido dos de las posibles estrellas: estrella ortogonal y estrella centrada en las caras. A continuación se seleccionó los niveles de concentración de herbicida añadido (C_A) y de muestra (S) para cada aplicación (tabla 2 del Anexo C5), realizando las experiencias para cada una de ellas. Los resultados experimentales se muestran en las tablas 3, 4, 5 y 6 del Anexo C5 para los herbicidas 2,4-D, MCPP, MCPA y 2,4,5-T en los dos tipos de muestras respectivamente.

Utilizando la calibración bivariante para una variable respuesta (R), siendo las variables predictoras la concentración de herbicida añadido (C_A) y la concentración de muestra (S), se puede obtener los parámetros del modelo a partir de la ecuación general:

$$R = b_0 + b_1 \cdot C_A + b_2 \cdot S + b_3 \cdot S^2 + b_4 \cdot C_A \cdot S$$

Los coeficientes de regresión para cada una de las aplicaciones se muestran en la tabla 7 del Anexo C5.

4. DETECCIÓN DEL TIPO DE ERROR SISTEMÁTICO PRESENTE EN LA DETERMINACIÓN

El modelo bivariante que proponíamos en el capítulo VIII para el sistema analito-muestra (Ecuación VIII-23) es el siguiente:

$$\mathbf{R = (a + K \cdot b) + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot S\ (1+P \cdot S) + P \cdot b \cdot C_A \cdot S =}$$

$$\mathbf{= (a + K \cdot b) + b \cdot C_A + b \cdot X \cdot S + b \cdot X \cdot P \cdot S^2 + P \cdot b \cdot C_A \cdot S}$$

que representa la dependencia general de la respuesta analítica con la concentración de analito añadida (C_A) y con la concentración de muestra (S). Si identificamos cada término con el obtenido en la calibración bivariente obtenemos:

$$b_0 = a + K \cdot b; \quad b_1 = b; \quad b_2 = b \cdot X; \quad b_3 = b \cdot X \cdot P; \quad b_4 = P \cdot b$$

Se considera que un coeficiente es significativo cuando la variabilidad que aporta al modelo es significativa comparándola con la variabilidad debida al error experimental mediante el test de Snedecor. Aquellos coeficientes cuyo valor de P sea mayor del 5% son considerados no significativos.

En la Figura X.2 se muestran la significación de los coeficientes b_1 (A), b_2 (B), b_3 (BB) y b_4 (AB), pero además aparece otro coeficiente (AA) que es debido al cuadrado de la concentración de analito añadida, que no se considera en el modelo y como muestra la Figura X.2 nunca es significativo.

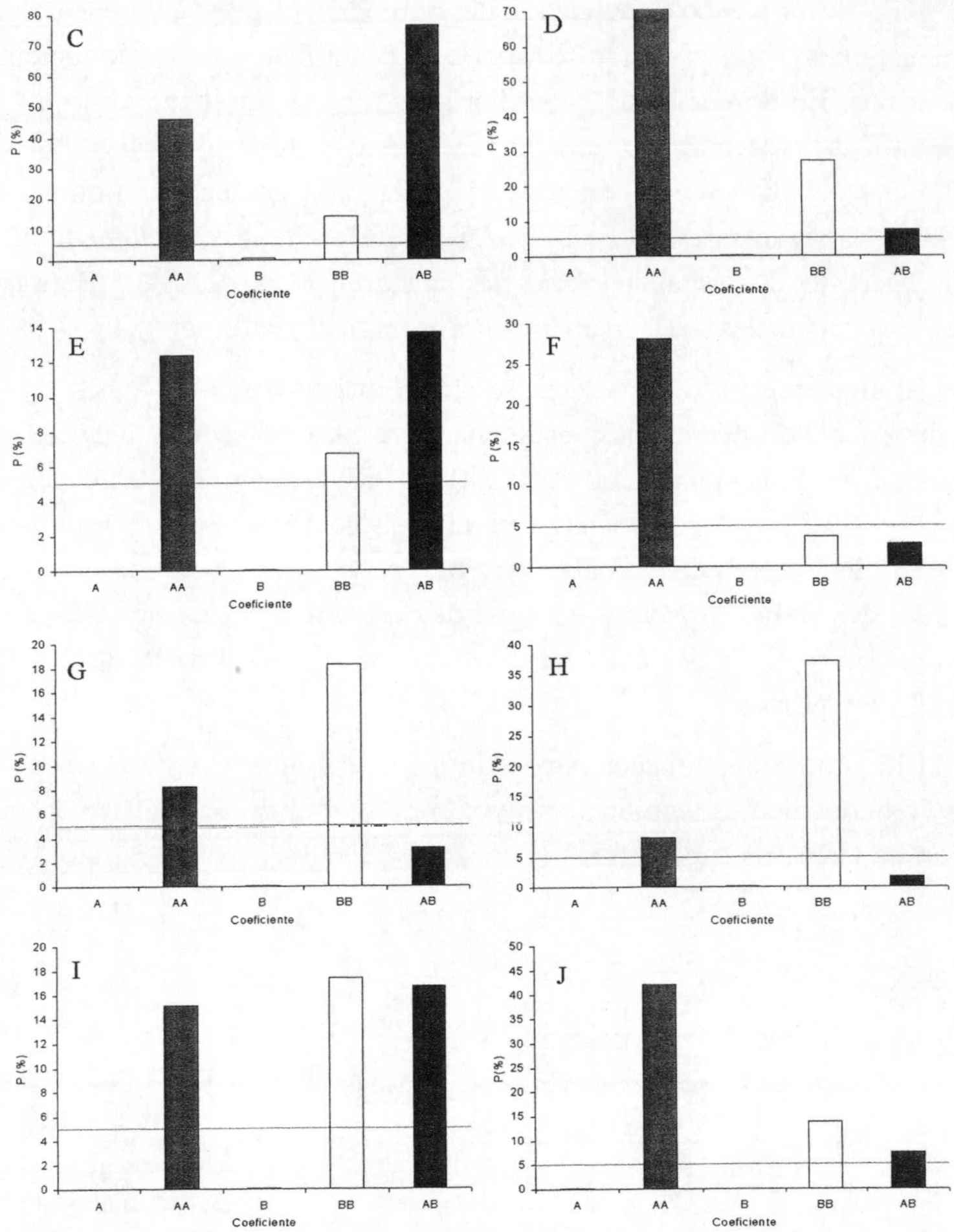


Figura X.2.

Representación de la significación de los coeficientes de regresión donde A=C_A, B=S, AA= C_A^2 , BB=S^2 y AB=$C_A \cdot S$ para C) 2,4-D en agua de grifo; D) 2,4-D en agua de río; E) MCPP en agua de grifo; F) MCPP en agua de río; G) MCPA en agua de grifo; H) MCPA en agua de río; I) 2,4,5-T en agua de grifo y J) 2,4,5-T en agua de río

Para llevar a cabo la detección del tipo de error presente en cada una de las determinaciones realizadas, se debe comprobar qué coeficientes son significativos. En primer lugar, se comprueba si b_3 es significativo, lo que pone de manificesto la presencia de errores sistemáticos proporcionales no saturados (CASO D.1). Solamente en una de las ocho aplicaciones se obtiene que éste coeficiente es significativo (P = 3,7%) y corresponde al herbicida MCPP en agua de río. El resto de las aplicaciones se ajustarán a los CASOS B (ausencia de errores proporcionales) o D.2 (errores proporcionales saturados).

El siguiente paso sería comprobar en qué aplicaciones b_4 es significativo. Tres, de las ocho aplicaciones, presentan éste tipo de error y corresponde a los herbicidas MCPP en agua de río (P = 2,8) y MCPA en agua de grifo (P = 3,2 %) y de río (P = 1,7 %). Como ya vimos en el capitúlo VIII, el modelo que se ajusta al CASO D.1 incluye los coeficientes b_3 y b_4, hecho que se pone de manifiesto en la aplicación del herbicida MCPP en agua de río. Pero si b_3 es significativo pero no b_4, estaremos en el CASO D.2, que es el que se adapta al herbicida MCPA en los dos tipos de matrices.

El resto de las aplicaciones están incluidos en el CASO B pues solamente tienen dos coeficientes significativos y son el b_1 y el b_2. La tabla X.1 muestra un resumen de los casos encontrados.

Tabla X.1.

Asignación del caso correspondiente a cada aplicación

CASOS		Aplicaciones
Ausencia de errores proporcionales	**B**	2,4-D en agua de grifo 2,4-D en agua de río MCPP en agua de grifo 2,4,5-T en agua de grifo 2,4,5-T en agua de río
Errores sistemáticos proporcionales no saturados	**D.1**	MCPP en agua de río
Errores sistemáticos proporcionales saturados	**D.2**	MCPA en agua de grifo MCPA en agua de río

5. ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE ANALITO Y SU INCERTIDUMBRE

En la aplicación de MOSR a partir de calibración bivariante, el contenido de analito en la muestra para los CASOS B y D.1 se calcula mediante el cociente de dos coeficientes de regresión del modelo bivariante. En el caso D.2, si embargo se calcula a partir de un coeficiente de regresión del modelo bivariante y la pendiente del calibrado AC.

Sólo para el herbicida MCPA en las dos matrices se necesita un calibrado AC para poder cuantificar la muestra. Éste calibrado AC se obtiene del propio diseño experimental, manteniendo constante la concentración de muestra S (al nivel del punto central) y seleccionando los puntos que tengan la misma concentración de muestra, en total para cada aplicación se obtienen 3 niveles de concentración y dos réplicas del punto central. Los datos experimentales y los coeficientes de regresión se muestran en la tabla 8 del Anexo C5.

En cuanto a la incertidumbre asociada al contenido de analito, en el caso del herbicida MCPA, una vez comprobado que las varianzas residuales del calibrado con el modelo difieren significativamente ($P < 5\%$) (Tabla 9 del Anexo C5) se calcula aplicando el teorema de Fieller siendo, en todos los casos, el parámetro g_{b1} o g_A menor que 0,05 (Tabla 9 del Anexo C5).

Los contenidos de analito junto con su incertidumbre asociada, las recuperaciones ($\Re$) y la precisión (RSD) asociada a cada determinación se muestran en la tabla X.2.

Los resultados obtenidos reflejan que MOSR con diseño experimental proporciona recuperaciones cercanas al 100% con sólo dos de ellas fuera del intervalo 95 – 105 %. En cuanto a la precisión es un poco más elevada que la obtenida con el método univariante, con valores próximos al 5% en la mayoría de los casos.

Tabla X.2

Contenido de analito, incertidumbre asociada, recuperación y precisión para las aplicaciones estudiadas utlizando MOSR con diseño experimental

Aplicación	$X_{añadido}$ (μg/g)	X (μg/g)	u(X) (μg/g)	ℜ (%)	RSD (%)
2,4-D (grifo)	7,20	6,92	0,96	96,1	13,8
2,4-D (río)	21,60	23,28	2,03	107,8	8,7
MCPP (grifo)	10,00	9,88	0,34	98,8	3,4
MCPP (río)	34,00	37,57	1,89	110,5	5,0
MCPA (grifo)	18,00	18,00	0,99	100,0	5,5
MCPA (río)	16,00	16,24	1,20	101,5	7,4
2,4,5-T (grifo)	14,50	14,41	0,73	99,4	5,1
2,4,5-T (río)	17,50	17,79	0,92	101,7	5,2

6. CONCLUSIONES

Comparando los resultados obtenidos de recuperación al aplicar las dos metodologías propuestas (MOSR a partir de calibrados univariante y bivariantes) con la metodología tradicional (MOSA), vemos que en la mayoría de los casos están próximas al 100 %, pero sólo con MOSR en ambas modalidades se obtiene que las recuperaciones están dentro de un intervalo entre 95 – 105 %, excepto dos de las aplicaciones que son 2,4-D y MCPP ambas en agua de río aplicando MOSR a partir de calibración bivariante que superan éste límite (Figura X.3). En cuanto a la precisión, MOSA a partir de la calibración bivariante proporciona en todos los casos una valor superior que las otras metodologías pero con metodología univariante es menor que la obtenida con MOSA.

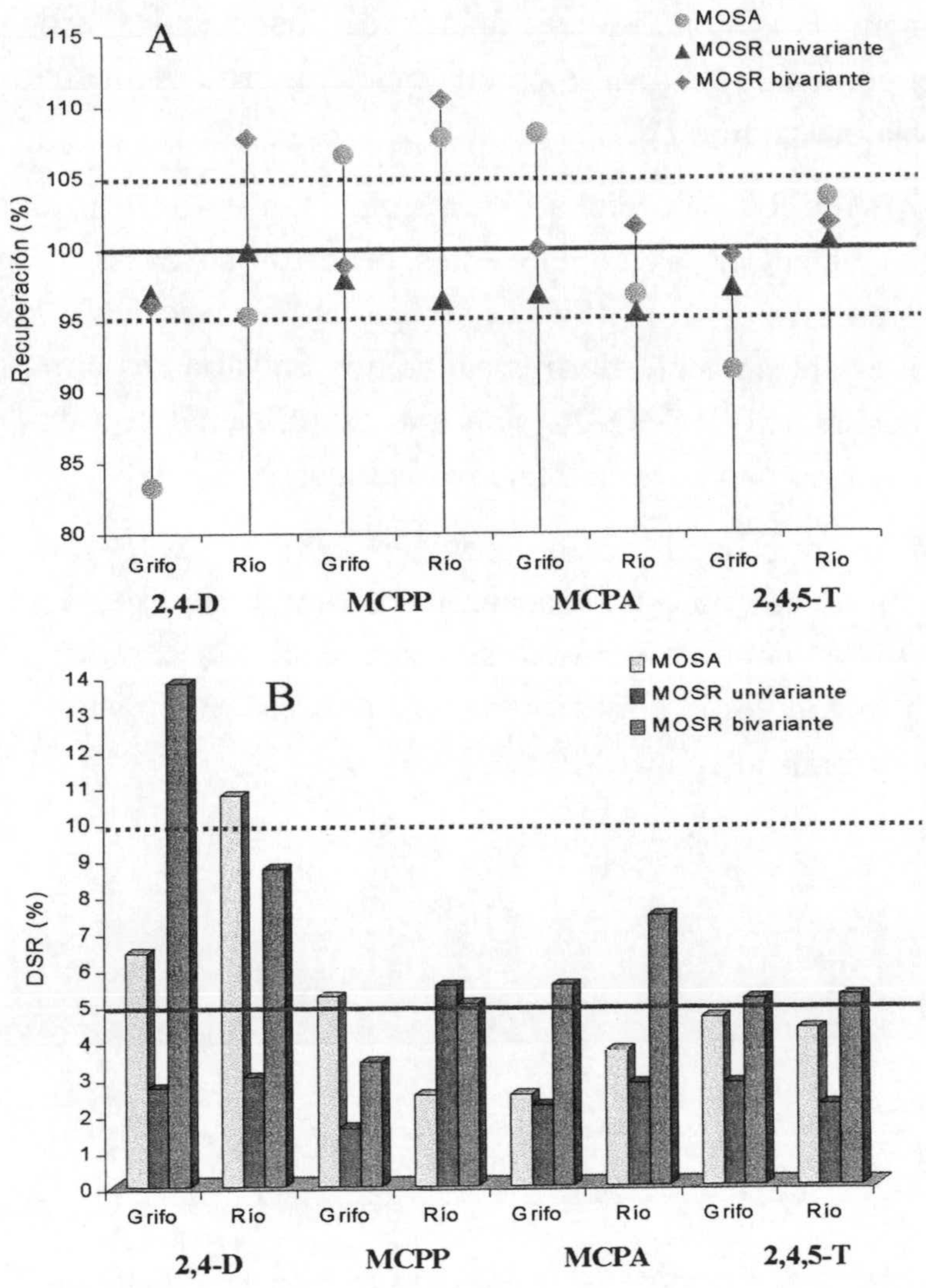


Figura X.3.

Comparación de A) recuperaciones y B) DSR obtenidas mediante MOSA y MOSR univariante y bivariante .

MOSR, en ambas modalidades, genera resultados libre del error sistemático debido al efecto matriz y permite una estimación fácil y correcta de la incertidumbre. Su aplicación proporciona algunas ventajas frente a la metodología tradicional (MOSA):

- En primer lugar, la simplicidad y rapidez de los cálculos asociados a la estimación del contenido de analito en una muestra, proporcionando, al mismo tiempo, una baja incertidumbre.
- Por otro lado, MOSR proporciona una disminución del trabajo experimental necesario para evidenciar las componentes de error sistemático constante y proporcional presentes en la matriz puesto que en la mayoría de los casos no es necesario el establecimiento de tres calibrados univariantes como ocurre en la aplicación tradicional de MOSA, sino que es suficiente con dos calibrados univariantes o incluso uno si es calibración bivariante.

Un inconveniente de la metodología MOSR a patir de calibración bivariante es que para cada muestra a analizar será necesario establecer un nuevo diseño experimental, aunque el número de experiencias necesarias es pequeño mayor que con la metodología univariante y en todo caso comparable al número de experiencias necesarias al aplicar MOSA.

Bloque II

ESTRATEGIAS PARA LA SUPRESIÓN DE ERRORES EN LA CUANTIFICACIÓN DEBIDO AL EFECTO MATRIZ

Capítulo XI

ESTABLECIMIENTO DE LA FUNCIÓN DE TOLERANCIA

1. ANTECEDENTES

La selectividad[1,2,3] mide la capacidad de un proceso analítico para producir señales que dependen casi exclusivamente del analito considerado presente en la muestra y es una propiedad cuya caracterización resulta difícil, dado que no existe un parámetro numérico aceptado para cuantificarla[4]. Así la selectividad es una propiedad que se puede graduar y no debe confundirse con la especificidad[5,6] que se refiere a la máxima selectividad y representa, por tanto, una propiedad absoluta.

Los errores sistemáticos debidos a la naturaleza de la muestra se deben a la existencia de uno o más componentes diferentes al analito que introducen cambios en la respuesta analítica y se denominan *interferentes*[7]. miestras que el error producido se le denomina habitualmente *interferencia* y puede ser constante, depender de la concentración de analito, depender de la concentración de interferente o depender de ambas concentraciones a la vez (interacción).

Por lo tanto, el interferente puede causar errores sistemáticos constantes, mediante una contribución a la señal independiente de la concentración de analito y errores sistemáticos proporcionales que modificación la sensibilidad como consecuencia de una interacción entre el analito y la matriz globalmente considerada, o entre analito y uno o más interferentes considerados individualmente. Su cuantificación requiere la estimación de niveles de tolerancia para cada una de las especies presumiblemente interferentes[8-10].

---

1. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd Edition, 1997.
2. Vessman J., Stefan R.I., Van Staden J.F., Danzer K., Lidner W., Burns D.T., Fajgelj A. and Müller H., *Pure Appl. Chem.*, 73, 1381-1386, 2001
3. WELAC Guidance Document No. WG D2 1st ed., EURACHEM/WELAC Chemistry, Teddington, 1993.
4. Valcárcel M. and Rios A., *Analusis*, 18, 469, 1990.
5. Persson B.A. and Vessman J., *Trends Anal. Chem.*, 20, 526-532, 2001.
6. Den Boef G. and Hulanicki A., *Pure Appl. Chem.*, 55, 554, 1983.
7. Wilson A.L., *Talanta*, 21, 1109-21, 1974.
8. Dadgar D. and Burnett P.E., *J. Pharm. Anal.*, 14, 23, 1995.
9. Vessman J., *J. Pharm. Anal.*, 14, 867, 1996.
10. Persson B.A., Vesman J. and McDowall R.D., *LG-CG Int.*, 11, 160, 1998.

Este estudio se realiza generalmente de forma univariante explorando, para una determinada concentración de analito la cantidad máxima de interferente en la disolución de trabajo que no genera un sesgo estadísticamente significativo en la determinación[11].

En este capítulo se presenta una alternativa multivariante que permite en un único experimento estudiar el comportamiento del interferente sobre todo el rango de concentraciones de analito cubierto por el calibrado. El empleo de esta metodología permite conocer los niveles de tolerancia de cada interferente considerando de forma simultánea sus efectos a los diferentes niveles de concentración de analito.

2. FUNCIÓN DE PREDICCIÓN

El modelo que se aplica a una regresión lineal sigue una ecuación de la forma: $R = a + b \cdot C_A$, donde la variable predictora, C_A, es la concentración de analito, R es la variable respuesta, a es el término independiente y b es la pendiente. En nuestro caso, sólo consideramos calibrados lineales aunque puede ser posible realizar el protocolo para calibrado curvos.

La Función de Predicción, PF, es característica del calibrado y viene determinada por los correspondientes planos hiperbólicos de predicción que se obtienen, en el espacio tridimensional de trabajo, por aplicación de la conocida ecuación derivada del análisis de la regresión[6]:

$$R = (a + b \cdot C_A) \pm t \cdot \sqrt{{s_{res}}^2 \cdot \left(1 + \frac{1}{n}\right) + {s_b}^2 \cdot {d_C}^2} \qquad \text{(XI-1)}$$

donde t es el valor del estadístico t-Student para un 95% de confianza y n-2 grados de libertad, s_{res} es la desviación estándar residual, n es el número de parejas de valores, s_b es la desviación estándar de la pendiente y $d_C = (C_A - \overline{C}_A)$ es la distancia (en unidades de concentración de analito) desde el valor de la

11. García Campaña A.M., Cuadros Rodríguez L., Jiménez Linares C., Alés Barrero F. and Román Ceba M., *Anal. Lett.*, 28, 369, 1995.

concentración de analito considerada, C_A, hasta el valor medio, $\overline{C}_A$, de las concentraciones utilizadas para establecer el calibrado.

La Función de Predicción determina los valores umbrales a partir de los cuales se puede considerar la interferencia como significativa. La ecuación anterior, que tiene la forma de un intervalo de predicción, genera dos soluciones que corresponden a las dos ramas de hipérbola. La rama superior (o incremento positivo) se obtiene al tomar el segundo miembro de la ecuación con el signo (+) y la rama inferir (incremento negativo), al tomar el segundo miembro de la ecuación con el signo (–) (Figura XI.1A).

Si la interferencia es positiva se obtendrá siempre una respuesta mayor a la predicha por el calibrado y entonces es necesario tomar la rama superior como criterio-umbral para caracterizar la interferencia positivo; al contrario, si la interferencia es negativa, respuesta es menor a la predicha por el calibrado y debe tomarse la rama inferior para hacer el estudio del interferente negativo.

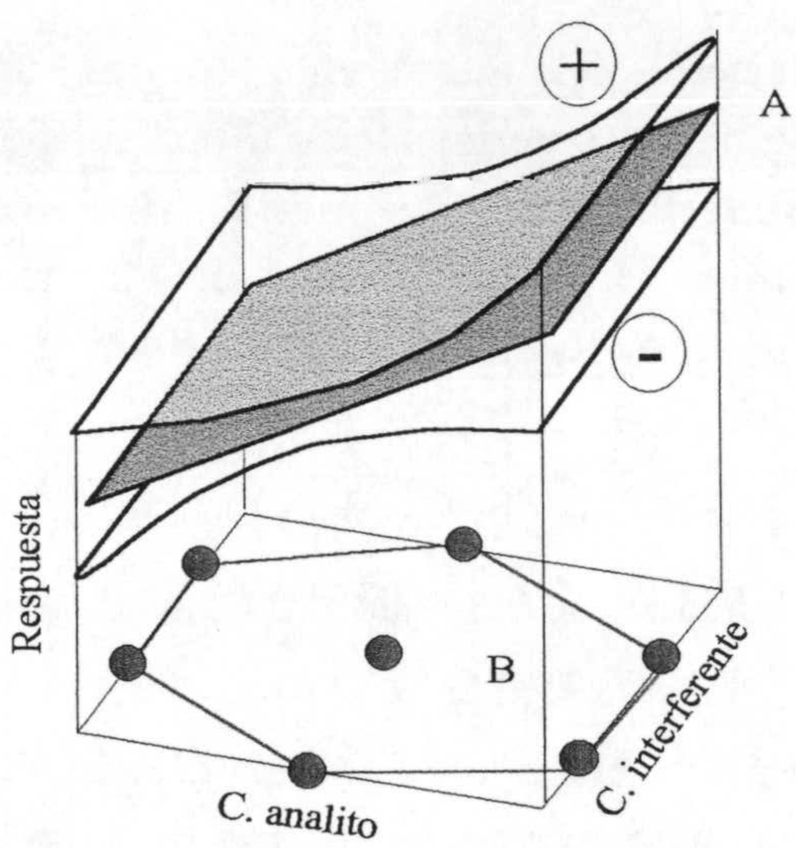


Figura XI.1.

Representación de A) plano de calibrado y curvas de predicción, y B) puntos definidos por el diseño experimetal (Doehlert)

3. SUPERFICIE DE RESPUESTA INTERFERENTE

La estrategia que se propone para la determinación del nivel de tolerancia de un analito, frente a un determinado interferente, está basada en la aplicación de la metodología de superficies de respuesta (RSM). En nuestro caso, para hacer el estudio experimental, hemos elegido aplicar los diseños Doehlert[12].

