

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
FARMACIA**



**TRABAJO MONOGRÁFICO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Tema:

“Validación del Método Analítico de Cuantificación de Litio en tabletas de Carbonato de Litio de 300 mg, por Espectrofotometría de Absorción Atómica en Emisión.”

Autoras:

- ❖ Br. Rosa Abigail Mendoza Suazo.
- ❖ Br. Darling Jacqueline Munguía Ruiz.
- ❖ Br. Susana Valeria Paniagua Delgado.

Tutor: Lic. Yader Benito Salgado.

León, 8 de octubre del 2014

¡A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD!



AGRADECIMIENTO

"Nuestra alma espera en el Señor: él es nuestra ayuda y nuestro escudo. Nuestro corazón se regocija en él: nosotros confiamos en su santo Nombre."(Salmo 33, 20-21).

Agradecemos a **Nuestro Padre Celestial** por prestarnos vida, salud, sabiduría y tiempo para culminar nuestro trabajo investigativo.

A la **Virgen Santísima** bajo la advocación de nuestra señora de Mercedes patroncita de León por ser luz en nuestro camino.

A **Nuestras Familias** por darnos amor, comprensión y apoyo incondicional, en los momentos más difíciles de nuestro trabajo investigativo.

A nuestro **Tutor Lic. Yader Salgado** por brindarnos su apoyo, conocimiento, guiarnos en nuestro trabajo y dedicarnos tiempo.

Al personal que labora en el Laboratorio de Control y Calidad de Medicamentos por apoyarnos y confiar en nosotros para realizar nuestro trabajo investigativo en sus instalaciones.

A **Nuestros Profesores** por compartir sus conocimientos y fortalecer nuestra enseñanza en el transcurso de nuestra carrera.



DEDICATORIA

Al finalizar una etapa más en mi vida dedico de manera especial este trabajo a **Dios** por iluminar mi camino con su gracia divina.

A mis abuelitos, **Francisco Suazo** y **Gloria González** por darme el ejemplo de superación, inculcarme valores y demostrarme que en la vida todo se puede conseguir con sacrificio, dedicación y esfuerzo.

A mi padre, **Miguel Mendoza** que desde el cielo me ha estado apoyando y guiando con su sabiduría y amor divino. A mi madre, **Framileth Suazo** por todo lo que soy en la vida.

A mi tía, **María N. Suazo** a quien respeto y admiro en alto grado por confiar en mí y apoyarme para cumplir una meta más en mi vida.

A mi compañero de vida, **Milton José Ramírez Otero** quien me ayudó y apoyó de forma desinteresada para culminar esta etapa de mi carrera con sus consejos y su voz de aliento que fue muy importante e indispensable para mí en todo este tiempo.

A mis bebés consentidos **Gloria Elisa** y **Luis Francisco** con quienes he pasado momentos gratificantes para inspirarme con su amor y ternura en el desarrollo de esta investigación.

A mis suegros, **Eleodora Otero** y **Arturo Ramírez** por haberme acogido en el seno de su familia, brindarme su confianza y apoyo incondicional en todo momento.

A mi cuñado, **Arturo J. Ramírez** por ayudarme en el transcurso de mi carrera, y apoyarme de forma desinteresada.

A mis compañeras de trabajo, **Darling Munguía** y **Susana Paniagua** por haberme permitido trabajar con ellas, brindarme su apoyo y confianza y por haber buscado siempre juntas la solución a los problemas que se nos presentaron durante el desarrollo de nuestra investigación.

Rosa A. Mendoza Suazo

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



DEDICATORIA

Dedico este trabajo *a Dios y a la Virgen María*, por ser la luz que ilumina mi caminar.

A mis padres *Ivania Ruiz* y *Bernabé Munguía* por haber depositado su confianza en mí y apoyarme en todo el transcurso de mi Carrera.

A mis hermanas y hermanos *Nellys, Edgar, Ivania, Josceline, Alejandra Munguía* y *Franklin Carmona* por haberme apoyado y ser mi motivación para culminar mi trabajo.

A mi novio y futuro Esposo *Luis Parrales* por animarme y apoyarme en los momentos difíciles y darme ánimos para seguir adelante y lograr cumplir mis metas.

A mis amigas en especial a *Kalia Rayo, Georlene Tórrez* y *Erika Masis* por darme ánimos para seguir adelante y poder terminar dicho trabajo.

A mis compañeras de trabajo monográfico *Rosa Mendoza* y *Susana Paniagua*, por aguantar mis regaños, por confiar en mí, por los momentos difíciles que pasamos, por las alegrías, por los enojos y por esa amistad que surgió entre las tres.

Darling J. Munguía Ruiz.



DEDICATORIA

El presente trabajo el cual el día de hoy culminó con éxito se lo dedico de manera muy especial a las siguientes personas

A mi buen padre **DIOS** el cual me ha prestado vida y regalado un poquito de cada uno de sus dones, principalmente sabiduría para poder llevar a cabo mis sueños y a mi corta edad poder realizar cada una de las metas que me he propuesto.

A mi tesoro más preciado mi hijo **Andrés J. Vásquez**, el cual desde su nacimiento ha llenado de alegría mi vida y me ha dado fortaleza, motivación e inspiración para enfrentar los obstáculos de mi vida y salir adelante con dicho trabajo.

A mis padres **Milagro Delgado y Yader Paniagua**, los cuales a pesar de su pobreza y con muchos esfuerzos y sacrificios me han brindado apoyo, amor, comprensión y me han encaminado hasta esta etapa de mi vida.

A mi esposo **Mario Vásquez**, el cual es uno de los principales pilares en mi vida ya que el con su paciencia, comprensión y amor a tenido palabras de aliento las cuales han sido de gran ayuda y apoyo, en los momentos más difíciles de mi vida y sobre por los que he tenido que pasar para poder culminar mi carrera.

Y a cada **Persona** que con un granito de arena me ha ayudado y brindado su mano amiga en los momentos que más lo he necesitado en especial a mis compañeras de trabajo **Darling Munguía y Rosa Mendoza**.

Susana V. Paniagua D.



ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Planteamiento de problema.....	3
3. Objetivos general y específicos.....	4
4. Marco Teórico.....	5
4.1 Generalidades del Carbonato de Litio.....	5
4.2 Validación.....	12
4.2.1 Generalidades.....	12
4.2.2 Objetivos fundamentales de la validación.....	12
4.2.3 Razones que justifican la validación de métodos analíticos.....	13
4.2.4 Consideraciones para iniciar la validación.....	13
4.2.5 Métodos susceptibles de ser validados.....	14
4.2.6 Documentación de la validación.....	14
4.2.7 Clasificación de Métodos Analíticos.....	16
4.2.8 Características de Practicabilidad.....	18
4.2.9 Características de idoneidad.....	18
4.3 Parámetro de validación.....	19
4.3.1 Idoneidad del sistema.....	19
4.3.2 Selectividad.....	21
4.3.3 Linealidad y rango.....	23
4.3.4 Precisión.....	27
4.3.5 Exactitud.....	32
4.3.6 Límite de detección y límite de cuantificación.....	36
4.3.7 Robustez.....	42
4.3.8 Incertidumbre.....	44
4.3.9 Estabilidad de la muestra.....	49
4.4 Entorno legal.....	51
4.4.1 Normas correctas de Fabricación de medicamentos.....	51
4.4.2 Validación frente a métodos oficiales y/o farmacopeas.....	51
4.4.3 Buenas Prácticas de Laboratorio.....	52

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



4.4.4 Áreas de trabajo bajo normas BPL.....	52
4.5 Absorción atómica.....	56
4.5.1 Generalidades.....	56
4.5.2 Propiedades de la radiación electromagnética.....	59
4.5.3 Tipos de espectrofotometría atómica.....	63
4.5.4 Atomización con llama.....	63
4.5.5 Instrumentos para la espectroscopia de absorción atómica.....	67
4.5.6 Componentes básicos de un equipo de absorción atómica.....	68
4.5.7 Espectroscopia de Emisión de Llama.....	70
4.5.8 Tipos de interferencia.....	71
4.5.9 Métodos empleados en la corrección de la absorción de fondo...	74
4.6 Análisis cuantitativo.....	75
4.6.1 Aplicaciones.....	76
4.7 Propiedades fisicoquímicas del Carbonato de Litio.....	76
4.7.1 Características fisicoquímicas.....	76
4.8 Características del Litio.....	77
5. Diseño metodológico.....	78
6. Resultados y análisis de resultados.....	95
7. Conclusión.....	151
8. Recomendaciones.....	152
9. Bibliografía.....	153
10. Abreviaturas.....	155
11. Glosario.....	156
12. Anexos.....	159



1. INTRODUCCIÓN

En la Industria Farmacéutica los Laboratorios de Control de Calidad de Medicamentos validan los métodos de análisis para la cuantificación de todo principio activo en su correspondiente matriz. La validación de un método analítico, es un proceso en donde se obtiene a través de estudios, una base de datos que demuestran estadísticamente que un método cumple con las especificaciones establecidas en los parámetros de desempeño (exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, robustez).

Esto implica la demostración y la determinación de fuentes de variabilidad, error sistemático, y al azar de un procedimiento dentro de la calibración y el análisis de muestras reales. Es importante que la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable.

Existen diferentes técnicas analíticas para efectuar la validación de métodos de análisis, una de estas, es la de absorción atómica. Las aplicaciones de esta técnica, permiten la cuantificación de muchos metales como: Ca, Fe, Li, etc., presente en diferentes formas farmacéuticas (tabletas, cápsulas, inyectables, sueros, etc.).

En Nicaragua, el Ministerio de la Salud (MINSa) es el ente regulador que establece que todas las instituciones cumplan con el Reglamento de la Ley 292 de Medicamentos y Farmacia, aprobada en Enero y publicada en Febrero de 1999. En el capítulo 4, “**Registro de Medicamentos**” señala que uno de los requisitos de información sobre “**Especificaciones y Validación de Métodos Analíticos**” de diferentes formas farmacéuticas, es detallar la metodología utilizada para cada uno de los parámetro medido como son linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, especificidad y robustez del método analítico.¹

El Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) establece directrices para la validación de métodos analíticos, que permitan la normalización de productos afines de los países de la región centroamericana, con el objetivo de cumplir las normativas vigentes de buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas de laboratorio.²

Cabe destacar que en la industria farmacéutica nicaragüense se realiza la validación de métodos de análisis, para poder registrar sus productos, sin embargo existen laboratorios que

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



no cuentan con un área de control de calidad y recurren a laboratorios reconocidos por el MINSA que brindan el servicio de validación de métodos.

Debido a que en nuestro estudio no se encontró información bibliográfica sobre la validación para la cuantificación de Litio en tabletas de Carbonato de Litio 300mg, por la técnica de Espectrofotometría Atómica de Emisión, se ajustó al método farmacopeico de los Estados Unidos **USP 36/NF 31** a las condiciones instrumentales y ambientales con las que cuenta el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamento (LCCM).

El LCCM es uno de los laboratorios reconocidos por el MINSA que cuenta con un sistema de gestión de la calidad que se ajusta a la norma ISO/IEC (**Organización Internacional de Normalización/Comisión Electrotécnica Internacional**) 17025:2005. Esta es una empresa que presta el servicio de análisis físico-químico y microbiológicos en distintas formas farmacéuticas, a los laboratorios y distribuidoras que a nivel nacional carecen de su propia área de control de calidad que les permita desarrollar métodos validados para registrar sus productos y cumplir con las directrices establecidas por el RTCA, garantizando la calidad y seguridad de estos.

Es por esto, que se validó una metodología analítica con el fin de poder verificar que dicho método es exacto, reproducible y confiable para la cuantificación de Litio en tabletas de Carbonato de Litio de 300 mg.

Al validar este método analítico se obtuvo un procedimiento concreto para el análisis de Litio en su correspondiente matriz bajo las condiciones instrumentales y ambientales establecidas por el Laboratorio de Control de Calidad, en el cual se realizó el ensayo cumpliendo así con los requerimientos de la metodología analítica propuesta.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No existe un método validado en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos (LCCM) para la Cuantificación de Litio en Tabletado de Carbonato de Litio de 300mg, por Espectrofotometría Atómica de Emisión.



3. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Validar el método de análisis para cuantificar Litio en tabletas de Carbonato de Litio 300 mg, por Espectrofotometría de Absorción Atómica en Emisión, para ser empleado como método de rutina en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Especificar la metodología analítica para la cuantificación de Litio en tabletas de Carbonato de Litio 300mg, por Espectrofotometría de Absorción Atómica en Emisión.
- ❖ Evaluar los parámetros de la validación previamente establecidos en la cuantificación de Litio en tabletas de Carbonato de Litio 300 mg por Espectrofotometría de Absorción Atómica en Emisión.
- ❖ Demostrar estadísticamente que los resultados obtenidos están dentro de los criterios de aceptación de los parámetros de desempeño.
- ❖ Estimar la Incertidumbre expandida a partir de los resultados obtenidos y todas las fuentes atribuidos al mensurando.



4. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES DEL CARBONATO DE LITIO:³

4.1.1. Historia.

Se atribuye el descubrimiento del Litio a Afwerdson en Suecia, en 1817. Durante todo el siglo XIX fue utilizado para el tratamiento de la enfermedad artrítica. El antecedente más nefasto de la historia del Litio se remonta a los años 1940, cuando se indicaba como sustituto de la sal común en pacientes cardiopatas, con innumerables casos de intoxicaciones y muertes, por lo que su venta fue prohibida en Estados Unidos. Casi simultáneamente, Cade, en Australia, descubre el efecto antimaníaco del Litio, al tratar de solubilizar los uratos urinarios de animales de laboratorio, a los cuales se les había administrado orina de enfermos que padecían diferentes trastornos mentales. Se comprobó que después de ingerir Litio, los animales entraban en un letargo muy especial, sin cambios notorios en el comportamiento. En Estados Unidos, su uso fue permitido por la Federación de Droguería y Alimento (FDA) solo a partir de 1970 para el tratamiento de la Manía aguda y, de 1974, como profiláctico del Trastorno Bipolar.

4.1.2. Usos terapéuticos.

4.1.2.1. Episodio maníaco (efecto antimaníaco).

El Litio posee un efecto antimaníaco muy efectivo y específico, con el único inconveniente de presentar un periodo de latencia de 7 a 14 días desde el comienzo de su acción. Ante un episodio maníaco severo es conveniente combinarlo con antipsicóticos.

4.1.2.2. Trastorno bipolar mixto, maníaco o depresivo (efecto anticíclico).

Actualmente se distinguen los siguientes tipos de trastorno bipolar:

- ❖ **Tipo I:** Episodio depresivo mayor asociado a manía.
- ❖ **Tipo II:** Episodio depresivo mayor asociado a hipomanía.
- ❖ **Ciclotimia** (síntomas depresivos e hipomaníacos frecuentes).



❖ **Trastorno maníaco debido a condiciones médicas generales o inducido por sustancias.**

4.1.2.3. Profilaxis de la depresión mayor.

La eficacia del Litio en la prevención de los episodios depresivos mayores oscila entre 60 y 80%. El término profilaxis implica tanto la reducción de la frecuencia a lo largo del tiempo como de la gravedad de la sintomatología durante la crisis.

4.1.2.4. Agresividad e impulsividad.

En los primeros estudios realizados por Cade en 1949 fue informada la eficacia del Litio para controlar estados de agresividad y de hipersexualidad asociados al estado maníaco. En los últimos años, se publicaron numerosos trabajos sobre su utilidad en la agresividad infantil, adolescente y adulta con un retraso mental, epilepsia, psicosis crónica, lesiones cerebrales orgánicas y en delinquentes. El efecto antiagresivo estaría relacionado con la acción del Litio en la vía serotoninérgica.

4.1.2.5. Alcoholismo.

Distintos estudios demuestran disminución de los efectos causados por la intoxicación alcohólica (confusión, deseos de continuar bebiendo, trastornos perceptuales y cognitivos, signos de abstinencia). Su efecto se atribuye a su acción sobre el sistema de transmisión serotoninérgico. Aún se necesitan mayores elementos para avalar su utilidad en el tratamiento del alcoholismo, aunque es de utilidad cuando existen desórdenes afectivos acompañantes.

4.1.2.6. Síndrome de tensión premenstrual.

El Litio es de mayor utilidad cuando hay un aumento de peso premenstrual y síntomas afectivos concomitantes.



4.1.2.7. Granulocitopenias.

Dado su efecto estimulante sobre los glóbulos blancos, se ha usado en el tratamiento de diferentes tipos de Granulocitopenias. En depresiones resistentes, la adición de Litio a los antidepresivos potencia sus efectos.

4.1.2.8. Trastorno esquizoafectivo.

Cuanto mayor es el componente afectivo, mayor es la posibilidad de obtener buenos resultados con la combinación de Litio con antipsicóticos y/o antidepresivos.

4.1.2.9. Trastornos fronterizos.

La asociación más frecuente a la personalidad de tipo borderlines es el trastorno afectivo, en especial, la distimia, la ciclotimia y la bipolaridad de tipo II; de allí surge la utilidad del Litio en esta patología.

4.1.3. Mecanismo de acción.

Los mecanismos de acción del Litio pueden agruparse de la siguiente manera:

4.1.3.1. Efecto sobre el ritmo circadiano.

Los distintos ritmos circadianos (ciclo sueño-vigilia, temperatura corporal, secreción de cortisol, etc.) se encuentran alterados en los trastornos afectivos. El Litio lentifica el ciclo sueño-vigilia en sujetos sanos, por lo que se cree que la acción sobre estos ritmos podría ser, responsable de su eficacia clínica.

4.1.3.2. Efecto sobre la neurotransmisión:

- ❖ **Sistema colinérgico:** Según algunos autores, existe un incremento en la concentración, en la síntesis y en el aumento del volumen de la acetilcolina en el cerebro.
- ❖ **Sistema catecolaminérgico:** Disminuye la concentración, almacenamiento y liberación de dopamina y noradrenalina en el Sistema Nervioso Central (SNC).