El tamaño del diseño se elige de forma que cubra el rango de concentraciones de analito incluidas en el calibrado (Figura XI.1B), mientras que se selecciona un intervalo de concentraciones de interferente no excesivamente amplio y tomado a partir de valores próximos al esperado nivel de tolerancia (conocidos por información previa del sistema que ha de estar disponible). En dicho diseño, la variable "concentración de analito" se estudia a 3 niveles (bajo, medio y alto sobre el rango determinado por el calibrado[13]) y la variable "concentración de interferente" a 5 niveles ya que, si lo que pretendemos es modelar su comportamiento para después inferir con el modelo encontrado, cuanto mayor sea la información estadística disponible, tanto mejor.

El comportamiento del interferente (o los interferentes) se modela ajustando la matriz de datos experimentales a una función polinómica cuadrática que denominamos **Superficie de Respuesta Interferente** (*IRS, Interference Response Surface*), que es característica del interferente (o interferentes) incluido(s) en ella matriz experimental. Esta función viene dada en términos generales por la ecuación:

$$R = b_0 + b_1 \cdot C_A + b_2 \cdot C_A^2 + b_3 \cdot C_I + b_4 \cdot C_I^2 + b_5 \cdot C_A \cdot C_I \qquad \text{(XI-2)}$$

donde b_i son los coeficientes de regresión y C_A y C_I son las concentraciones de analito e interferente respectivamente.

La calidad del ajuste entre los datos experimentales y la función teórica se evalúa estadísticamente mediante el usual test de fallo de ajuste (lack-of-fit F-test), que indica la probabilidad de que las diferencias encontradas entre los valores experimentales y los predichos por la función cuadrática (valores residuales) sean debidas a errores de tipo aleatorio.

---

12. Doehlert D.H., *Appl. Statist.*, 19, 231, 1970.
13. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M. and Bosque Sendra J.M., *Anal. Lett.* 29, 1231, 1996.

4. FUNCIÓN DE TOLERANCIA

La Función de Tolerancia es una curva que representa la intersección entre la Superficie de Respuesta Interferente y la Función de Predicción. Su expresión viene dada por una función de dos variables, concentración de analito (C_A) y concentración de interferente (C_I) obtenida igualando las expresiones de PF (Ecuación IX-1) y ISR (Ecuación XI-2):

$$b_0+b_1\cdot C_A+b_2\cdot C_A{}^2+b_3\cdot C_I+ b_4\cdot C_I{}^2+ b_5\cdot C_A\cdot C_I =$$

$$= a + b\cdot C_A \pm t\cdot[s_{res}{}^2\cdot(1+1/n)+s_b{}^2\cdot d_C{}^2]^{1/2} \qquad \text{(XI-3)}$$

Esta función permite calcular la concentración de tolerancia del interferente en estudio a cualquier concentración de analito.

5. PROTOCOLO PROPUESTO

El protocolo propuesto para el establecimiento de la Función de Tolerancia requiere la consecución de las siguientes etapas (Figura XI.2):

✓ *Establecimiento del calibrado con patrón externo (EC).* Se obtiene la relación Respuesta – Concentración de analito.

✓ *Cálculo de la Función de Predicción, PF.* Para el calibrado EC establecedido se calcula la Función de Predicción, PF, característica dada por la ecuación XI-1, seleccionando como criterio-umbral para caracterizar la interferencia la rama superior, si la interferencia es positiva y la inferior si es negativa.

✓ *Establecimiento del diseño y realización del trabajo experimental.* Para hacer el estudio experimental seleccionamos, para el diseño Doehlert, el rango de concentraciones de analito, generalmente el mismo que el del calibrado EC, y el rango concentraciones de interferente.

✓ *Estimación de la Superficie de Respuesta Interferente, IRS.* Una vez realizado el trabajo experimental y obtenidas las correspondientes respuestas, se

modela el comportamiento del interferente ajustando la matriz de datos experimentales a una función polinómica cuadrática mediante la ecuanción XI-2.

✓ La *calidad del ajuste* entre los datos experimentales y la función teórica se evalúa estadísticamente mediante el usual test de fallo de ajuste. Si se obtiene una conclusión significativa (P < 5 %), (*i.e.*, el modelo no ajusta los puntos experimentales) es necesario comprimir o expandir el diseño, para ello se disminuye o aumenta el intervalo de concentraciones de interferente, p.e. a la mitad, se realiza un nuevo trabajo experimental y se estima una nueva IRS. El proceso se repite tantas veces sea necesario hasta que se obtenga un ajuste bueno.

✓ *Cálculo de la Función de Tolerancia, TF.* Una vez obtenidas las expresiones de IRS y PF, se combinan ambas ecuaciones para calcular la Función de Tolerancia, TF, característica de cada interferente (Ecuación XI-3).

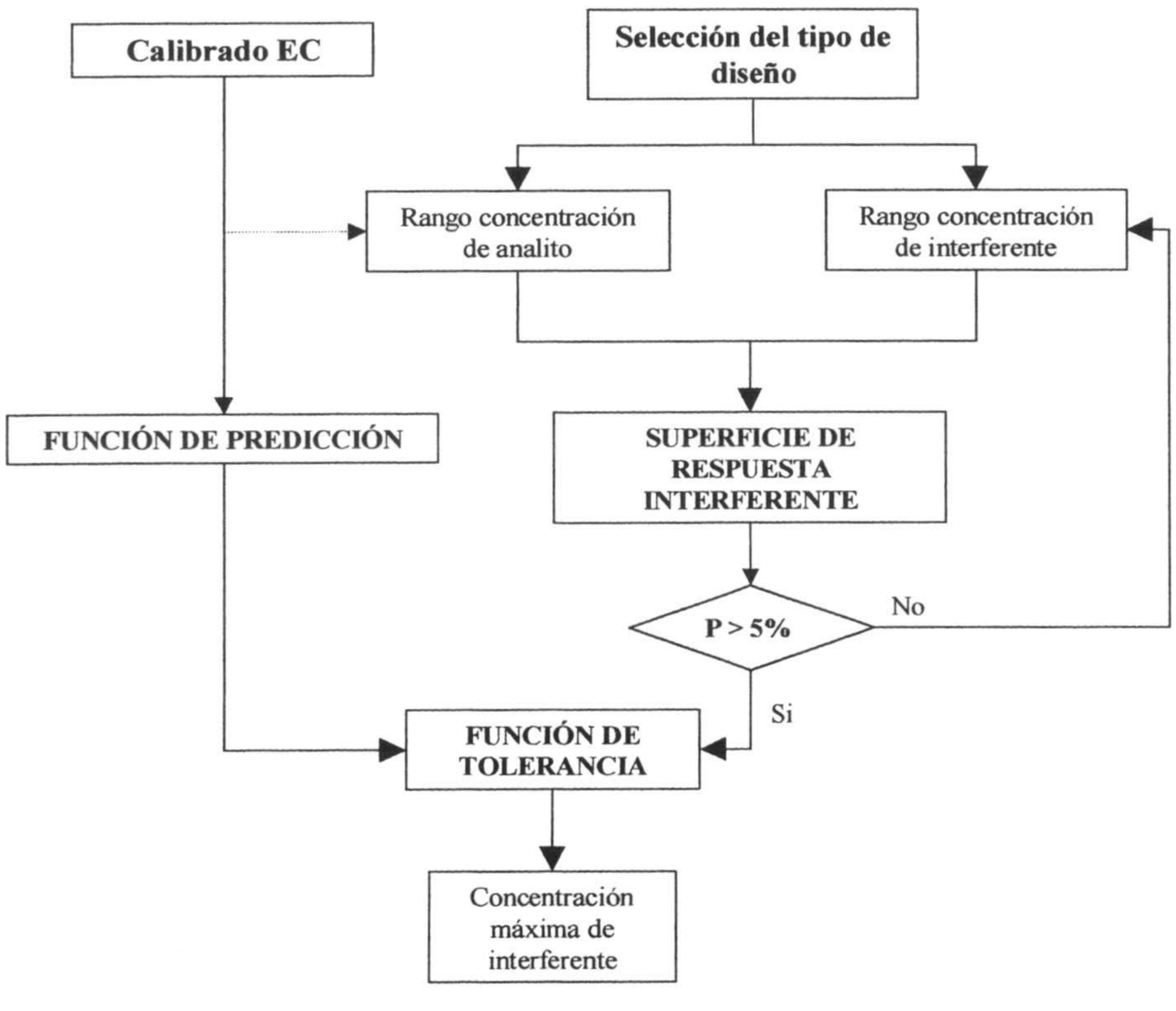


Figura XI.2.

Diagrama de flujo para el establecimiento de la Función de Tolerancia

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Reactivos y materiales

Todos las experiencias se llevaron a cabo con reactivos analíticos de grado químico y agua Milli–Q.

Rojo de alizarina S (10^{-3} M), suministrada por Merk, se preparó pesando exactamente 0,091 g del reactivo y diluyendo a 250 ml con agua Milli–Q. La disolución de EDTA (0,1 M), siministrada por Riedel–de Haën, se preparó de la sal disódica del ácido etilen-diamino-tetraacético pesando exactamente 3,722 g del reactivo y diluyendo a 100 ml con agua Milli–Q.

Las disoluciones de Boro (1000 mg/l), suminstrada por Probys, fueron preparadas a partir del reactivo $B_4O_7Na_2 \cdot 10H_2O$ diluyendo con agua Milli–Q. Las disoluciones de Hierro (1000 mg/l), suministrada por Merk, fueron preparadas a partir de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ diluyendo con agua Milli–Q. Las disoluciones de Aluminio (1000 mg/l), suministradas Pro analysi, fueron preparadas a partir de $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ diluycndo cn agua Milli–Q. Las dc Fluoruro (25 g/l), sumisnistradas por Panreac, fueron prepadas a partir de NaF en agua Milli–Q. Más diluyen que las soluciones fueron preparadas por diluciones apropiadas con agua de Milli–Q.

Las disoluciones reguladoras a pH 7,.4 fueron preparadas a partir de 0,1 M de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ y 0,1 M de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, ambas suministradas por Pro analysi.

6.2 Equipos

La señal de fluorescencia se obtuvo con un espectrofluorímetro modelo Perkin–Elmer MPF–66, equipado con una lámpara de xenón de 150 W y un fotomultiplicador R–928. El espectrofotómetro estaba conectado a un ordenador modelo Perkin–Elmer 7300 Profesional provisto de un software PETLS (C 646–0280).

Todas las medidas se realizaron en cubeta de cuarzo de 10 nm termostatadas a 25,0 ± 0,5 ºC con baño de agua modelo Frigiterm S–382.

El pHmetro utlizado para controlar el pH fue un Crison modelo Digit–501.

6.3 Procedimiento analítico

Para ilustrar la estrategia propuesta, su utilizó el sistema analítico descrito para la determinación espectrofluorimétrica de B(III) en aguas siguiendo en procedimiento recomendado por García Campaña[14] y colaboradores. Se eligieron tres interferentes, de los cuales dos de ellos (los iones Al^{3+} y F^-) producían una interferencia positiva, y el tercero (el ion Fe^{3+}) generaba una interferencia negativa.

Con objeto de facilitar el seguimiento del protocolo, se decidió realizar independientemente el estudio de cada interferente a fin de que el tratamiento completo se moviese en un espacio tridimensional, dado por las variables: Respuesta – Concentración de analito – Concentración de interferente, representándolo en la misma figura.

Previamente, se establece un calibrado con patrón externo (EC) a partir de 10 ml de disoluciones que contienen 0, 0,5, 1, 1,5, 2 ml de disolución de B(III) de 5 mg/l, a las que se le añade 1 ml de EDTA 0,1 M, 1,5 ml Alizarina S (10^{-3} M) y 2 ml de tampón de pH 7,4 y se completa con agua Milli–Q. Se realizaron dos réplicas por cada valor de concentración de analito. Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizaron a longitudes de onda constantes de 423 nm para la excitación y 593 nm para la emisión, manteniendo ambas rendijas de excitación y emisión a 15 nm y un tiempo de integración de 8 s.

Para la realización de cada uno de los experimentales se varía la concentración de B(III) entre 50-1000 µg/l a tres niveles, y las concentraciones de interferente a 5 niveles, entre 1-250 mg/l para los iones Fe^{3+} y Al^{3+}, y entre 1-10 g/l para el ion F^-; añadiendo las mismas cantidades de los demás reactivos (EDTA, Alizarina S y tampón), manteniendo las condiciones instrumentales, descritas para el calibrado.

---

14. García Campaña A.M., Alés Barrero F. and Román Ceba M., *Analyst*, 117, 1189, 1992.

7. ESTIMACIÓN DE LA FUNCIÓN DE TOLERANCIA PARA LAS INTERFERENCIAS Fe^{3+}, Al^{3+} Y F^-

7.1. Función de predicción

En primer lugar, se establece un calibrado EC con dos réplicas por cada valor de concentración de analito en un intervalo de 0 a 1000 µg/l. En la Tabla 1 del Anexo C6 se muestra las señales de fluorescencia (F) obtenidas para cada valor concentración de boro (C_B), junto con los correspondientes parámetros estadísticos del calibrado.

La Función de Predicción (PF) del calibrado lineal, viene dada por la expresión:

$$F = 183{,}01 + 0{,}153 \cdot C_B \pm 2{,}306 \cdot \sqrt{1{,}086 + 7{,}9 \cdot 10^{-7} \cdot (C_B - 500)^2}$$

En éste caso, la ecuación se puede simplificar ya que $s_b^2 \cdot d_C^2 << s_{res}^2 \cdot (1+1/n)$, y por tanto se obtienen que la Función de Predicción es:

$$F = 183{,}01 + 0{,}153 \cdot C_B \pm 2{,}403$$

7.2. Superficie de Respuesta Interferente

Para la realización de cada uno de los experimentales, se ha seleccionado el diseño Doehlert, originalmente regular y dispuesta alrededor de un hexágono, y se ha deformado alargando las coordenadas de los extremos en el eje de la concentración de analito (los valores originales de ± 0,867 se convierten en ± 1), con objeto de utilizar unos valores codificados más asequibles experimentalmente[15].

Para la **experiencia de Fe^{3+}**, se obtuvo una Superficie de Respuesta Interferentes, estimadas a partir de los datos indicados en la tabla 2 del Anexo C6,

15. Nechar M., Molina Molina M.F., Cuadros Rodríguez L. and Bosque Sendra J.M., *Anal. Chim.*

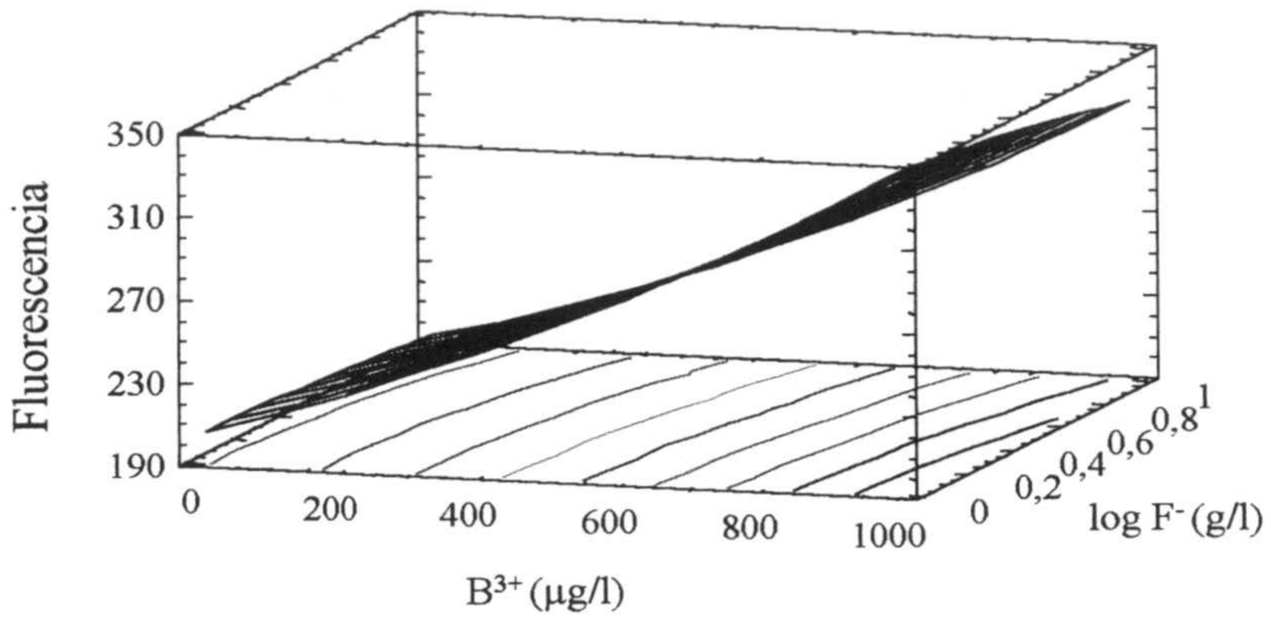


Figura XI.5.

Superficie de respuesta interferente para F^-

7.3. Función de tolerancia

Cada una de las Funciones de Tolerancia se obtienen igualando la señal de flurescencia de la Superficie de Respuesta Interferente con la Función de Predicción, es decir la TF sería una ecuación que representa la línea de corte de ISR con FP. En la Figura XI.6 se muestra las TF obtenidas para las interferencias del Fe^{3+}, Al^{3+} y F^- en el espacio original tridimensional, siendo éstas TF:

***Hierro (interferencia negativa)*:**

$$1{,}9\cdot10^{-3}\cdot C_{Fe}^{\,2} + 3{,}1\cdot10^{-5}\cdot C_B^{\,2} - 0\cdot97\cdot C_{Fe} - 5\cdot3\cdot10^{-2}\cdot C_B - 4{,}3\cdot10^{-4}\cdot C_B\cdot C_{Fe} + 49{,}62 = 0$$

***Aluminio (interferencia positiva)*:**

$$2{,}9\cdot10^{-3}\cdot C_{Al}^{\,2} + 1{,}4\cdot10^{-4}\cdot C_B^{\,2} - 1{,}27\cdot C_{Al} + 3{,}0\cdot10^{-3}\cdot C_B - 7{,}4\cdot10^{-4}\cdot C_B\cdot C_{Fe} - 70{,}43 = 0$$

***Fluoruro (interferencia negativa)*:**

$$10{,}4\cdot\log^2(F) - 4{,}8\cdot10^{-5}\cdot C_B^{\,2} - 0{,}30\cdot\log(F) + 0{,}06\cdot C_B + 0{,}013\cdot C_B\cdot\log(F) - 20{,}07 = 0$$

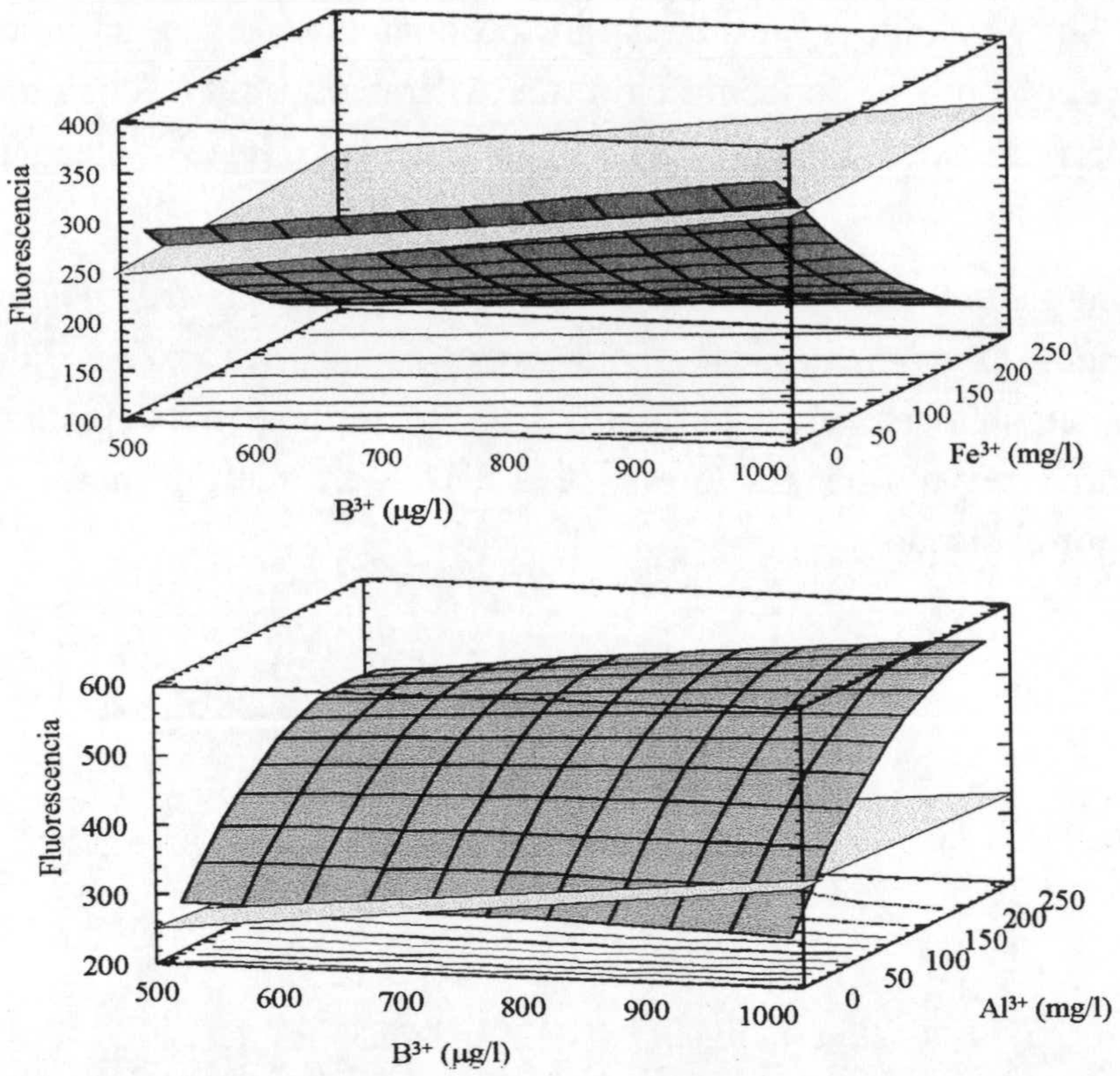


Figura XI.6.

Intersección de la Superficie de Respuesta Interferente y la Función de Predicción para A) Fe^{3+}, B) Al^{3+} y C) F^-

A partir de éstas ecuaciones se puede conocer la concentración de cada interferente que admite el sistema sin producir un sesgo significativo en la respuesta (denominada concentración de tolerancia), para cualquier valor de concentración de boro incluida dentro del intervalo lineal determinado por el calibrado.

En la Figura XI.7 se encuentran representadas las tres TF en el espacio bidimensional. Obviamente las anteriores ecuaciones tienes dos posibles soluciones matemáticas, en esta figura sólo se representan aquellas que tienen sentido químico, ya que las otras se salen fuera del dominio experimental explorado por el diseño.

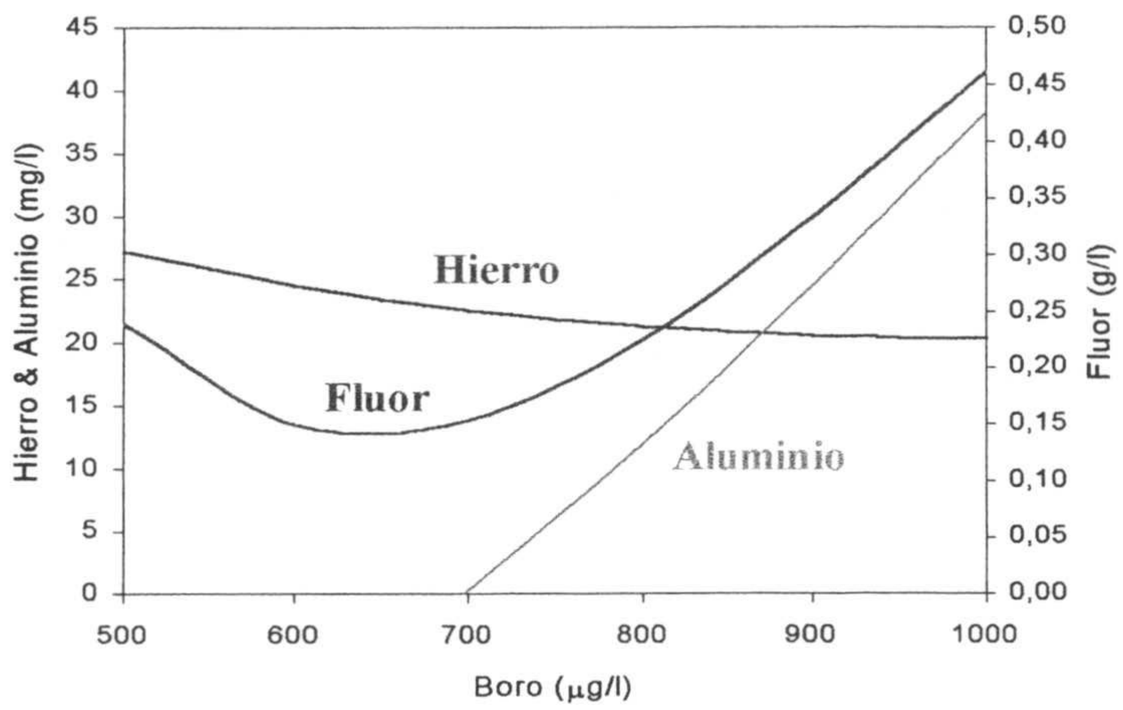


Figura XI.7.