- ❖ **Sistema serotoninérgico:** Inicialmente se produce un incremento de la captación del triptófano en las sinapsis, luego aumenta la síntesis de serotonina. Algunos autores sugieren que existe una relación entre el efecto antiagresivo del Litio y los niveles incrementados de serotonina, evidenciada por un aumento de los niveles de 5-HIAA (Acido 5-hidroxi-indolacético) en el Líquido Céfalo Raquídeo (LCR).

4.1.3.3. Efectos Neuroendocrinos.

El Litio disminuye los niveles de testosterona, este efecto se ha relacionado con su acción antiagresiva. Actúa a nivel de las hormonas tiroideas, disminuyendo los niveles séricos, y de la glándula pineal, produciendo una hiperplasia parenquimatosa con aumento de los niveles de melatonina.

4.1.3.4. Efectos Posinápticos.

El Litio inhibe a la adenilciclase noradrenalina sensible, ello disminuye la síntesis de AMP cíclico (adenosin monofosfato cíclico, segundo mensajero), alterando así la cadena de neurotransmisión. El Litio, asimismo, inhibe a la enzima inositol-monofosfato-fosfatasa que hidroliza los fosfatidil-inositoles y disminuye la formación de inositol libre, necesario para la continuación del ciclo. Esta acción del Litio ha sido postulada como uno de los probables mecanismos de acción subyacentes a su efecto clínico (hipótesis de la depleción de inositol).

4.1.4. Formas de Tratamiento.

Antes de administrar Litio, es necesaria una completa evaluación clínica del paciente, incluyendo hemograma y el estudio de las funciones renal, tiroidea y cardíaca. El conocimiento de los hábitos alimentarios del enfermo es importante para evaluar su ingesta de sodio.



4.1.4.1. Tratamiento del episodio agudo.

Ante un cuadro de manía agudo el Litio constituye la droga de primera elección. La imposibilidad de realizar una psicoterapia directa y la necesidad de actuar antes de los siete días, hacen perentoria la administración de litio con antipsicóticos por vía oral o parenteral. Empíricamente, puede comenzarse con 600 mg/ día en dos tomas y realizar una litemia a los cinco o siete días, momento en que se alcanza el equilibrio en la distribución.

Una vez hecha la corrección de la dosis, deberán monitorearse las litemias semanalmente durante el primer mes, quincenalmente durante el segundo y tercer mes, mensualmente del cuarto al sexto mes y trimestralmente mientras se mantenga el tratamiento. Debe procurarse alcanzar valores de litemia entre 0,8 y 1,2 mEq/l.

4.1.4.2. Tratamiento de mantenimiento o sostén.

Una vez que la fase aguda ha remitido, se realizará un tratamiento de mantenimiento (ausencia de sintomatología) con litemias entre 0,6 y 1 mEq/l durante 1-5 años. El objetivo del tratamiento es suprimir o disminuir la frecuencia de los episodios agudos maníacos o depresivos, su severidad y su duración.

4.1.5. Posología.

4.1.5.1 Manía aguda.

La respuesta óptima al tratamiento usualmente se alcanza y se mantiene con una dosis de 600 mg dos o tres veces por día. Tales dosis producen normalmente un nivel sérico efectivo de Litio de 1 a 1,5 mEq/l. La dosis debe ser personalizada según niveles séricos y respuesta clínica, por lo que es imprescindible el monitoreo regular de la litemia y de la respuesta clínica. La primera litemia se debe realizar una vez transcurridas cinco vidas medias (es decir, a los 5 días) y en base a sus resultados se ajusta la dosis. En fase aguda se debe dosar la litemia dos veces por semana hasta la estabilización de los niveles séricos y las condiciones clínicas.



4.1.5.2. Terapia de mantenimiento.

La litemia mínima eficaz es de 0,5 a 0,8 mEq/l, debe determinarse a la mañana luego de 12 hrs. de la toma nocturna del día anterior y justo antes de la primera toma del día. La litemia deseable está entre 0,6 y 1,2 mEq/l la que usualmente se alcanza con el suministro de 300 mg de carbonato de litio 3 - 4 veces por día.

Los pacientes anormalmente sensibles al Litio pueden exhibir signos de toxicidad con niveles séricos de 1 a 1,5 mEq/l. Deben evitarse niveles mayores a 2 mEq/l. En pacientes ancianos o con algún grado de patología renal que altere la excreción de la droga deben emplearse dosis menores que las habituales. En estos pacientes la vida media del Litio está aumentada por lo que la litemia deberá solicitarse luego de cinco vidas medias es decir a los 7 o más días.

4.1.5.3. Rango terapéutico: Dosis mínima 450 mg/día o dosis máxima 1800 mg/día.

4.1.5.4. Dosis Tóxicas.

Existe poca relación entre los niveles séricos de Litio y la severidad de la intoxicación aguda no así para la intoxicación crónica. La dosis tóxica en una intoxicación aguda es de 50 – 100 mg/Kg.

Los valores de Litemia son los siguientes:

- Niveles terapéuticos: 0,6 a 1,2 mEq/L

- Niveles Tóxicos

1) Leve ha Moderado: 1,5 a 2,5 mEq/L

2) Severo: 2,5 a 3 mEq/L

3) Fatal: niveles mayores a 3 a 4 mEq/L pueden ser fatal, especialmente en pacientes en terapia crónica con Litio. Pacientes con Litemia de 3 a 6 mEq/L después de una intoxicación aguda han permanecido asintomáticos.



4.1.6. Farmacocinética:



4.1.7. Efectos adversos:

- ❖ Cardiovasculares: como arritmias de distinto tipo, sus efectos cardiovasculares se asocian a cambios en el potasio intracelular, con interacciones con el metabolismo del magnesio y del calcio.
- ❖ A nivel de la tiroides: la incidencia de efectos en el nivel tiroideo más común en la mujer oscila entre el 5 y el 15 % de los pacientes tratados a largo plazo.
- ❖ Neurológicos como letargo, disforia y disminución de la espontaneidad. Pero el efecto secundario característico del litio es un temblor fino en las manos, que se agrava con el cansancio, la ansiedad y la cafeína, y puede entorpecer la realización de tareas delicadas.
- ❖ En el embarazo y el recién nacido la acción teratogénica del Litio durante el primer trimestre de embarazo ha sido bien establecida.



4.2. VALIDACIÓN

4.2.1. Generalidades: ⁴

4.2.1.1. Definición.

El término validación ha sido definido en la literatura de diversas maneras. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo: especificar e implementar, aprobar y documentar.

Según las normas de correcta fabricación (edición 99):

Validación: es la obtención de pruebas con arreglo a las normas de correcta fabricación, de cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema que produce en realidad el resultado previsto.

4. 2.1.2. Según la definición analítica:

Validación: es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

4.2.1.3. Ciclo de la validación:





4.2.2 Objetivos fundamentales de la validación:

- ❖ Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos según las necesidades del análisis.
- ❖ Asegurar la calidad y constancia de la información obtenida.
- ❖ Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
- ❖ Facilitar las auditoras de la calidad.
- ❖ Fundamentar la transferencia (de métodos y herramientas) y la armonización de los resultados entre los laboratorios, con el objetivo de conseguir el reconocimiento mutuo.

4.2.3 Razones que justifican la validación de métodos analíticos:

- ❖ Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtenerlas respuestas documentadas al respecto.
- ❖ Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizara el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.
- ❖ Trabajar con métodos validos permite no solo conocimiento del método analítico si no también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Practicas de Laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.
- ❖ La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

4.2.4 Consideraciones para iniciar la validación:

- ❖ Tener perfectamente caracterizado el analito.
- ❖ Trabajar con una formulación definitiva (en caso de especialidad), puesto que cambios en la composición incluso a nivel de excipientes afectaran probablemente al procedimiento analítico.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



❖ Trabajar suficientemente con el método de análisis como para que nuestros conocimientos acerca de este, nos ofrezca garantía de que la validación puede ser satisfactoria. Solo cuando el procedimiento está definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados debe iniciarse la validación. Por ello en el desarrollo previo del método, es recomendable llevar a cabo el estudio de robustez para garantizar la bondad del procedimiento que se quiere validar.

4.2.5. Métodos susceptibles de ser validados:

- ❖ Ensayos de identificación.
- ❖ Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- ❖ Ensayos para la determinación de características farmacotécnicas inherentes (ej. Test de disolución).
- ❖ Ensayo de límite de impurezas y de cuantificación de impurezas.
- ❖ Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- ❖ Ensayos microbiológicos.

4.2.6. Documentación de la validación.

Toda validación comienza a partir de un método ya aprobado y ajustado. La validación trata de demostrar con un número mínimo de ensayos, que tanto el método de análisis como su sistema analítico asociado producirán resultados adecuados a las exigencias preestablecidas.

4.2.6.1. Protocolo de validación.

Es un documento que ha de recoger el objetivo, la definición del sistema a validar, la identificación de los parámetros, el diseño del plan experimental y los criterios de aceptación. Debe ser específico para cada producto y método, debiendo ir firmado y fechado por las personas responsables de la validación y aprobación.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



El esquema de un protocolo de validación puede incluir los siguientes puntos:

- ❖ Objetivo: Exposición de la finalidad de la validación y propuesta de fechas de inicio y final.
- ❖ Responsables: Relación de las personas que llevaran a cabo la validación y de las que la aprobaran.
- ❖ Parámetros a estudiar: Los parámetros a estudiar se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración de analito.
- ❖ Muestras: El muestreo se realizara de acuerdo con procedimientos descritos, en los cuales se indicaran los sistemas de identificación y tratamiento previos de las muestras. Si se precisan placebos, también existirán procedimientos del método de preparación.
- ❖ Equipos: Se han de identificar los equipos implicados en el proceso de validación (pH-metros, balanzas, cromatógrafos, etc.) y comprobar que están convenientemente cualificados, referenciando estos datos en el informe de validación.
- ❖ Métodos analíticos: Existirán métodos escritos describiendo el procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnicas y cálculos.
- ❖ Criterios de aceptación: Se establecerán a prioridad para cada uno de los parámetros, basándose en las necesidades o finalidad del método y en la información recogida durante la fase de desarrollo del procedimiento analítico.

4.2.6.2. Realización de validación evaluación de resultados analíticos.

Todos los datos primarios deben de ser perfectamente auditables. Una vez realizada la parte experimental de la validación, se evaluarán los resultados obtenidos. Si durante la ejecución del protocolo se produce alguna modificación se añadirá como anexo al mismo explicando el cambio introducido respecto al original y la razón que lo justifica.



4.2.6.3. Informe de validación.

Los informes de validación deben de incluir:

- ❖ Referencia al protocolo en el cual se describe el procedimiento para la determinación de cada uno de los parámetros a evaluar.
- ❖ Resultados de las determinaciones de cada parámetro incluyendo todos los datos primarios.
- ❖ Referencias de calibración y Cualificación de los instrumentos utilizados y resultados de la verificación de los parámetros de idoneidad antes de iniciar el estudio de validación.
- ❖ Discusión de los resultados y conclusiones. Se indicara la aceptación o no de la validación del método analítico. También se puede aceptar un método analítico con limitaciones para un tipo de muestras concreto.

4.2.6.4. Certificado de validación.

El certificado de validación o documento formal de aprobación que emite el laboratorio con los resultados obtenidos para cada parámetro, debe ser firmado por las personas responsables. Este certificado puede ser independiente, incluyendo un resumen del protocolo de validación y de los resultados obtenidos, o bien anexarse al final del informe. Los documentos referentes a la validación se archivarán durante todo el tiempo de vida del producto.

4.2.6.5. Revalidación.

La revalidación de un método analítico consiste en repetir de forma total o parcial su validación, ya sea debido a modificaciones en el método, equipos, en la muestra a analizar, etc., para garantizar la obtención de resultados fiables.

4.2.7. Clasificación de métodos analíticos:⁵

4.2.7.1. En general, se establece que el laboratorio **DEBE** validar:

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



4.2.7.1.1 Métodos no normalizados: Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos, validación prospectiva (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados (validación retrospectiva).

4.2.7.1.1.1. Validación Prospectiva, generando a través de análisis de datos experimentales.

4.2.7.1.1.2. Validación Retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el Laboratorio dispone, para la cual se realizara la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines de la validación son aceptables.

4.2.7.1.2. Método normalizado con una modificación significativa: Corresponden a métodos desarrollados en el laboratorio, pero con una modificación de la metodología usada que pueda variar los datos obtenidos ejemplo: modificar la concentración del analito o cambiar la concentración del disolvente.

4.2.7.2. Según categoría de método : ⁴

Categoría I: Para la cuantificación de materia prima o principio activo en producto terminado.

Categoría II: Para determinar impurezas en materias primas o compuestos de degradación en producto terminado o para análisis de residuos en material biológico o alimentos.

Categoría III: Para determinar las características de funcionamiento, disolución o liberación de drogas en el organismo.

Categoría IV: Pruebas de identificación.



4.2.8. Características de Practicabilidad: ⁴

4.2.8.1. Definición.

Deben evaluarse los parámetros de Practicabilidad del método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, coste, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad.

4.2.8.2. Estudios de estabilidad de la muestra preparada para análisis.

La estabilidad de la muestra preparada para analizar se evalúa durante la fase de desarrollo del método junto con la robustez. La estabilidad de las disoluciones de la muestra (CDER, 94), después de su preparación según el método de análisis, debe ser evaluada de acuerdo al tiempo requerido para su realización.

Muchos laboratorios utilizan equipos automáticos que procesan muestras durante largos periodos de tiempo, con lo que la muestra puede permanecer horas preparadas antes de ser analizada. De la misma forma debe mostrarse la estabilidad de las muestras y patrones preparados si se utiliza durante varios días.

4.2.9. Características de idoneidad: ⁴

La puesta a punto del método analítico, incluye desde los primeros apuntes de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

A partir del estudio de la robustez se definirán las características de idoneidad o conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados. La comprobación de la idoneidad forma parte integral del método, y debe realizarse cada día al inicio del análisis, para comprobar el correcto funcionamiento del sistema. Los requerimientos y parámetros a evaluar en un ensayo de idoneidad dependerán del tipo de

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



método. El hecho de que sea necesario evaluar unos u otros parámetros dependerá básicamente del tipo de ensayo, pudiendo resumirse en la siguiente tabla recomendada en la guía ICH Q2.

Parámetros	Identificación	Impurezas		Valoración: -Disolución. -Contenido.
Exactitud	No	Cuantitativo	Test limite	Si
		Si	No	
Precisión:				
Repetibilidad	No	Si	No	Si
Precisión intermedia	No	Si	No	Si
Selectividad	Si	Si	Si	Si
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación.	No	Si	No	No
Linealidad.	No	Si	No	Si
Rango.	No	Si	No	Si

Tabla N°1. Datos requeridos en la validación de métodos analíticos.

4.3. Parámetros de validación: ⁴

4.3.1 Idoneidad del sistema.

4.3.1.1. Definición: El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método, que el sistema es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método.



4.3.1.2. Ámbito de aplicación.

Este test es susceptible de emplearse en cualquier procedimiento de medida en el que las condiciones analíticas pueden estar sometidas a variación de las condiciones operacionales, por ejemplo en procedimientos analíticos volumétricos.

4.3.1.3. Procedimiento de determinación de la idoneidad.

Los requisitos que debe cumplir el método analítico se establecen desde la primera fase de desarrollo, aunque en esos momentos no es posible concretar la prueba que permitirá comprobarlos.

Posteriormente, los resultados de robustez permitirán adquirir el conocimiento necesario para establecer los factores críticos y el impacto que estos han tenido sobre el comportamiento del método. Este es el momento de diseñar las pruebas a realizar y establecer los criterios que permitan asegurar que los requisitos establecidos se cumplirán más allá del momento concreto en el que se lleva a cabo la validación propiamente dicha.

Los ensayos de idoneidad del sistema. Que se establecen vendrán dados por el conocimiento adquirido del método y la viabilidad de su empleo en rutina debiendo corresponderse con los valores mínimos para los que los parámetros estudiados permanecen dentro de las especificaciones establecidas.

Estos ensayos no solo demuestran que el sistema se encuentra en perfectas condiciones para realizar el análisis sino que también permiten establecer el criterio por el que modificar las condiciones analíticas descritas en el procedimiento con el fin de alcanzar la idoneidad.

4.3.1.4. Parámetro de evaluación.

Los parámetros de evaluación de los ensayos de idoneidad se pueden agrupar en tres categorías:

- ❖ Precisión
- ❖ Parámetros cromatográficos:
 - Factor de capacidad (k').
 - Número de platos teóricos (N)



- Factor de asimetría o de cola.
- ❖ Límites de detección o cuantificación.

Como se puede observar, en las pruebas de idoneidad su mayor difusión está dentro de las técnicas separativas, y por ellos los parámetros de evaluación son principalmente de carácter cromatográficos. No obstante la filosofía del test es aplicable a cualquier tipo de técnica analítica.

Como norma general una prueba de idoneidad del sistema tendrá como mínimo parámetros pertenecientes a dos categorías por ejemplo: precisión y resolución o precisión y límite de detección.

4.3.2. Selectividad.

4.3.2.1. Definición: Es la capacidad de un método analítico para medir simultánea o separadamente los analitos de interés en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como:

- ❖ La aparición de falsos positivos.
- ❖ Distorsionar la respuesta del analito. Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.

La selectividad se debería realizar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

4.3.2.2. Ámbito de aplicación.

El estudio de la selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico, en el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



utilización de métodos lo más selectivos posible, en la que la presencia de otros componente tienen escasa influencia en los resultados.

Atendiendo a criterios técnicos, se deberá establecer, en cada caso, hasta qué punto se debe buscar interferencias, debido a las imposibilidad de reflejare todas las situaciones y consideraciones posibles.

El grado de selectividad asociado a un método adquiere mayor relevancia si su finalidad es evaluar la estabilidad del principio activo o de la forma farmacéutica.