Funciones de Tolerancia para las interferencias de Fe^{3+}, Al^{3+} y F^-

8. CONCLUSIONES

A partir de la forma de las curvas dadas en la figura XI.7, podemos obtener información cualitativa sobre el mecanismo de interferencia, en función de que la máxima tolerancia se encuentre en la parte alta o baja del calibrado y de la forma

de la curva. En este sentido, y utilizando los ejemplos estudiados, podemos hacer las siguientes consideraciones:

① ***Hierro:*** Al quedar la Superficie de Respuesta Inerferente (Figura XI.6) por debajo del plano de calibración se produce una interferencia negativa del hierro. Además al aumentar la concentración de boro el nivel de tolerancia hacia el hierro disminuye por lo que resulta "más afectada" la parte alta del calibrado (Figura XI.7). La interferencia del hierro de produce porque este ion reacciona con el reactivo (Alizarina S) para dar un complejo no-fluorescente muy robusto (interferencia negativa) que secuestra reactivo del medio. Esta reacción compite con la correspondiente del boro y por ello, al aumentar la concentración de éste, los requerimientos de reactivo son mayores y aumenta la interferencia.

② ***Aluminio:*** Al contrario que el caso anterior, el Al^{3+} produce una interferencia positiva. En la Figura XI.7 se observa que por debajo de 700 μg/l de boro, la tolerancia hacia el aluminio es nula y cualquier cantidad de éste último genera interferencia, mientras que la tolerancia aumenta al aumentar la cantidad de boro a partir del valor señalado en relación casi lineal. El aluminio da lugar a otro complejo con alizarina S, que también es fluorescente, por lo que la señal de fluorescencia aumenta (interferencia positiva); aunque dado que éste es menos robusto que el de boro, conforme aumenta la concentración de éste último disminuye la formación del complejo Alizarina-Al y la interferencia se hace menor (aumenta la tolerancia).

③ ***Fluoruro:*** Su comportamiento es más difícil de explicar, ya que, aunque la interferencia es siempre positiva, la TF presenta un perfil que combina los correspondientes a los anteriores interferentes (Figura XI.7). El ion fluoruro forma con boro un compuesto covalente de fórmula BF_4 que se puede coordinar con el reactivo para dar lugar a un complejo ternario fluorescente (por ello la interferencia es positiva). La formación de dicho complejo ternario aumenta con la concentración de boro por lo que disminuye la tolerancia hasta un valor (alrededor de 650 μg/l) en que se invierte la tendencia, posiblemente debido a que se rebasan las condiciones de formación del complejo ternario.

CONCLUSIONES

En el primer y segundo capítulo (**método de Job y Yoe Jones**) hemos propuesto una metodología simple y rigurosa para la determinación de la estequiometría y la constante de formación y sus correspondientes incertidumbres, utilizando para ello tres modelos de regresión diferentes aplicados a las distintas partes de la curva obtenida: regresión lineal por mínima mediana de cuadrados, regresión lineal por mínimos cuadrados y regresión polinómica por mínimos cuadrados.

De la aplicación de la metodología propuesta se deduce que para complejos de estequiometrías 1:1 o 2:1, es más adecuado la elección del método de Job para el cálculo de la estequiometría y de la constante de formación, ya que éste método abarca un intervalo mayor de grados de disociación a los que pueda ser aplicado aunque el rango de desviación estándar de repetibilidad sea menor que el del método de Yoe Jones. Pero en el caso de tener un complejo cuya estequiometría sea 3:1 es conveniente la aplicación del método de Yoe Jones, pues se ha comprobado que el método de Job no ofrece resultados concluyentes debido a la proximidad de la estequiometría 4:1.

Otro aspecto a tener en cuenta, es que, en ambos métodos, para obtener un valor de incertidumbre asociada a la constante de formación aceptable es necesario la realización de un gran número de experiencias, sobre todo en la zona de curvatura, pues en caso contrario la desviación estándar relativa asociada a la constante de formación será muy elevada. Sin embargo, si el objetivo del estudio es solamente obtener la estequiometría del complejo no será necesario que el número de datos experimentales sea tan elevado, ya que las zonas lineales pueden ser delimitadas con un número reducido de puntos, aunque en este caso el intervalo de punto de corte de las rectas podría incluir más de una estequiometría, debiendo en este caso aumentar el número de experiencias.

Esta metodología propuesta para el cálculo de la estequiometría no sólo es válida y aplicable a estos dos métodos, sino que es un procedimiento que debería ser aplicado a cualquier problema, tanto químico como físico, en el que se quiera obtener un valor por intersección dc dos líneas rectas.

En el caso de la metodología propuesta para el **método de Benesi-Hildebrand** (capítulo III), los métodos computacionales, como bootstrap y jackknife, son dos herramientas poderosas en la evaluación de datos experimentales en situaciones complicadas. Aunque los cálculos pudieran ser complicados y tediosos, existen algunos paquetes estadísticos de alta calidad que pueden utilizarse para éste propósitos.

Nosotros hemos aplicado seis métodos (teorema de Fieller, bootstrap RC, bootstrap RR, jackknife, jackknife-bootstrap y bootstrap-jackknife) utilizando regresión recíproca simple para determinar la constante de formación del complejo de inclusión HP–β–CD:2,4–D, obteniendo que todos los métodos son aplicables al problema propuesto. Pero es importante destacar que, aunque todos los métodos proporcionan constantes de estabilidad similares, la incertidumbre menor se ha obtenido con el método bootstrap RR, el cual los hemos considerado el más apropiado en términos de exactitud en el valor estimado.

La metodología de corrección del efecto matriz, basada en el uso de **Funciones de Corrección**, proporciona una manera rápida y barata de llevar a cabo análisis en rutina sin necesidad de preparar calibraciones en matriz, cuando están presentes errores sistemáticos constantes y/o proporcionales.

El uso de extractos de blanco matriz para preparar curvas de la calibración conlleva desventajas económicas derivadas del material consumible, la mano de obra y el tiempo de análisis. Sin embargo, una disminución del costo en dinero y tiempo implica un aumento de la incertidumbre del resultado. No obstante, en todos los casos, esta disminución es rentable dado que el incremento de la incertidumbre es insignificante.

La aplicación correcta de la metodología de adición de patrón en el análisis de muestras reales implica el establecimiento independiente de al menos tres curvas de calibrado: EC (calibrado de patrón externo), YC (calibrado de Youden), y AC (calibrado de adición de patrón) o MC (calibrado en presencia de matriz). Aplicando la metodología clásica de MOSA es posible obtener el contenido de analito en una muestra, así como la precisión asociada al resultado. Sin embargo, la aplicación del **método del cociente de pendientes** (MOSR) proporciona un

método alternativo para la obtención de este resultado a partir del cociente de la pendientes de los correspondientes calibrados YC y AC (o YC y EC si no hay existe la componente constante de error sistemático).

La aplicación correcta de la metodología propuesta (MORS) en sus dos modalidades (calibración univariante y bivariante) genera resultados libre del error sistemático debido al efecto matriz y permite una estimación fácil de la incertidumbre. MOSR proporciona varias ventajas frente a la metodología tradicional (MOSA), como son la simplicidad y rapidez de los cálculos asociados a la estimación del contenido de analito en una muestra, proporcionando, al mismo tiempo, una baja incertidumbre, y una disminución del trabajo experimental necesario para evidenciar las componentes de error sistemático constante y proporcional presentes en la matriz.

Un inconveniente de la metodología MOSR con calibración bivariante es que para cada muestra a analizar será necesario establecer un nuevo diseño experimental aunque el número de experiencias necesarias es pequeño, más grande que con la metodología univariante y en todo caso comparable al número de experiencias necesarias al aplicar MOSA.

La estimación de la **Función de Tolerancia** para estudiar el comportamiento de un interferente sobre todo el rango de concentraciones de analito cubierto por el calibrado, nos permite conocer los niveles de tolerancia del interferente en estudio, considerando de forma simultánea sus efectos a los diferentes niveles de concentración de analito. Obviamente el problema de conocer los niveles de tolerancia simultáneamente para cada concentración de analito requiere una metodología multivariante y cualquier metodología de modelado y regresión podría ser factible.

Además, este enfoque múltiple es especialmente recomendable ya que existen interacciones entre los efectos correspondientes a cada interferente, es decir los niveles de tolerancia no son independientes. Así, cada interferencia caracterizada por una contribución de error sistemático se suma a la generada por el resto de interferentes (con su correspondiente signo) siendo las concentraciones de tolerancia de cada uno de ellos depediente de la concentración presente de los demás.

ANEXOS

A. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Generales

	Significado
ANCOVA	Análisis de la covarianza
ANOVA	Análisis de la varianza
g	Parámetro incluido en el cálculo de la incertidumbre por el teorema de Fieller
k	Factor de cobertura
LMSR	Regresión por mínima mediana de cuadrados
LSR	Regresión por mínimos cuadrados
LSPR	Regresión polinómica por mínimos cuadrados
ν	Grados de libertad
n	Número de datos experimentales
PIF	Intensidad de fluorescencia fotoinducida
Q_{x^2}	Suma de cuadrados corregida de x
Q_{y^2}	Suma de cuadrados corregida de y
Q_{xy}	Suma corregida de productos cruzados de x e y
RSM	Metodología de superficie de respuesta
s_{res}	Desviación estándar residual
T	Tiempo de irradiación
u	Incertidumbre

Bloque I

	Significado
a, b y c	Parámetros de regresión
α	Grado de disociación
C_M	Concentración de metal M
C_L	Concentración de ligando L
CD	Ciclodextrinas
C_{CD} y C_S	Concentraciones analíticas de CD y S
cov(b,a)	Covarianza entre los parámetros de regresión a y b
F_S, F_{CD} y $F_{S\text{-}CD}$	Intensidades de fluorescencia del substrato libre de CD libre y del complejo
ΔF	Intensidad de fluorescencia debido al complejo de inclusión
K_i^B	Constante de estabilidad estimada en cada simulación Bootstrap
K_i^J	Constante de estabilidad estimada en cada simulación Jackknife
K_f	Constante de formación
m y g	Coeficientes estequiométricos del complejo M_mL_g
N^B, N^J	Número de simulaciones en el método Bootstrap y Jackknife
r	Razón molar de ligando
S	Substrato
SMF	Fracción molar estequiométrica
SMR	Razón molar estequiométrica
s_a, s_b y s_c	Desviaciones estándar de los parámetros de regresión
s_S o s_A	Desviaciones estándar de la respuesta analítica o absorbancia
s_x	Desviación estándar de la fracción molar
s_r	Desviación estándar de la razón molar

	Significado
SD	Desviación estándar teórica de repetibilidad
S_{IP} o A_{IP}	Respuesta analítica en el punto de intersección de las rectas
SR	Residuos estandarizados
S_{SMR}	Señal analítica de la razón estequiométrica en el punto de intersección con la curva
$s_{x,IP}$	Desviación estándar de la fracción molar en el punto de intersección de las rectas
$s_{r,IP}$	Desviación estándar de la razón molar en el punto de intersección de las rectas
S_{max} o A_{max}	Respuesta analítica en el máximo de la regresión polinómica
$s_{S,max}$ o $s_{A,max}$	Desviación estándar de la fracción molar en el máximo de la regresión polinómica
$s_{S,SMR}$	Desviación estándar de la razón molar estequiométrica en el punto de intersccción con la curva
S_0 o A_0	Respuesta analítica máxima teórica
s_{So} o s_{Ao}	Desviación estándar de la respuesta analítica máxima teórica
u_α	Incertidumbre asociada a los grados de disociación
u_{Kf}	Incertidumbre asociada a la constante de formación
x	Fracción molar de ligando
X_b	Fracción molar del substrato S
x_{IP}	Fracción molar en la intersección entre rectas de regresión
x_{max}	Fracción molar en el máximo de la regresión polinómica
r_{IP}	Razón molar en la intersección entre rectas de regresión

Bloque II

	Significado
A	Coeficiente de Corrección correspondiente a término independiente de CF
a_A	Término independiente de AC
a_E	Término independiente de EC
a_{CM}	Término independiente en CMC
a_{CFM}	Término independiente en CFMC
$a_{corregida}$	Término independiente obtenido a partir de la pendiente promedio en ANCOVA
a_M	Término independiente de MC
a_Y	Término independiente en YC
B	Coeficiente de Corrección correspondiente a la pendiente de CF
b_A	Pendiente de AC
b_{CM}	Pendiente en CMC
b_{CFM}	Pendiente en CFMC
b_E	Pendiente de EC
b_M	Pendiente de MC
b_{prom}	Pendiente promedio
b_Y	Término lineal de YC
$b_Y{}^C$	Término cuadrático de YC
CF	Función de Corrección
C_{CM}	Concentración de analito obtenida a partir de CMC
C_{CFM}	Concentración de analito obtenida a partir de CFMC
$CF_{E\text{-}CFM}$	Función de corrección de EC a CFMC

	Significado
CF_{CM-CFM}	Función de corrección de CMC a CFMC
CMC	Calibrado en matriz de traje
CFMC	Calibrado en matriz de traje y formulado
C_M	Concentración de analito obtenida de MC
C^*_{CM-CFM}	Concentración de analito obtenida a partir de CF_{CM-CFM}
C^*_M	Concentración de analito obtenida de CF
C^*_{E-CFM}	Concentración de analito obtenida a partir de CF_{E-CFM}
C_{refer}	Concentración de analito de referencia usada en los ensayos de recuperación
C_E	Concentración de analito obtenida de EC
F	Factor de Corrección
F_{CM}	Factor de Corrección de C_{CM} a C^*_{CM-CFM}
F_E	Factor de Corrección de C_E a C^*_{E-CFM}
IRS	Superficie de Respuesta Interferente
K	Componente de error sistemático constante
K_S	Factor de Saturación
m	Número de regresiones en ANCOVA
M	Concentración de muestra en la disolución de medida MC: Calibrado en matriz
MS_{res}	Media de cuadrados residual reducida o varianza residual reducida
p	Número de parejas comparadas con el test de Bonferroni
P	Factor de proporcionalidad
PF	Función de Predicción
r	Número de experiencias replicadas para establecer la CF

	Significado
$r_{A,B}$	Coeficiente de correlación entre los Coeficientes de Corrección
$\Re_E$	Recuperación "global" calculada a partir de C_E y C_{refer}. Es una medida del error total en la cuantificación con EC
$\Re_{CM}, \Re_{CFM}, \Re_M$	Recuperación "global" calculada a partir de C_M y C_{refer}. Es una medida del error en la cuantificación con CMC, CFMC o MC, respectivamente debida a la pérdida de analito
$\Re^*_M, \Re^*_{E\text{-}CFM}, \Re^*_{CM\text{-}CFM}$	Recuperación de calibración calculada a partir de C^*_M y C_{refer}. Cuando el efecto matriz es corregido adecuadamente por la CF correspondiente sólo evalúa las pérdidas de analito en el tratamiento de la muestra
$\Re^*_S$	Recuperación de calibración o "aparente" calculada a partir de C_S y C^*_M. Cuantifica el efecto matriz
s_D^2, s'^2_D	Varianza que mide la contribución de las desviaciones del modelo lineal considerando los calibrados independientes. Constituye el denominador del estadístico F en la comparación de pendientes y términos independientes en ANCOVA
s_N^2	Varianza que mide la contribución de las diferencias observadas entre las pendientes y los términos independientes de los calibrados a la suma de cuadrados de las desviaciones del modelo lineal. Constituye el numerador del estadístico F en la comparación de pendientes en ANCOVA
s'^2_N	Igual que el anterior pero en la comparación de término independientes
SS_{res}	Suma de cuadrados residual
t	Estadístico t para la comparación del término entre paréntesis en el test de Bonferroni
TF	Función de Tolerancia
X	Contenido de analito en muestra

B1. TABLAS CAPÍTULO I

Tabla 1.

Datos simulados de absorbancia (A), fracción molar (x) y residuos estandarizados (SR) para estequiometría 1:1 ($K_f = 10^6$ M^{-1}; $C = 1{,}8 \cdot 10^{-4}$ M; SD=0,01).

x	A	SR	x	A	SR	x	A	SR	
0,01	0,0213	0,38	0,22	0,4518	1,95	0,43	0,8250	-2,18	
0,02	0,0355	-0,17	0,23	0,4512	-0,07	0,44	0,8583	-0,83	
0,03	0,0760	1,90	0,24	0,4831	1,13	0,45	0,8730	-1,33	
0,04	0,0839	0,72	0,25	0,4858	-0,56	0,46	0,8802	-2,59	*
0,05	0,0872	-0,92	0,26	0,5022	-0,89	0,47	0,8707	-5,49	*
0,06	0,1140	-0,22	0,27	0,5309	0,00	0,48	0,8882	-5,71	*
0,07	0,1327	-0,32	0,28	0,5542	0,35	0,49	0,9081	-5,70	*
0,08	0,1645	0,88	0,29	0,5858	1,53	0,50	0,9125	-7,22	*
0,09	0,1695	-0,58	0,30	0,5904	0,02	0,51	0,8893	-4,25	*
0,10	0,2012	0,60	0,31	0,6114	0,14	0,52	0,9003	-2,04	
0,11	0,2205	0,56	0,32	0,6380	0,83	0,53	0,8819	-2,00	
0,12	0,2273	-0,74	0,33	0,6487	-0,07	0,54	0,8671	-1,70	
0,13	0,2457	-0,87	0,34	0,6714	0,22	0,55	0,8421	-2,14	
0,14	0,2795	0,53	0,35	0,6917	0,27	0,56	0,8525	0,01	
0,15	0,2862	-0,77	0,36	0,7011	-0,76	0,57	0,8061	-2,01	
0,16	0,3214	0,77	0,37	0,7203	-0,81	0,58	0,8036	-0,80	
0,17	0,3430	0,96	0,38	0,7565	0,83	0,59	0,7943	-0,09	
0,18	0,3598	0,66	0,39	0,7644	-0,35	0,60	0,7674	-0,68	
0,19	0,3869	1,39	0,40	0,7835	-0,42	0,61	0,7528	-0,36	
0,20	0,3831	-0,96	0,41	0,8156	0,81	0,62	0,7286	-0,75	
0,21	0,4016	-1,08	0,42	0,8111	-1,60	0,63	0,7164	-0,25	

Tabla 1.

Continuación

x	A	SR	x	A	SR	x	A	SR
0,64	0,7025	0,11	0,76	0,4865	0,93	0,88	0,2545	0,56
0,65	0,6901	0,60	0,77	0,4481	-0,50	0,89	0,2025	-1,87
0,66	0,6658	0,20	0,78	0,4446	0,63	0,90	0,1896	-1,43
0,67	0,6470	0,21	0,79	0,4168	-0,03	0,91	0,1932	0,23
0,68	0,6308	0,41	0,80	0,4057	0,55	0,92	0,1713	0,01
0,69	0,6020	-0,32	0,81	0,3756	-0,27	0,93	0,1422	-0,74
0,70	0,5974	0,74	0,82	0,3523	-0,59	0,94	0,1222	-0,82
0,71	0,5663	-0,16	0,83	0,3524	0,81	0,95	0,1051	-0,69
0,72	0,5607	0,82	0,84	0,3204	-0,16	0,96	0,0864	-0,67
0,73	0,5510	1,50	0,85	0,2949	-0,64	0,97	0,0693	-0,53
0,74	0,5364	1,82	0,86	0,2699	-1,09	0,98	0,0496	-0,59
0,75	0,4922	-0,04	0,87	0,2644	-0,10	0,99	0,0128	-1,91

Tabla 2.

Parámetros de regresión los modelos lineales aplicados a los datos simulados de la Tabla 1

	N	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	45	0,0026	0,0027	1,9545	0,0103	0,9988	0,0090
Recta 2	48	1,9010	0,0102	-1,8840	0,0132	0,9977	0,0127

Tabla 3.

Datos simulados de absorbancia (A), fracción molar (x) y parámetros del modelo polinómico aplicado para estequiometría 1:1 ($K_f = 10^6$ M^{-1}; $C = 1{,}8 \cdot 10^{-4}$ M; SD=0,01). Puntos cercanos al máximo de la curva.

x	A	x	A	x	A
0,45	0,8730	0,8381	0,49	0,9081	0,8875	0,53	0,8819	0,8839
0,46	0,8802	0,8740	0,50	0,9125	0,9114	0,54	0,8671	0,8674
0,47	0,8707	0,8943	0,51	0,8893	0,8973	0,55	0,8421	0,8579
0,48	0,8882	0,8847	0,52	0,9003	0,8957			

Parámetros del modelo polinómico

N	a	s_a	b	s_b	c	s_c	R^2	s_{res}
22	-3.9171	0,5936	19,3174	2,3810	-19,3606	2,3801	0,7780	0,0098

Tabla 4.

Datos simulados y parámetros de regresión del modelo lineal para el cálculo de la señal analítica máxima teórica para estequiometría 1:1 ($K_f = 10^6$ M^{-1}; $C = 1{,}8 \cdot 10^{-4}$ M; SD=0,01).

C_M	A		Parámetros de regresión	
0	0,0006	-0,0096	N	16
$2{,}25 \cdot 10^{-5}$	0,2554	0,2627	a	-0,0007
$4{,}50 \cdot 10^{-5}$	0,4906	0,4983	s_a	0,0042
$6{,}75 \cdot 10^{-5}$	0,7646	0,7468	b	11121,68
$9{,}00 \cdot 10^{-5}$	0,9969	1,0012	s_b	44,58
$1{,}12 \cdot 10^{-4}$	1,2347	1,2699	R^2	0,9998
$1{,}35 \cdot 10^{-4}$	1,4924	1,4804	s_{res}	0,0092
$1{,}58 \cdot 10^{-4}$	1,7596	1,7409		

Tabla 5.

Datos simulados de absorbancia (A), fracción molar (x) y residuos estandarizados (SR) para estequiometría 2:1 ($K_f = 10^{10}$ M^{-2}; $C = 1{,}5 \cdot 10^{-4}$ M; SD=0,02).

x	A	SR	x	A	SR	x	A	SR	
0,01	0,0013	-1,0131	0,26	0,3450	0,0761	0,51	0,6630	-0,0290	
0,02	0,0050	-1,4324	0,27	0,3909	1,6092	0,52	0,6811	0,2168	
0,03	0,0416	-0,3327	0,28	0,3840	0,6967	0,53	0,7272	1,7593	
0,04	0,0541	-0,3467	0,29	0,3713	-0,4861	0,54	0,7103	0,3813	
0,05	0,0315	-1,9888	0,30	0,4181	1,0887	0,55	0,7465	1,4659	
0,06	0,0843	-0,1346	0,31	0,3914	-0,7458	0,56	0,7573	1,3714	
0,07	0,0658	-1,5857	0,32	0,4098	-0,4833	0,57	0,7660	1,1834	
0,08	0,0928	-0,9278	0,33	0,4753	1,9613	0,58	0,7478	-0,2558	
0,09	0,1031	-1,0428	0,34	0,4238	-1,0224	0,59	0,7734	0,3372	
0,10	0,0962	-1,9594	0,35	0,4964	1,7484	0,60	0,7369	-1,9517	
0,11	0,1397	-0,5350	0,36	0,4249	-2,1629	0,61	0,7821	-0,4473	
0,12	0,1552	-0,4079	0,37	0,5289	2,0670	0,62	0,7987	-0,2728	
0,13	0,1535	-1,0814	0,38	0,5023	0,2422	0,63	0,7466	-3,2835	*
0,14	0,1994	0,4513	0,39	0,5215	0,5350	0,64	0,8208	-0,4361	
0,15	0,1568	-2,1182	0,40	0,5175	-0,2416	0,65	0,8162	-1,2440	
0,16	0,2254	0,4717	0,41	0,5430	0,3457	0,66	0,7929	-2,9170	*
0,17	0,2222	-0,2718	0,42	0,5582	0,4568	0,67	0,7997	-3,3071	*
0,18	0,2212	-0,9138	0,43	0,5605	-0,0290	0,68	0,8107	-2,3314	
0,19	0,2608	0,3270	0,44	0,5816	0,3554	0,69	0,8052	-1,7725	
0,20	0,2704	0,1801	0,45	0,6041	0,8039	0,7	0,7996	-1,2154	
0,21	0,2889	0,4456	0,46	0,5989	-0,0321	0,71	0,7721	-1,2116	
0,22	0,2824	-0,4520	0,47	0,6117	-0,0317	0,72	0,7621	-0,7659	
0,23	0,3186	0,6339	0,48	0,6350	0,4532	0,73	0,7561	-0,2205	
0,24	0,2809	-1,7084	0,49	0,6413	0,1521	0,74	0,7353	-0,0473	
0,25	0,3236	-0,3223	0,50	0,6467	-0,1933	0,75	0,6938	-0,3962	

Tabla 5.

Continuación

x	A	SR	x	A	SR	x	A	SR
0,76	0,7028	0,5287	0,84	0,4561	-0,1159	0,92	0,2307	-0,2192
0,77	0,6341	-0,5087	0,85	0,4537	0,5224	0,93	0,2512	0,9955
0,78	0,6581	0,7952	0,86	0,4350	0,7474	0,94	0,1806	-0,0886
0,79	0,6470	1,2122	0,87	0,3875	0,2463	0,95	0,1455	-0,2770
0,8	0,5778	0,1642	0,88	0,3793	0,7374	0,96	0,1069	-0,5532
0,81	0,5551	0,2891	0,89	0,2938	-0,7210	0,97	0,0696	-0,7952
0,82	0,5018	-0,3577	0,9	0,3049	0,2561	0,98	0,0716	-0,0473
0,83	0,5149	0,6716	0,91	0,2713	0,1073	0,99	0,0239	-0,5531

Tabla 6.

Parámetros de regresión los modelos lineales aplicados a los datos simulados de la Tabla 5

	N	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	64	-0,0050	0,0052	1,3211	0,0014	0,9931	0,0207
Recta 2	32	2,6820	0,0480	-2,6512	0,0572	0,9862	0,0299

Tabla 7.

Datos simulados de absorbancia (A), fracción molar (x) y parámetros del modelo polinómico aplicado para estequiometría 2:1 ($K_f = 10^{10}$ M^{-2}; $C = 1{,}5 \cdot 10^{-4}$ M; SD=0,02). Puntos cercanos al máximo de la curva.

x	A	x	A	x	A
0,45	0,6041	0,5837	0,56	0,7573	0,7427	0,67	0,7997	0,7705
0,46	0,5989	0,5926	0,57	0,7660	0,7136	0,68	0,8107	0,7939
0,47	0,6117	0,6103	0,58	0,7478	0,7638	0,69	0,8052	0,7756
0,48	0,6350	0,6130	0,59	0,7734	0,7342	0,70	0,7996	0,7937
0,49	0,6413	0,6612	0,60	0,7369	0,7705	0,71	0,7721	0,7657
0,50	0,6467	0,6741	0,61	0,7821	0,7657	0,72	0,7621	0,7868
0,51	0,6630	0,6618	0,62	0,7987	0,7697	0,73	0,7561	0,7682
0,52	0,6811	0,6752	0,63	0,7466	0,7956	0,74	0,7353	0,7490
0,53	0,7272	0,6878	0,64	0,8208	0,7908	0,75	0,6938	0,7120
0,54	0,7103	0,6920	0,65	0,8162	0,8131			
0,55	0,7465	0,7550	0,66	0,7929	0,8113			

Parámetros del modelo polinómico

a	1,9169	s_a	0,8087	**N**	62
b	-10,4847	s_b	4,1350	R^2	0,9379
c	24,0784	s_c	6,9641	s_{res}	0,0170
d	-16,3015	s_d	3,8653		

Tabla 8.

Datos simulados para el cálculo de la señal analítica máxima teórica para estequiometría 2:1 ($K_f = 10^{10}$ M^{-2}; $C = 1{,}5 \cdot 10^{-4}$ M; SD=0,02). Parámetros de los modelos lineales.

C_M	A		Parámetros de regresión	
0	0,0186	-0,0129	**N**	16
$1{,}25 \cdot 10^{-5}$	0,2351	0,2731	**a**	-0,0002
$2{,}50 \cdot 10^{-5}$	0,4861	0,4815	s_a	0,0082
$3{,}75 \cdot 10^{-5}$	0,7451	0,7663	**b**	20088,66
$5{,}00 \cdot 10^{-5}$	1,0183	1,0041	s_b	157,54
$6{,}25 \cdot 10^{-5}$	1,2345	1,2889	R^2	0,9991
$7{,}50 \cdot 10^{-5}$	1,5128	1,5158	s_{res}	0,0180
$8{,}75 \cdot 10^{-5}$	1,7351	1,7571		

Tabla 9.

Datos simulados de absorbancia (A), fracción molar (x) y residuos estandarizados (SR) para estequiometría 3:1 ($K_f = 10^{15}$ M^{-3}; $C = 1{,}06 \cdot 10^{-4}$ M; SD=0,01).

x	A	SR	x	A	SR	x	A	SR
0,01	0,0000	0,39	0,11	0,1188	0,44	0,21	0,2333	0,15
0,02	0,0249	1,47	0,12	0,1061	-1,58	0,22	0,2368	-0,54
0,03	0,0110	-0,66	0,13	0,1449	0,65	0,23	0,2545	-0,05
0,04	0,0156	-1,25	0,14	0,1306	-1,51	0,24	0,2668	-0,01
0,05	0,0446	0,17	0,15	0,1428	-1,47	0,25	0,2649	-1,14
0,06	0,0511	-0,27	0,16	0,1804	0,66	0,26	0,2808	-0,80
0,07	0,0693	0,26	0,17	0,1798	-0,37	0,27	0,2894	1,07
0,08	0,0602	-1,47	0,18	0,1836	-1,03	0,28	0,3222	0,66
0,09	0,0948	0,41	0,19	0,2156	0,63	0,29	0,3183	-0,63
0,10	0,0955	-0,51	0,20	0,2334	1,13	0,30	0,3397	0,15

Tabla 9.

Continuación

x	A	SR	x	A	SR		x	A	SR
0,31	0,3611	0,95	0,54	0,6145	-0,55		0,77	0,7879	-2,15
0,32	0,3550	-0,52	0,55	0,6306	-0,20		0,78	0,7776	-1,45
0,33	0,3881	1,23	0,56	0,6378	-0,58		0,79	0,7595	-0,94
0,34	0,3875	0,20	0,57	0,6578	0,09		0,80	0,7589	0,01
0,35	0,3946	-0,18	0,58	0,6522	-1,34		0,81	0,7470	0,68
0,36	0,4183	0,79	0,59	0,6878	0,62		0,82	0,6940	0,29
0,37	0,4269	0,53	0,60	0,6913	-0,06		0,83	0,6638	0,48
0,38	0,4326	0,02	0,61	0,7018	-0,17		0,84	0,6439	0,94
0,39	0,4725	2,34	0,62	0,7028	-1,07		0,85	0,5966	0,69
0,40	0,4493	-0,54	0,63	0,7131	-1,19		0,86	0,5547	0,58
0,41	0,4597	-0,66	0,64	0,7019	-3,09	*	0,87	0,5114	0,44
0,42	0,4754	-0,33	0,65	0,7382	-1,07		0,88	0,4824	0,66
0,43	0,5009	0,78	0,66	0,7594	-0,29		0,89	0,4531	0,88
0,44	0,5310	2,29	0,67	0,7627	-1,00		0,90	0,4157	0,88
0,45	0,5148	-0,01	0,68	0,7563	-2,50	*	0,91	0,3392	-0,11
0,46	0,5310	0,34	0,69	0,7554	-3,55	*	0,92	0,2996	-0,16
0,47	0,5482	0,79	0,70	0,7831	-2,24	*	0,93	0,2684	0,00
0,48	0,5441	-0,51	0,71	0,7926	-2,43	*	0,94	0,2584	0,72
0,49	0,5648	0,21	0,72	0,7809	-4,37	*	0,95	0,1918	-0,09
0,50	0,5761	0,17	0,73	0,7871	-4,83	*	0,96	0,1477	-0,13
0,51	0,5982	1,02	0,74	0,8064	-4,21	*	0,97	0,1097	-0,20
0,52	0,6045	0,57	0,75	0,7896	-4,06	*	0,98	0,0697	-0,23
0,53	0,6240	1,20	0,76	0,7936	-2,98	*	0,99	0,0423	0,05

Tabla 10.

Parámetros de regresión de los modelos lineales aplicados a los datos simulados de la Tabla 9.

	N	a	S_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	68	-0,0157	0,0028	1,1745	0,0070	0,9976	0,0115
Recta 2	23	3,6755	0,0811	-3,6543	0,0919	0,9868	0,0292

Tabla 11.

Datos simulados de absorbancia (A), fracción molar (x) y residuos estandarizados (SR) para estequiometría 4:1 ($K_f = 10^{10}$ M^{-4}; $C = 1{,}6 \cdot 10^{-2}$ M; SD=0,01).

x	A	SR	x	A	SR	x	A	SR
0,01	-0,0190	1,86	0,15	0,0884	0,25	0,29	0,2450	0,93
0,02	-0,0044	1,84	0,16	0,1011	-0,26	0,30	0,2537	-0,59
0,03	0,0125	0,33	0,17	0,1113	0,68	0,31	0,2551	0,55
0,04	0,0094	0,80	0,18	0,1078	-0,86	0,32	0,2633	1,08
0,05	0,0260	0,38	0,19	0,1298	0,18	0,33	0,2840	-0,25
0,06	0,0192	-0,68	0,20	0,1455	0,00	0,34	0,3019	0,99
0,07	0,0294	-0,58	0,21	0,1493	-0,91	0,35	0,2932	-0,02
0,08	0,0201	-0,67	0,22	0,1722	-0,41	0,36	0,3182	1,41
0,09	0,0369	1,67	0,23	0,1627	-0,05	0,37	0,3354	-0,34
0,10	0,0419	-0,08	0,24	0,1858	0,61	0,38	0,3284	-1,03
0,11	0,0385	0,08	0,25	0,1961	0,43	0,39	0,3553	-0,17
0,12	0,0503	0,05	0,26	0,2029	-0,24	0,40	0,3524	0,91
0,13	0,0596	-1,01	0,27	0,2127	-0,39	0,41	0,3819	0,74
0,14	0,1009	-0,14	0,28	0,2261	0,37	0,42	0,3693	-0,15

Tabla 11.

Continuación

x	A	SR	x	A	SR		x	A	SR	
0,43	0,3708	-0,06	0,62	0,5814	-0,23		0,81	0,7030	-6,28	*
0,44	0,3927	0,41	0,63	0,5737	-1,62		0,82	0,7053	-4,64	*
0,45	0,4175	0,02	0,64	0,5890	-1,26		0,83	0,6784	-3,95	*
0,46	0,4257	-0,96	0,65	0,6226	0,50		0,84	0,6650	-2,81	*
0,47	0,4245	-0,23	0,66	0,6263	-0,02		0,85	0,6614	-1,48	
0,48	0,4362	0,33	0,67	0,6282	-0,69		0,86	0,6334	-0,85	
0,49	0,4530	-1,12	0,68	0,6150	-2,42		0,87	0,6092	-0,05	
0,50	0,4584	0,46	0,69	0,6437	-2,54	*	0,88	0,5755	0,37	
0,51	0,4560	-0,92	0,70	0,6551	-2,61	*	0,89	0,5389	0,68	
0,52	0,4762	-0,20	0,71	0,6383	-3,19	*	0,90	0,4925	0,64	
0,53	0,4941	0,37	0,72	0,6567	-2,56	*	0,91	0,4441	0,56	
0,54	0,4854	-1,19	0,73	0,6610	-2,99	*	0,92	0,4047	0,85	
0,55	0,5169	0,46	0,74	0,6795	-2,33	*	0,93	0,3508	0,55	
0,56	0,4979	-1,78	0,75	0,6934	-2,58	*	0,94	0,2940	0,20	
0,57	0,5229	-0,68	0,76	0,7023	-2,60	*	0,95	0,2349	-0,26	
0,58	0,5487	0,48	0,77	0,7060	-2,70	*	0,96	0,1935	-0,07	
0,59	0,5573	0,34	0,78	0,7069	-3,54	*	0,97	0,1373	-0,42	
0,60	0,5559	-0,53	0,79	0,7073	-9,25	*	0,98	0,0928	-0,34	
0,61	0,5613	-0,96	0,80	0,6975	-7,90	*	0,99	0,0387	-0,62	

Tabla 12

Parámetros de regresión de los modelos lineales aplicados a los datos simulados de la Tabla 11.

	N	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	68	-0,0575	0,0028	1,0204	0,0064	0,9974	0,0105
Recta 2	15	4,6161	0,1092	4,6044	0,1186	0,9914	0,0198

Tabla 15.

Combinaciones de constante de estabilidad y concentraciones estudiadas para la estequiometría 1:1; 2:1, 3:1 y 4:1.

	K_f	$C = C_M + C_L$ (M)				
Estequiometría 1:1	10^2	2,0	$7,5\ 10^{-2}$	$1,2\ 10^{-2}$	$4,0\ 10^{-1}$	$4,0\ 10^{-2}$
		$6,2\ 10^{-3}$	$1,6\ 10^{-1}$	$2,2\ 10^{-2}$	$2,5\ 10^{-3}$	
	10^6	$1,8\ 10^{-4}$	$7,5\ 10^{-6}$	$1,2\ 10^{-6}$	$6,2\ 10^{-7}$	$4,0\ 10^{-5}$
		$4,0\ 10^{-6}$	$1,6\ 10^{-5}$	$2,2\ 10^{-6}$	$2,5\ 10^{-7}$	
	10^{10}	$1,8\ 10^{-8}$	$7,5\ 10^{-10}$	$1,2\ 10^{-10}$	$4,0\ 10^{-9}$	$4,0\ 10^{-10}$
		$6,2\ 10^{-11}$	$1,6\ 10^{-9}$	$2,2\ 10^{-10}$	$2,5\ 10^{-11}$	
Estequiometría 2:1	10^5	$1,4\ 10^{-1}$	$1,4\ 10^{-2}$	$4,4\ 10^{-3}$	$4,7\ 10^{-2}$	$9,5\ 10^{-3}$
		$3,0\ 10^{-3}$	$2,4\ 10^{-2}$	$6,4\ 10^{-3}$	$1,8\ 10^{-3}$	
	10^{10}	$4,5\ 10^{-4}$	$4,6\ 10^{-5}$	$1,4\ 10^{-5}$	$1,5\ 10^{-4}$	$3,0\ 10^{-5}$
		$9,4\ 10^{-6}$	$7,6\ 10^{-5}$	$2,0\ 10^{-5}$	$5,6\ 10^{-6}$	
	10^{15}	$1,4\ 10^{-6}$	$1,4\ 10^{-7}$	$4,4\ 10^{-8}$	$4,7\ 10^{-7}$	$9,5\ 10^{-8}$
		$3,0\ 10^{-8}$	$2,4\ 10^{-7}$	$6,4\ 10^{-8}$	$1,8\ 10^{-8}$	
Estequiometría 3:1	10^{10}	$1,3\ 10^{-2}$	$1,8\ 10^{-3}$	$6,7\ 10^{-4}$	$4,9\ 10^{-3}$	$1,2\ 10^{-3}$
		$8,9\ 10^{-4}$	$2,7\ 10^{-3}$	$9,0\ 10^{-4}$	$3,3\ 10^{-4}$	
	10^{15}	$2,8\ 10^{-4}$	$3,8\ 10^{-5}$	$1,4\ 10^{-5}$	$1,1\ 10^{-4}$	$2,7\ 10^{-5}$
		$1,0\ 10^{-5}$	$6,0\ 10^{-5}$	$1,9\ 10^{-5}$	$7,1\ 10^{-6}$	
	10^{20}	$6,0\ 10^{-6}$	$8,2\ 10^{-7}$	$3,1\ 10^{-7}$	$2,3\ 10^{-6}$	$5,7\ 10^{-7}$
		$2,3\ 10^{-7}$	$1,3\ 10^{-6}$	$4,2\ 10^{-7}$	$1,5\ 10^{-7}$	
Estequiometría 4:1	10^{10}	$6,8\ 10^{-2}$	$1,1\ 10^{-2}$	$4,6\ 10^{-3}$	$2,8\ 10^{-2}$	$7,9\ 10^{-3}$
		$3,5\ 10^{-3}$	$1,6\ 10^{-2}$	$5,9\ 10^{-3}$	$2,5\ 10^{-3}$	
	10^{15}	$3,8\ 10^{-3}$	$6,1\ 10^{-4}$	$2,6\ 10^{-4}$	$1,6\ 10^{-3}$	$4,4\ 10^{-4}$
		$2,0\ 10^{-4}$	$9,2\ 10^{-4}$	$3,3\ 10^{-4}$	$1,4\ 10^{-4}$	
	10^{20}	$2,2\ 10^{-4}$	$3,5\ 10^{-5}$	$1,4\ 10^{-5}$	$8,8\ 10^{-5}$	$2,5\ 10^{-5}$
		$1,1\ 10^{-5}$	$5,1\ 10^{-5}$	$1,9\ 10^{-5}$	$8,0\ 10^{-6}$	

Tabla 16.

Datos de absorbancia (A), fracción molar (x) y residuos estandarizados (SR) para el complejo Ni(II)-pRNa$_2$.

x	A	SR		x	A	SR		x	A	SR
0,05	0,014	4,31	*	0,40	0,358	–0,65		0,75	0,560	–1,69
0,10	0,041	0,13		0,45	0,420	0,65		0,80	0,470	0,28
0,15	0,079	–2,32		0,50	0,475	0,86		0,85	0,360	0,00
0,20	0,154	1,02		0,55	0,524	0,13		0,90	0,250	–0,28
0,25	0,198	–0,50		0,60	0,574	–0,44		0,95	0,145	0,00
0,30	0,252	–0,44		0,65	0,605	–3,99	*			
0,35	0,305	–0,55		0,70	0,598	–13,49	*			

Parámetros de los modelos lineales

	N	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	11	-0,072	0,004	1,083	0,011	0,9990	0,006
Recta 2	5	2,142	0,035	-2,100	0,042	0,9988	0,007

Tabla 17.

Datos en las cercanías del máximo y parámetros del modelo polinómico aplicado del complejo Ni(II)-pRNa$_2$.

x	A	x	A	x	A
0,35	0,305	0,32	0,50	0,475	0,485	0,65	0,605	0,61
0,40	0,358	0,352	0,55	0,524	0,523	0,70	0,598	0,589
0,45	0,42	0,412	0,60	0,574	0,576			

Parámetros del modelo polinómico

a	1,0288	s_a	0,2192	**N**	16
b	-6,1441	s_b	1,3155	R^2	0,9966
c	15,5167	s_c	2,5630	s_{res}	0,0070
d	-10,8889	s_d	1,6244		

Tabla 18.

Datos de concentración de metal y absorbancia para el complejo Ni(II)-$pRNa_2$. Parámetros del modelo lineal.

C_M	A	Parámetros de regresión	
$1{,}6 \cdot 10^{-05}$	0,080	**N**	10
$1{,}6 \cdot 10^{-05}$	0,102	**a**	-0,0958
$3{,}2 \cdot 10^{-05}$	0,275	s_a	0,0070
$3{,}2 \cdot 10^{-05}$	0,280	**b**	11650,00
$4{,}8 \cdot 10^{-05}$	0,462	s_b	131,95
$4{,}8 \cdot 10^{-05}$	0,458	R^2	0,9990
$6{,}4 \cdot 10^{-05}$	0,640	s_{res}	0,0094
$6{,}4 \cdot 10^{-05}$	0,667		
$8{,}0 \cdot 10^{-05}$	0,831		
$8{,}0 \cdot 10^{-05}$	0,839		

B2. TABLAS CAPÍTULO II

Tabla 1.

Datos simulados de absorbancia (A), razón molar (r) y residuos estandarizados (SR) para estequiometría 1:1 ($K_f=10^{10}$ M^{-1}; C_M =9,00·10^{-9} M; SD=0,01).

r	A	SR	r	A	SR		r	A	SR	
0,10	0,1007	0,27	0,52	0,5231	1,42		0,94	0,8682	-4,91	*
0,12	0,1077	-0,94	0,54	0,5269	-0,11		0,96	0,8825	-5,42	*
0,14	0,1406	0,35	0,56	0,5494	0,18		0,98	0,8762	-7,92	*
0,16	0,1782	2,09	0,58	0,5642	-0,28		1,00	0,9010	-7,41	*
0,18	0,1759	-0,02	0,60	0,5813	-0,52		1,02	0,9188	-1,58	
0,20	0,1896	-0,59	0,62	0,6124	0,61		1,04	0,9200	-1,60	
0,22	0,2266	1,10	0,64	0,6194	-0,61		1,06	0,9081	-2,63	*
0,24	0,2357	0,10	0,66	0,6338	-1,11		1,08	0,9295	-1,08	
0,26	0,2576	0,32	0,68	0,6722	0,72		1,10	0,9392	-0,54	
0,28	0,2726	-0,11	0,70	0,6697	-1,42		1,12	0,9446	0,38	
0,30	0,2938	0,04	0,72	0,6771	-2,59	*	1,14	0,9524	-0,01	
0,32	0,3071	-0,57	0,74	0,7187	-0,46		1,16	0,9435	-0,41	
0,34	0,3388	0,61	0,76	0,7395	-0,34		1,18	0,9458	-0,34	
0,36	0,3558	0,36	0,78	0,7658	0,31		1,20	0,9584	0,53	
0,38	0,3692	-0,23	0,80	0,7576	-2,38		1,22	0,9543	0,11	
0,40	0,3804	-1,03	0,82	0,7847	-1,64		1,24	0,9734	1,49	
0,42	0,4056	-0,49	0,84	0,7835	-3,64	*	1,26	0,9538	-0,14	
0,44	0,4301	-0,02	0,86	0,8164	-2,35		1,28	0,9647	0,60	
0,46	0,4558	0,58	0,88	0,8377	-2,19		1,30	0,9665	0,63	
0,48	0,4745	0,51	0,90	0,8420	-3,66	*	1,32	0,9552	-0,35	
0,50	0,4916	0,26	0,92	0,8600	-3,82	*	1,34	0,9669	0,45	

Tabla 1.

Continuación

r	A	SR	r	A	SR	r	A	SR	
1,36	0,9821	1,53	1,60	0,9822	0,26	1,84	0,9925	-0,22	
1,38	0,9790	1,18	1,62	0,9884	0,63	1,86	0,9938	-0,22	
1,40	0,9791	1,08	1,64	0,9864	0,37	1,88	0,9853	-0,98	
1,42	0,9585	-0,62	1,66	0,9748	-0,63	1,90	1,0061	0,52	
1,44	0,9868	1,46	1,68	0,9794	-0,38	1,92	0,9750	-2,00	
1,46	0,9768	0,58	1,70	0,9675	-1,41	1,94	0,9820	-1,56	
1,48	0,9690	-0,13	1,72	0,9869	-0,01	1,96	0,9846	-1,46	
1,50	0,9683	-0,29	1,74	0,9802	-0,64	1,98	0,9838	-1,63	
1,52	0,9725	-0,07	1,76	0,9898	0,00	2,00	0,9634	-3,32	*
1,54	0,9812	0,50	1,78	0,9765	-1,14	2,02	0,9838	-1,85	
1,56	0,9838	0,59	1,80	0,9886	-0,31	2,04	0,9859	-1,79	
1,58	0,9680	-0,74	1,82	0,9755	-1,42	2,06	0,9868	-1,82	

Tabla 2.

Parámetros de regresión de los modelos lineales aplicados a los datos simulados de la Tabla 1.

	N	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	38	0,0090	0,0032	0,9546	0,0062	0,9985	0,0086
Recta 2	51	0,8925	0,0082	0,0511	0,0053	0,9586	0,0112

Tabla 3.

Datos simulados de absorbancia (A), razón molar (r) y parámetros del modelo polinómico para estequiometría 1:1. ($K_f=10^{10}$ M^{-1}; $C_M=9{,}00\cdot10^{-9}$ M; DSR=0,01). Puntos cercanos al máximo de la curva.

r	A	r	A	r	A
0,82	0,7847	0,7810	1,00	0,9010	0,8968	1,18	0,9458	0,9333
0,84	0,7835	0,7930	1,02	0,9188	0,9105	1,20	0,9584	0,9495
0,86	0,8164	0,8147	1,04	0,9200	0,9159	1,22	0,9543	0,9731
0,88	0,8377	0,8282	1,06	0,9081	0,9443	1,24	0,9734	0,9693
0,90	0,8420	0,8469	1,08	0,9295	0,9312	1,26	0,9538	0,9653
0,92	0,8600	0,8510	1,10	0,9446	0,9294	1,28	0,9647	0,9569
0,94	0,8682	0,8747	1,12	0,9392	0,9400	1,30	0,9665	0,9799
0,96	0,8825	0,8704	1,14	0,9524	0,9534			
0,98	0,8762	0,8720	1,16	0,9435	0,9427			

Parámetros del modelo polinómico

a	-1,5923	s_a	0,6032	**N**	50
b	5,5479	s_b	1,7392	R^2	0,9791
c	-4,0709	s_c	1,6551	s_{res}	0,0086
d	1,0144	s_d	0,5201		

Tabla 4.