4.3.2.3. Procedimiento de determinación de la selectividad.

En el estudio de la selectividad, como norma general, se comparan el resultado del análisis de muestra con o sin analitos en presencia o ausencia de impureza, producto de degradación, sustancias relacionadas y excipientes.

Se pueden plantear diferentes alternativas para proceder a la demostración documental de la selectividad del método.

4.3.2.3.1. Por adición de las interferencias.

La primera aproximación sería de aplicación para aquellos analitos en lo que se tienen identificadas las posibles interferencias y estas se encuentran disponibles de formas aisladas. En estos casos se puede comprobar la selectividad comparando los resultados del análisis de muestras con y sin analitos en presencias o ausencias de dichas interferencias. Se evaluaran a que nivel se producen y si es preciso modificar el método añadir alguna técnica complementaria.

4.3.2.3.2. Por aplicación de técnicas confirmatorias con muestras sometidas a estrés.

Se puede realizar mediante el estudio de muestras sometidas a estrés para generar los compuestos potencialmente interferentes. Este tipo de estudio es importante para los métodos en que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica.



4.3.3. Linealidad y Rango.

4.3.3.1. Definiciones:

- ❖ **De linealidad del sistema:** Cuando la recta de regresión se realiza con el analito puro.
- ❖ **De linealidad del método:** cuando la recta de regresión se obtiene mediante ensayos realizados sobre la matriz adicionada del analito.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

4.3.3.2. Ámbito de aplicación.

Según la guía ICH Q2A se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo:

- Valoración del contenido de principio activo.
- Uniformidad de contenido
- Velocidad de disolución
- Cuantificación de impureza.

4.3.3.3. Procedimiento de determinación de la linealidad para la cuantificación de un Principio activo:

- ❖ Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar al menos cinco niveles de concentración y analizarlas por triplicado ($K=5$, n° de réplicas=3) con un total de 15 determinaciones ($n=15$). Por ejemplo: 80, 90, 100, 110, 120% del contenido teórico.
- ❖ Estadísticamente lo correcto sería analizar las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



- ❖ Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes (por ejemplo 15 pesadas), ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones.
- ❖ El número de repeticiones de cada muestra (por ejemplo el número de inyecciones en HPLC) dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado, y de lo que se decida incluir como rutina en el procedimiento a validar.

Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variable independiente) y la respuesta y (variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, absorbancias). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y=b*x+a$, obtenida por un método de ajuste (por lo general el de mínimos cuadrados). En algunos casos podría ser necesaria alguna transformación matemática previa (uso de logaritmos, recíprocos de las variables, etc.) para obtener funciones lineales.

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste. Se pueden representar además las hipérbolas indicativas de los intervalos de confianza.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena (existe falta de ajuste) o bien que el error experimental es importante y los intervalos de confianza serán amplios (hipérbolas anchas).

4.3.3.4. Evaluación estadística de la linealidad.

Además de la representación gráfica la linealidad implica una comprobación estadística.

4.3.3.4.1. Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen.

En la recta de regresión $y=b*x+a$, x es la concentración, y la respuesta, b el valor de la pendiente y, a el término independiente



La pendiente **b** se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). El término independiente **a**, u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas u es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.

4.3.3.4.2. Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r²).

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre la variable **x** (concentración), y la variable **y** (respuesta). Su valor máximo es 1, si el coeficiente de correlación es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.⁴

El valor recomendado para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 , aunque en el caso de impurezas se admite ≥ 0.990 .

La información obtenida mediante el cálculo de **r** es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo **r²** coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de **y** explicada por el modelo.

4.3.3.4.3. Variancia residual constante (Homocedasticidad).

La representación de los residuales **e_i** aporta mucha información acerca de la validez del modelo. De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia.

4.3.3.4.4. Análisis de la Variancia: ANOVA.

Para poder realizar una ANOVA se deben cumplir los siguientes supuestos:

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



- ❖ **Homogeneidad de variancias:** esta se puede comprobar aplicando, por ejemplo, un test de Cochran que indicará si el factor de concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados.

El valor de G_{exp} se calcula de la siguiente forma:

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2} \cdot \frac{s^2 \text{ máxima}}{S^2_1 + S^2_2 + S^2_3 + S^2_4 + S^2_5}$$

S_i^2 : variancia de cada grupo k

$S^2_{\text{máxima}}$: variancia máxima de los k grupos.

$G_{tab} (\alpha=0.05, k=5, n=3) = 0.68$

Las varianzas no deben ser estadísticamente diferentes entre sí, para el grado de significación escogido, generalmente $\alpha=0.05$.

- ❖ **Normalidad de los residuales:** se puede comprobar mediante la representación gráfica que algunos programas estadísticos realizan de los mismos o bien aplicando un test de normalidad.

Una vez comprobado estos supuestos se calcularan los estadísticos F_1 y F_2 .

$F_{1exp} > F_{1 \text{ tabla}}$ demuestra una pendiente distinta de cero.

$F_{2exp} < F_{2 \text{ tabla}}$ demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Los valores tabulados para F se obtienen en las tablas estadísticas de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significación α normalmente igual a 0.



4.3.4. Precisión.

4.3.4.1. Definición.

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiple a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

4.3.4.2. Evaluación de la precisión.

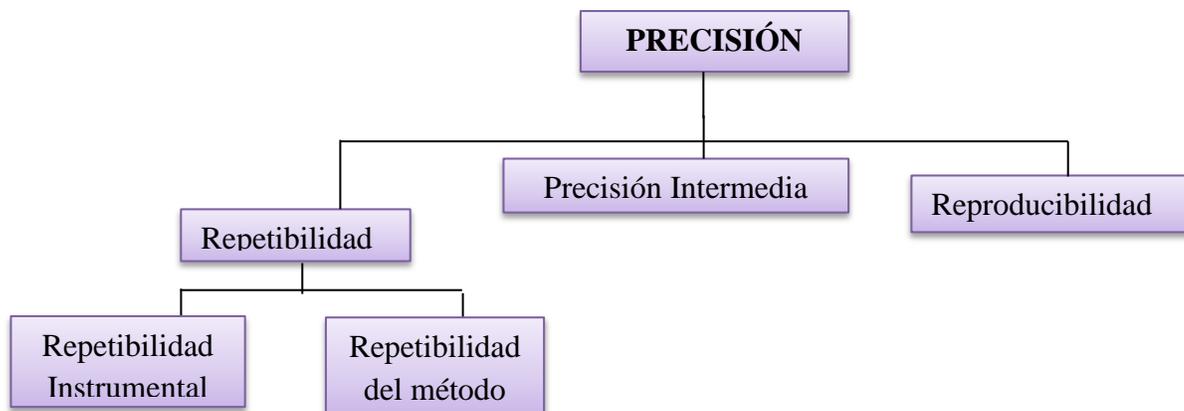
La precisión generalmente se evalúa a nivel de:

4.3.4.2.1. Precisión del sistema: se determina evaluando la dispersión obtenida al aplicar el método a una preparación del estándar y lista para el análisis directo del analito (sin tratamiento adicional).

4.3.4.2.2. Precisión del método: se determina aplicando el método completo a muestras Homogéneas o aún a placebos que contengan una cantidad conocida del analito equivalente a la del producto farmacéutico.



4.3.4.3. Estudios que engloba la precisión:



4.3.4.3.1. Repetibilidad: Estudia la variabilidad del método efectuado una serie de análisis sobre la misma muestras en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

4.3.4.3.2. Precisión intermedia: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes análisis, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

4.3.4.3.3. Reproducibilidad: Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas.

4.3.4.4. Ámbito de aplicación.

Según la ICH Q2B el estudio de la precisión se debe realizar únicamente para la determinación cuantitativa de principios activos y cuantificación de impurezas. Por lo tanto la evaluación de la precisión no es necesaria ni en el ensayo de identificación ni en el test límite de impurezas.

4.3.4.5. Repetibilidad: Se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación de una serie de medidas.



Uno de los factores que más pueden influir en la Repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. Por otro lado, el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación (especificaciones) especificado en el método de análisis. El número de replicados se deduce a partir del CV de repetibilidad del método.

4.3.4.5.1. Repetibilidad del sistema instrumental.

Estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces. En el caso que se desee analizar el principio activo de una materia prima o de una especialidad farmacéutica se prepara la muestra a la concentración nominal, y en el caso de analizar impurezas a la concentración del límite especificado.

La estimación de la Repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas.

Para especialidades farmacéuticas y materia prima suelen aceptarse valores inferiores al 1-2%. Mientras que para el análisis de impurezas los valores aceptados se sitúan alrededor del 5%.

4.3.4.5.2. Repetibilidad del método.

Se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.

Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.
- Un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

La estimación de la Repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Los valores aceptables del coeficiente de variación del sistema instrumental deben ser inferiores a los valores que se aceptan para el coeficiente de variación del método. La expresión matemática que permite relacionar ambos coeficientes de variación es:

$$\text{CV método} = \text{CV sistema} * \sqrt{2}$$

- a. Coeficiente de variación:** El cálculo de este permite deducir el número de replicados que se deben realizar en el método de ensayo para un determinado intervalo de aceptación. Esta relación se establece según la fórmula siguiente:

$$\text{CV} = 100 - \text{LA} * \frac{\sqrt{n}}{z} \quad (\text{Camacho et al, 1993})$$

Dónde:

LA= Valor límite aceptado

n= Número de replicados que se deben realizar en el método de análisis.

Z= (alfa=0.01)= 2.58

b. Intervalos de confianza:

La guía ICH Q2B recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiado.⁴

Los intervalos de confianza se calculan a partir de:

- Los resultados individuales $\bar{X} \pm t * s$
- Los resultados promedios $\bar{X}_p \pm t * s / \sqrt{n}$

Dónde:

X_p= media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.

t= valor de la t Student de tablas para n-1 grados de libertad y α : 0.05

n= número de análisis.

4.3.4.6. Precisión intermedia.

El objetivo es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones diferentes.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos.

Para estudiar los factores de una manera aleatoria se recomienda un estudio matricial y, para cada combinación de éstos, las muestras deben ser preparadas independientemente como mínimo por triplicado.

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de las respuestas obtenidas, es decir, considerando cada resultado independientemente. Generalmente se aceptan valores de coeficiente de variación de la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la Repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla es necesario evaluar cuál es el factor responsable de esta variabilidad. Se recomienda, además, determinar el coeficiente de variación para cada grupo de análisis para comprobar que se cumplen las especificaciones establecidas en la repetibilidad del método.⁴

4.3.4.7. Reproducibilidad.

Estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método.

Este estudio no es de obligado cumplimiento y se debe realizar solamente en aquellos casos en que se quiera transferir el método a otros laboratorios o incluirlo en guías oficiales (las farmacopeas).



4.3.5 Exactitud.

4.3.5.1. Definición:

La exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

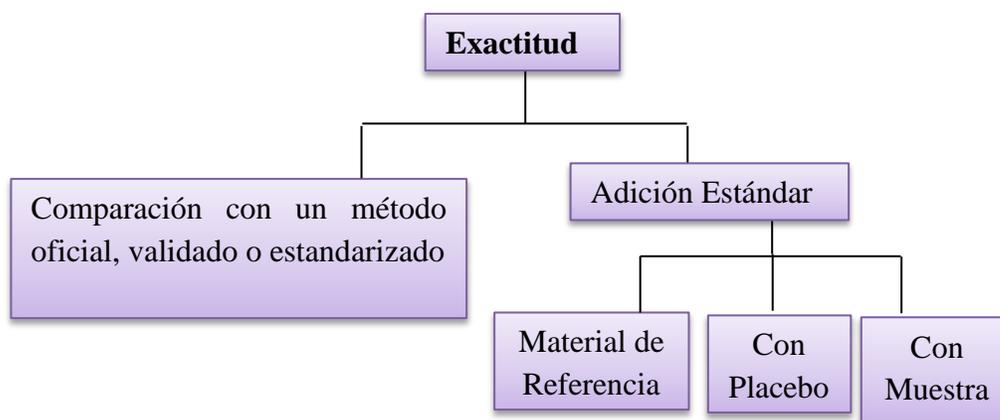
4.3.5.2. Ámbito de aplicación.

Según la guía (ICH, Q2A) debe ensayarse la exactitud en métodos de análisis para la valoración en materia prima y en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impurezas.

Según la USP 24 también debe evaluarse la exactitud en los métodos de análisis de estudios de velocidad de disolución.

4.3.5.3. Determinación de exactitud.

Existen diferentes maneras de determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes en la literatura, y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis.



“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



La no exactitud (inexactitud) puede presentarse:

- a) Por defecto: suelen darse en métodos analíticos muy elaborados.
- b) Por exceso: generalmente se suceden cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es adecuada.

4.3.5.4. Procedimientos de determinación de la exactitud.

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado.

En función del tipo de método a validar, y de cada caso concreto se deberá de tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:

- ❖ Riqueza de un principio activo en materia o en producto acabado: 80-120%.
- ❖ **Impurezas:** desde el 50% de nivel de especificación hasta el 120% de dicho nivel.
- ❖ **Ensayo de disolución:** si se trata de un producto de liberación inmediata sería de Q-20% a Q+20%; si se trata de un producto de liberación controlada, sobre cada límite de disolución en cada período de tiempo se aplicaría ($\pm 2\%$).

La exactitud se expresare como porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra como diferencia entre la medida obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.

Porcentaje de recuperación (**R**)= $X_m / \mu * 100$

Diferencia= $X_m - \mu$

Dónde:

X_m = valor medio hallado

μ = valor aceptado como verdadero.



4.3.5.5. Riqueza de un principio activo.

4.3.5.5.1. Aplicación del método analítico a una muestra de riqueza conocida.

Para evaluar la riqueza de un principio activo o de una materia prima es habitual la utilización de un método absoluto, por ejemplo una valoración ácido-base. En este caso exactitud del método un patrón de referencia de concentración conocida y se compara el valor hallado verdadero conocido.

4.3.5.5.2. Comparación con un método de referencia validado.

Se comparan los resultados obtenido con el método analítico se quiere validar con los obtenidos con un método de referencia, cuya exactitud está bien determinada o definida. Ambos método deben ser independientes.

4.3.5.5.3. Determinación cuantitativa de un analito en un producto acabado.

En enfoque es similar al que se plantea para evaluar la exactitud de un método para la riqueza de un principio activo en este caso se trabaja sobre el producto acabado.

4.3.5.5.4. Aplicación de métodos analíticos a una muestra de concentración conocida

La muestra de concentración conocido se prepara a partir de un placebo cargado con cantidades conocidas de analito, o bien, cuando es difícil o imposible obtener un placebo en cuestión, se puede usar el método de adiciones de patrón sobre el problema.

❖ Método del placebo cargado.

Se prepara un placebo del problema que contiene todos los ingredientes excepto el analito a determinar. Sobre dicho placebo se añaden cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. El ensayo de recuperación se realiza como mínimo con 3 replicados para cada nivel. El analito se determina en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calcula la recuperación (Green, 1996; Carr, 1990; Mehta, 1989).



❖ **Método de adición de patrón.**

Se utiliza esta aproximación no es posible preparar un placebo de la matriz de la muestra que no contenga analítico. Este podría ser el caso de la muestra liofilizadas en las que la presencia o ausencia del analítico significativamente distancia. Se añaden sobre una o varias muestra conocida de un analítico patrón a 3 niveles concentración dentro del rango a estudiar.

Se realiza como mínimo 3 réplicas para cada nivel y se analizan las muestras adicionales y no adicionales según el método analítico calculando finalmente la recuperación. Este método tiene la ventaja de utilizar muestras reales y no requiere preparación de un placebo cargado.

No obstante, también debe hacer la misma reflexión que para el método del placebo cargado, ya que la adición de un Patrón sobre una muestra no es exactamente lo mismo que el producto acabado real.

4.3.5.5. Determinación cuantitativa de impurezas.

Se aplican los mismos métodos que para principio activo o producto acabado pero se utilizan muestras (principio activo/producto) cargadas con cantidades conocidas de impurezas. En la determinación de impureza suele ser más habitual utilizar el método de adición de patrón de la impureza patrón sobre la muestra de principio activo o producto acabado.

En el caso en que es imposible obtener muestras con cantidades conocidas de impurezas o productos de degradación, por ejemplo cuando no se puede obtener la impureza aislada, se considera aceptable comparar los resultados obtenidos con un segundo método independiente. Como los métodos de determinación de impurezas son, en general, métodos cromatográficos, puede usarse el factor de respuesta relativo al principio activo, es decir, utilizar como patrón de referencia un patrón del principio activo diluido a la concentración límite de la impureza que se quiere determinar. Debería quedar bien definido cómo se calcula el valor individual o total de impurezas respecto a la cantidad mayor de analito presente en el producto.

4.3.5.6. Criterio de aceptación.

La recuperación depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra (más o menos complejo) y la concentración del analito en la misma.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación cercanos al 100%, en según qué tipos de matrices complejas solo se obtienen valores del 50, 80 o 90%. En estos casos es importante que aunque la recuperación sea baja, la precisión del método sea alta ya que entonces puede intentarse aplicarse un factor de corrección.

Con respecto a si un resultado analítico debe ser corregido o no según la recuperación del método, se recomienda consultar la guía sobre recuperación preparada por la IUPAC, ISO y la AOAC, ya que existen argumentos a favor y en contra de este concepto (Thompson, 1999).

Criterios de aceptación que pueden orientar en la estimación de la recuperación:

Valores orientativos aceptables en la industria farmacéutica.

Tipo.	Coficiente de Recuperación %.
Materia prima	99.0-101.0
Formulado farmacéutico	97.0-103.0
Trazas (0.1 a 10ppm)	Min. 90%
Trazas (menor a 0.1ppm)	Min. 75%

4.3.6. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

4.3.6.1. Definición: Se entiende por **límite de cuantificación** de un método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada exactitud y precisión; y por **límite de detección** la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales.

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es cualitativo, encontrándose entre ambos términos un rango de concentraciones en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.



4.3.6.2. Ámbito de aplicación.