Datos simulados y parámetros de regresión para el cálculo de la señal máxima teórica para estequiometría 1:1 ($K_f=10^{10}$ M^{-1}; $C_M=9{,}00\cdot10^{-9}$ M; DSR=0,01).

C_M	A		Parámetros de regresión	
0	-0,0072	-0,0133	**N**	16
$2{,}25\cdot10^{-9}$	0,2456	0,2480	**a**	-0,0092
$4{,}50\cdot10^{-9}$	0,5076	0,4834	s_a	0,0054
$6{,}75\cdot10^{-9}$	0,7420	0,7282	**b**	$1{,}1199\cdot10^{8}$
$9{,}00\cdot10^{-9}$	1,0172	1,0138	s_b	$5{,}7884\cdot10^{5}$
$1{,}12\cdot10^{-8}$	1,2252	1,2486	R^2	0,9996
$1{,}35\cdot10^{-8}$	1,5044	1,5072	s_{res}	0,0119
$1{,}57\cdot10^{-8}$	1,7600	1,7530		

Tabla 5.

Datos simulados de absorbancia (A), razón molar (r) y residuos estandarizados (SR) para estequiometría 2:1 ($K_f=10^{10}$ M^{-2}; $C=1{,}50\cdot10^{-4}$ M; DSR=0,01).

r	A	SR	r	A	SR	r	A	SR	
0,10	0,0433	-1,34	0,82	0,3750	-0,52	1,54	0,7086	0,44	
0,13	0,0598	-1,10	0,85	0,3870	-0,62	1,57	0,7114	-0,35	
0,16	0,0865	-0,11	0,88	0,4259	1,28	1,60	0,7526	1,72	
0,19	0,1097	0,62	0,91	0,4191	-0,22	1,63	0,7584	1,16	
0,22	0,0958	-1,41	0,94	0,4307	-0,35	1,66	0,7554	-0,06	
0,25	0,1229	-0,38	0,97	0,4442	-0,34	1,69	0,7978	2,10	
0,28	0,1468	0,40	1,00	0,4698	0,57	1,72	0,7911	0,61	
0,31	0,1553	0,03	1,03	0,4687	-0,51	1,75	0,7975	0,09	
0,34	0,1454	-1,69	1,06	0,5089	1,49	1,78	0,8320	1,67	
0,37	0,1760	-0,41	1,09	0,5198	1,30	1,81	0,8363	0,99	
0,40	0,1792	-1,17	1,12	0,5093	-0,48	1,84	0,8577	1,59	
0,43	0,1943	-1,04	1,15	0,5318	0,21	1,87	0,8548	0,37	
0,46	0,2253	0,27	1,18	0,5458	0,26	1,90	0,8598	-0,25	
0,49	0,2272	-0,58	1,21	0,5659	0,76	1,93	0,8692	-0,54	
0,52	0,2355	-0,96	1,24	0,5862	1,27	1,96	0,8900	0,01	
0,55	0,2752	1,00	1,27	0,5953	0,96	1,99	0,9049	0,13	
0,58	0,2835	0,62	1,30	0,6011	0,39	2,02	0,8968	-1,47	
0,61	0,2977	0,69	1,33	0,6208	0,86	2,05	0,9148	-1,13	
0,64	0,2993	-0,19	1,36	0,6251	0,19	2,08	0,9265	-1,25	
0,67	0,3127	-0,18	1,39	0,6627	2,00	2,11	0,9255	-2,32	
0,70	0,3086	-1,48	1,42	0,6563	0,53	2,14	0,9233	-3,48	*
0,73	0,3421	0,01	1,45	0,6694	0,51	2,17	0,9417	-3,10	*
0,76	0,3493	-0,44	1,48	0,7036	2,06	2,20	0,9381	-4,37	*
0,79	0,3806	0,89	1,51	0,7061	1,25	2,23	0,9531	-4,24	*

Tabla 5.

Continuación

r	A	SR		r	A	SR	r	A	SR	
1,87	0,8548	-2,52	*	2,29	0,9769	1,35	2,71	0,9755	-1,39	
1,90	0,8598	-2,44	*	2,32	0,9737	0,99	2,74	0,9955	-0,51	
1,93	0,8692	-2,13		2,35	0,9681	0,50	2,77	1,0023	-0,34	
1,96	0,8900	-1,21		2,38	0,9726	0,54	2,80	1,0045	-0,41	
1,99	0,9049	-0,60		2,41	0,9935	1,47	2,83	0,9907	-1,34	
2,02	0,8968	-1,22		2,44	0,9801	0,57	2,86	0,9889	-1,63	
2,05	0,9148	-0,45		2,47	0,9963	1,25	2,89	1,0149	-0,43	
2,08	0,9265	-0,02		2,50	0,9708	-0,31	2,92	1,0123	-0,75	
2,11	0,9255	-0,26		2,53	0,9838	0,19	2,95	0,9781	-2,78	*
2,14	0,9233	-0,57		2,56	0,9924	0,46	2,98	0,9896	-2,35	
2,17	0,9417	0,23		2,59	0,9870	-0,02	3,01	1,0050	-1,72	
2,20	0,9381	-0,16		2,62	1,0003	0,51	3,04	0,9839	-3,04	
2,23	0,9531	0,46		2,65	0,9931	-0,07				
2,26	0,9667	0,99		2,68	1,0041	0,33				

Tabla 6.

Parámetros de regresión de los modelos lineales aplicados a los datos simulados de la Tabla 5.

	N	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	68	0,0125	0,0033	0,4508	0,0027	0,9977	0,0129
Recta 2	37	0,6874	0,0240	0,1134	0,0097	0,9950	0,0191

Tabla 7.

Datos simulados de absorbancia (A), razón molar (r) y parámetros del modelo polinómico para estequiometría 2:1 ($K_f=10^{10}$ M^{-2}; $C_M=1{,}50\cdot10^{-4}$ M; SD = 0,01). Puntos cercanos al máximo de la curva.

r	A		r	A		r	A	
1,81	0,8363	0,8339	1,99	0,9049	0,8838	2,17	0,9417	0,9327
1,84	0,8577	0,8401	2,02	0,8968	0,8983	2,20	0,9381	0,9801
1,87	0,8548	0,8520	2,05	0,9148	0,9098	2,23	0,9531	0,9623
1,90	0,8598	0,8716	2,08	0,9265	0,9132	2,26	0,9667	0,9514
1,93	0,8692	0,8895	2,11	0,9255	0,9599			
1,96	0,8900	0,8786	2,14	0,9233	0,9314			

Parámetros del modelo polinómico

a	3,0108	s_a	8,1130	**N**	32
b	-4,0517	s_b	12,0150	R^2	0,9347
c	2,3121	s_c	5,9171	s_{res}	0,0111
d	-0,4073	s_d	0,9690		

Tabla 8.

Datos simulados para el cálculo de la señal analítica máxima teórica para estequiometría 1:1 ($K_f=10^{10}$ M^{-2}; $C_M=1{,}50\cdot10^{-4}$ M; SD =0,01). Parámetros del modelo lineal.

C_M	A		Parámetros de regresión	
0	0,0036	-0,0010	**N**	16
$3{,}75\cdot10^{-5}$	0,2548	0,2497	**a**	0,0044
$7{,}50\cdot10^{-5}$	0,4984	0,5105	s_a	0,0029
$1{,}12\cdot10^{-4}$	0,7478	0,7615	**b**	6622,77
$1{,}50\cdot10^{-4}$	0,9957	0,9856	s_b	18,36
$1{,}87\cdot10^{-4}$	1,2542	1,2494	R^2	0,9999
$2{,}25\cdot10^{-4}$	1,4969	1,4891	s_{res}	0,0063
$2{,}62\cdot10^{-4}$	1,7401	1,7426		

Tabla 9.

Datos simulados de absorbancia (A), razón molar (r) y residuos estandarizados (SR) para estequiometría 3:1 ($K_f=10^{15}$ M^{-3}; $C_M=2.65\cdot10^{-5}$ M; SD=0.02).

r	A	SR	r	A	SR		r	A	SR	
0,10	0,0062	0,01	1,15	0,2779	-1,00		2,15	0,5838	0,87	
0,15	0,0153	-0,27	1,20	0,2789	-1,77		2,20	0,5883	0,31	
0,20	0,0379	0,26	1,25	0,3075	-0,88		2,25	0,5944	-0,14	
0,25	0,0448	-0,15	1,30	0,3198	-0,96		2,30	0,6107	0,01	
0,30	0,0385	-1,36	1,35	0,3526	0,19		2,35	0,6443	1,21	
0,35	0,0660	-0,52	1,40	0,3555	-0,47		2,40	0,6290	-0,54	
0,40	0,0648	-1,42	1,45	0,3842	0,43		2,45	0,6313	-1,23	
0,45	0,1042	0,12	1,50	0,4007	0,60		2,50	0,6639	-0,10	
0,50	0,0788	-2,24	1,55	0,3795	-1,50		2,55	0,7014	1,33	
0,55	0,1041	-1,54	1,60	0,4265	0,50		2,60	0,6992	0,38	
0,60	0,1466	0,19	1,65	0,4570	1,51		2,65	0,7319	1,52	
0,65	0,1197	-2,26	1,70	0,4513	0,34		2,70	0,7321	0,70	
0,70	0,1609	-0,60	1,75	0,4499	-0,57		2,80	0,7439	-0,24	
0,75	0,1583	-1,59	1,80	0,4274	-2,76	*	2,85	0,7625	0,05	
0,80	0,1802	-1,10	1,85	0,4934	0,39		2,90	0,7581	-1,04	
0,85	0,2074	-0,29	1,90	0,4921	-0,52		2,95	0,7856	-0,21	
0,90	0,1943	-1,90	1,95	0,5133	-0,06		3,00	0,7889	-0,84	
1,00	0,2725	1,16	2,00	0,4996	-1,72		3,05	0,8182	0,10	
1,05	0,2495	-1,06	2,05	0,5229	-1,14		3,10	0,8552	-2,72	*
1,10	0,2877	0,42	2,10	0,5656	0,60		3,15	0,8470	-2,65	*

Tabla 9.

Continuación.

r	A	SR		r	A	SR	r	A	SR
2,80	0,7439	-3,55	*	3,55	0,8769	-0,50	4,30	0,9670	0,47
2,85	0,7625	2,86	*	3,60	0,9516	1,92	4,35	0,9704	0,45
2,90	0,7581	-2,98	*	3,65	0,9459	1,59	4,40	0,9643	0,10
2,95	0,7856	-1,94		3,70	0,9046	0,02	4,45	0,9768	0,39
3,00	0,7889	-1,97		3,75	0,9035	-0,15	4,50	0,9896	0,68
3,05	0,8182	-1,10		3,80	0,9405	0,98	4,55	0,9755	0,06
3,10	0,8552	0,02		3,85	0,9448	0,98	4,60	0,9908	0,44
3,15	0,8470	-0,40		3,90	0,9647	1,52	4,65	1,0211	1,34
3,20	0,8585	-0,15		3,95	0,9780	1,84	4,70	0,9882	0,07
3,25	0,8478	-0,65		4,00	0,9326	0,14	4,75	0,9666	-0,81
3,30	0,8879	0,58		4,05	0,9905	1,99	4,80	0,9957	0,04
3,35	0,8688	-0,21		4,10	0,9745	1,30	4,85	0,9829	-0,54
3,40	0,9058	0,92		4,15	0,9565	0,54	4,90	0,9889	-0,47
3,45	0,9086	0,87		4,20	0,9893	1,52	4,95	1,0110	0,15
3,50	0,8825	-0,17		4,25	0,9874	1,31	5,00	0,9985	-0,42

Tabla 10.

Parámetros de regresión de los modelos lineales aplicados a los datos simulados de la Tabla 9.

	N	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	57	-0,0359	0,0040	0,2807	0,0022	0,9965	0,0148
Recta 2	42	0,5729	0,0278	0,0912	0,0069	0,8133	0,0271

Tabla 11.

Datos simulados de absorbancia (A), razón molar (r) y parámetros del modelo polinómico para estequiometría 3:1 ($K_f = 10^{15}$ M^{-3}; $C_M = 2.65 \cdot 10^{-5}$ M; SD=0.02). Puntos cercanos al máximo de la curva.

r	A		r	A		r	A	
2,70	0,7321	0,7607	2,95	0,7856	0,7676	3,15	0,8470	0,8259
2,75	0,7817	0,7381	3.00	0,7889	0,8028	3,20	0,8585	0,8582
2,80	0,7439	0,7785	3,05	0,8182	0,7686	3,25	0,8478	0,8641
2,85	0,7625	0,7496	3,10	0,8552	0,8325	3,30	0,8879	0,8517
2,90	0,7581	0,7311						

Parámetros del modelo polinómico

a	41,5658	s_a	20,2117	**N**	26
b	-40,7100	s_b	20,2896	R^2	0,8609
c	13,4424	s_c	6,7757	s_{res}	0,0190
d	-1,4676	s_d	0,7527		

Tabla 12.

Datos simulados para el cálculo de la señal analítica máxima teórica para estequiometría 3:1 ($K_f = 10^{15}$ M^{-3}; $C_M = 2.65 \cdot 10^{-5}$ M; SD=0.02). Parámetros del modelo lineal.

C_M	A		Parámetros de regresión	
0	-0,0090	0,0195	**N**	16
$6,61 \cdot 10^{-6}$	0,2290	0,2498	**a**	-0,0005
$1,32 \cdot 10^{-5}$	0,5102	0,5050	s_a	0,0083
$1,98 \cdot 10^{-5}$	0,7510	0,7404	**b**	$3,77 \cdot 10^4$
$2,65 \cdot 10^{-5}$	0,9868	0,9696	s_b	$0,03 \cdot 10^4$
$3,31 \cdot 10^{-5}$	1,2581	1,2651	R^2	0,9991
$3,97 \cdot 10^{-5}$	1,5067	1,4947	s_{res}	0,0182
$4,63 \cdot 10^{-5}$	1,7724	1,7089		

Tabla 13.

Datos simulados de absorbancia (A), razón molar (r) y residuos estandarizados (SR) para estequiometría 4:1 ($K_f=10^{20}$ M^{-4}; C_M =4.3·10^{-5} M; SD = 0.01).

r	A	SR	r	A	SR	r	A	SR
0,10	-0,0060	-0,10	1,54	0,3313	-0,11	2,92	0,6666	0,99
0,16	0,0080	-0,11	1,60	0,3394	-0,65	2,98	0,6831	1,20
0,22	0,0389	1,42	1,66	0,3668	0,56	3,04	0,6784	-0,49
0,28	0,0407	0,31	1,72	0,3681	-0,60	3,10	0,7151	1,56
0,34	0,0547	0,30	1,78	0,3941	0,49	3,16	0,7074	-0,42
0,40	0,0780	1,14	1,84	0,4144	1,06	3,22	0,7294	0,31
0,46	0,0736	-0,53	1,90	0,4296	1,16	3,28	0,7244	-1,43
0,52	0,0853	-0,75	1,96	0,4471	1,47	3,34	0,7565	0,21
0,58	0,1148	0,65	2,02	0,4638	1,72	3,40	0,7695	0,12
0,64	0,1284	0,61	2,08	0,4619	0,26	3,46	0,7890	0,61
0,70	0,1295	-0,56	2,14	0,4580	-1,36	3,52	0,8115	1,38
0,76	0,1616	1,08	2,20	0,5051	1,64	3,58	0,8230	1,15
0,82	0,1680	0,38	2,26	0,4950	-0,56	3,64	0,8374	1,18
0,88	0,1823	0,41	2,32	0,5141	-0,10	3,70	0,8580	1,78
0,94	0,1805	-1,03	2,38	0,5402	1,00	3,76	0,8394	-1,19
1,00	0,2172	1,02	2,44	0,5452	0,17	3,82	0,8621	-0,41
1,06	0,2129	-0,65	2,50	0,5544	-0,27	3,88	0,8795	-0,10
1,18	0,2458	-0,22	2,56	0,5970	2,32	3,94	0,9054	0,98
1,24	0,2694	0,65	2,62	0,5949	0,86	4,00	0,8870	-1,98
1,30	0,2712	-0,46	2,68	0,5926	-0,63	4,06	0,9105	-1,12
1,36	0,2730	-1,57	2,74	0,6227	0,83	4,12	0,9247	-1,11
1,42	0,3065	0,19	2,80	0,6446	1,54	4,18	0,9444	-0,59
1,48	0,3307	1,11	2,86	0,6479	0,56	4,24	0,9448	-1,83

Tabla 13.

Continuación.

r	A	SR		r	A	SR	r	A	SR
3,52	0,8115	-9,58	*	4,36	0,9585	-1,58	5,20	0,9891	-0,32
3,58	0,8230	-8,95	*	4,42	0,9768	-0,56	5,26	0,9987	0,20
3,64	0,8374	-8,15	*	4,48	0,9693	-1,03	5,32	1,0138	1,04
3,70	0,8580	-6,99	*	4,54	0,9772	-0,61	5,38	1,0036	0,41
3,76	0,8394	-8,11	*	4,60	0,9990	0,61	5,44	1,0034	0,36
3,82	0,8621	-6,83	*	4,66	0,9888	-0,01	5,50	0,9946	-0,18
3,88	0,8795	-5,86	*	4,72	1,0002	0,61	5,56	1,0265	1,62
3,94	0,9054	-4,40	*	4,78	0,9843	-0,35	5,62	0,9918	-0,42
4,00	0,8870	-5,50	*	4,84	0,9894	-0,09	5,68	1,0006	0,06
4,06	0,9105	-4,18	*	4,90	0,9880	-0,20	5,74	0,9905	-0,57
4,12	0,9247	-3,39	*	4,96	1,0069	0,85	5,80	1,0008	0,00
4,18	0,9444	-2,29		5,02	0,9827	-0,58	5,86	0,9998	-0,10
4,24	0,9448	-2,30		5,08	1,0020	0,50	5,92	1,0271	1,44
4,30	0,9463	-2,25		5,14	0,9882	-0,34	5,98	1,0027	0,00

Tabla 14.

Parámetros de regresión de los modelos lineales aplicados a los datos simulados de la Tabla 13.

	N	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Recta 1	69	-0,0240	0,0026	0,2334	0,0011	0,9986	0,0107
Recta 2	31	0,8431	0,0230	0,0289	0,0045	0,9860	0,0135

Tabla 15.

Datos simulados de absorbancia (A), Relación Molar (r) y parámetros del modelo polinómico para estequiometría 4:1 ($K_f = 10^{20}$ M^{-4}; $C_M = 4.3 \cdot 10^{-5}$ M; SD = 0.01). Puntos cercanos al máximo de la curva.

r	A		r	A		r	A	
3,52	0,8115	0,8126	3,88	0,8795	0,8742	4,24	0,9448	0,9509
3,58	0,8230	0,8193	3,94	0,9054	0,9023	4,30	0,9463	0,9446
3,64	0,8374	0,8449	4,00	0,8870	0,9089	4,36	0,9585	0,9520
3,70	0,8580	0,8415	4,06	0,9105	0,9033	4,42	0,9768	0,9686
3,76	0,8394	0,8619	4,12	0,9247	0,9179	4,48	0,9693	0,9676
3,82	0,8621	0,8831	4,18	0,9444	0,9151	4,54	0,9772	0,9862

Parámetros del modelo polinómico

a	0,3495	s_a	4,0701	**N**	36
b	-0,0864	s_b	3,0478	R^2	0,9752
c	0,1041	s_c	0,7584	s_{res}	0,0088
d	-0,0120	s_d	0,0627		

Tabla 16.

Datos simulados para el cálculo de la señal analítica máxima teórica para estequiometría 4:1 ($K_f = 10^{20}$ M^{-4}; $C_M = 4.3 \cdot 10^{-5}$ M; SD = 0.01).

C_M	A		Parámetros de regresión	
0	-0,0097	-0,0107	**N**	16
$1{,}08 \cdot 10^{-5}$	0,2452	0,2418	**a**	-0,0051
$2{,}16 \cdot 10^{-5}$	0,5023	0,4960	s_a	0,0049
$3{,}25 \cdot 10^{-5}$	0,7629	0,7559	**b**	$2{,}32 \cdot 10^{4}$
$4{,}33 \cdot 10^{-5}$	0,9850	1,0067	s_b	$0{,}01 \cdot 10^{4}$
$5{,}41 \cdot 10^{-5}$	1,2519	1,2472	R^2	0,9997
$6{,}49 \cdot 10^{-5}$	1,4723	1,5031	s_{res}	0,0107
$7{,}58 \cdot 10^{-5}$	1,7466	1,7625		

Tabla 17.

Combinaciones de constante de estabilidad y concentraciones estudiadas para la estequiometría 1:1; 2:1, 3:1 y 4:1.

	K_{est}	C_M (M^{-1})				
Estequiometría 1:1	**10^2**	$9,0\ 10^{-1}$ $2,0\ 10^{-1}$	$7,8\ 10^{-2}$ $3,7\ 10^{-2}$	$2,0\ 10^{-2}$ $1,1\ 10^{-2}$	$6,1\ 10^{-3}$ $3,1\ 10^{-3}$	$1,2\ 10^{-3}$
	10^6	$9,0\ 10^{-5}$ $2,0\ 10^{-5}$	$7,8\ 10^{-6}$ $3,7\ 10^{-6}$	$2,0\ 10^{-6}$ $1,1\ 10^{-6}$	$6,2\ 10^{-7}$ $3,1\ 10^{-7}$	$1,2\ 10^{-7}$
	10^{10}	$9,0\ 10^{-9}$ $2,0\ 10^{-9}$	$7,8\ 10^{-10}$ $3,7\ 10^{-10}$	$2,0\ 10^{-10}$ $1,1\ 10^{-10}$	$6,1\ 10^{-11}$ $3,1\ 10^{-11}$	$1,2\ 10^{-11}$
Estequiometría 2:1	**10^5**	$4,7\ 10^{-2}$ $1,6\ 10^{-2}$	$8,1\ 10^{-3}$ $4,8\ 10^{-3}$	$3,2\ 10^{-3}$ $2,1\ 10^{-3}$	$1,5\ 10^{-3}$ $9,9\ 10^{-4}$	$5,9\ 10^{-4}$
	10^{10}	$1,5\ 10^{-4}$ $5,0\ 10^{-5}$	$2,5\ 10^{-5}$ $1,5\ 10^{-5}$	$1,0\ 10^{-5}$ $6,8\ 10^{-6}$	$4,7\ 10^{-6}$ $3,1\ 10^{-6}$	$1,8\ 10^{-6}$
	10^{15}	$4,7\ 10^{-7}$ $1,6\ 10^{-7}$	$8,1\ 10^{-8}$ $4,8\ 10^{-8}$	$3,2\ 10^{-8}$ $2,1\ 10^{-8}$	$1,5\ 10^{-8}$ $9,9\ 10^{-9}$	$5,9\ 10^{-9}$
Estequiometría 3:1	**10^{10}**	$3,2\ 10^{-3}$ $1,2\ 10^{-3}$	$6,8\ 10^{-4}$ $4,4\ 10^{-4}$	$3,1\ 10^{-4}$ $2,2\ 10^{-4}$	$1,7\ 10^{-4}$ $1,2\ 10^{-4}$	$8,3\ 10^{-5}$
	10^{15}	$6,9\ 10^{-5}$ $2,6\ 10^{-5}$	$1,5\ 10^{-5}$ $9,5\ 10^{-6}$	$6,7\ 10^{-6}$ $4,8\ 10^{-6}$	$3,6\ 10^{-6}$ $2,6\ 10^{-6}$	$1,8\ 10^{-6}$
	10^{20}	$1,5\ 10^{-6}$ $5,7\ 10^{-7}$	$3,2\ 10^{-7}$ $2,1\ 10^{-7}$	$1,4\ 10^{-7}$ $1,1\ 10^{-7}$	$7,7\ 10^{-8}$ $5,7\ 10^{-8}$	$3,8\ 10^{-8}$
Estequiometría 4:1	**10^{15}**	$7,7\ 10^{-4}$ $3,1\ 10^{-4}$	$1,8\ 10^{-4}$ $1,2\ 10^{-4}$	$8,9\ 10^{-5}$ $6,7\ 10^{-5}$	$5,1\ 10^{-5}$ $3,9\ 10^{-5}$	$2,8\ 10^{-5}$
	10^{20}	$4,3\ 10^{-5}$ $1,8\ 10^{-5}$	$1,0\ 10^{-5}$ $6,9\ 10^{-6}$	$5,0\ 10^{-6}$ $3,8\ 10^{-6}$	$2,9\ 10^{-6}$ $2,2\ 10^{-6}$	$1,6\ 10^{-6}$
	10^{25}	$2,4\ 10^{-6}$ $9,9\ 10^{-7}$	$5,8\ 10^{-7}$ $3,9\ 10^{-7}$	$2,8\ 10^{-7}$ $2,1\ 10^{-7}$	$1,6\ 10^{-7}$ $1,2\ 10^{-7}$	$9,0\ 10^{-8}$

Tabla 18.

Datos de absorbancia (A), razón molar (r) y residuos estandarizados (SR) para el complejo Co(II)-pRNa$_2$.

r	A	SR		r	A	SR		r	A	SR	
0,125	0,031	4,77	*	1,125	0,301	0,28		2,125	0,580	-3,29	*
0,250	0,040	1,72		1,250	0,345	0,75		2,250	0,624	-0,92	
0,375	0,057	-0,52		1,375	0,373	-0,38		2,375	0,640	-0,98	
0,500	0,101	-0,05		1,500	0,415	-0,12		2,500	0,662	0,09	
0,625	0,146	0,52		1,625	0,455	-0,05		2,625	0,683	0,98	
0,750	0,178	-0,22		1,750	0,507	1,22		2,750	0,702	1,49	
0,875	0,224	0,45		1,875	0,517	-1,72		2,875	0,711	0,09	
1,000	0,255	-0,38		2,000	0,554	-1,96		3,000	0,727	0,03	

Parámetros de los modelos lineales

	N	a	s_a	b	s_b	r	s_{res}
Recta 1	15	-0,0468	0,0052	0,3064	0,0042	0,9975	0,0087
Recta 2	7	0,3101	0,0174	0,1403	0,0066	0,9890	0,0044

Tabla 19.

Datos en las cercanías del máximo y parámetros del modelo polinómico aplicado del complejo Co(II)-pRNa$_2$.

r	A		r	A		r	A	
1,875	0,517	0,510	2,250	0,624	0,628	2,625	0,683	0,679
2,000	0,554	0,558	2,375	0,640	0,639	2,750	0,702	0,690
2,125	0,580	0,585	2,500	0,662	0,664			

Parámetros del modelo polinómico

a	-1,3331	s_a	0,9952	**N**	16
b	1,8376	s_b	1,3111	**r**	0,9936
c	-0,5724	s_c	0,5711	s_{res}	0,0055
d	0,0627	s_d	0,0822		

Tabla 20.

Datos de concentración de metal y absorbancia para el complejo Co(II)-pRNa$_2$. Parámetros del modelo lineal.

C_M	A		Parámetros de regresión			
$4{,}0\cdot10^{-5}$	0,298	0,300	**N**	8		
$6{,}0\cdot10^{-5}$	0,445	0,451	**a**	0,0027	$\mathbf{s_a}$	0,0039
$8{,}0\cdot10^{-5}$	0,598	0,602	**b**	7427,5	$\mathbf{s_b}$	53,6
$1{,}0\cdot10^{-4}$	0,741	0,746	$\mathbf{R^2}$	0,9996	$\mathbf{s_{res}}$	0,0034

B3. TABLAS CAPÍTULO III

Tabla 1.

1er diseño Box-Behnken para la optimización de las variables influyentes en la intensidad de fluorescencia (F) del complejo de inclusión HP–β–CD:2,4–D ($C_{2,4\text{-}D}$ = 4 mg/l). Valores codificados entre paréntesis.

Exp. No.	C_{CD} (M)	pH	T(min)	F
1	0,01 (-1)	2 (-1)	20 (0)	20,6
2	0,05 (1)	2 (-1)	20 (0)	48,8
3	0,01 (-1)	8 (1)	20 (0)	28,0
4	0,05 (1)	8 (1)	20 (0)	54,1
5	0,01 (-1)	5 (0)	10 (-1)	15,5
6	0,05 (1)	5 (0)	10 (-1)	49,5
7	0,01 (-1)	5 (0)	30 (1)	25,8
8	0,05 (1)	5 (0)	30 (1)	61,9
9	0,03 (0)	2 (-1)	10 (-1)	29,1
10	0,03 (0)	8 (1)	10 (-1)	34,8
11	0,03 (0)	2 (-1)	30 (1)	42,7
12	0,03 (0)	8 (1)	30 (1)	47,7
13	0,03 (0)	5 (0)	20 (0)	45,7
14	0,03 (0)	5 (0)	20 (0)	44,0
15	0,03 (0)	5 (0)	20 (0)	46,9

Tabla 2.

2° diseño Box-Behnken para la optimización de las variables influyentes en la intensidad de fluorescencia (F) del complejo de inclusión HP–β–CD:2,4–D ($C_{2,4\text{-}D}$ = 4 mg/l). Valores codificados entre paréntesis.

Exp. No.	C_{CD} (M)	pH	T (min)	F
1	0,05 (1)	2 (-1)	30 (1)	54,8
2	0,09 (3)	2 (-1)	30 (1)	60,9
3	0,05 (1)	8 (1)	30 (1)	51,4
4	0,09 (3)	8 (1)	30 (1)	60,8
5	0,05 (1)	5 (0)	20 (0)	55,0
6	0,09 (3)	5 (0)	20 (0)	65,4
7	0,05 (1)	5 (0)	40 (2)	57,2
8	0,09 (3)	5 (0)	40 (2)	65,1
9	0,07 (2)	2 (-1)	20 (0)	55,3
10	0,07 (2)	8 (1)	20 (0)	53,9
11	0,07 (2)	2 (-1)	40 (2)	59,8
12	0,07 (2)	8 (1)	40 (2)	60,2
13	0,07 (2)	5 (0)	30 (1)	66,3
14	0,07 (2)	5 (0)	30 (1)	67,6
15	0,07 (2)	5 (0)	30 (1)	67,0

Tabla 3.

Valores experimentales, respuestas predichas, residuos y parámetros de regresión para el complejo de inclusión HP–β–CD:2,4–D ($C_{2,4\text{-}D}$ = 4 mg/l).

C_{CD} (M)	F	Respuesta Predicha	Residuos	Parámetros de Regresión	
0,01	14,7	$6{,}70\cdot10^{-04}$	$8{,}49\cdot10^{-06}$	**N**	7
0,02	21,5	$9{,}30\cdot10^{-04}$	$-2{,}68\cdot10^{-06}$	**a**	$4{,}11\cdot10^{-04}$
0,03	25,1	$1{,}19\cdot10^{-03}$	$1{,}18\cdot10^{-06}$	$\mathbf{s_a}$	$0{,}11\cdot10^{-04}$
0,04	27,6	$1{,}45\cdot10^{-03}$	$-5{,}89\cdot10^{-06}$	**b**	$2{,}61\cdot10^{-02}$
0,05	29,2	$1{,}72\cdot10^{-03}$	$-3{,}97\cdot10^{-06}$	$\mathbf{s_b}$	$2{,}37\cdot10^{-04}$
0,06	30,6	$1{,}98\cdot10^{-03}$	$-1{,}66\cdot10^{-05}$	$\mathbf{R^2}$	0,9996
0,07	31,0	$2{,}24\cdot10^{-03}$	$1{,}95\cdot10^{-05}$	$\mathbf{s_{res}}$	$1{,}26\cdot10^{-05}$

C1. TABLAS CAPÍTULO IV

Tabla 1.

Características del material utilizado.

Equipo	Tolerancia*	Corrección** (µl)	Coeficiente de variación (%)	Incertidumbre (k=2)
Matraz 50 ml	± 0,05 ml			
Matraz 2 ml	± 0,025 ml			
Micropipeta 40 – 200 µl		– 0,18 (40) – 0,28 (70) – 0,60 (200)	± 0,60 ± 0,21 ± 0,30	
Micropipeta 200 – 1000 µl		– 0,32 (200) – 0,49 (300) – 1,47 (1000)	± 0,50 ± 0,33 ± 0,30	
Balanza	± 0,033 g			
Balanza analítica		0		± 1 mg

* Intervalo de confianza dado por el fabricante

** Valor entre paréntesis: volumen al cual el fabricante estable la corrección

Tabla 2.

Datos experimentales y parámetros de regresión para el calibrado EC.

Réplicas	Concentración (mg/l)			
	0,25	**0,50**	**0,75**	**1,00**
R_1	0,7325	1,926	2,4174	3,7687
R_2	0,7307	1,9253	2,4613	3,7591
R_3	0,6799	1,9874	2,504	3,7137

Parámetros de regresión					
a	**s_a**	**b**	**s_b**	**R^2**	**s_{res}**
-0,186	0,131	3,845	0,192	0,976	0,186

Tabla 3.

Señales analíticas, concentraciones estimadas mediante EC y recuperaciones, $C_{añadida}$ = 0,5 mg/l.

Señal	C_{est} (mg/l)	ℜ(%)
1,0867	0,331	66,2
1,0982	0,334	66,7
1,0674	0,326	65,1
1,0982	0,334	66,7
1,0713	0,327	65,4
1,1174	0,339	67,8
1,0713	0,327	65,4
1,0905	0,332	66,4
1,0713	0,327	65,3

C2. TABLAS CAPÍTULO VI

Tabla 1.

Datos experimentales para EC y VMC.

Metodología		Réplicas	Concentración (mg/l)			
			0,25	**0,50**	**0,75**	**1,00**
Diciembre 1999	**EC**	R_1	0,7325	1,926	2,4174	3,7687
		R_2	0,7307	1,9253	2,4613	3,7591
		R_3	0,6799	1,9874	2,504	3,7137
	VMC	R_1	0,5485	0,8269	1,6062	2,3802
		R_2	0,5439	0,8386	1,6546	2,3804
		R_3	0,5601	0,8618	1,6098	2,4242
Marzo 2000	**EC**	R_1	0,7354	1,9117	2,4774	3,7586
		R_2	0,741	1,9359	2,4984	3,7804
		R_3	0,7096	1,942	2,5814	3,7243
	VMC	R_1	0,5023	0,9184	1,6725	2,4132
		R_2	0,5112	0,912	1,6827	2,4048
		R_3	0,504	0,9198	1,6291	2,4282
Abril 2000	**EC**	R_1	0,7903	1,6486	2,4877	3,2487
		R_2	0,7941	1,6541	2,4937	3,2584
		R_3	0,7959	1,6546	2,4986	3,2563
	VMC	R_1	0,2122	0,7005	1,0983	1,6519
		R_2	0,2051	0,6959	1,106	1,6257
		R_3	0,2089	0,6929	1,1133	1,6433
Mayo 2000	**EC**	R_1	0,7269	1,8119	2,9036	3,6513
		R_2	0,7406	1,8221	2,8929	3,6661
		R_3	0,7575	1,8060	2,9669	3,6914
	VMC	R_1	0,4796	1,0416	1,7069	2,4610
		R_2	0,4701	1,0523	1,7006	2,4640
		R_3	0,4836	1,0514	1,6644	2,4768

Tabla 2.

Parámetros de regresión de EC y VMC para cada réplica.

Metodología		Réplicas	Parámetros					
			a	**s_a**	**b**	**s_b**	**R^2**	**s_{res}**
Diciembre 1999	**EC**	R_1	-0,189	0,31	3,834	0,453	0,973	0,253
		R_2	-0,186	0,279	3,848	0,407	0,798	0,228
		R_3	-0,183	0,29	3,847	0,424	0,976	0,237
	VMC	R_1	-0,228	0,236	2,51	0,345	0,964	0,193
		R_2	-0,227	0,221	2,53	0,323	0,968	0,18
		R_3	-0,221	0,234	2,534	0,342	0,965	0,191
Marzo 2000	**EC**	R_1	-0,188	0,261	3,854	0,381	0,981	0,213
		R_2	-0,181	0,264	3,872	0,386	0,981	0,216
		R_3	-0,182	0,216	3,873	0,315	0,987	0,176
	VMC	R_1	-0,245	0,156	2,595	0,228	0,985	0,127
		R_2	-0,235	0,161	2,581	0,235	0,984	0,131
		R_3	-0,25	0,171	2,593	0,249	0,982	0,139
Abril 2000	**EC**	R_1	-0,01	0,044	3,286	0,064	0,999	0,036
		R_2	-0,008	0,043	3,293	0,062	0,999	0,035
		R_3	-0,005	0,046	3,29	0,067	0,999	0,037
	VMC	R_1	-0,263	0,055	1,887	0,081	0,996	0,045
		R_2	-0,26	0,039	1,869	0,057	0,998	0,032
		R_3	-0,266	0,039	1,889	0,057	0,998	0,032
Mayo 2000	**EC**	R_1	-0,193	0,161	3,946	0,235	0,993	0,131
		R_2	-0,181	0,145	3,939	0,211	0,994	0,118
		R_3	-0,185	0,176	3,985	0,257	0,992	0,144
	VMC	R_1	-0,23	0,083	2,644	0,121	0,996	0,068
		R_2	-0,236	0,079	2,652	0,115	0,996	0,064
		R_3	-0,229	0,11	2,637	0,161	0,993	0,09

Tabla 3.

Resultados test de Cochran y Snedecor.

	G_{SC}	G_{VMC}	F_{global}
Diciembre 1999	0,372	0,350	1,61
Marzo 2001	0,379	0,366	2,33
Abril 2001	0,361	0,503	1,06
Mayo 2000	0,398	0,479	1,11

Tabla 4.

Parámetros de regresión de EC y VMC con todos los datos.

Metodología		a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Diciembre 1999	**EC**	-0,186	0,131	3,845	0,192	0,976	0,186
	VMC	-0,225	0,103	2,525	0,151	0,965	0,146
Marzo 2000	**EC**	-0,184	0,111	3,867	0,162	0,983	0,157
	VMC	-0,243	0,073	2,589	0,106	0,983	0,103
Abril 2000	**EC**	-0,008	0,020	3,289	0,029	0,999	0,028
	VMC	-0,263	0,020	1,882	0,030	0,997	0,029
Mayo 2000	**EC**	-0,186	0,073	3,957	0,106	0,993	0,103
	VMC	-0,232	0,041	2,644	0,060	0,995	0,098

Tabla 5.

Parámetros de regresión con todos los datos.

Metodología	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Diciembre 1999	0,516	-0,206	0,258	3,185	0,377	0,765
Marzo 2000	0,502	-0,214	0,251	3,228	0,366	0,779
Abril 2000	0,628	-0,135	0,314	2,585	0,459	0,591
Mayo 2000	0,836	-0,159	0,418	2,756	0,610	0,481

Tabla 6.

Coeficientes de Corrección B, incertidumbre u(B) y grados de libertad ν(B) asociados, para $CF_{E\text{-}VM}$.

	B	u(B)	ν(B)
Diciembre 1999	1,5227	0,0140	11
Marzo 2000	1,4933	0,0077	11
Abril 2000*	1,7482	0,0010	11
Mayo 2000	1,4963	0,0028	11

* Esta experiencia es declarada anómala con el Test de Dixon.

Tabla 7.

Concentraciones estimadas y recuperaciones en las dos metodologías (EC y VMC). $C_{añadida}$ = 0,5 mg/l.

C_E (mg/l)	$\Re_E$ (%)	C_{VM} (mg/l)	$\Re_{VM}$ (%)
0,331	66,2	0,505	101,1
0,334	66,7	0,501	100,2
0,326	65,1	0,498	99,5
0,334	66,7	0,500	100,0
0,327	65,4	0,500	100,1
0,339	67,8	0,506	101,1
0,327	65,4	0,491	98,2
0,332	66,4	0,509	101,9
0,327	65,3	0,492	98,4

Tabla 8.

Resultados del test (comparación con 100%) para las recuperaciones obtenidas. $C_{añadida}$ = 0,5 mg/l.

	$\overline{\Re}$	$s_{\Re}$	t_{exp}	P(%)
EC	66,1	0,88	114,2	0,0
VMC	100,1	1,22	0,14	89,1

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2002
COMISIÓN DE DOCTORADO

Tabla 9.

Recuperaciones obtenidas cuantificando con $CF_{E\text{-}VM}$. $C_{añadida}$ = 0,5 mg/l.

Metodología 1 $\Re^*_{E\text{-}VM}$			**Metodología 2** $\Re^*_{E}$
99,6	100,3	98,4	
100,3	98,4	99,9	66,5
97,9	102,0	98,2	

Tabla 10.

Resultados del test de muestras apareadas en las metodologías de validación.

	Metodología 1 $\Re^*_{E\text{-}VM} - \Re_{VM}$	**Metodología 2** $\Re^*_{E} - \Re_{E}$
$\overline{D}$	– 0,62	0,37
s_D	1,07	0,89
t_{exp}	0,897	1,27
P(%)	12,2	24,0

t_{tab}(8 grados de libertad, α = 5%) = 2,306

C3. TABLAS CAPÍTULO VII

Tabla 1.

Datos experimentales para EC, CMC y CFMC.

Metodología		Réplicas	Concentración (µg/l) 500	750	1000	1500
Mayo 2000	EC	R_1	0,6201	0,7937	0,9412	1,3129
		R_2	0,6405	0,8071	0,9512	1,3177
		R_3	0,6184	0,7710	0,9331	1,3210
	CMC	R_1	0,5858	0,7270	0,8686	1,0904
		R_2	0,5968	0,7280	0,8811	1,0973
		R_3	0,5739	0,7182	0,8569	1,0853
	CFMC	R_1	0,5743	0,6772	0,8154	1,0247
		R_2	0,5733	0,6768	0,8173	1,0330
		R_3	0,5732	0,6747	0,8083	1,0273
Enero 2001	EC	R_1	0,9846	1,5446	2,0029	2,8990
		R_2	0,9551	1,4709	1,9460	2,7568
		R_3	0,9783	1,5438	1,9839	2,8486
	CMC	R_1	1,1127	1,5324	2,0687	2,7633
		R_2	1,1150	1,6314	2,1181	2,8456
		R_3	1,0963	1,5171	2,0081	2,7338
	CFMC	R_1	0,9605	1,3203	1,6471	2,2701
		R_2	0,9821	1,3613	1,6566	2,3110
		R_3	0,9727	1,3268	1,7217	2,2920
Febrero 2001	EC	R_1	1,0160	1,5231	1,8331	2,8773
		R_2	1,0275	1,5040	1,8046	2,8522
		R_3	1,0061	1,5179	1,8359	2,8602
	CMC	R_1	0,9987	1,4166	1,8248	2,4664
		R_2	1,0269	1,4450	1,7758	2,5367
		R_3	0,9945	1,3846	1,7892	2,4313
	CFMC	R_1	0,9223	1,3332	1,5869	2,2126
		R_2	0,9600	1,2578	1,5913	2,2032
		R_3	0,9939	1,2654	1,6314	2,2578

Tabla 1.

Continuación.

Metodología		Réplicas	Concentración (µg/l)			
			500	750	1000	1500
Marzo 2001	EC	R_1	1,0658	1,5455	1,9922	3,0000
		R_2	1,0497	1,5482	1,9219	2,9591
		R_3	1,0623	1,5643	2,0107	3,0126
	CMC	R_1	1,0526	1,4358	1,9057	2,5971
		R_2	1,0364	1,4965	1,7527	2,5990
		R_3	1,0568	1,4628	1,7976	2,6268
	CFMC	R_1	0,9743	1,4209	1,6781	2,3374
		R_2	0,9868	1,4149	1,6235	2,3757
		R_3	0,9924	1,4059	1,6775	2,3580
Junio 2001	EC	R_1	1,1296	1,6235	2,1849	3,2580
		R_2	1,1255	1,7021	2,0636	3,2606
		R_3	1,1557	1,6598	2,1529	3,3005
	CMC	R_1	1,1413	1,6605	2,1270	3,1240
		R_2	1,1534	1,6755	2,0760	3,1418
		R_3	1,1290	1,6682	2,0817	3,1531
	CFMC	R_1	1,1015	1,5051	1,9779	2,9750
		R_2	1,0493	1,5570	2,0193	2,9053
		R_3	1,0758	1,6240	2,0651	3,0010
Julio 2001	EC	R_1	1,1709	1,6039	2,1209	3,1484
		R_2	1,0606	1,5083	2,0245	3,1240
		R_3	1,0565	1,5446	2,0379	2,9292
	CMC	R_1	0,9915	1,3865	1,9248	2,4613
		R_2	1,0667	1,4585	1,8519	2,6225
		R_3	1,0281	1,4499	1,9034	2,5181
	CFMC	R_1	0,9720	1,4630	1,6183	2,3111
		R_2	1,0105	1,4914	1,7418	2,4819
		R_3	1,0300	1,4613	1,7151	2,4912

Tabla 2.

Parámetros de regresión de EC, CMC y CFMC para cada réplica.

Metodología	Réplicas	Parámetros					
		a	**s_a**	**b**	**s_b**	**R^2**	**s_{res}**
Mayo 2000							
EC	R_1	0,2703	0,0212	$6,9 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-4}$	0,9982	0,0155
	R_2	0,2964	0,0226	$6,7 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-4}$	0,9978	0,0166
	R_3	0,2487	0,0301	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	0,9964	0,0221
CMC	R_1	0,3464	0,0243	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-4}$	0,9954	0,0179
	R_2	0,3549	0,0272	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$0,3 \cdot 10^{-4}$	0,9943	0,0199
	R_3	0,3315	0,0223	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-4}$	0,9963	0,0163
CFMC	R_1	0,3458	0,0173	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-4}$	0,9972	0,0127
	R_2	0,3389	0,0171	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-4}$	0,9974	0,0125
	R_3	0,3404	0,0134	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-4}$	0,9983	0,0098
Enero 2001							
EC	R_1	0,0838	0,0696	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-5}$	0,9973	0,0511
	R_2	0,1045	0,0763	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$7,6 \cdot 10^{-5}$	0,9964	0,0560
	R_3	0,1092	0,0813	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$8,1 \cdot 10^{-5}$	0,9962	0,0596
CMC	R_1	0,3101	0,1069	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,9919	0,0785
	R_2	0,3172	0,1125	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,9916	0,0826
	R_3	0,2974	0,0749	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$0,7 \cdot 10^{-4}$	0,9959	0,0549
CFMC	R_1	0,3283	0,0302	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	0,9989	0,0222
	R_2	0,3459	0,0357	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	0,9986	0,0262
	R_3	0,3397	0,0704	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$	0,9944	0,0517
Febrero 2001							
EC	R_1	0,0930	0,1096	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,9930	0,0804
	R_2	0,1074	0,1185	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,9916	0,0870
	R_3	0,0927	0,1000	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$9,9 \cdot 10^{-5}$	0,9941	0,0733
CMC	R_1	0,3072	0,0743	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$7,4 \cdot 10^{-5}$	0,9949	0,0546
	R_2	0,3001	0,0423	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$4,2 \cdot 10^{-5}$	0,9984	0,0311
	R_3	0,3047	0,0602	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-5}$	0,9965	0,0442
CFMC	R_1	0,3304	0,0670	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$6,7 \cdot 10^{-5}$	0,9945	0,0492
	R_2	0,3323	0,0151	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	0,9997	0,0111
	R_3	0,3373	0,0372	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-5}$	0,9983	0,0273

Tabla 2.

Continuación.

Metodología	Réplicas	Parámetros					
		a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Marzo 2001	EC R_1	0,0907	0,0330	$1,9\cdot10^{-3}$	$3,3\cdot10^{-5}$	0,9994	0,0242
	EC R_2	0,0953	0,0756	$1,9\cdot10^{-2}$	$7,5\cdot10^{-5}$	0,9969	0,0555
	EC R_3	0,0915	0,0282	$1,9\cdot10^{-2}$	$2,8\cdot10^{-5}$	0,9996	0,0207
	CMC R_1	0,2902	0,0679	$1,5\cdot10^{-3}$	$6,7\cdot10^{-5}$	0,9963	0,0499
	CMC R_2	0,2855	0,0889	$1,5\cdot10^{-3}$	$8,8\cdot10^{-5}$	0,9934	0,0652
	CMC R_3	0,2732	0,0414	$1,6\cdot10^{-3}$	$4,1\cdot10^{-5}$	0,9986	0,0304
	CFMC R_1	0,3564	0,0804	$1,3\cdot10^{-3}$	$8,0\cdot10^{-5}$	0,9928	0,0590
	CFMC R_2	0,3303	0,0919	$1,3\cdot10^{-3}$	$9,1\cdot10^{-5}$	0,9910	0,0674
	CFMC R_3	0,3512	0,0570	$1,3\cdot10^{-3}$	$5,7\cdot10^{-5}$	0,9965	0,0418
Junio 2001	EC R_1	0,0423	0,0290	$2,1\cdot10^{-3}$	$2,9\cdot10^{-5}$	0,9996	0,0213
	EC R_2	0,0639	0,1228	$2,1\cdot10^{-3}$	$1,2\cdot10^{-4}$	0,9933	0,0901
	EC R_3	0,0542	0,0594	$2,1\cdot10^{-3}$	$5,9\cdot10^{-5}$	0,9985	0,0436
	CMC R_1	0,1623	0,0209	$2,0\cdot10^{-3}$	$2,1\cdot10^{-5}$	0,9998	0,0153
	CMC R_2	0,1632	0,0685	$2,0\cdot10^{-3}$	$6,8\cdot10^{-5}$	0,9976	0,0503
	CMC R_3	0,1275	0,0630	$2,0\cdot10^{-3}$	$6,2\cdot10^{-5}$	0,9981	0,0630
	CFMC R_1	0,1191	0,0594	$1,9\cdot10^{-3}$	$5,9\cdot10^{-5}$	0,9981	0,0436
	CFMC R_2	0,1523	0,0406	$1,8\cdot10^{-3}$	$4,0\cdot10^{-5}$	0,9990	0,0298
	CFMC R_3	0,1552	0,0508	$1,9\cdot10^{-3}$	$5,0\cdot10^{-5}$	0,9986	0,0373
Julio 2001	EC R_1	0,1416	0,0493	$2,0\cdot10^{-3}$	$4,9\cdot10^{-5}$	0,9988	0,0361
	EC R_2	-0,0197	0,0645	$2,1\cdot10^{-3}$	$6,4\cdot10^{-5}$	0,9981	0,0474
	EC R_3	0,1380	0,0357	$1,9\cdot10^{-3}$	$3,5\cdot10^{-5}$	0,9993	0,0262
	CMC R_1	0,3006	0,1591	$1,5\cdot10^{-3}$	$1,6\cdot10^{-4}$	0,9778	0,1167
	CMC R_2	0,2915	0,0058	$1,6\cdot10^{-3}$	$5,8\cdot10^{-6}$	0,9999	0,0042
	CMC R_3	0,3299	0,1027	$1,5\cdot10^{-3}$	$1,0\cdot10^{-4}$	0,9907	0,0753
	CFMC R_1	0,3885	0,1321	$1,3\cdot10^{-3}$	$1,3\cdot10^{-4}$	0,9795	0,0970
	CFMC R_2	0,3387	0,0915	$1,4\cdot10^{-3}$	$9,1\cdot10^{-5}$	0,9920	0,0671
	CFMC R_3	0,3307	0,0740	$1,4\cdot10^{-3}$	$7,3\cdot10^{-5}$	0,9948	0,0543

Tabla 3.