La guía tripartita ICH establece como necesaria la determinación del límite de detección en métodos de análisis destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite. Por el contrario se considera necesario establecer únicamente el límite de cuantificación en métodos destinados a la determinación numérica de impurezas.

Siempre que el método de análisis se emplee en la determinación de impurezas o trazas de principio activo, sería muy recomendable de entrada establecer no sólo el límite de detección sino también el límite de cuantificación.

4.3.6.3. Procedimientos de determinación del LD y LC.

4.3.6.3.1. Método basado en el examen visual.

En este caso, según ICH Q2B, tanto el LD como el LC podrían determinarse a partir del análisis de muestras con concentraciones conocidas y decrecientes de analito, estableciéndose visualmente la mínima concentración detectable así como aquella concentración límite que permite cuantificar con razonable precisión y exactitud la señal obtenida.

Este método es el más indicado en el caso de métodos de análisis no instrumentales en los que no se tiene una señal numérica.

4.3.6.3.2. Método basado en la relación señal/ ruido.

Requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental, se establece la señal ruido que proporciona un blanco o placebo a partir del análisis reiterado de dicho blanco (se recomienda un mínimo de 6-10 análisis consecutivos). En el caso de métodos espectrofotométricos el analista puede obtener fácilmente la lectura de absorbancia de soluciones placebo usando las condiciones instrumentales descritas, para métodos cromatográficos el cálculo de dicha señal-ruido es más costoso pero una vez establecido este valor puede concluirse de forma teórica y aproximada que el LC será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 10

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



veces mayor (en ocasiones se admite hasta un valor de 20) a dicho ruido de fondo, y que el LD será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 3 veces superior a éste.

Es posible que no sea necesario alcanzar el verdadero límite del método siempre y cuando el LC encontrado sea inferior al 50% del valor límite de las especificaciones de impurezas.

4.3.6.3.3. Método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado.

De acuerdo con la IUPAC, puede calcularse el LD y el LC de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra placebo y la pendiente de la recta de calibrado del analito.

4.3.6.3.4. Métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco.

Utilizados típicamente en métodos cromatográficos GC o HPLC. En éstos se ha de tener en cuenta también la señal media obtenida del análisis correspondiente al placebo, es decir, el ruido de fondo del sistema (Y_{bl}) con lo que la expresión final sería:

$$C_i = Y_{bl} + (K * S_{bl})$$

4.3.6.3.5. Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.

Se trata de un procedimiento aplicable también a métodos analíticos instrumentales que proporcionan resultados numéricos y dirigido a evitar el cálculo, en ocasiones costoso en tiempo, de la señal media del blanco y su desviación estándar. Para ello el método utiliza la pendiente de una recta de calibrado realizada a niveles de concentración cercanos a los límites esperados, pero sustituye el valor real de la señal del blanco por el resultante de la extrapolación de dicha recta. La intersección con el eje “Y” corresponderá teóricamente al valor de la respuesta a concentración cero del analito.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



De la misma manera se sustituye en la fórmula, la desviación estándar del blanco por la obtenida de estimar a partir de esta recta la de un hipotético blanco.

Experimentalmente, consiste pues en analizar muestras con concentraciones conocidas próximas al límite de cuantificación y calcular la ecuación de la recta Respuesta frente a concentración, y aplicar las mismas fórmulas que las expuestas en el apartado anterior.

4.3.6.3.6. Método experimental de cálculo para el LC (Método EURACHEM).

Cuando no existe la posibilidad de tener una muestra placebo o cuando se especifica un criterio concreto de precisión y exactitud, un método experimental, sencillo y eficaz, para el cálculo de LC es el método EURACHEM.

Consiste en preparar una serie de muestras con cantidades decrecientes de analito y analizar cada una de ellas 6 veces consecutivas, representando CV (%) de la precisión frente a la concentración de cada muestra.

Normalmente se fija un criterio de precisión de un CV igual a 10% en el límite de cuantificación, aunque se puede llegar a aceptar hasta un 20 %, en función de las características del método.

4.3.6.3.7. Método Meier-Zünd

El límite de detección de un método analítico es la cantidad mínima de analito presente en una muestra que puede ser detectado, aunque no necesariamente cuantificado bajo condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud, por otra parte el límite de cuantificación de un método analítico es la mínima cantidad de analito presente en una muestra que puede ser cuantificado bajo condiciones que el límite de detección.

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo, mientras que el límite de detección es un término cualitativo.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación se utilizó el método de Método Meier-Zünd, para lo cual utilizamos las siguientes ecuaciones:

$$\sum X_i^2 = (X_1^2 + X_2^2 + \dots + X_i^2)$$

$$\sum Y_i^2 = (Y_1^2 + Y_2^2 + \dots + Y_i^2)$$

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y_i}{n}$$

$$\sum_{XX} = \frac{\sum X_i^2 - (\sum X_i * \sum X_i)}{n}$$

$$\sum_{YY} = \frac{\sum Y_i^2 - (\sum Y_i * \sum Y_i)}{n}$$

$$\sum_{XY} = \frac{\sum XY - (\sum X_i * \sum Y_i)}{n}$$

$$\sum (XY)^2 = \sum XY * \sum XY$$

Estas ecuaciones se utilizaron para calcular el intercepto, la pendiente y los coeficientes de correlación y determinación:

$$b = \frac{\sum XY}{\sum XX}$$

$$a = \bar{Y} - b * \bar{X}$$

$$r = \frac{\sum XY}{\sqrt{\sum XX * \sum YY}}$$

$$r^2 = (r)^2$$

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Por otra parte se calculó la varianza y desviación estándar de Y, de la forma siguiente:

$$S_Y^2 = \frac{\sum YY - \left(\frac{\sum(XY)^2}{\sum XX}\right)}{n - 2}$$

$$S_Y = \sqrt{S_Y^2}$$

Así mismo se calcularon las desviaciones estándar del intercepto y la pendiente, de la forma siguiente:

$$S_a = S_y * \left(\sqrt{\left(\frac{\sum X_i^2}{n * \sum XX}\right)} \right)$$

$$S_b = \frac{S_y}{\sqrt{\sum XX}}$$

Utilizando las ecuaciones anteriores, calculamos los límites de detección y cuantificación de la forma siguiente:

$$LD = (t_{(0.05;n-2)} * S_y) * \frac{\sqrt{\left(\frac{\sum X_i^2}{n * \sum XX}\right)}}{b}$$

$$LC = (t_{(0.05;n-2)} * S_y) * \frac{\sqrt{\left(\frac{\sum X_i^2}{n * \sum XX}\right) + \frac{1}{n} + \frac{(LD - \bar{X})^2}{\sum XX}}}{b}$$



4.3.7. Robustez

4.3.7.1. Definición.

La robustez de un método analítico se define como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo en rutina.

Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válida en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

4.3.7.2. Ámbito de aplicación.

La robustez surgió con el fin de resolver los problemas que se planteaban en la transferencia de métodos analíticos. En estas circunstancias era frecuente que algún parámetro del método sufriera una variación que provoca serias dificultades en la equivalencia entre los resultados e ambos centros de análisis.

De modo que con el fin de identificar los factores potencialmente críticos surgió la necesidad de evaluar las fuentes de variación del método de hecho la consecuencia directa de los resultados del estudio de robustez ha de ser la definición razonada del test de idoneidad del método.

4.3.7.3. Procedimientos de determinación de la robustez.

4.3.7.4. Factores y niveles de influencia:

Dado los factores, hay que definir donde se quiere estudiar su influencia o bien determinar que parámetros se van a medir en cada ensayo. En cualquier método los factores a evaluar pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



- ❖ **Cuantitativos:** valor del pH, valor de la temperatura, porcentaje de componente orgánico en una fase móvil, etc.
- ❖ **Cualitativos:** fabricante de la columna cromatográfica, fabricante de un determinado reactivo, etc.

Una vez determinado los factores se han de fijar los márgenes de variación que se quieren evaluar, por ejemplo para el pH sería un margen de ± 0.1 u. referente al valor nominal descrito.

Tras establecer los factores a estudiar, la forma más sencilla de comprobar la influencia de cada uno de ellos sobre el método sería comprobar los resultados obtenidos modificando dicho factor pero manteniendo constante los demás.

No obstante esto conlleva a dos problemas:

- El efecto de modificar más de un factor a la vez puede ser diferente de lo observado al modificarlos de uno en uno.
 - Cuando hay bastantes factores esto representa mucho trabajo, tiempo y dinero.
- ❖ **Diseños factoriales fraccionados:** esta es la forma más eficaz de estudiar la robustez. Normalmente se utilizan dos tipos de diseños factoriales:

- ✓ **Diseños factoriales completos y fraccionados.**
- ✓ **Diseños de Plackett y Youden-Steiner.**

Ejemplos del diseño factorial:

- **Completa de ocho experimentos para evaluar la influencia de tres factores.**
- **Fraccionado de ocho experimentos para evaluar la influencia de cuatro factores.**
- **De Plackett-Burman.**
- **De Youden-Steiner.**



4.3.8. Incertidumbre:⁶

4.3.8.1. Definición: La incertidumbre de una medición es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando.

El mensurando: Es la concentración de un analito, no obstante, en análisis químico es usado para medir otras cantidades como por ejemplo: color, pH, etc., y por consiguiente el término general de mensurando será utilizado.

4.3.8.2. Origen de la incertidumbre de la medida

Parece evidente que no es posible obtener valores exactos como resultados de las medidas, ya que existen correcciones residuales debido a la inestabilidad de las magnitudes de influencia o a valores inexactos de patrones y equipos de medidas. Por otro lado, el valor obtenido cuando se decide interrumpir la aplicación de las sucesivas correcciones suele denominarse valor convencionalmente verdadero, es decir, es el mejor valor que puede obtenerse con los mejores medios disponibles.

Las causas principales de la incertidumbre, coinciden con los factores que influyen en los resultados de la medición que podrían ser agrupados según las cinco M:

- ❖ Método de medición.
- ❖ Medios humanos (Operador)
- ❖ Medios y equipos (Instrumento de medida)
- ❖ Medio ambiente (Magnitudes de influencia)
- ❖ Mensurando (Magnitud física objeto de la medición)

4.3.8.3. Proceso de estimación de la incertidumbre de medida:

- ❖ Modelización de la medición
- ❖ Evaluación de los componentes de la incertidumbre
- ❖ Evaluación de la varianza compuesta
- ❖ Estimación de la incertidumbre expandida



4.3.8.4. Fuentes de incertidumbre: ⁷

En este sentido, es importante que para un método validado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

- a) Muestreo
- b) Condiciones de almacenamiento.
- c) Efectos de los instrumentos.
- d) Pureza de Reactivos: materiales de referencia, preparación de estándares.
- e) Estequiometría asumida.
- f) Condiciones de la medición.
- g) Efectos de la muestra.
- h) Efectos de cálculos.
- i) Blancos de corrección.
- j) Efectos del operador.
- k) Efectos casuales.

4.3.8.5. Componentes de la incertidumbre:

4.3.8.5.1. Incertidumbre patrón: $u(X_i)$ Cuando un componente es expresado como una desviación del patrón.

4.3.8.5.2. Incertidumbre estándar combinada: $u_c(y)$ Es una desviación estándar estimada igual a la raíz cuadrada positiva de la variación total obtenida al combinar todos los componentes de la incertidumbre de cualquier modo evaluados, usando la ley de propagación de la incertidumbre.

4.3.8.5.3. Incertidumbre expandida: (U) Provee un intervalo dentro del cual el valor del mensurando permanece con un nivel más alto de seguridad.

4.3.8.5.4. Factor de cobertura: (k) La escogencia del factor k está basada en el nivel de Seguridad deseada. Para un nivel aproximado de seguridad del 95%, k es 2.



4.3.8.6. Error e incertidumbre: Es importante distinguir entre Error e incertidumbre.

4.3.8.6.1. Error: Diferencia entre un resultado individual y el valor verdadero de la medición, es un valor único.

4.3.8.6.2. Incertidumbre: Toma la forma de un rango y si es estimada para un procedimiento analítico y un tipo de muestra definida puede aplicarse a todas las determinaciones así descritas. El valor de la incertidumbre puede ser usado para corregir un resultado de la medición.

4.3.8.6.3. Tipos de error

4.3.8.6.3.1. Error causal: Típicamente aparece de variaciones impredecibles de cantidades de influencia, estos efectos casuales causan variaciones en las observaciones repetidas del mensurando.

4.3.8.6.3.2. Error sistemático: Es un componente independiente del número de mediciones hechas y no puede, por consiguiente, ser reducido al incrementar el número de análisis bajo condiciones constantes de medición.

4.3.8.6.4. Tipos de incertidumbre: ⁶

4.3.8.6.4.1. Tipo A: Las que se estima por procedimientos estadísticos. Tienen su origen en la naturaleza aleatoria de la medida. Consiste en realizar una serie de mediciones, bajo condiciones de repetibilidad, obteniendo unos valores x_1, x_2, \dots, x_n sobre un modelo de referencia o sobre un patrón.

4.3.8.6.4.2. Tipo B: Las que se estiman por otros métodos. Se basa fuertemente en la experiencia de la función metrológica y en la información proveniente de los factores de influencia que pueden afectar al resultado de la medida. Pueden provenir de las siguientes fuentes:

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



- ❖ Datos de mediciones anteriores.
- ❖ Experiencia o conocimiento de los equipos de medida.
- ❖ Documentación del fabricante.
- ❖ Datos obtenidos de calibración de equipo y patrones.
- ❖ Variaciones conocidas por variación de los factores de influencia (normalmente a través de la documentación del fabricante o de la propia experiencia).

4.3.8.7 Trazabilidad: ⁷

Para garantizar la trazabilidad de los resultados de una medición es necesario controlar los siguientes aspectos, tanto desde un punto de vista interno a la organización como externo en materia de subcontratación del proceso de calibración:

4.3.8.7.1. Trazabilidad externa:

La función metrológica debe disponer de unos laboratorios externos que tengan capacidad para evidenciar su trazabilidad, por ejemplo, a través de su acreditación o, en caso contrario, mediante la demostración de su trazabilidad por otros métodos, siendo aconsejable que puedan demostrar que cumple con los requisitos de la ISO 17025.

En este último caso, es necesario que puedan aportar evidencia de la trazabilidad de la calibración de los propios patrones que se han utilizado de la calibración en cuestión. También sería conveniente que se pudiese evidenciar la validación o el uso de métodos normalizados a través del análisis de la hoja de datos de la calibración, que ya algunos laboratorios lo incorporan como anexo al certificado.

4.3.8.7.2. Trazabilidad interna:

Mediante el cumplimiento del plan de calibración y el uso del diagrama de niveles que facilitará la identificación de los grupos de calibración interno y, por tanto, la trazabilidad interna.



En ambos casos debe garantizarse que el equipo de medición se utiliza en el rango de calibración, ya que no es posible extrapolar los resultados de la calibración. Es decir, la trazabilidad solo está garantizada en el rango de calibración.

4.3.8.7.3. Trazabilidad en magnitudes no pertenecientes al Sistema Internacional:

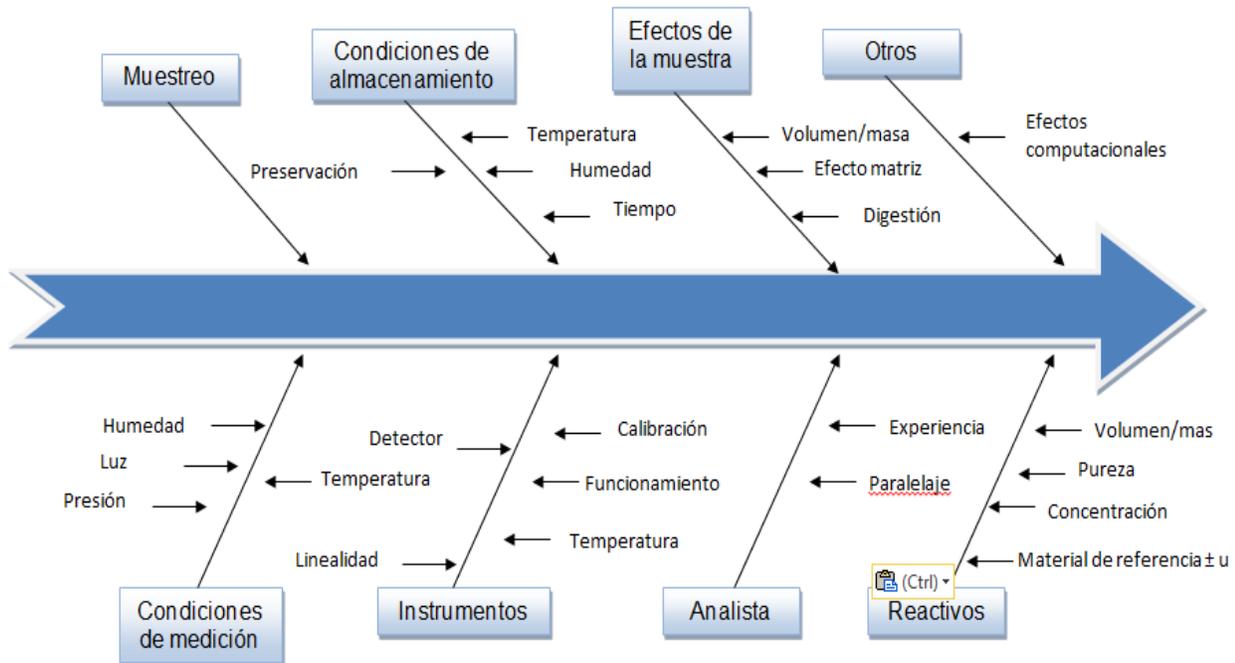
Existen algunas áreas metrológicas en las que no es posible garantizar la trazabilidad a patrones internacionales, simplemente porque estos no existen. En estos casos, suele ser habitual utilizar, con el mismo enfoque que se utiliza un patrón en el SI, un material de referencia certificado.

En algunos casos, ni siquiera será posible contar con la existencia de un material de referencia certificado, por lo que es necesario recurrir a otros métodos para establecer la referencia común y determinar la veracidad de la medición.

Entre estos métodos destaca un anillo de intercomparación entre varios laboratorios, donde el objetivo sea establecer una referencia común. En este caso, la trazabilidad queda garantizada únicamente a este anillo de laboratorio.



4.3.8 Análisis de las fuentes de Incertidumbre: ⁵



4.3.9. Estabilidad de la Muestra: ⁸

4.3.9.1. Estabilidad farmacéutica.

El término “estabilidad”, con respecto a las formas farmacéuticas de medicamentos, se refiere a la integridad física y química de la unidad de dosificación y cuando corresponda, a la capacidad de la unidad de dosificación de mantener la protección contra la contaminación microbiológica. La vida útil de la forma farmacéutica es el lapso de tiempo desde la preparación inicial hasta la fecha de caducidad especificada. Las especificaciones de la monografía en cuanto a identidad, contenido, calidad y pureza se aplican a lo largo de toda la vida útil del producto.

Los parámetros de estabilidad de la forma farmacéutica de un medicamento pueden estar influenciados por condiciones ambientales de almacenamiento (temperatura, luz, aire y humedad), así como también por los componentes del envase. Los artículos farmacopeicos deben incluir en su etiquetado las condiciones de almacenamiento requeridas.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Éstas son las condiciones según las cuales se aplicará la fecha de caducidad. Los requisitos de almacenamiento especificados en el etiquetado del artículo deben respetarse a lo largo de toda la distribución del artículo. Aunque el etiquetado para el consumidor debe indicar las condiciones de almacenamiento apropiadas, se reconoce que es difícil llevar a cabo el control más allá del dispensador o vendedor. La fecha límite de uso debe colocarse en la etiqueta del envase.

4.3.9.2. Protocolos de estabilidad.

La estabilidad de las formas farmacéuticas fabricadas debe ser demostrada por el fabricante, utilizando métodos apropiados para ese fin. Las pruebas de la monografía podrían utilizarse para las pruebas de estabilidad si diferencian con exactitud entre las moléculas intactas del fármaco y sus productos de degradación. Las consideraciones de estabilidad deben incluir los requisitos farmacopeicos específicos, también los cambios en la apariencia física del producto que advertirían a los usuarios si la integridad continuada del producto es cuestionable.

Los estudios de estabilidad para sustancias activas y formas farmacéuticas envasadas se llevan a cabo mediante pruebas “en tiempo real” y a largo plazo a temperaturas específicas y humedades relativas que presentan las condiciones de almacenamiento experimentadas en la cadena de distribución de las zonas climáticas del país o región del mundo involucrado.

El etiquetado de la sustancia activa o forma farmacéutica envasada debe reflejar los efectos de la temperatura, la humedad relativa, el aire y la luz sobre su estabilidad. Las advertencias de temperatura de almacenamiento en la etiqueta reflejarán los resultados de las pruebas de almacenamiento en tiempo real y también permitirán variaciones de temperatura estacionales esperadas.



4.4 Entorno legal: ⁴

4.4.1. Normas correctas de fabricación de medicamentos.

Las normas correctas de fabricación de medicamentos de la CEE de control de calidad indican que los métodos deben de estar validados (apartado 6.15). De igual manera las buenas prácticas de manufactura indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad, y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados.

4.4.2. Validación frente a los métodos oficiales y/o farmacopeas:

Se pueden diferenciar entre validación de métodos de análisis de principios activos y especialidades farmacéuticas:

- ❖ **Principios activos de síntesis:** los métodos oficiales o de farmacopea se consideran validados siempre y cuando se aplican a principios activos con la misma ruta de síntesis y por tanto el mismo perfil de impurezas que aquellos para los que fuera redactada la monografía.
- ❖ **Especialidades:** no es recomendable considerar ningún método oficial o de farmacopea totalmente para una especialidad, puesto que difícilmente se tendrá los mismos componentes ni la misma proporción.

No obstante pueden emplearse como punto de partida métodos desarrollados para especialidades tipo, como pueden ser los de la Farmacopea Europea (EP), Farmacopea Americana (USP) o Farmacopea Británica (BP), que permitan obviar una gran parte del desarrollo analítico.



4.4.3. Buenas Prácticas de Laboratorio: ⁴

Para validar un método analítico se requiere en primer lugar un entorno de trabajo que garantice la seguridad de los resultados que se obtengan. La consecución de esta garantía de calidad requiere trabajar de acuerdo con unas pautas correctas.

Los laboratorios de I+D especializados en estudios no clínicos destinados al registro de medicamentos (de toxicología, farmacología, farmacocinética, etc.) fueron los primeros en establecer unas Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

Las BPL surgieron para evitar deficiencias tales como experimentos sin protocolos previos, datos o resultados no supervisados o trazables, instrumentos o reactivos en condiciones inaceptables, muestras no representativas, personal no cualificado, etc. Frente a estas deficiencias las BPL preconizaban un sistema unificado de trabajo y de gestión que permitiera establecer comparaciones entre laboratorios diferentes, intercambiara información, la aceptación mutua de resultados y la resolución de conflictos.

Las primeras BPL fueron la de los estados unidos en 1979 y en la actualidad son de aplicación general en todos los laboratorios de I+D que realizan estudios no solamente sobre medicamentos sino también sobre cosméticos, aditivos alimentarios, plaguicidas y productos químicos en general cuando afectan a temas de salud humana, animal o medio ambiente.

Las filosofías de las BPL se han extendido también a los laboratorios de ensayo de los sectores químico, agroalimentario, etc. Y a los laboratorios de control de calidad de la industria farmacéutica y biosanitaria.

4.4.4. Las áreas de trabajo bajo normas BPL son:

- a) Organización y personal del laboratorio
- b) Instalaciones.



- c) Cuidado, alojamiento y confinamiento de los elementos utilizados en los sistemas experimentales biológicos.
- d) Aparatos, materiales, reactivos y especímenes.
- e) Productos de referencia y muestras de ensayos.
- f) Documentación.
- g) Archivos: almacenamiento y conservación de registros.
- h) Verificaciones de estudios.
- i) Inspecciones.

❖ **Organización y personal.**

Es uno de los factores más importantes a la hora de asegurar la calidad del análisis. El laboratorio debe disponer de suficiente personal técnico, bien organizado y dirigido para que puedan efectuarse los estudios en un tiempo razonable y sin sobre saltos, de manera que existan las condiciones apropiadas para poder efectuar las tareas de preparación, formación, supervisión, calibración, validación, etc.; actividades en suma que podrían denominarse de “prevención de errores”.

❖ **Instalaciones.**

Las instalaciones del laboratorio, tanto interiores como exteriores, deben de reunir las condiciones idóneas en cuanto a dimensiones, construcción, diseño y ubicación para poder realizar los estudios de forma correcta.

❖ **Aparatos, reactivos, material y especímenes:**

❖ **Aparatos.**

El laboratorio debe de disponer de instrumentos en cantidad suficiente y de capacidad adecuada para responder a las exigencias de los ensayos que se realizan. Se deben mantener limpios y en buen funcionamiento para obtener resultados fiables. Con este fin se realizarán las comprobaciones, calibraciones y cualificaciones de los equipos e instrumentos de medición (incluidos los sistemas informativos).

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



La Cualificación requiere que los equipos sean instalados correctamente e inspeccionados, limpiados, conservados, comprobados y calibrados periódicamente, según procedimientos escritos. Estos Procedimientos Normalizados de Trabajos (PNT) describirán lo suficiente detalle las instrucciones de funcionamientos, los métodos, materiales y programas a realizar en los aparatos. También se indicara las personas responsables de cada operación.

Debe mantenerse un registro de las diferentes operaciones que se realicen en el equipo e instrumento, ya sean de funcionamiento, mantenimiento, limpieza, calibración o Cualificación. Estos registros deben archivarlos durante un periodo de tiempo no inferior a 5 años.

- ❖ **Reactivos:** Los reactivos químicos deben ser preparados por personas cualificadas y según procedimientos descritos en la farmacopea u otros procedimientos aprobados.

En la etiqueta de los reactivos se deben contar con:

- ❖ Origen.
- ❖ Identificación de la sustancia.
- ❖ Condiciones de conservación.
- ❖ Fecha de preparación.
- ❖ Seguridad.
- ❖ Fecha de caducidad.
- ❖ Analista

Debe guardarse registro de cada preparación y procesos de estandarización.

- ❖ **Material y especímenes.**

El material de vidrio interviene en la mayoría de los análisis y se tiende erróneamente a dar por supuesta su idoneidad. Esto puede extenderse a materiales de porcelana, cuarzo, plástico, y metálicos. Los errores a causa de estos materiales pueden ser debidos a: suciedad o contaminación y defectos del material.

Los especímenes se identificaran por sistema experimental, estudio, naturaleza, y fecha de muestra.



❖ **Sistemas experimentales.**

Son estudios realizados en el laboratorio a partir de sistemas químicos y físicos, celulares, microbianos y vegetales o animales.

❖ **Productos de referencias y muestra de ensayo.**

Todos ellos deben presentar protocolos de preparación, manipulación, y almacenaje. Además se ha de registrar una serie de datos como son la recepción, la toma de muestra, la utilización y el almacenamiento. Se etiquetaran debidamente y se llevara un registro sobre su identidad, pureza, composición, estabilidad, trazabilidad, así como de posibles impurezas.

Se pueden encontrar diferentes tipos de referencias y de ensayo:

- ❖ Procedentes de proveedores externos.
- ❖ Patrones de referencia primarios originales (USP, EP, etc.)
- ❖ Patrones de referencia secundarios de trabajos (working standards).
- ❖ Mezclas o diluciones que se preparan en el laboratorio.

Las muestras de ensayos deben ser representativas y obtenidas según procedimientos de muestreos escritos y aprobados que deberán incluir los agrupamientos y tratamientos previos al análisis.

❖ **Verificación de resultados.**

Debe existir un procedimiento para la verificación por el analista de los resultados obtenidos de la muestra, su registro y su inclusión en el boletín de análisis. El supervisor debe revisar, firmar y fechar estos resultados.

Cuando se utilicen sistemas informáticos deben validarse para garantizar su seguridad frente a errores de funcionamiento o manipulación. También deben considerarse aspecto de confidencialidad.



❖ Autoinspección.

Un programa de Autoinspección o auditorías internas con personal de la propia sección de trabajo o secciones a fines, conduce a una crítica abierta y constructiva sobre todas las actividades del laboratorio, con consecuencias positivas a todos los niveles.

Fases en el desarrollo de un método analítico y criterios de validación.

No existe una guía oficial que indique la secuencia de experimentos analíticos para el desarrollo de un método. No obstante, el desarrollo de un método analítico transcurre en diferentes fases.

4.5. ABSORCIÓN ATÓMICA

4.5.1. Generalidades: ⁹

4.5.1.1. Definición: La espectrometría es el conjunto de técnicas que utiliza la luz para medir concentraciones químicas. Estos fenómenos están asociados con cambios en los estados de energía de las diferentes especies. Por consiguiente, dado que cada especie posee estados energéticos característicos, la espectrofotometría puede utilizarse para identificarlos.

La espectrofotometría constituye la base del análisis espectro químico, en el que la interacción de la radiación electromagnética con la materia se utiliza para obtener información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de una muestra.

La espectroscopia de absorción atómica se basa en la absorción de la luz por los átomos de un elemento a cuantificar en una muestra, cuando se hace incidir en ella un haz de luz emitido por una lámpara con una rigurosa longitud de onda definida, la cual corresponde a la longitud de onda de emisión característica del elemento particular escogido para el análisis.

4.5.1.2. Esencia del método.

La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la propiedad que tienen los átomos neutros del elemento que se analiza, para absorber la energía luminosa y en la correlación

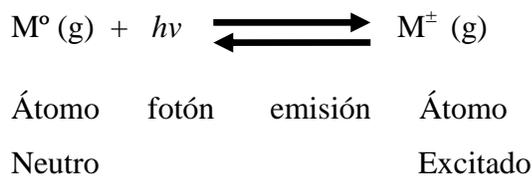
“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



entre la intensidad de la absorción y la concentración de dicho elemento en la muestra objeto de análisis.

Para que ocurra el fenómeno de absorción es necesario, la presencia de átomos neutros no excitados del elemento que se va a analizar, en forma de una nube gaseosa. Esto se logra mediante la utilización de un atomizador, en donde las muestras se vaporizan a una temperatura de 2,000-3,000°C. Estos átomos neutros así producidos, pueden absorber la energía luminosa de una longitud de onda determinada, proveniente de una fuente de radiación, y al hacerlo, se excitan un nivel energético superior. Después, los átomos excitados regresan a su estado base emitiendo la energía absorbida.

Los fenómenos de absorción y emisión se representan de la forma siguiente:



En Absorción Atómica y Emisión, la longitud de onda características que usualmente se utiliza en la determinación de la mayoría de los metales, corresponde a la primera línea de resonancia, es decir, a la línea espectral de transición entre el estado base y el estado excitado de la menor energía. Esta línea generalmente es más intensa y proporciona mayor sensibilidad en el análisis.

Es importante tener presente que un átomo puede absorber o emitir energía luminosa a diferentes longitudes de onda. Por otro lado, si la llama posee suficiente energía, el átomo metálico puede ionizarse, y los iones pueden absorber y/o emitir energía luminosa.

4.5.1.3. En qué consiste esta técnica.

La técnica analítica de absorción atómica consiste en llevar a un estado de excitación a las moléculas de una solución acuosa mediante la aplicación de energía en forma térmica, por medio de una llama de una combinación oxígeno acetileno o bien de óxido nítrico acetileno,

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



la muestra a alta temperatura se irradia con una luz a la longitud de onda a la cual el elemento en interés absorbe energía.

4.5.1.4. Fundamento de la técnica.

La técnica analítica de absorción atómica es un método instrumental que se basa en la absorción, emisión y fluorescencia de radiación electromagnética por partículas atómicas. Se emplean principalmente radiaciones del espectro ultravioleta (UV) y visible y Rayos X.

Consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La especie atómica se logra por atomización de la muestra. La técnica de atomización más usada es la absorción atómica con flama o llama, que nebuliza la muestra y luego la disemina en forma de aerosol dentro de una llama de aire de acetileno u óxido nitroso-acetileno.

La absorción de la luz por medio de átomos brinda una herramienta analítica poderosa para los análisis cuantitativos y cualitativos.

La técnica de absorción atómica se basa en el principio que los átomos libres en estado fundamental pueden absorber la luz a una cierta longitud de onda. La absorción es específica, por lo que cada elemento absorbe a longitudes de onda únicas. Es una técnica analítica aplicable al análisis de trazas de elementos metálicos en minerales, muestras biológicas, metalúrgicas, farmacéuticas, aguas, alimentos y de medio ambiente. Ésta transforma la muestra problema (que puede encontrarse en disolución o sólida) en átomos en estado de vapor y medir la radiación electromagnética absorbida por dichos átomos.

La mayor parte de la información útil se obtiene operando en las regiones UV, visible y rayos X. Los espectros atómicos están constituidos por picos estrechos y bien definidos que se originan por transiciones entre los diferentes niveles de energía electrónica, estas líneas de resonancia tienen origen en el estado basal y un destino en diferentes estados excitados.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



La absorción atómica es el proceso que ocurre cuando átomos de un elemento en estado fundamental absorben energía radiante a una longitud de onda específica. La cantidad de radiación absorbida aumenta al incrementar el número de átomos del elemento presentes en el “camino óptico”, esto permite utilizar a la absorción atómica con fines cuantitativos. Este método puede detectar cantidades tan bajas como 10-14gramos. La absorción de radiación por átomos libres involucra una transición de estos átomos desde el altamente poblado estado basal hasta un estado electrónico excitado.

4.5.1.5. Principio físico.

Los electrones de los átomos en el atomizador pueden ser promovidos a orbitales más altos por un instante mediante la absorción de una cantidad de energía (es decir, luz de una determinada longitud de onda). Esta cantidad de energía (o longitud de onda) se refiere específicamente a una transición de electrones en un elemento particular, y en general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento. Análisis Instrumental

Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida, y la cantidad restante en el otro lado (el detector) se puede medir, es posible calcular cuántas de estas transiciones tienen lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide.

4.5.2 Propiedades de la radiación electromagnética

La radiación electromagnética es una forma de energía que se transmite por el espacio a enorme velocidad. La radiación electromagnética puede describirse como una onda con propiedades de longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud. En contraste con las ondas sonoras, la luz no requiere un medio de soporte para su transmisión, de modo que propaga fácilmente en el vacío. Además viaja a una velocidad casi un millón de veces mayor que la del sonido. El modelo de onda no explica fenómenos relacionados con absorción y emisión de la energía radiante.

En la relación con estos procesos, se puede considerar a la radiación electromagnética como paquetes discretos de energía o partículas llamados fotones o cuantos. Estas dos

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



consideraciones de la radiación como partículas y ondas no son excluyentes entre sí, sino más bien complementarias. De hecho, la energía de un fotón es directamente proporcional a su frecuencia. De manera similar, esta dualidad se aplica al flujo de electrones, protones y otras partículas elementales, que pueden producir efectos de interferencia y difracción habitualmente relacionados con el comportamiento de las ondas.

La radiación electromagnética puede interactuar con la materia de diferentes maneras. Si el haz de radiación transfiere energía a la materia se dice que ocurre una absorción de la radiación. El proceso inverso, el que ocurre cuando parte de la energía interna de la materia es convertida en energía radiante, se llama proceso de emisión. Ambos fenómenos son sumamente importantes en espectrofotometría.

La radiación electromagnética tiene propiedades ondulatorias y corpusculares. Los fenómenos de refracción, reflexión, dispersión, etc. son explicables considerando la radiación electromagnética como ondas.

El efecto fotoeléctrico sugiere que la radiación electromagnética también tiene comportamiento corpuscular y que esta radiación consiste de partículas discretas llamadas fotones, los cuales tienen energía definida y se desplazan a la velocidad de la luz.