Resultados test de Cochran

	G_{EC}	G_{CMC}	G_{CFMC}	G_{global}
Mayo 2000	0,4855	0,4046	0,3899	0,4611
Enero 2001	0,3827	0,4262	0,6941	0,5315
Febrero 2001	0,3897	0,5051	0,7361	0,5973
Marzo 2001	0,7523	0,5549	0,4649	0,3998
Junio 2001	0.7753	0.5158	0,4545	0,4548
Julio 2001	0,5295	0,7053	0,5578	0,1955*

*Este valor corresponde al estadístico χ^2 del test de Bartlett.

Tabla 4.

Parámetros de regresión de EC, CMC y CFMC con todos los datos.

Metodología		a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Mayo 2000	**EC**	0,2718	0,0135	$6,9 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-4}$	0,9924	0,0172
	CMC	0,3442	0,0126	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-4}$	0,9878	0,0160
	CFMC	0,3417	0,0074	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-4}$	0,9948	0,0094
Enero 2001	**EC**	0,0992	0,0459	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$	0,9878	0,0583
	CMC	0,3082	0,0555	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$	0,9787	0,0706
	CFMC	0,3380	0,0248	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,9930	0,0315
Febrero 2001	**EC**	0,0977	0,0495	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$4,9 \cdot 10^{-5}$	0,9857	0,0629
	CMC	0,3040	0,0328	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	0,9902	0,0418
	CFMC	0,3334	0,0240	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	0,9930	0,0304
Marzo 2001	**EC**	0,0925	0,0282	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	0,9958	0,0358
	CMC	0,2830	0,0324	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$	0,9914	0,0412
	CFMC	0,3460	0,0351	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	0,9866	0,0446

Tabla 4.

Continuación

Metodología		a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Junio 2001	**EC**	0,0535	0,0379	$2{,}1\cdot10^{-3}$	$3{,}8\cdot10^{-5}$	0,9938	0,0482
	CMC	0,1510	0,0252	$2{,}0\cdot10^{-3}$	$2{,}5\cdot10^{-5}$	0,9968	0,0320
	CFMC	0,1422	0,0330	$1{,}9\cdot10^{-3}$	$3{,}3\cdot10^{-5}$	0,9940	0,0420
Julio 2001	**EC**	0,0866	0,0557	$2{,}0\cdot10^{-3}$	$5{,}5\cdot10^{-5}$	0,9846	0,0708
	EC*	0,1398	0,0751	$1{,}9\cdot10^{-3}$	$7{,}5\cdot10^{-5}$	0,9825	0,0779
	CMC	0,3073	0,0542	$1{,}5\cdot10^{-3}$	$5{,}4\cdot10^{-5}$	0,9751	0,0689
	CFMC	0,3526	0,0620	$1{,}4\cdot10^{-3}$	$6{,}2\cdot10^{-5}$	0,9616	0,0788

*Parámetros obtenidos con las réplicas R_1 y R_3

Tabla 5.

Resultados del test de Bomferroni para la comparación de los términos independientes para las tres réplicas EC en Julio 01.

Réplicas	t(a)	P (a) %
$R_1 - R_2$	7,01	0,0
$R_1 - R_3$	0,15	88,0
$R_2 - R_3$	6,85	0,0

Tabla 6.

Parámetros de regresión con todos los datos.

Metodología	a	s_a	b	s_b	R^2	s_{res}
Mayo 2000	0,3193	0,0339	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$	0,7876	0,0747
Enero 2001	0,2485	0,0777	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$7,7 \cdot 10^{-5}$	0,8604	0,1711
Febrero 2001	0,2450	0,0707	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$	0,8688	0,1556
Marzo 2001	0,2405	0,0715	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$7,1 \cdot 10^{-5}$	0,8793	0,1573
Junio 2001	0,1156	0,0383	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	0,9759	0,0842
Julio 2001	0,2824	0,0792	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$7,9 \cdot 10^{-5}$	0,8647	0,1643

Tabla 7.

Resultados del test de Bonferroni para la comparación de las pendientes y los términos independientes.

Metodología		t(b)	P(b) %	t(a)	P(a) %
Mayo 2000	**EC – CMC**	13,36	0,0	14,57	0,0
	EC – CFMC	16,58	0,0	15,06	0,0
	CMC – CFMC	3,22	0,3	0,51	61,2
Enero 2001	**EC – CMC**	3,581	0,1	12,5	0,0
	EC – CFMC	11,32	0,0	14,3	0,0
	CMC – CFMC	7,75	0,0	1,78	8,5
Febrero 2001	**EC – CMC**	7,37	0,0	11,86	0,0
	EC – CFMC	11,47	0,0	13,54	0,0
	CMC – CFMC	4,09	0,0	1,69	10,1
Marzo 2001	**EC – CMC**	8,07	0,0	11,51	0,0
	EC – CFMC	12,56	0,0	15,32	0,0
	CMC – CFMC	4,48	0,0	3,81	0,1

Tabla 7.

Continuación

Metodología		t(b)	P(b) %	t(a)	P(a) %
Junio 2001	EC – CMC	3,02	0,5	5,59	0,0
	EC – CFMC	5,15	0,0	5,09	0,0
	CMC – CFMC	2,13	5,1	0,505	61,7
Julio 2001	EC – CMC	4,37	0,0	4,85	0,0
	EC – CFMC	5,67	0,0	6,16	0,0
	CMC – CFMC	1,45	15,8	1,46	15,4

Tabla 8.

Coeficientes de Corrección A y B, incertidumbre u(A) y u(B) y grados de libertad ν(A) y ν(B) asociados para $CF_{E\text{-}CFM}$.

	A	u(A)	ν(A)	B	u(B)	ν(B)
Mayo 2000	-151,9407	32,4830	11	1,5007	0,0378	11
Enero 2001	-181,9141	38,2210	11	1,4035	0,0435	11
Febrero 2001	-186,5065	42,1189	11	1,4411	0,0474	11
Marzo 2001	-188,9005	29,8842	11	1,4325	0,0426	11
Junio 2001*	-47,1954	26,2130	11	1,1336	0,0281	11
Julio 2001	-153,9126	66,3287	7,5	1,3976	0,0823	7,5

* Esta experiencia es declarada anómala con el Test de Dixon.

Tabla 9

Coeficiente de Corrección B, incertidumbre y grados de libertad asociados para CF_{CM-CFM}.

	B	**u(B)**	**ν(B)**
Mayo 200	1,0972	$1,05 \cdot 10^{-3}$	11
Enero 2001	1,2760	$2,33 \cdot 10^{-3}$	11
Febrero 2001	1,1574	$1,14 \cdot 10^{-3}$	11
Marzo 2001	1,1544	$1,47 \cdot 10^{-3}$	11
Junio 2001	1,0553	$0,51 \cdot 10^{-3}$	11
Julio 2001	1,0912	$3,87 \cdot 10^{-3}$	11

Tabla 10.

Concentraciones estimadas y recuperaciones para las tres metodologías (EC, CMC, CFMC).

$C_{añadida}$ = 750 µg/l						
C_E	602,2	645,7	691,8	663,6	624,7	555,2
$\Re(\%)_E$	80,3	86,1	92,2	88,5	83,3	74,0
C_{CM}	680,1	585,5	720,3	700,5	621,9	733,3
$\Re(\%)_{CM}$	90,7	78,1	96,0	93,4	82,9	80,0
C_{CFM}	751,7	724,4	810,5	761,8	832,2	767,5
$\Re(\%)_{CFM}$	100,2	96,6	108,1	101,6	111,0	82,9
$C_{añadida}$ = 1500 µg/l						
C_E	1048,7	1269,4	1201,7	1129,3	1315,3	1140,7
$\Re(\%)_E$	69,9	84,6	80,1	75,3	87,7	76,0
C_{CM}	1290,8	1271,4	1355,2	1278,4	1363,7	1350,0
$\Re(\%)_{CM}$	86,1	84,8	90,3	85,2	90,9	90,0
C_{CFM}	1421,8	1599,7	1545,2	1428,9	1721,7	1440,4
$\Re(\%)_{CFM}$	94,8	106,6	103,0	95,3	114,8	96,0

Tabla 11.

Resultados del test (comparación con 100%) para las recuperaciones obtenidas.

	$C_{añadida}$ = 750 ppb			$C_{añadida}$ = 1500 ppb		
	EC	**CMC**	**CFMC**	**EC**	**CMC**	**CFMC**
$\overline{\Re}$	84,1	86,9	100,1	77,1	85,9	101,8
$s_{\Re}$	6,42	7,51	9,90	4,94	4,07	7,98
t_{cal}	6,074	4,290	0,014	11,347	8,467	0,538
P(%)	0,2	0,8	98,9	0,0	0,0	61,4

Tabla 12.

Recuperaciones obtenidas cuantificando con $CF_{E\text{-}CFM}$ y $CF_{CM\text{-}CFM}$.

	Metodología 1		**Metodología 2**	
	$\Re^*_{E\text{-}CFM}$	$\Re^*_{CM\text{-}CFM}$	$\Re^*_{E}$	$\Re^*_{CM}$
$C_{añadida}$ = 750 µg/l	92,2	103,2	84,4	87,8
	100,5	88,9	82,9	87,8
	109,4	109,4	81,7	87,8
	104,0	106,4	82,4	87,8
	96,5	94,4	83,6	87,8
	83,2	91,1	86,3	87,8
$C_{añadida}$ = 1500 µg/l	88,8	98,0	78,7	87,8
	109,9	96,5	77,0	87,8
	103,5	102,9	77,4	87,8
	96,5	97,0	78,0	87,8
	97,6	102,5	77,9	87,8
	98,2	99,7	77,3	87,8

Tabla 13.

Resultados del test de muestras apareadas en las metodologías de validación.

	Metodología 1		**Metodología 2**	
	$\Re^*_{E\text{-}CFM} - \Re_{CFM}$	$\Re^*_{CM\text{-}CFM} - \Re_{CFM}$	$\Re^*_{E} - \Re_{E}$	$\Re^*_{CM} - \Re_{CM}$
D	2,55	1,74	0,87	0,43
s_D	7,19	7,86	7,16	5,42
t_{cal}	1,229	0,768	0,419	0,277
P(%)	24,5	45,9	68,3	78,7

t_{tab}(11 grados de liberta, $\alpha = 5\%$) = 2,201

Tabla 14.

Características del material utilizado.

Equipo	**Tolerancia***	**Corrección** (µl)**	**Coeficiente de variación (%)**	**Uncertainty (k=2)**
Matraz 250 ml	± 0,80 ml			
Matraz 50 ml	± 0,05 ml			
Matraz 10 ml	± 0,025 ml			
Micropipeta 5 – 40 µl		0,03 (5) 0,02 (10) 0,04 (40)	± 2,00 ± 0,50 ± 0,50	
Balanza analítica		0		± 1 mg

* Intervalo de confianza dado por el fabricante

** Valor entre paréntesis: volumen al cual el fabricante estable la corrección

C4. TABLAS CAPÍTULO IX

Tabla 1.

Concentraciones de analito y muestra

Herbicida	*Agua grifo*		*Agua río*	
	Muestra (g/l)	**Analito (mg/l)**	**Muestra (g/l)**	**Analito (mg/l)**
2,4-D	800	5,76	800	17,28
2,4,5-T	800	11,60	800	14,00
MCPP	900	9,00	600	20,40
MCPA	800	14,40	600	9,60

Tabla 2.

Rangos de concentración para los calibrados AC e YC y factor de dilución de la muestra en AC,

		Herbicida			
		2,4-D	**2,4,5-T**	**MCPP**	**MCPA**
Agua grifo	**Rango AC (mg/l)**	0 – 5,2	0 – 5,6	0 – 4,0	0 – 4,6
	Factor de dilución	0,2	0,2	0,2	0,25
	Rango YC (g/l)	40 – 200	40 – 200	90 – 450	90 – 450
Agua río	**Rango AC (mg/l)**	0 – 5,8	0 – 5,6	0 – 6,8	0 – 4,6
	Factor de dilución	0,2	0,2	0,1	0,35
	Rango YC (g/l)	80 – 400	40 – 200	30 – 150	90 – 450

Tabla 3.

Diseño Doehlert para la optimización de la concentración micelar y el tiempo de irradiación del 2,4-D

Exp.	Concentración Micelar (%)	Tiempo de irradiación (min)	PIF
1	0,2 (-0,5)	20 (1)	51,1
2	0,4 (0,5)	20 (1)	58,1
3	0,1 (-1)	15 (0)	47,2
4	0,3 (0)	15 (0)	64,5
5	0,3 (0)	15 (0)	63,8
6	0,3 (0)	15 (0)	66,0
7	0,5 (1)	15 (0)	61,1
8	0,2 (-0,5)	10 (-1)	46,0
9	0,4 (0,5)	10 (-1)	57,6

Los valores codificados para cada experiencia aparecen entre paréntesis

Tabla 4.

Diseños Doehlert (diseño 1: experiencias 1-9, diseño 2: experiencias 10-18) para la optimización de la concentración micelar y el tiempo de irradiación del MCPP

Exp.	Concentración Micelar (%)	Tiempo de irradiación (min)	PIF
1	0,2 (-0,5)	15 (1)	70,0
2	0,4 (0,5)	15 (1)	65,3
3	0,1 (-1)	10 (0)	57,3
4	0,3 (0)	10 (0)	71,3
5	0,3 (0)	10 (0)	71,8
6	0,3 (0)	10 (0)	67,1
7	0,5 (1)	10 (0)	80,0
8	0,2 (-0,5)	5 (-1)	85,4
9	0,4 (0,5)	5 (-1)	96,6
10	0,6 (1,5)	5 (-1)	103,7
11	0,8 (2,5)	5 (-1)	105,3
12	0,5 (1)	3 (-1,4)	109,8
13	0,7 (2)	3 (-1,4)	114,6
14	0,7 (2)	3 (-1,4)	116,8
15	0,7 (2)	3 (-1,4)	115,8
16	0,9 (3)	3 (-1,4)	109,4
17	0,6 (1,5)	1 (-1,8)	110,0
18	0,8 (2,5)	1 (-1,8)	111,1

Los valores codificados para cada experiencia aparecen entre paréntesis

Tabla 5.

Diseño Doehlert para la optimización de la concentración micelar y el tiempo de irradiación del MCPA

Exp.	Concentración Micelar (%)	Tiempo de irradiación (min)	PIF
1	0,6 (-0,5)	5 (1)	69,6
2	0,3 (0,5)	5 (1)	70,8
3	0,5 (-1)	3 (0)	65,1
4	0,7 (0)	3 (0)	103,5
5	0,7 (0)	3 (0)	102,6
6	0,7 (0)	3 (0)	104,3
7	0,9 (1)	3 (0)	80,4
8	0,6 (-0,5)	1 (-1)	75,8
9	0,8 (0,5)	1 (-1)	86,1

Los valores codificados para cada experiencia aparecen entre paréntesis

Tabla 6.

Diseños Doehlert (diseño 1: experiencias 1-8, diseño 2: experiencias 9-16) para la optimización de la concentración micelar y el tiempo de irradiación del 2,4,5-T

Exp.	Concentración Micelar (%)	Tiempo de irradiación (min)	PIF
1	0,3 (-0,5)	15 (1)	42,2
2	0,7 (0,5)	15 (1)	49,0
3	0,1 (-1)	10 (0)	26,7
4	0,5 (0)	10 (0)	44,5
5	0,5 (0)	10 (0)	42,4
6	0,9 (1)	10 (0)	50,5
7	0,3 (-0,5)	5 (-1)	21,7
8	0,7 (0,5)	5 (-1)	29,3
9	0,7 (0,5)	15 (1)	49,0
10	1,1 (1,5)	15 (1)	52,9
11	0,5 (0)	10 (0)	44,5
12	0,9 (1)	10 (0)	50,5
13	0,9 (1)	10 (0)	51,5
14	1,3 (2)	10 (0)	49,2
15	0,7 (0,5)	5 (-1)	29,3
16	1,1 (1,5)	5 (-1)	32,3

Los valores codificados para cada experiencia aparecen entre paréntesis

Tabla 7.

Datos experimentales y parámetros de regresión para los calibrados EC, YC y AC en la determinación de 2,4-D en agua de grifo y de río

Agua grifo					
EC		**YC**		**AC (S = 160 g/l)**	
C_A (mg/l)	**R**	**S (g/l)**	**R**	**C_A (mg/l)**	**R**
0	6	80	10,7	0	14,4
0	6,2	160	16,3	1,44	28,8
0	5,9	240	21,8	2,88	42
1,3	17,8	320	27,3	4,32	56,5
1,3	16,5	400	31,8	5,76	69,1
1,3	18				
2,6	29,1				
2,6	28,6				
2,6	29				
3,9	44,6				
3,9	42,3				
3,9	41,9				
5,2	56,8				
5,2	54,2				
5,2	53,9				
6,5	67,2				
6,5	69,7				
6,5	65,5				

Agua río			
YC		**AC (S = 160 g/l)**	
S (g/l)	**R**	**C_A (mg/l)**	**R**
40	12,6	0	37,5
80	19,4	1,3	49,2
120	28	2,6	63,8
160	36,3	3,9	72,9
200	45,3	5,2	91

Parámetros de regresión

	Agua grifo			*Agua río*	
	EC	**YC**	**AC (S = 160 g/l)**	**YC**	**AC (S = 160 g/l)**
n	18	5	5	5	5
a	5,303	5,620	14,740	3,630	36,740
s_a	0,538	0,403	0,422	0,731	1,733
b	9,534	0,066	9,521	0,206	10,054
s_b	0,137	0,001	0120	0,006	0,544
s_{res}	1,289	0,385	0,545	0,697	2,237

Tabla 8.

Datos experimentales y parámetros de regresión para los calibrados EC, YC y AC en la determinación de MCPP en agua de grifo y de río

Agua grifo					
EC		**YC**		**AC (S = 180 g/l)**	
C_A (mg/l)	**R**	**S (g/l)**	**R**	**C_A (mg/l)**	**R**
0	8	90	21,6	0	40,7
0	8,6	180	39,6	1	59,9
0	7,6	270	55,2	2	81,3
1,375	38,7	360	73,5	3	99
1,375	35,8	450	89,9	4	116,4
1,375	36,8				
2,75	64,3				
2,75	63				
2,75	62,3				
4,125	90,6				
4,125	88,8				
4,125	87,2				
5,5	116				
5,5	118,4				
5,5	116				
6,875	145,2				
6,875	140,2				
6,875	138,8				

Agua río			
YC		**AC (S = 60 g/l)**	
S (g/l)	**R**	**C_A (mg/l)**	**R**
30	25	0	46,5
60	39,8	1,71	77,1
90	54,1	3,42	108,2
120	65,8	5,13	137,5
150	74,2	6,84	170,2

Parámetros de regresión	*Agua grifo*			*Agua río*	
	EC	**YC**	**AC (S = 180 g/l)**	**YC**	**AC (S = 60 g/l)**
n	18	5	5	5	5
a	9,375	4,810	41,360	6,760	43,340
s_a	0,778	0,713	1,065	1,367	0,641
b	19,354	0,189	19,050	0,635	18,000
s_b	0,187	0,002	0,435	0,035	0,153
b^C			– 0,0012		
$s_{b,c}$			0,0002		
s_{res}	1,863	0,680	1,374	0,637	0,878

Tabla 9.

Datos experimentales y parámetros de regresión para los calibrados EC, YC y AC en la determinación de MCPA en agua de grifo y de río

Agua grifo					
EC		**YC**		**AC (S = 200 g/l)**	
C_A (mg/l)	**R**	**S (g/l)**	**R**	**C_A (mg/l)**	**R**
0	7,9	90	5,1	0	42,9
0	7,2	180	30,4	1,14	64,1
0	7,3	270	58,4	2,28	84,1
1,5	41,1	360	83,6	3,42	102,1
1,5	40,1	450	111,8	4,56	120,8
1,5	39,5				
3	70				
3	69,2				
3	68,1	*Agua río*			
4,5	98,8	**YC**		**AC (S = 210 g/l)**	
4,5	99,4	**S (g/l)**	**R**	**C_A (mg/l)**	**R**
4,5	95,7	90	11,1	0	41,7
6	129,3	180	35,7	1,14	63,7
6	126,8	270	57,1	2,28	83,4
6	122,4	360	80,4	3,42	101,1
7,5	157,6	450	105,4	4,56	119,9
7,5	152,6				
7,5	150,4				

Parámetros de regresión

	Agua grifo			*Agua río*	
	EC	**YC**	**AC (S = 200 g/l)**	**YC**	**AC (S = 210 g/l)**
n	18	5	5	5	5
a	9,768	– 22,120	44,040	– 12,050	43,200
s_a	1,041	0,953	0,898	1,104	1,123
b	19,371	0,296	17,000	0,259	17,000
s_b	0,229	0,003	0,322	0,004	0,402
s_{res}	2,493	0,908	1,160	1,052	1,450

Tabla 10.

Datos experimentales y parámetros de regresión para los calibrados EC, YC y AC en la determinación de 2,4,5-T en agua de grifo y de río

Agua grifo

EC		YC		AC (S = 160 g/l)	
C_A (mg/l)	R	S (g/l)	R	C_A (mg/l)	R
0	6,7	40	9,1	0	20,2
0	6,2	80	13,1	1,4	28,9
0	6,2	120	16,1	2,8	38,8
1,4	15,5	160	20,2	4,2	47,5
1,4	15	200	23,4	5,6	57,8
1,4	16				
2,8	24,3				
2,8	23				
2,8	24,2				
4,2	33,5				
4,2	32,9				
4,2	32,7				
5,6	40,5				
5,6	42,1				
5,6	42,6				
7	51,8				
7	50,9				
7	49,6				

Agua río

YC		AC (S = 160 g/l)	
S (g/l)	R	C_A (mg/l)	R
40	7,9	0	24,9
80	11,9	1,4	33,5
120	16,4	2,8	43,4
160	20,8	4,2	51,2
200	25,7	5,6	60,7

Parámetros de regresión

	Agua grifo			*Agua río*	
	EC	YC	AC (S = 160 g/l)	YC	AC (S = 160 g/l)
n	18	5	5	5	5
a	6,403	5,670	19,880	3,190	24,880
s_a	0,284	0,308	0,371	0,288	0,391
b	6,322	0,089	6,700	0,111	6,378
s_b	0,067	0,002	0,108	0,002	0,114
s_{res}	0,679	0,294	0,479	0,275	0,504

Tabla 11.

Resultados del test t-Student para la comparación de las pendientes de los calibrados EC y AC e intervalo de confianza para los términos independientes de los calibrados EC e YC.

Aplicación	t(b)	P(b) %	$a_E \pm t \cdot s_{aE}$	$a_Y \pm t \cdot s_{aY}$
2,4-D (agua grifo)	0,045	96,4	5,30 ± 1,14	5,62 ± 1,28
2,4-D (agua río)	1,324	20,1	5,30 ± 1,14	3,63 ± 2,33
MCPP (agua grifo)	0,511	61,5	9,37 ± 1,65	4,81 ± 2,27
MCPP (agua río)	3,697	0,1	9,37 ± 1,65	6,76 ± 4,35
MCPA (agua grifo)	3,478	0,3	9,77 ± 2,21	–22,12 ± 3,03
MCPA (agua río)	3,440	0,3	9,77 ± 2,21	–12,05 ± 3,51
2,4,5-T (agua grifo)	2,337	3,1	6,40 ± 0,60	5,67 ± 0,98
2,4,5-T (agua río)	0,335	74,1	6,40 ± 0,60	3,19 ± 0,92

Tabla 12.