4.5.2.1 Espectros de Absorción.

Cuando una molécula absorbe un fotón pasa a un estado excitado de mayor energía, y al revés, cuando una molécula emite fotón, disminuye su energía en un valor igual a la energía del fotón. Los orbitales moleculares describen la distribución de electrones en una molécula, del mismo modo que los orbitales atómicos describen la distribución de electrones de un átomo. En toda transición electrónica se produce un salto de electrón de un orbital a otro, con el consiguiente aumento o disminución de la energía de la molécula.

El espectro se define como una representación gráfica o fotográfica de la distribución de intensidades de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia, en función de la longitud de onda de dicha radiación. Los espectros son debidos a transiciones entre estados de energía característicos de la materia.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Los espectros pueden ser de emisión, que se obtienen excitando adecuadamente la materia para que emita radiación electromagnética y de absorción, obtenidos sometiendo a la materia a una radiación electromagnética continua y representando la proporción de radiación absorbida por la misma en función de la frecuencia o longitud de onda.

4.5.2.2. Ley de Lambert-Beer.

La base de la espectrofotometría de absorción UV -Vis y su uso en el análisis cuantitativo están dados por la relación conocida como ley de Lambert – Beer, que establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración del analito en esa solución. Por lo tanto, puede emplearse para determinar la concentración de un compuesto en una solución.¹⁰

La longitud de onda λ de absorción de la luz es específica de cada cromóforo. Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una solución que contiene un analito absorbente, la intensidad (**I**)* que atraviesa la muestra es menor que la del haz incidente (**Io**). La fracción de radiación que ha traspasado la muestra se denomina transmitancia.¹⁰

(**T = I/Io**). La transmitancia T está relacionada con la absorbancia (A) de acuerdo a la siguiente expresión: ¹⁰

$$A = -\log T = -\log (I/Io)$$

Por aspectos prácticos, para las mediciones se usa la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia (T), debido a que, de acuerdo a la ley Lambert – Beer, A está linealmente relacionada con la concentración del analito absorbente a una determinada longitud de onda: ¹⁰

$$A = -\log_{10} (I/Io) = \epsilon cl$$

Dónde:

A: absorbancia medida.

I: intensidad de la luz transmitida.

Io: intensidad de la luz incidente

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



ϵ : coeficiente de absorción molar*, característico de cada sustancia absorbente a cada longitud de onda

l : longitud del camino óptico (distancia que atraviesa la luz dentro de la muestra)

c : concentración de la sustancia absorbente (mol L⁻¹).

La ley de Lambert-Beer se cumple para valores pequeños del producto ϵcl (0,01 a 0,1). Para cada analito absorbente y longitud de onda λ , ϵ es una constante y es una propiedad molecular fundamental asociada a un solvente dado, a una temperatura y presión particular.¹⁰

La absorbancia A y el coeficiente de absorción ϵ son a veces definidos en términos del logaritmo natural en lugar del logaritmo de base 10. ϵ es una constante relacionada con el área de incidencia del cromóforo y la probabilidad de que se produzca la absorción. Cuando ϵ es inferior a 10000, la absorción se debe a una transición electrónica prohibida por las reglas de selección. El espectrofotómetro UV-Vis registra las longitudes de onda a las cuales se cuantifica y registra la absorción. El espectro se registra como absorbancia (A) vs. Longitud de onda (λ).¹⁰

4.5.2.3. Casos en los que no se cumple la ley de Beer.

La ley de Beer afirma que absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente. Esta ley se aplica a radiación monocromática, y funciona muy bien con disoluciones diluidas ($\leq 0.01M$) de la mayoría de las sustancias.⁹

En disoluciones concentradas, las moléculas de soluto interaccionan entre si debido a su proximidad. Cuando las moléculas del soluto se aproximan entre sí, sus propiedades (entre las que se encuentran la absorptividad molar cambian algo. A concentraciones muy altas, los solutos se convierten prácticamente en disolventes. Las propiedades de una molécula no son exactamente las mismas en diferentes disolventes. Los solutos de una disolución que no absorben también pueden interaccionar con las especies absorbentes y alterar la absorptividad. Si la molécula absorbente participa en un equilibrio químico que depende de la concentración, la absorptividad cambia con la concentración, por tanto esta no obedecerá a la ley de Beer cuando se diluya.⁹



4.5.2.4. Teoría Atómica de Bohr (1913).

Los electrones alrededor del núcleo están en niveles bien definidos, con un número limitado de ellos. Un electrón puede saltar de una órbita a otra absorbiendo (si va hacia una órbita más exterior) o emitiendo (en caso contrario). Un cuanto de radiación electromagnética de energía es igual a la diferencia existente entre los estados de partida y de llegada.⁹

4.5.3. Tipos de Espectrofotometría Atómica.

4.5.3.1. Absorción: Se aspira una muestra hasta una llama, que se encuentra a altas temperaturas, el líquido se evapora, y las partículas sólidas resultantes se descomponen en átomos en la llama. Cuando se bombardea el cátodo con iones de Ne y Ar energizados, los átomos excitados se vaporizan y emiten luz de las mismas frecuencias de las que se absorben los átomos en llama, en donde hay un detector convencional para medir la cantidad de luz que pasa por la llama.⁹

4.5.3.2. Emisión: Las colisiones de átomos en un plasma muy caliente elevan los átomos a estados electrónicos excitados, desde donde pueden emitir fotones espontáneamente al volver a su estado fundamental. No se usa lámpara en esta técnica. La intensidad de emisión es proporcional a la concentración del elemento en la muestra.⁹

4.5.4 Atomización con Llama.

En la atomización con llama, una disolución de la muestra se pulveriza en una llama mediante un nebulizador, el cual transforma la disolución de la muestra en un aerosol constituido por diminutas gotitas de líquido. A continuación ocurren una serie de procesos encadenados; estos procesos al final dan como resultado una mezcla de átomos del analito, iones del analito y con seguridad una variedad de especies moleculares y atómicas que se forman por reacciones entre el combustible, el oxidante y la muestra. Debido a la gran variedad de procesos complejos que tienen lugar, no es sorprendente que la atomización sea la etapa más crítica en la espectroscopia de llama, y la que limita la precisión de estos métodos.



Es precisamente por la naturaleza crítica de la etapa de atomización, que resulta importante comprender y conocer las características de las llamas y las variables que las afectan.¹¹

4.5.4.1. Etapas y procesos de la atomización: ¹¹

a) **Transporte de la disolución.** Esta etapa implica el movimiento de la disolución desde el recipiente que la contiene hasta el nebulizador a través de un estrecho tubo de plástico. Es necesario que este proceso sea reproducible tanto para las muestras como para los patrones, para lo cual es preciso que las disoluciones sean lo más iguales posibles en cuanto a disolventes, viscosidad, tensión superficial, etc. Así mismo deben evitarse disoluciones turbias y con partículas en suspensión.

b) **Nebulización:** La etapa de nebulización es de gran importancia y constituye un talón de Aquiles de los métodos de espectroscopia de llama. Implica la conversión de la disolución en un fino aerosol (suspensión de partículas ultramicroscópicas de sólidos o líquidos en el aire u otro gas).

El objetivo ideal es convertir la disolución en aerosol con una eficacia del 100%. En la realidad la eficacia oscila entre un 3 y 15% ya que para que la muestra que llega a la llama sea atomizada el tamaño de las partículas de aerosol debe ser menor de 10 μm (idealmente de 1 a 2 μm). El resultado neto es que 90 % de la muestra se drena en esta etapa hacia el recipiente de desecho.

c) **Transporte del aerosol:** En esta etapa el aerosol es transportado hasta la llama a través de la cámara de mezcla. Esta cámara tiene una serie de componentes—bola de impacto, deflectores—que aseguran que sólo las partículas más pequeñas lleguen a la llama.

d) **Desolvatación:** una vez que el aerosol alcanza la llama es la desolvatación, esto es, la conversión del aerosol en partículas de sal. La velocidad de desolvatación depende de factores tales como el tamaño de las gotas, disolvente, velocidad de aspiración, temperatura de la llama, etc.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



- e) **Vaporización:** Se trata de la conversión en la llama de las partículas de sal en vapor. Esta es una etapa crítica en los métodos de llama y en ella pueden presentarse serias interferencias que comentaremos más adelante. Entre las variables que afectan a esta etapa podemos citar el tamaño de la partícula, la composición de la misma, la temperatura de la llama y el tiempo (altura) en la llama.
- f) **Equilibrado de las especies vaporizadas:** La última etapa antes de la etapa de medida es el equilibrado de las especies vaporizadas. Como se indica en el esquema entre equilibrio se produce entre las especies moleculares (óxidos e hidróxidos), átomos neutros e iones.

En general, en los métodos de llama se prefiere los átomos neutros-especies primarias para absorción y fluorescencia, y átomos neutros excitados para emisión. La distribución relativa de estas especies depende del tipo de llama, de flujo relativo de los gases, y de la altura de observación en la llama.

4.5.4.2. Tipos de llama utilizadas en la espectroscopia atómica: ¹¹

COMBUSTIBLE	OXIDANTE	TEMPERATURA °C	VELOCIDAD DE COMBUSTIÓN (CM S ⁻¹)
Gas natural	Aire	1700-1900	39-43
Gas natural	Oxigeno	2700-2800	370-390
Hidrógeno	Aire	2000-2100	300-440
Hidrógeno	Oxigeno	2550-2700	900-1400
Acetileno	Aire	2100-2400	158-266
Acetileno	Oxigeno	3050-3150	1100-2480
Acetileno	Óxido nitroso	2600-2800	285

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



En la tabla anterior se enumeran los combustibles y oxidantes más comunes que se utilizan en espectroscopia de llama y también las temperaturas que se alcanzan con cada una de las mezclas, a esas temperaturas, sólo las especies fácilmente excitables tales como los metales alcalinos y los alcalinos térreos producen espectros de emisión aprovechables.

La velocidad de combustión indicada es de considerable importancia, porque las llamas sólo son estables en ciertos intervalos de caudal. Si el caudal no sobrepasa la velocidad de combustión, la llama se propaga hacia atrás por dentro del quemador, dando un fognazo interior, cuando el caudal aumenta, la llama sube hasta alcanzar un punto por encima del quemador donde el caudal y la velocidad de combustión son iguales, en esta región es donde la llama es estable.

4.5.4.3. Estructura de la llama: ¹¹

Las regiones más importantes de la llama son la zona de combustión primaria, la región interconal y el cono exterior, el aspecto y el tamaño relativo de esas regiones varía considerablemente con la relación Combustible/Oxidante.

- ❖ **Zona de combustión primaria:** se reconoce por su luminiscencia azul que proviene de los espectros de C_2 , CH y otros radicales, en general en esta no se alcanza el equilibrio térmico, y así la zona de combustión primaria rara vez se utiliza para la espectroscopia de llama.
- ❖ **Área Interconal:** es relativamente estrecha en llamas de hidrocarburo estequiométricas, puede alcanzar varios centímetros de altura con fuentes ricas en combustible de acetileno/oxígeno o acetileno/óxido nitroso. La zona es rica en átomos libres y es la parte de la llama que más se utiliza en espectroscopía.
- ❖ **Cono Exterior:** es una zona de reacción secundaria donde los productos formados en la región interior se convierten en óxidos moleculares estables.



4.5.4.4. Atomizadores de llama.

Los atomizadores de llama se emplean para las medidas de emisión, absorción y fluorescencia atómica. Un atomizador de llama consiste en un nebulizador neumático, que transforma la disolución de la muestra en una niebla, o aerosol que se introduce en un quemador. El tipo más común de nebulizador es el de tubo concéntrico, en el que la muestra líquida se aspira a través de un tubo capilar mediante un flujo de gas a alta presión alrededor de la punta del capilar a este procedimiento de transporte de líquido se le denomina aspiración. Debido a la alta velocidad del gas en el extremo del capilar, el líquido se dispersa en finas gotitas de varios tamaños, las cuales se introducen en la llama. También se emplean los nebulizadores de flujo cruzado en los que el gas a alta presión atraviesa el extremo del capilar en ángulo recto.¹¹

4.5.4.5. Reguladores de combustible y oxidante.

En la espectroscopia de llama los caudales de oxidante y de combustible constituyen variables importantes que se deben controlar de forma precisa. Es deseable poder variar cada uno de ellos en un intervalo amplio para poder encontrar experimentalmente las condiciones óptimas para la atomización. Por lo general, el combustible y el oxidante se combinan en una proporción estequiométrica. Sin embargo, en el análisis de metales que forman óxidos estables es más conveniente el empleo de una llama enriquecida con exceso de combustible. Los caudales se controlan por lo general por medio de reguladores de presión de doble diafragma seguidos de válvulas de aguja localizadas en el instrumento. Uno de los sistemas de medida de caudal más empleado es el rotámetro.¹¹

4.5.5. Instrumentos para la espectroscopia de absorción atómica: ¹¹

❖ Espectrofotómetros de un solo HAZ.

Consiste en varias fuentes de cátodo hueco, un cortador o una fuente de alimentación de impulsos, un atomizador y un espectrofotómetro sencillo de red de difracción con un fotomultiplicador como transductor.



❖ **Espectrofotómetro de doble HAZ.**

El haz que proviene de la fuente de cátodo hueco se divide mediante un cortador reflectante, de esta forma una mitad pasa a través de la llama y la otra mitad por fuera de ella. Las dos haces se recombinan mediante un espejo semiplatedado y llegan a un monocromador de red Czerny-Turner y un tubo fotomultiplicador actúa como transductor.

4.5.6. Componentes básicos de un equipo de absorción atómica son: ¹²

- ❖ Fuente Radiante
- ❖ Atomizador
- ❖ Monocromador
- ❖ Detector Amplificador.

A. La fuente radiante: La fuente de radiación característica debe poseer tres propiedades fundamentales:

- ❖ **Monocromaticidad:** la línea de resonancia se debe poder seleccionar con toda precisión exactamente a la longitud de onda del elemento a determinar.
- ❖ **Intensidad:** deber ser lo suficientemente intensa a la longitud de onda de interés.
- ❖ **Estabilidad:** suficiente como para poder realizar las medidas sin fluctuaciones considerables.

Actualmente hay varias fuentes de radiación utilizables: las de emisión continua, que abarcan el espectro desde el ultravioleta lejano hasta el visible y las fuentes de emisión discontinua, que emiten únicamente a longitudes de onda muy concretas.

Son más utilizadas las fuentes de emisión discontinua, entre las que se pueden distinguir las lámparas de cátodo hueco y las lámparas de descarga sin electrodos. Tanto unas como otras requieren un período de calentamiento antes de comenzar las mediciones. Sin embargo, se debe destacar que las lámparas de descarga sin electrodos tienen un elevado precio y requieren un elevado tiempo de calentamiento, pero presentan la ventaja de alta intensidad de emisión frente a las lámparas de cátodo hueco.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



La más común para las mediciones de absorción atómica es la lámpara de cátodo hueco, que consiste en un cilindro relleno con un gas inerte dentro del cual se encuentra un cátodo (construido del metal a analizar) y un ánodo. Al aplicar un cierto potencial a través de los electrodos esta fuente emite el espectro atómico del metal del cual está construido el cátodo

B. Atomizadores: se utilizan con y sin llama para producir átomos libres del metal en el haz de la radiación. El atomizador con llama está compuesto de un nebulizador, cámara de premezcla y un quemador. La solución de la muestra es convertida primero a un fino aerosol, y luego llevada a la llama que entrega la energía suficiente para evaporar el solvente y descomponer los compuestos químicos resultantes en átomos libres en su estado fundamental. Las mezclas de gases más usados para producir la llama adecuada son: aire/propano, aire/acetileno y óxido nitroso/acetileno. Generalmente, la elección dependerá de la temperatura requerida para la disociación de los compuestos y de las características químicas del elemento a determinar.

- ❖ **Nebulizador:** cuya misión es convertir la muestra aspirada en una nube de tamaño de gota muy pequeño.
- ❖ **Cámara de premezcla:** donde penetra la muestra una vez que se ha nebulizado. En ella se separan las pequeñas gotitas que forman la niebla mezclándose la muestra nebulizada con el oxidante y el combustible íntimamente.
- ❖ **Mechero:** Se sitúa sobre la cámara de premezcla, y por él sale la llama con temperatura suficiente para poder comunicar a la muestra la energía suficiente para llevar los átomos a su estado fundamental.
- ❖ **La llama:** es el medio de aporte de energía a la muestra. Entre las llamas se diferencia entre la de aire-acetileno y la de óxido nitroso-acetileno. En la llama se pueden distinguir tres zonas: - La zona interna: es la más próxima al mechero, de color azul y con temperatura relativamente baja. - La zona de reacción: donde se produce la atomización. - La zona externa: Es la parte más fría de la llama.

C. Monocromadores: Los espectrofotómetros de absorción atómica poseen generalmente monocromadores de red con montaje de Littrow o de Czerny-Turner. Estos monocromadores permiten aislar una línea de resonancia del espectro emitido por la lámpara de cátodo hueco.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



D. Detectores. Miden la intensidad de la radiación antes y después de la absorción por la muestra. A partir de los valores obtenidos se podrá calcular la radiación absorbida. En los aparatos comerciales se emplean tubos fotomultiplicadores. La llama emite energía continuamente a longitudes de onda no deseadas, produciendo interferencia y una gran inestabilidad en las lecturas. Los detectores que se utilizan son sensibles a determinadas frecuencias, ignorando las señales continuas ocasionadas por la llama. Por ello, se modula el sistema de alimentación de las lámparas a la misma frecuencia que el tubo fotomultiplicador

E. Sistema óptico: Su función es conducir las radiaciones emitidas por la lámpara a través del sistema de obtención de átomos en estado fundamental y el monocromador hasta llegar al detector. El sistema óptico está formado por:

F. Espejos y lentes: que focalizan sobre la llama la mayor cantidad de energía emitida por la lámpara y la sitúan a la entrada del monocromador.

G. Láminas plano paralelas: que se utilizan para aislar los demás elementos del exterior.

H. Rendijas: se sitúan una a la entrada para obtener un haz paralelo y estrecho procedente de la lámpara y otra a la salida para seleccionar la longitud de onda adecuada eliminando el resto de las emisiones.

4.5.7 Espectroscopia de emisión de llama.

Tiene una gran aplicación en el análisis elemental la cual es la determinación de sodio, potasio, litio y calcio, especialmente en tejidos y fluidos biológicos. Por razones de conveniencia, rapidez, y por la relativa falta de interferencias, la espectroscopia de emisión de llama se ha convertido en el método de elección para el análisis de estos elementos que suelen ser difíciles de determinar por medios de otras técnicas.¹¹

A. Instrumentación.

Los instrumentos para trabajar con emisión de llama son similares a los instrumentos de absorción de llama, excepto por el hecho de que en los primeros la llama actúa como fuente de radiación, en consecuencia la lámpara de cátodo hueco y el cortador no son necesarios



.Muchos instrumentos se pueden adaptar para su uso tanto en el análisis de absorción como de emisión.¹¹

B. Espectrofotómetros.

Para el análisis que no son de rutina resulta más conveniente emplear un espectrofotómetro ultravioleta/ visible con registrador, cuya resolución sea aproximadamente 0.5Å. El registrador constituye un medio simple para realizar correcciones del fondo.¹¹

C. Fotómetros.

Se utilizan fotómetros simples de filtros. En estos casos se utiliza una llama de baja temperatura para evitar la excitación de la mayoría de los metales algunos fotómetros son específicamente diseñados para cada metal.¹¹

4.5.8 Tipos de interferencia:¹²

4.5.8.1. Interferencias físicas: Este tipo de interferencias está relacionado con la efectividad con que la solución es transportada a la llama y son causadas por diferencias en las propiedades físicas de las soluciones: viscosidad, tensión superficial o presión de vapor.

Un ejemplo de estas interferencias se observa en la determinación de Mg y Cu en presencia de ácido fosfórico. A mayor concentración de H₃PO₄ la viscosidad de la solución aumenta, disminuyendo la velocidad de aspiración de ella y una fracción menor llega a la llama, produciéndose una absorbancia menor de la muestra.

También la presencia de solventes orgánicos produce este tipo de interferencias debido a un aumento en la eficiencia de la nebulización (menor viscosidad y menor tensión superficial), lo que produce un aumento de la absorbancia.

Una forma de compensar este tipo de interferencia es preparar las soluciones estándar con los mismos componentes de la matriz de la solución problema.



4.5.8.2. Interferencias químicas: Es cualquier alteración en el número total de átomos libres formados por unidad de volumen debido a la formación de compuestos químicos termoestables. Las causas más comunes de éstas son:

a. Disociación incompleta de la molécula formada o formación de una sal difícil de fundir.

El efecto del fosfato en la determinación de calcio es un ejemplo de este tipo de interferencia. El calcio con el fosfato forman el fosfato de calcio, el cual se transforma en pirofosfato de calcio, que es relativamente estable en una llama aire/acetileno. Así la cantidad de átomos libres de calcio generados en la llama será menor que la obtenida con una solución de calcio de igual concentración, pero sin presencia de fosfato, provocando una disminución de la señal.

Existen otros componentes refractarios que dan también una disminución de la señal de absorción del elemento de interés. Tal es el caso de silicatos, aluminatos y piro sulfatos de calcio, magnesio, estroncio y bario.

b. Reacción espontánea de los átomos libres con otros átomos o radicales presentes en el medio ambiente.

Esta interferencia es causada por la formación de óxidos e hidróxidos u ocasionalmente carburos o nitruros, debido a la reacción de los átomos libres con los productos de la combustión de la llama. Aproximadamente unos 30 metales no se pueden determinar con llama aire/acetileno (ejemplo: aluminio, silicio, boro, elementos lantánidos, etc.). La magnitud de la interferencia va a depender del tipo de estequiometría de la llama.

Las interferencias químicas pueden ser minimizadas por las siguientes formas:

- ❖ Empleo de llamas con mayores temperaturas. Como ejemplo tenemos la llama acetileno/óxido nítrico, la que es capaz de descomponer totalmente los compuestos refractarios.
- ❖ Agregar a la solución muestra un elemento “buffer”, el cual forma con el elemento interferente un compuesto más estable que con el elemento a determinar. El ejemplo más



conocido es la adición de lantano o estroncio en la determinación de calcio en presencia de fosfato.

- ❖ Preparación de las soluciones estándar de modo tal que su composición sea lo más semejante con la de la solución problema. Esta alternativa es difícil de aplicar debido a que requiere un conocimiento completo de la muestra.

4.5.8.3. Interferencias de ionización.

Un átomo neutro en su estado fundamental puede ser ionizado a temperaturas elevadas. Estos iones exhiben propiedades espectroscópicas diferentes a un átomo neutro y no pueden ser determinados por espectroscopia de absorción atómica. Así, el número total de átomos disponibles para la absorción atómica.

Así, el número total de átomos disponibles para la absorción de la radiación por unidad de volumen disminuye, lo que produce una pérdida de sensibilidad. Esta interferencia depende tanto de la temperatura de la llama como del potencial de ionización del elemento en estudio.

La ionización puede ser detectada notando que la curva de calibración tiene una desviación positiva a concentraciones altas, dado que la fracción de átomos ionizados es menor a concentraciones mayores. Estas interferencias se pueden eliminar agregando a todas las soluciones estándar y a la muestra un exceso del elemento que sea fácilmente ionizable en la llama, por ejemplo: el sodio, potasio, litio o cesio, o mediante el empleo de una llama de menor temperatura.

4.5.8.4. Interferencias espectrales.

En este tipo de interferencias, la radiación del elemento a determinar es directamente influenciada, existiendo interferencias espectrales de línea e interferencias espectrales de banda:

a. Las interferencias espectrales de línea, ocurren cuando hay superposición de dos líneas atómicas o cuando éstas no son resueltas por el monocromador.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



En general este tipo de interferencias no son frecuentes debido a la naturaleza muy específica de la longitud de onda que se usa en espectroscopia de absorción atómica. Si se llegan a presentar se pueden eliminar seleccionando una segunda línea de resonancia del elemento de interés (probablemente se obtenga mayor sensibilidad o empleando una ranura del monocromador más angosta).

b. Las interferencias espectrales de banda, se producen debido a la absorción de la radiación por moléculas o radicales, y por dispersión de la radiación por sólidos. Para ambos efectos, que en principio son distintos, se emplea el término absorción de fondo. Aquí existe una pérdida de radiación no específica que lleva a absorbancias mayores que la absorbancia obtenida por el analito. La señal está compuesta por la absorción del elemento a determinar más la absorción no específica.

La absorción molecular ocurre cuando una especie molecular en el atomizador posee un perfil de absorción que se superpone al del elemento de interés. El espectro molecular del hidróxido de calcio muestra un máximo de absorción en la línea de resonancia del bario.

Este problema es más serio en la región espectral bajo los 250 nm, donde concentraciones altas de metales alcalinos y de otras sales muestran una alta absorción molecular.

La dispersión de la luz ocurre cuando partículas de sólidos causan una deflexión de parte de la radiación de la fuente fuera del eje del sistema monocromador-detector. Estos problemas son relevantes con muestras conteniendo altas concentraciones de elementos refractarios.

4.5.9. Métodos empleados en la corrección de la absorción de fondo.

4.5.9.1. Método de corrección de doble línea: En este método se realiza la medición de una línea de emisión no absorbida por el analito, cuyo valor se resta al valor de la medición obtenida a la longitud de onda de resonancia del analito. El método tiene la desventaja que a veces no es fácil disponer de una línea de no resonancia cercana a la línea de resonancia del analito.



4.5.9.2. Método de corrección continua de fondo: La forma más eficaz para medir la absorción de fondo es realizar la medición empleando una lámpara de deuterio o de hidrógeno que emite un espectro continuo bajo los 320 nm. En estos instrumentos ambas fuentes radiantes (lámpara de cátodo hueco (LCH) y de deuterio (LD) son moduladas a la misma frecuencia, pero desfasadas, recorriendo el mismo camino óptico a través de la muestra en el monocromador para llegar al detector.

Este observa alternadamente en el tiempo las dos fuentes radiantes. La absorción de fondo disminuye la intensidad de ambas fuentes, mientras que la absorción proveniente de la lámpara de cátodo hueco. La electrónica del instrumento separa ambas señales y compara la absorción de ambas fuentes entregando una señal corregida con respecto a la absorción de fondo.

4.6. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Cuando la absorbancia de soluciones estándar de concentración conocida del elemento a determinar se grafica vs. la concentración, se obtiene una curva de calibración. La curva así obtenida es generalmente lineal a bajas concentraciones y la concentración de la muestra puede ser determinada por interpolación de su absorbancia en la curva de calibración.⁹

Para emplear este método de análisis cuantitativo la composición de las soluciones estándar deben ser preparadas lo más semejante posible a la composición de la solución-muestra para compensar o eliminar interferencias.⁹

Especialmente útil resulta el empleo del método de adición estándar, el cual permite trabajar en presencia de una interferencia sin eliminarla y obtener una determinación con buena exactitud del elemento en la solución-muestra. Interferencias físicas y algunas interferencias químicas pueden ser compensadas empleando este método que consiste en la adición de cantidades diferentes de una solución estándar del elemento a determinar a varias porciones iguales de la solución-muestra.

De esta forma, la interferencia afectará por igual a todas las soluciones. Si existe interferencia, se observará que la pendiente de la adición estándar es menor que la de la curva de calibración.⁹



4.6.1. Aplicaciones.

La absorción atómica es una técnica capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de los elementos químicos, por lo que sus campos de aplicación son variados. Este método se puede aplicar para la determinación de ciertos metales tales como: antimonio, cadmio, calcio, cesio, cromo, cobalto, oro, plomo, níquel, litio entre otros. Se emplea en análisis de agua, de suelos, bioquímica, toxicología, medicina, industria farmacéutica, alimenticia, petroquímica, etc.¹²

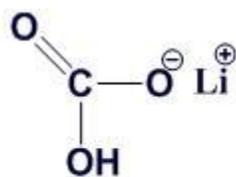
El servicio de espectroscopia de absorción atómica en las industrias agroalimentarias es de gran importancia para llevar a cabo funciones como las siguientes: ¹²

- ❖ Estimación de contaminaciones por oligoelementos
- ❖ Análisis de elementos químicos mayores (Fe, Ca, Al, etc.) en vinos y aceites
- ❖ Estudios de citotoxicidad de conservantes y aditivos
- ❖ Análisis de composición y control de calidad de derivados del petróleo.
- ❖ Análisis de metales como Pl, Li, Ca, Mg presentes en diferentes formas farmacéutica.

4.7. Propiedades físico químicas del carbonato de litio.

4.7.1. Características físico-químicas: ¹³.

- ❖ **Descripción:** El carbonato de litio es un polvo de color blanco de aspecto sólido e inodoro. Con peso molecular de 73.89.
- ❖ **Estructura química:**



CARBONATO DE LITIO



- ❖ **Fórmula química:** Li_2CO_3
- ❖ **pH:** 10-11.
- ❖ **Punto de fusión:** 720 °C.
- ❖ **Punto de ebullición:** no aplicable.
- ❖ **Densidad relativa:** 2,11 g/cm³.
- ❖ **Solubilidad:** 13 g/l agua 20 °C.

4.8 Características del Litio: ¹³

Símbolo químico	Li
Número atómico	3
Grupo	1
Periodo	2
Aspecto	blanco plateado/gris
Bloque	s
Densidad	535 kg/m ³
Masa atómica	7.0160040 u
Radio atómico	167
Radio covalente	134 pm
Radio de van der Waals	183 pm
Configuración electrónica	[He]2s ¹
Electrones por capa	2
Estados de oxidación	1 (base fuerte)
Estructura cristalina	cúbica centrada en el cuerpo
Estado	sólido
Punto de fusión	453.69 K
Punto de ebullición	1615 K
Calor de fusión	3 kJ/mol
Electronegatividad	0,98 (Pauling)



5. DISEÑO METODOLÓGICO.

5.1. Tipo de estudio: Experimental.

5.2. Área de estudio: El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos ubicado en el Complejo Docente Campo Médico, UNAN-León.

5.3. Unidad de análisis: Tabletillas de Carbonato de Litio de 300 mg.

5.4. Población de estudio: 300 Tabletillas de Carbonato de Litio de tres lotes diferentes, que ingresaron al LCCM, fabricados por un mismo laboratorio.

5.5. Muestra: 40 Tabletillas por cada lote (número de lote 033, 046, 057), obteniendo un total de 120 Tabletillas de 300 mg, (equivalentes al 40% de la población).

5.6. Alcance del presente estudio: Cuantificación de Litio en Tabletillas de Carbonato de Litio de 300 mg por la técnica instrumental de Espectroscopia Atómica de Emisión.

5.7. Plan de análisis: El análisis de datos obtenidos de los parámetros medidos (Linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad, robustez, límite de cuantificación y límite de detección se realizó a través del programa estadístico Microsoft Excel 2010 y Maple17 para la estimación de la Incertidumbre, presentando la información a través de tablas y gráficos.



5.8. Material y Equipo

NOMBRE	DESCRIPCIÓN
Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Llama.(AAE o EAA)	Marca: VARIAN, modelo: AA240, con 4 lámparas de cátodo hueco marca: VARIAN para Cu/Mn/Zn/Fe, Capacidad de corriente min: De 10 mA y max. De 20 mA
Balanza analítica	Marca: A&D, modelo: GH-120; capacidad: máx. : 120g, min.: 0.0001g; desviación: 0.1mg; condiciones operacional ambiental: temperatura: de 5 a 40 °C porcentaje de humedad relativa < 0 = 85% e= 1mg; serie: 13506973.
Balanza analítica	Marca: A&D; modelo: HM-120; capacidad: máx. : 120g, min.: 0.0001g; desviación: 0.1mg; serie: 15102356. condiciones operacional ambiental: temperatura: de 5 a 40 °C porcentaje de humedad relativa < 0 = 85%
Ultrasonic Cleaner	Marca: Bracsonic; modelo: B3-R baño ultrasónico para clarificar soluciones.
Pipetas automáticas	De 100 a 1000 mL; marca: Eppendox; división escala: ± 0.015 ml
Pipetas volumétricas	Pipetas volumétricas clase A; de 1 y 5 ml marca: pyrex.
Espátula	Espátula para pesar el polvo.
Balón calibrado.	Balón pyrex clase A, de 100, 200, 500 y 1000 mL.
Embudo y sostenedor	Embudo de vidrio y sostenedor de madera, para filtrar las muestras de la linealidad.
Vasos de precipitación	Beaker pyrex de 250 y 10 mL
Probetas	Probetas de vidrio de 500 y 10 mL
Destilador de agua	Destilador de agua potable marca Eppendox.
Mortero y pilón	Mortero y pilón para triturar las tabletas.



5.9. Reactivos y patrones.

Los reactivos y patrones siguientes se utilizarán durante la ejecución:

Nombre	Grado	Descripción	Formula química
Agua	Destilada	Agua destilada Densidad: 1 g/mL	H ₂ O
Ácido clorhídrico	Reactivo de Pureza: 37% Densidad: 1.190g/L	Líquido viscoso, muy corrosivo. Marca: Fisher.	HCl
Carbonato de Litio	Estándar	Polvo Blanco	Li ₂ CO ₃
Lauril Sulfato de Sodio	Agente Surfactante	Polvo blanco	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄

5.10. Procedimiento analítico para llevar a cabo la metodología de cuantificación de litio en presente en tabletas de Carbonato de Litio.

5.10.1. Condiciones espectrofotométricas.

Flujo del aire.	3.5 L/min.
Flujo del acetileno.	1.5 L/min.
Longitud de onda.	670.8 nm
Anchura de rendija.	0.2 nm
Corrección de fondo	Activado.
Volumen de aspiración.	4-6 mL/min.



5.10.2. Verificación del equipo de absorción atómica :

Para la realización de cada uno de los parámetros inicialmente se verificó el equipo efectuando una serie de pruebas:

- ❖ La estabilización de la llama durante un tiempo de 15 a 20 minutos.
- ❖ La medición del volumen de aspiración de 4 a 6 ml por minuto.
- ❖ Optimización del equipo: lectura del blanco y parámetros de emisión.

5.10.3. Preparación de soluciones:

a. Surfactante: Lauril Sulfato de Sodio 0.5%

- ❖ Pesar en un beaker de 50 mL, 1 g de Lauril Sulfato de Sodio.
- ❖ Transferirlo a un matraz de 500 mL y agregarle 200 mL de agua previamente calentada hasta diluir, evitando la formación de espuma.

b. Preparación de HCl al 2.4%.

- ❖ Medir 250 mL de agua destilada en una probeta, transferirlo en un matraz de 1000 mL.
- ❖ Agregar 32 mL de HCl concentrado.
- ❖ Agregar 250 mL más de agua destilada, para obtener un volumen total de 500 mL de HCl al 2.4%.

c. Preparación del estándar.

- ❖ Pesar con exactitud 34 ± 0.1 mg de Carbonato de Litio estándar, equivalente a 6.39 mg de Litio.
- ❖ Depositarlo en un matraz aforado de 100 mL, añadirle 40 mL de HCl al 2.4% hasta disolver.
- ❖ Ponerlo 10 minutos en el bransonic y aforar con agua destilada.
- ❖ Tomar una alícuota de 3 mL y transferirlo a un matraz aforado de 100 mL.
- ❖ Añadirle 80 mL de agua destilada y 2 mL del surfactante.
- ❖ Luego aforar con agua destilada, para obtener una concentración nominal del estándar de $1.92 \mu\text{g/mL}$ (100%).



d. Preparación de la muestra.