Componente de error constante, factor de proporcionalidad y factor de saturación

Aplicación	K	P	K_S
2,4-D (agua grifo)	—	—	—
2,4-D (agua río)	—	—	—
MCPP (agua grifo)	– 0,24	—	—
MCPP (agua río)	—	– 0,0012	—
MCPA (agua grifo)	– 1,65	—	0,878
MCPA (agua río)	– 1,13	—	0,880
2,4,5-T (agua grifo)	—	—	—
2,4,5-T (agua río)	– 0,51	—	—

Tabla 13.

Parámetros g_A y g_E y grados de libertad ν_A y ν_{pooled} para el cálculo de la incertidumbre con MOSA y MOSR respectivamente

Aplicación	g_A	ν_A	g_E	ν_{pooled}
2,4-D (agua grifo)	0,0017	3	0,0008	18
2,4-D (agua río)	0,0321	3	0,0008	10
MCPP (agua grifo)	0,0057	3	0,0004	16
MCPP (agua río)	0,0008	3	0,0004	13
MCPA (agua grifo)	0,0039	3	0,0022*	6
MCPA (agua río)	0,0061	3	0,0039*	5
2,4,5-T (agua grifo)	0,0023	3	0,0010	13
2,4,5-T (agua río)	0,0035	3	0,0004	14

* g_A

Tabla 14.

Resultados del test de Snedecor para la comparación de las varianzas residuales de los calibrados EC e YC

Aplicación	F_{exp}	P %
2,4-D (agua grifo)	8095,5	0,0
2,4-D (agua río)	615,9	0,0
MCPP (agua grifo)	6127,2	0,0
MCPP (agua río)	29,0	3,4
MCPA (agua grifo)*	10159,6	0,0
MCPA (agua río)*	11831,4	0,0
2,4,5-T (agua grifo)	831,6	0,0
2,4,5-T (agua río)	948,9	0,0

* F_{exp} y P(%) entre los calibrados AC e YC

C5. TABLAS CAPÍTULO X

Tabla 1.

Concentraciones de analito y muestra

Herbicida	*Agua grifo*		*Agua río*	
	Muestra (g/l)	**Analito (mg/l)**	**Muestra (g/l)**	**Analito (mg/l)**
2,4-D	800	5,76	800	17,28
2,4,5-T	800	11,60	800	14,00
MCPP	900	9,00	600	20,40
MCPA	800	14,40	600	9,60

Tabla 2.

Concentraciones de analito y muestra asignados a los valores codificados para los diseños experimentales de cada aplicación

Aplicación		Estrella	C_A (mg/l)		S (g/l)	
			-1	**1**	**-1**	**1**
2,4-D	**Grifo**	Ortogonal	2,00	6,00	80,0	160,0
	Río	Ortogonal	2,00	6,00	80,0	160,0
MCPP	**Grifo**	Centrada en las caras	0,00	4,00	0,0	180,0
	Río	Centrada en las caras	0,00	6,84	0,0	180,0
MCPA	**Grifo**	Ortogonal	0,38	5,61	12,8	187,2
	Río	Ortogonal	0,38	5,61	12,8	187,2
2,4,5-T	**Grifo**	Ortogonal	1,00	6,00	20,0	200,0
	Río	Ortogonal	2,00	6,00	50,0	300,0

Tabla 3.

Diseño central compuesto con estrella ortogonal y resultados experimentales para 2,4-D en agua de grifo y río.

Exp.	C_A (mg/l)	S (g/l)	PIF (grifo)	PIF (río)
1	2,00	80,0	27,1	37,7
2	6,00	80,0	63,3	62,3
3	2,00	160,0	32,9	46,9
4	6,00	160,0	68,8	76,4
5	1,70	120,0	27,7	39,0
6	6,29	120,0	66,4	69,2
7	4,00	74,1	45,4	47,2
8	4,00	165,9	49,6	62,9
9	4,00	120,0	47,7	54,5
10	4,00	120,0	47,0	55,9
11	4,00	120,0	46,9	55,4

Tabla 4.

Diseño central compuesto con estrella centrada en las caras y resultados experimentales para MCPP en agua de grifo y río.

Exp.	C_A (mg/l) (grifo)	C_A (mg/l) (río)	S (g/l) (grifo y rio)	PIF (grifo)	PIF (río)
1	0,00	0,00	0,0	7,8	5,7
2	4,00	6,84	0,0	85	97,9
3	0,00	0,00	180,0	42,6	82,1
4	4,00	6,84	180,0	116,4	160,9
5	0,00	0,00	90,0	24,7	46,5
6	4,00	6,84	90,0	98,6	132,8
7	2,00	3,42	0,0	47,5	54,8
8	2,00	3,42	180,0	81,3	119,8
9	2,00	3,42	90,0	61,7	89,6
10	2,00	3,42	90,0	63,1	93,7
11	2,00	3,42	90,0	62,5	91,6
12	—	3,42	90,0	—	91,9

Tabla 5.

Diseño central compuesto con estrella ortogonal y resultados experimentales para MCPA en agua de grifo y río.

Exp.	C_A (mg/l)	S (g/l)	PIF (grifo)	PIF (río)
1	0,39	12,8	26,4	25,4
2	5,61	12,8	108,9	114,2
3	0,39	187,2	73,9	67,8
4	5,61	187,2	147,4	139,3
5	0,00	100,0	40,1	38,4
6	6,00	100,0	133,8	135
7	3,00	0,0	64,1	68,2
8	3,00	200,0	115,9	112,4
9	3,00	100,0	90,3	87,0
10	3,00	100,0	88,7	89,3
11	3,00	100,0	89,8	88,2

Tabla 6.

Diseño central compuesto con estrella ortogonal y resultados experimentales para 2,4,5-T en agua de grifo y río.

	Grifo			Río		
Exp.	C_A (mg/l)	S (g/l)	PIF	C_A (mg/l)	S (g/l)	PIF
1	1,00	20,0	19,8	2,00	50,0	28,3
2	6,00	20,0	49,2	6,00	50,0	50,3
3	1,00	200,0	34,7	2,00	300,0	52,5
4	6,00	200,0	66,8	6,00	300,0	70,7
5	0,63	110,0	26,2	1,71	175,0	40,3
6	6,37	110,0	61,1	6,29	175,0	61,9
7	3,50	6,7	32,9	4,00	31,6	38,5
8	3,50	213,3	50,5	4,00	318,4	62,6
9	3,50	110,0	42,2	4,00	175,0	51,2
10	3,50	110,0	42,2	4,00	175,0	51,1
11	3,50	110,0	43,3	4,00	175,0	52,1

Tabla 7.

Parámetros de regresión para las aplicaciones estudiadas

Coef.	Aplicación							
	2,4-D		MCPP		MCPA		2,4,5-T	
	grifo	río	grifo	río	grifo	río	grifo	río
b_0	5,109	9,773	8,686	6,567	15,323	14,698	11,486	16,020
s_{b0}	1,228	1,818	0,835	1,542	1,624	2,251	0,722	0,970
b_1	8,782	6,690	18,742	13,518	16,182	17,532	6,123	4,898
s_{b1}	0,166	0,246	0,261	0,336	0,448	0,621	0,143	0,189
b_2	0,061	0,156	0,185	0,508	0,281	0,261	0,088	0,087
s_{b2}	0,008	0,012	0,006	0,026	0,013	0,019	0,004	0,003
b_3	–	–	–	$-5{,}1\cdot10^{-4}$	–	–	–	–
s_{b3}	–	–	–	$1{,}3\cdot10^{-4}$	–	–	–	–
b_4	–	–	–	– 0,011	– 0,010	– 0,019	–	–
s_{b4}	–	–	–	0,003	0,004	0,005	–	–
$cov(b_1,b_2)$	0	0	0	$2{,}6\cdot10^{-3}$	$4{,}1\cdot10^{-3}$	$7{,}9\cdot10^{-3}$	0	0
R^2	0,9972	0,9912	0,9987	0,9988	0,9985	0,9971	0,9966	0,9947
s_{resid}	0,858	1,270	1,281	1,781	1,692	2,345	0,924	0,976

Tabla 8.

Datos experimentales (obtenidos de la tabla 5) y parámetros de regresión el calibrado AC para MCPA en agua de grifo y río. (S = 100 g/l)

C_A (mg/l)	PIF (grifo)	PIF (río)
0,00	40,1	38,4
6,00	133,8	135
3,00	90,3	87,0
3,00	88,7	89,3
3,00	89,8	88,2
Parámetros de regresión		
a	41,690	39,280
s_a	1,510	1,104
b	15,617	16,100
s_b	0,425	0,311
R^2	0,9978	0,9989
S_{res}	1,804	1,320

Tabla 9.

Resultados del test de Snedecor para la comparación de las varianzas residuales del calibrado AC y el modelo y parámetros g_{b1} y grados de libertad ν para el cálculo de la incertidumbre

Aplicación	F_{exp}	P %	g_{b1}	ν
2,4-D (agua grifo)	—	—	0,002	8
2,4-D (agua río)	—	—	0,008	8
MCPP (agua grifo)	—	—	0,001	8
MCPP (agua río)	—	—	0,004	7
MCPA (agua grifo)	1,137	39,8	0,007*	7
MCPA (agua río)	0,387	81,3	0,002*	7
2,4,5-T (agua grifo)	—	—	0,003	8
2,4,5-T (agua río)	—	—	0,008	8

* g_A

C6. TABLAS CAPÍTULO XI

Tabla 1.

Concentraciones de Boro, señal de fluorescencia y parámetros de regresión

C_B (µg/l)	F		Parámetros de regresión	
0	181,7	183,5	**a**	183,0100
250	220,2	221,9	s_a	0,5442
500	259,5	260,9	**b**	0,1528
750	298,3	298,2	s_b	0,0009
1000	335,4	334,7	R^2	0,9997
			s_{res}	0,9937

Tabla 2.

Diseño Doehlert y señal de fluorescencia para el sistema Boro-Hierro

Exp.	C_B (µg/l)	C_{Fe} (mg/l)	F
1	50 (–1)	64 (–0,5)	179,5
2	50 (–1)	189 (0,5)	116,7
3	525 (0)	1 (–1)	291,9
4	525 (0)	126 (0)	174,8
5	525 (0)	126 (0)	170,1
6	525 (0)	126 (0)	172,4
7	525 (0)	250 (1)	112,7
8	1000 (1)	64 (–0,5)	281,7
9	1000 (1)	189 (0,5)	167,8

Los valores codificados para cada experiencia aparecen entre paréntesis

Tabla 3.

Diseño Doehlert y señal de fluorescencia para el sistema Boro-Aluminio (Diseño 1 y 2)

		Diseño 1		Diseño 2	
Exp.	**C_B (μg/l)**	**C_{Al} (mg/l)**	**F**	**C_{Al} (mg/l)**	**F**
1	50 (–1)	125 (–0,5)	558,8	64 (–0,5)	336,4
2	50 (–1)	375 (0,5)	561,5	189 (0,5)	404,9
3	525 (0)	1 (–1)	286,3	1 (–1)	295,3
4	525 (0)	250 (0)	457,5	126 (0)	450,5
5	525 (0)	250 (0)	454,2	126 (0)	454,1
6	525 (0)	250 (0)	455,0	126 (0)	453,6
7	525 (0)	500 (1)	612,9	250 (1)	521,6
8	1000 (1)	125 (–0,5)	429,4	64 (–0,5)	382,0
9	1000 (1)	375 (0,5)	479,9	189 (0,5)	538,7

Los valores codificados para cada experiencia aparecen entre paréntesis

Tabla 4.

Diseño Doehlert y señal de fluorescencia para el sistema Boro-Fluor

Exp.	**C_B (μg/l)**	**log C_F (mg/l)**	**F**
1	50 (–1)	0,25 (–0,5)	207,6
2	50 (–1)	0,75 (0,5)	206,1
3	525 (0)	0 (–1)	269,7
4	525 (0)	0,5 (0)	260,2
5	525 (0)	0,5 (0)	262,3
6	525 (0)	0,5 (0)	263,5
7	525 (0)	1 (1)	249,1
8	1000 (1)	0,25 (–0,5)	341,3
9	1000 (1)	0,75 (0,5)	333,8

Los valores codificados para cada experiencia aparecen entre paréntesis

D. TABLAS ESTADÍSTICAS

Tabla 1

Factor de cobertura

Grados de libertad	k
1	13,97
2	4,53
3	3,31
4	2,87
5	2,65
6	2,52
7	2,43
8	2,37
10	2,28
> 10	2,00

Tabla 2.

Distribución F de Snedecor para un nivel de confianza, $\alpha = 5\%$

ν	1	2	3	4	5	6	7	8
1	161,446	199,499	215,707	224,583	230,160	233,988	236,767	238,884
2	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,329	19,353	19,371
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,688	3,581	3,500	3,438
9	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,334	2,266
50	4,034	3,183	2,790	2,557	2,400	2,286	2,199	2,130
100	3,936	3,087	2,696	2,463	2,305	2,191	2,103	2,032

ν	9	10	15	20	30	50	75	100
1	240,543	241,882	245,949	248,016	250,096	251,774	252,618	253,043
2	19,385	19,396	19,429	19,446	19,463	19,476	19,482	19,486
3	8,812	8,785	8,703	8,660	8,617	8,581	8,563	8,554
4	5,999	5,964	5,858	5,803	5,746	5,699	5,676	5,664
5	4,772	4,735	4,619	4,558	4,496	4,444	4,418	4,405
6	4,099	4,060	3,938	3,874	3,808	3,754	3,726	3,712
7	3,677	3,637	3,511	3,445	3,376	3,319	3,290	3,275
8	3,388	3,347	3,218	3,150	3,079	3,020	2,990	2,975
9	3,179	3,137	3,006	2,936	2,864	2,803	2,771	2,756
10	3,020	2,978	2,845	2,774	2,700	2,637	2,605	2,588
15	2,588	2,544	2,403	2,328	2,247	2,178	2,142	2,123
20	2,393	2,348	2,203	2,124	2,039	1,966	1,927	1,907
30	2,211	2,165	2,015	1,932	1,841	1,761	1,718	1,695
50	2,073	2,026	1,871	1,784	1,687	1,599	1,551	1,525
100	1,975	1,927	1,768	1,676	1,573	1,477	1,422	1,392

Tabla 3.

Distribución F de Snedecor para un nivel de confianza, $\alpha = 2{,}5\%$

ν	1	2	3	4	5	6	7	8
1	647,793	799,482	864,151	899,599	921,835	937,114	948,203	956,643
2	38,506	39,000	39,166	39,248	39,298	39,331	39,356	39,373
3	17,443	16,044	15,439	15,101	14,885	14,735	14,624	14,540
4	12,218	10,649	9,979	9,604	9,364	9,197	9,074	8,980
5	10,007	8,434	7,764	7,388	7,146	6,978	6,853	6,757
6	8,813	7,260	6,599	6,227	5,988	5,820	5,695	5,600
7	8,073	6,542	5,890	5,523	5,285	5,119	4,995	4,899
8	7,571	6,059	5,416	5,053	4,817	4,652	4,529	4,433
9	7,209	5,715	5,078	4,718	4,484	4,320	4,197	4,102
10	6,937	5,456	4,826	4,468	4,236	4,072	3,950	3,855
15	6,200	4,765	4,153	3,804	3,576	3,415	3,293	3,199
20	5,871	4,461	3,859	3,515	3,289	3,128	3,007	2,913
30	5,568	4,182	3,589	3,250	3,026	2,867	2,746	2,651
50	5,340	3,975	3,390	3,054	2,833	2,674	2,553	2,458
100	5,179	3,828	3,250	2,917	2,696	2,537	2,417	2,321

ν	9	10	15	20	30	50	75	100
1	963,279	968,634	984,874	993,081	1001,405	1008,098	1011,475	1013,162
2	39,387	39,398	39,431	39,448	39,465	39,478	39,485	39,487
3	14,473	14,419	14,253	14,167	14,081	14,010	13,974	13,956
4	8,905	8,844	8,657	8,560	8,461	8,381	8,340	8,319
5	6,681	6,619	6,428	6,329	6,227	6,144	6,101	6,080
6	5,523	5,461	5,269	5,168	5,065	4,980	4,937	4,915
7	4,823	4,761	4,568	4,467	4,362	4,276	4,232	4,210
8	4,357	4,295	4,101	3,999	3,894	3,807	3,762	3,739
9	4,026	3,964	3,769	3,667	3,560	3,472	3,426	3,403
10	3,779	3,717	3,522	3,419	3,311	3,221	3,175	3,151
15	3,123	3,060	2,862	2,756	2,644	2,549	2,499	2,473
20	2,837	2,774	2,573	2,464	2,349	2,249	2,197	2,169
30	2,575	2,511	2,307	2,195	2,074	1,968	1,911	1,881
50	2,381	2,317	2,109	1,993	1,866	1,752	1,689	1,655
100	2,244	2,179	1,968	1,849	1,715	1,592	1,522	1,483

Tabla 4.

Distribución F de Snedecor para un nivel de confianza, $\alpha = 1\%$

ν	1	2	3	4	5	6	7	8
1	4052,185	4999,340	5403,534	5624,257	5763,955	5858,950	5928,334	5980,954
2	98,502	99,000	99,164	99,251	99,302	99,331	99,357	99,375
3	34,116	30,816	29,457	28,710	28,237	27,911	27,671	27,489
4	21,198	18,000	16,694	15,977	15,522	15,207	14,976	14,799
5	16,258	13,274	12,060	11,392	10,967	10,672	10,456	10,289
6	13,745	10,925	9,780	9,148	8,746	8,466	8,260	8,102
7	12,246	9,547	8,451	7,847	7,460	7,191	6,993	6,840
8	11,259	8,649	7,591	7,006	6,632	6,371	6,178	6,029
9	10,562	8,022	6,992	6,422	6,057	5,802	5,613	5,467
10	10,044	7,559	6,552	5,994	5,636	5,386	5,200	5,057
15	8,683	6,359	5,417	4,893	4,556	4,318	4,142	4,004
20	8,096	5,849	4,938	4,431	4,103	3,871	3,699	3,564
30	7,562	5,390	4,510	4,018	3,699	3,473	3,305	3,173
50	7,171	5,057	4,199	3,720	3,408	3,186	3,020	2,890
100	6,895	4,824	3,984	3,513	3,206	2,988	2,823	2,694

ν	9	10	15	20	30	50	75	100
1	6022,397	6055,925	6156,974	6208,662	6260,350	6302,260	6323,680	6333,925
2	99,390	99,397	99,433	99,448	99,466	99,477	99,484	99,491
3	27,345	27,228	26,872	26,690	26,504	26,354	26,278	26,241
4	14,659	14,546	14,198	14,019	13,838	13,690	13,615	13,577
5	10,158	10,051	9,722	9,553	9,379	9,238	9,166	9,130
6	7,976	7,874	7,559	7,396	7,229	7,091	7,022	6,987
7	6,719	6,620	6,314	6,155	5,992	5,858	5,789	5,755
8	5,911	5,814	5,515	5,359	5,198	5,065	4,998	4,963
9	5,351	5,257	4,962	4,808	4,649	4,517	4,449	4,415
10	4,942	4,849	4,558	4,405	4,247	4,115	4,048	4,014
15	3,895	3,805	3,522	3,372	3,214	3,081	3,012	2,977
20	3,457	3,368	3,088	2,938	2,778	2,643	2,572	2,535
30	3,067	2,979	2,700	2,549	2,386	2,245	2,170	2,131
50	2,785	2,698	2,419	2,265	2,098	1,949	1,868	1,825
100	2,590	2,503	2,223	2,067	1,893	1,735	1,646	1,598

Tabla 5.

Distribución t de Student

Grados de libertad	Nivel de confianza, α (%)				
	10	**5**	**2,5**	**1**	**0,1**
1	6,3137	12,7062	25,4519	63,6559	636,5776
2	2,9200	4,3027	6,2054	9,9250	31,5998
3	2,3534	3,1824	4,1765	5,8408	12,9244
4	2,1318	2,7765	3,4954	4,6041	8,6101
5	2,0150	2,5706	3,1634	4,0321	6,8685
6	1,9432	2,4469	2,9687	3,7074	5,9587
7	1,8946	2,3646	2,8412	3,4995	5,4081
8	1,8595	2,3060	2,7515	3,3554	5,0414
9	1,8331	2,2622	2,6850	3,2498	4,7809
10	1,8125	2,2281	2,6338	3,1693	4,5868
11	1,7959	2,2010	2,5931	3,1058	4,4369
12	1,7823	2,1788	2,5600	3,0545	4,3178
13	1,7709	2,1604	2,5326	3,0123	4,2209
14	1,7613	2,1448	2,5096	2,9768	4,1403
15	1,7531	2,1315	2,4899	2,9467	4,0728
16	1,7459	2,1199	2,4729	2,9208	4,0149
17	1,7396	2,1098	2,4581	2,8982	3,9651
18	1,7341	2,1009	2,4450	2,8784	3,9217
19	1,7291	2,0930	2,4334	2,8609	3,8833
20	1,7247	2,0860	2,4231	2,8453	3,8496
40	1,6839	2,0211	2,3289	2,7045	3,5510
60	1,6706	2,0003	2,2990	2,6603	3,4602
80	1,6641	1,9901	2,2844	2,6387	3,4164
100	1,6602	1,9840	2,2757	2,6259	3,3905

Tabla 6.

Distribución χ^2

Grados de libertad	Nivel de confianza, α (%)				
	10	**5**	**2,5**	**1**	**0,1**
1	2,7055	3,8415	5,0239	6,6349	10,8274
2	4,6052	5,9915	7,3778	9,2104	13,8150
3	6,2514	7,8147	9,3484	11,3449	16,2660
4	7,7794	9,4877	11,1433	13,2767	18,4662
5	9,2363	11,0705	12,8325	15,0863	20,5147
6	10,6446	12,5916	14,4494	16,8119	22,4575
7	12,0170	14,0671	16,0128	18,4753	24,3213
8	13,3616	15,5073	17,5345	20,0902	26,1239
9	14,6837	16,9190	19,0228	21,6660	27,8767
10	15,9872	18,3070	20,4832	23,2093	29,5879
11	17,2750	19,6752	21,9200	24,7250	31,2635
12	18,5493	21,0261	23,3367	26,2170	32,9092
13	19,8119	22,3620	24,7356	27,6882	34,5274
14	21,0641	23,6848	26,1189	29,1412	36,1239
15	22,3071	24,9958	27,4884	30,5780	37,6978
16	23,5418	26,2962	28,8453	31,9999	39,2518
17	24,7690	27,5871	30,1910	33,4087	40,7911
18	25,9894	28,8693	31,5264	34,8052	42,3119
19	27,2036	30,1435	32,8523	36,1908	43,8194
20	28,4120	31,4104	34,1696	37,5663	45,3142
30	40,2560	43,7730	46,9792	50,8922	59,7022
35	46,0588	49,8018	53,2033	57,3420	66,6192
40	51,8050	55,7585	59,3417	63,6908	73,4029
50	63,1671	67,5048	71,4202	76,1538	86,6603
60	74,3970	79,0820	83,2977	88,3794	99,6078
70	85,5270	90,5313	95,0231	100,4251	112,3167
80	96,5782	101,8795	106,6285	112,3288	124,8389
90	107,5650	113,1452	118,1359	124,1162	137,2082
100	118,4980	124,3421	129,5613	135,8069	149,4488

Tabla 7.

Criterio Q de dixon

n	Nivel de confianza, α (%)			
	Una cola		Dos colas	
	5	1	5	1
3	0,941	0,988	0,970	0,994
4	0,765	0,889	0,829	0,926
5	0,642	0,780	0,710	0,821
6	0,560	0,698	0,628	0,740
7	0,507	0,637	0,569	0,680
8	0,554	0,683	0,608	0,717
9	0,512	0,635	0,564	0,672
10	0,477	0,597	0,530	0,635
11	0,450	0,566	0,502	0,605
12	0,428	0,541	0,479	0,579
13	0,570	0,670	0,611	0,697
14	0,546	0,641	0,586	0,670
15	0,525	0,616	0,565	0,647
18	0,475	0,561	0,514	0,594
20	0,450	0,535	0,489	0,567
25	0,406	0,489	0,443	0,517
30	0,376	0,457	0,412	0,483

Tabla 8.

G de Cochran (m: tamaño muestral, n: número de muestras)

m	n – 1						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**8**	**10**
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8872	0,8159	0,7880
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6333	0,6025
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5175	0,4884
5	0,8412	0,6838	0,5981	0,5441	0,5065	0,4387	0,4118
6	0,7808	0,3131	0,5321	0,4803	0,4447	0,3817	0,3568
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3384	0,3154
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3043	0,2829
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,2768	0,2568
10	0,6220	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2541	0,2353
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,1815	0,1671
20	0,3895	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1422	0,1303
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1002	0,0921
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0292	0,0266

Biblioteca Universitaria de Granada
01066681