- ❖ Pesar por individual 10 tabletas de Carbonato de Litio de 300 mg y morterizarlas conjuntamente.
- ❖ Del polvo resultante pesar con exactitud lo equivalente a 34 ± 0.1 mg del estándar de Carbonato de Litio y llevarlo a un matraz aforado de 100 mL.
- ❖ Añadirle 40 mL de HCl al 2.4% y ponerlo en un baño maría a 80°C por 10 minutos, dejarlo 10 minutos en el bransonic y aforar con agua destilada.
- ❖ Filtrar la solución y tomar una alícuota de 3 mL, depositarla en un matraz aforado de 100 mL y agregarle 80 mL de agua destilada, 2 mL de surfactante y aforar con agua destilada. Para obtener una concentración nominal de la muestra de $1.92 \mu\text{g/mL}$ (100%).

e. Preparación del blanco.

- ❖ Medir en una probeta 40 mL de HCl al 2.4 %.
- ❖ Transferirlo en un balón aforado de 100 mL, añadirle 2 mL de surfactante y aforar con agua destilada.

5.11. Procedimiento experimental para determinar algunos parámetros de validación aplicables a esta metodología analítica para la cuantificación de Litio presente en tabletas de Carbonato de Litio de 300 mg.

5.11.1. Selectividad.

Todas las técnicas atómicas tienen en común su gran sensibilidad y selectividad al estar basadas en transiciones electrónicas de átomos que se producen en forma definida para cada uno de éstos y siendo distinta de un átomo a otro. Esta característica posibilita la determinación multielemental en una sola medida y prácticamente sin interferencia. Los espectros atómicos están constituidos por picos estrechos y bien definidos originados por transiciones entre distintos niveles de energía electrónica, esto explica la gran selectividad que suelen presentar estas técnicas, así mismo la sensibilidad depende del número de átomos en estado fundamental (Técnicas de absorción) y en estado de activación (Técnica de emisión).

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Este parámetro no se realizó en la validación para la cuantificación de Litio principalmente por que la técnica utilizada es selectiva para metales. En el Espectrofotómetro de Absorción Atómica el Litio se absorbe a una longitud de onda específica, utilizando una llama de aire acetileno específica. Es decir, que otros compuestos de la tableta no eluyen en la zona a la cual eluye el analito y no se absorben a la misma longitud de onda.

5.11.2. Linealidad del sistema instrumental.

a. Determinación experimental.

Para realizar el parámetro de linealidad del sistema, se hicieron pesadas individuales del estándar de Carbonato de Litio Anhidro (Li_2CO_3) y se prepararon cinco soluciones madres de Litio de concentración 63.9 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$), de estas se realizaron cinco soluciones de trabajo de concentraciones de (70%, 80%, 90%, 100% y 130%) del contenido teórico de (1.36, 1.56, 1.76, 1.92 y 2.54 ppm), a todas las soluciones se le añadió 2 mL de la solución surfactante (Lauril Sulfato de Sodio) y se aforaron con agua destilada.

Se optimizó el equipo con la solución de más alta concentración, se sumergió el capilar en el recipiente de cada una de las soluciones estándar (previamente agitadas) y se procedió a leer de manera ascendente la Intensidad de emisión a una longitud de onda de 670.8nm, analizándolas por triplicado en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica en modo de Emisión.

Se grafica la concentración para cada solución estándar versus la lectura obtenida.

a. Tablas, gráficos y Test estadísticos aplicados.

- ❖ Gráfica de regresión lineal.
- ❖ Coeficiente de determinación.
- ❖ Coeficiente de Variación.
- ❖ Homocedasticidad residual (Gráfica de residuales).
- ❖ Test de Cochran.
- ❖ ANOVA de dos factores.
- ❖ Test de linealidad.
- ❖ Test de proporcionalidad.



b. Criterio de aceptación.

- ❖ Se debe presentar una línea recta distinta de cero.
- ❖ El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual de 0.995 ($r^2 \geq 0.995$).
- ❖ El coeficiente de variación debe ser menor o igual del dos por ciento ($CV \leq 2\%$).
- ❖ Para la Homocedasticidad residual (Gráfica de residuales): La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia.
- ❖ Para el Test de Cochran, el G tabulado debe ser mayor que el G calculado; indica que las varianzas son homogéneas. ($G_{tab} > G_{cal}$).
- ❖ En ANOVA:
 - Para la regresión el F calculado debe ser mayor que el F tabulado ($F_{cal} > F_{tab}$), demuestra la existencia de una pendiente distinta de 0.
 - Para la falta de ajuste F calculado debe ser menor que el F tabulado ($F_{cal} < F_{tab}$), demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.
- ❖ Para el Test de linealidad:
 - Coeficiente de Variación de los factores de repuesta, debe ser menor que el dos por ciento ($CV < 2\%$).
- ❖ Para Test de proporcionalidad:
 - Si el intervalo incluye al intercepto, se dice que el intercepto es estadísticamente igual a cero.
 - Si el intervalo no incluye al intercepto, se dice que el intercepto es estadísticamente diferente de cero.
 - Si el intervalo incluye a la pendiente, se dice que la pendiente es estadísticamente distinta de cero.
 - Si el intervalo no incluye a la pendiente, se dice que la pendiente es estadísticamente igual a cero.



5.11.3. Linealidad de la muestra.

a. Determinación experimental

Para realizar el parámetro de linealidad de la muestra, se hicieron pesadas individuales del polvo de Carbonato de Litio (Li_2CO_3) para preparar cinco soluciones madres de Litio de concentración 63.9 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$), las cuales se calentaron, se llevaron al aforo y se filtraron. De estas se prepararon cinco soluciones de trabajo de concentraciones de (70%, 80%, 90%, 100% y 130%) del contenido teórico de (1.36, 1.56, 1.76, 1.92 y 2.54 ppm). Posteriormente a cada una se le añadió 2 mL de la solución surfactante (Lauril Sulfato de Sodio) y se aforaron con agua destilada.

Se optimizó el equipo con la solución de más alta concentración, se sumergió el capilar en el recipiente de cada una de las soluciones de la muestra (previamente agitadas) y se procedió a leer de manera ascendente la intensidad de emisión a una longitud de onda de 670.8 nm analizándolas por triplicado en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica en modo de Emisión.

Se grafica la concentración para cada solución estándar versus la lectura obtenida.

b. Tablas, gráficos y Test estadísticos aplicados.

- ❖ Gráfica de regresión lineal.
- ❖ Coeficiente de determinación.
- ❖ Coeficiente de Variación.
- ❖ Homocedasticidad residual (Gráfica de residuales).
- ❖ Test de Cochran.
- ❖ ANOVA de dos factores.
- ❖ Test de linealidad.
- ❖ Test de proporcionalidad.

b. Criterio de aceptación.

- ❖ Se debe presentar una línea recta distinta de cero.
- ❖ El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual de 0.995 ($r^2 \geq 0.995$).
- ❖ El coeficiente de variación debe ser menor del tres por ciento ($\text{CV} < 3\%$).

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



- ❖ Para la Homocedasticidad residual (Gráfica de residuales): La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia.
- ❖ Para el Test de Cochran, el G tabulado debe ser mayor que el G calculado; indica que las varianzas son homogéneas. ($G_{\text{tab}} > G_{\text{cal}}$).
- ❖ En ANOVA:
 - Para la regresión el F calculado debe ser mayor que el F tabulado ($F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$), demuestra la existencia de una pendiente distinta de 0.
 - Para la falta de ajuste F calculado debe ser menor que el F tabulado ($F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$), demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.
- ❖ Para el Test de linealidad:
 - Coeficiente de Variación de los factores de repuesta, debe ser menor que el dos por ciento ($CV < 2\%$).
- ❖ Para Test de proporcionalidad:
 - Si el intervalo incluye al intercepto, se dice que el intercepto es estadísticamente igual a cero.
 - Si el intervalo no incluye al intercepto, se dice que el intercepto es estadísticamente diferente de cero.
 - Si el intervalo incluye a la pendiente, se dice que la pendiente es estadísticamente distinta de cero.
 - Si el intervalo no incluye a la pendiente, se dice que la pendiente es estadísticamente igual a cero.

5.11.4. Precisión.

5.11.4.1. Repetibilidad del sistema instrumental.

a. Determinación experimental.

Para la realización del estudio de la repetibilidad del sistema, se prepararon tres soluciones estándar a la concentración nominal 1.92 $\mu\text{g/mL}$ (100%) de una misma solución madre, el mismo día y por el mismo analista y se leyeron por triplicado (obteniendo un total de nueve lecturas).

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Se optimizó el equipo con la solución de más alta concentración de la curva de calibración de la linealidad del sistema. Una vez agitadas, se sumergió el capilar en el recipiente de cada una de las soluciones de la muestra y se procedió a leer de manera ascendente la intensidad de emisión a una longitud de onda de 670.8nm, analizándolas por triplicado en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica en modo de Emisión.

Se tomaron las intensidades de las soluciones y se procedió a tabular los resultados.

b. Tablas reportadas

- ❖ Coeficiente de Variación (%CV).
- ❖ Porcentaje de Recobro (%R).

c. Criterios de aceptación.

- ❖ El Coeficiente de Variación de la repetibilidad del sistema debe ser menor o igual al dos por ciento ($CV \leq 2\%$).
- ❖ El porcentaje de recobro de la repetibilidad del sistema debe estar en el rango del 97 al 103%.

5.11.4.2 Repetibilidad del Método.

a. Determinación experimental.

Para la realización del estudio de la repetibilidad del método, se prepararon tres soluciones muestra a tres niveles de concentración (80, 100 y 120%) del contenido teórico (1.56, 1.92 y 2.34 ppm). A partir de una misma solución madre, el mismo día y por el mismo analista y se leyeron por triplicado (obteniendo un total de nueve lecturas).

Se optimizó el equipo con la solución de más alta concentración de la curva de calibración de la linealidad del sistema. Una vez agitadas, se sumergió el capilar en el recipiente de cada una de las soluciones de la muestra y se procedió a leer de manera ascendente la intensidad de emisión a una longitud de onda de 670.8 nm, analizándolas por triplicado en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica en modo de Emisión.

Se tomaron las intensidades de las soluciones y se procedió a tabular los resultados.



b. Tablas a reportar.

- ❖ Coeficiente de Variación (%CV).
- ❖ Porcentaje de Recobro (%R)
- ❖ Niveles de confianza para cada nivel de concentración.

c. Criterios de aceptación.

- ❖ El Coeficiente de Variación de la repetibilidad del método debe ser menor o igual al dos por ciento ($CV \leq 2\%$).
- ❖ El porcentaje de recobro de la repetibilidad del método debe estar en el rango del 97 al 103%.
- ❖ Para los niveles de confianza la media de los porcentajes de recobro debe de estar dentro de los límites superior e inferior.

Se tomaron las intensidades de las soluciones y luego se procedió a tabular los resultados.

5.11.4.3. Precisión intermedia del sistema instrumental.

a. Determinación experimental.

Para la realización del estudio de la precisión intermedia del sistema se preparó una curva de calibración de estándar a tres niveles de concentración (80, 100 y 120%).

Luego se prepararon por individual tres soluciones estándar a la concentración nominal (100%), esto se realizó por dos analistas diferentes (cada uno 3 soluciones), siguiendo el mismo procedimiento por tres días consecutivos y con las mismas condiciones ambientales e instrumentales.

Se optimizó el equipo con la solución de más alta concentración de la curva de calibración, luego se sumergió el capilar en el recipiente de cada una de las soluciones de la estándar y se procedió a leer de manera ascendente la intensidad de emisión a una longitud de onda de 670.8 nm, analizándolas por triplicado (obteniendo un registro total de 18 lecturas) en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica en modo de Emisión.



Se tomaron las intensidades de las soluciones y luego se procedió a tabular los resultados.

b. Tablas y test aplicados.

- ❖ Coeficiente de variación global.
- ❖ Homogeneidad de varianzas (Test de Batler).
- ❖ ANOVA de dos factores.

c. Criterios de aceptación.

- ❖ Coeficiente de variación global debe ser menor o igual al 3% ($CV \leq 3\%$).
- ❖ Test de Batler, las varianzas tienen que ser homogéneas.
- ❖ ANOVA de dos factores:
 - El F calculado entre filas tiene que ser menor F tabulado ($F_{cal} < F_{tab}$).
 - El F calculado entre columnas tiene que ser menor que el F tabulado ($F_{cal} < F_{tab}$).

5.11.4.4. Precisión intermedia del método.

a. Determinación experimental.

Para la realización del estudio de la precisión intermedia del método se preparó una curva de calibración de estándar a tres niveles de concentración (80, 100 y 120%).

Luego se prepararon por individual tres soluciones muestras a la concentración nominal (100%), esto se realizó por dos analistas diferentes (cada uno 3 soluciones), siguiendo el mismo procedimientos por tres días consecutivos y con las mismas condiciones ambientales e instrumentales.

Se optimizó el equipo con la solución de más alta concentración de la curva de calibración, luego se sumergió el capilar en el recipiente de cada una de las soluciones de la muestra y se procedió a leer de manera ascendente la intensidad de emisión a una longitud de onda de 670.8nm, analizándolas por triplicado (obteniendo un registro total de 18 lecturas) en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica en modo de Emisión.

Se tomaron las intensidades de las soluciones y luego se procedió a tabular los resultados.



b. Tablas y test aplicados

- ❖ Coeficiente de variación global.
- ❖ Homogeneidad de varianzas (Test de Batler).
- ❖ ANOVA de dos factores.

c. Criterios de aceptación.

- ❖ Coeficiente de variación global debe ser menor o igual al 3% ($CV \leq 3\%$).
- ❖ Test de Batler, las varianzas tienen que ser homogéneas.
- ❖ ANOVA de dos factores:
 - El F calculado entre filas tiene que ser menor F tabulado ($F_{cal} < F_{tab}$).
 - El F calculado entre columnas tiene que ser menor que el F tabulado ($F_{cal} < F_{tab}$).

5.11.5. Exactitud.

a. Determinación experimental por el método de adición patrón.

Para la realización del estudio de la exactitud por medio del método adición patrón se prepararon inicialmente dos soluciones madres una de muestra y otra de estándar. De la solución madre de la muestra se tomaron 1.5 mL para preparar una muestra al 50%. Luego se prepararon tres soluciones a tres niveles de concentración diferentes en el rango especificado de (80%, 100% y 120%), las cuales contenían 1.5 mL de la muestra madre y la diferencia del volumen de la alícuota se tomó de la solución estándar madre. Esto se trabajó con una curva de calibración de soluciones estándar de siete puntos en un rango de concentración del (70 al 130%)

Se sumerge el capilar del espectrofotómetro en cada una de las soluciones y se lee por triplicado, colocando cada muestra desde la más baja a la más alta. Se grafica la concentración de la curva normal en función de las intensidades obtenidas para la muestra cargada con solución estándar de carbonato de litio y se estima el porcentaje de recobro para cada una.



b. Gráficos , tablas y test aplicados

- Porcentaje de recobro (%R).
- Curva de adición patrón.
- El Test de student.
- Comparación de las pendientes de las rectas de los RMAP y RMCN.
- Comparación estadística de las pendientes de las RMAP y RMCN: Test de homogeneidad de varianzas y Test student ,

c. Criterios de aceptación.

- Porcentaje de recobro debe de estar en el rango de 98 a 102%.
- Coeficiente de determinación debe de ser mayor o igual a 0.995 ($r^2 \geq 0.995$).
- El test de student debe de especificar que el estadístico calculado debe ser menor que el estadístico tabulado ($t_{cal} < t_{tab}$)
- Si $b_{(RMAP)} = b_{(RMCN)}$, en este caso no existe efecto matriz si $b_{(RMAP)} > b_{(RMCN)}$, en este caso existe efecto matriz intensificador y si $b_{(RMAP)} < b_{(RMCN)}$, en este caso existe efecto matriz depresor.
- $F_{cal} < F_{(0.05, n1-2, n2-2)}$ las varianzas son homogéneas.
- $t_{cal} < t_{(0.05; n1+ n2- 4)}$, las pendientes son iguales.

5.11.6. Límites de detección y cuantificación.

a. Determinación experimental del límite de detección.

El límite de detección se calculó por medio de las ecuación de Mier and Zund; sacando la desviación estándar de las variables dependientes por la raíz cuadrada de la sumatoria de las concentraciones al cuadrado entre el número de concentraciones entre la pendiente.

b. Criterio de aceptación.

Límite de detección es igual a 3.3 veces la desviación estándar de la curva de regresión por adición patrón dividida entre su pendiente.



a. Determinación experimental del límite de cuantificación.

El límite de cuantificación se calculó por medio de las ecuaciones de Mier and zung; Calculando el LD más la raíz cuadrada de uno entre el número de réplicas más el LD menos la media, esto al cuadrado entre la sumatoria de las concentraciones entre la pendiente.

b. Criterio de aceptación

Límite de cuantificación es igual a diez veces la desviación estándar de la curva de regresión por adición patrón dividida entre su pendiente.

5.11.7. Rango

a. Descripción del rango

Es el intervalo entre la alta (2.54ppm) y baja (1.36ppm) concentración de analito en la muestra para la que se ha demostrado que el procedimiento de análisis tiene un nivel adecuado de precisión exactitud y linealidad

El intervalo encontrado de trabajo para la validación fue 1.18ppm.

5.11.8. Robustez

a. Determinación experimental.

La robustez se verificó mediante el análisis factorial 2^3 ; en donde se establece como factores de variación:

- La cantidad de HCl usado para disolver el carbonato de litio. (+45 ml, -35ml)
- La longitud de onda (+671.8, -669.8)
- La optimización del equipo (+1, -0.8)

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



La tabla siguiente indica el número de experimento a realizar.

N° de experimentos	A	B	C
	HCl	Long. de onda	Optimización.
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

a. Criterios de aceptación.

Si el efecto es mayor dos veces la desviación estándar agrupada los efectos son significativos.

5.11.9 Estabilidad

a. Determinación experimental.

Para realizar el estudio de la estabilidad de la muestra se preparó una solución muestra a la concentración nominal 100% (1.92 µg/mL), la cual se leerá por triplicado durante tres días consecutivos.

b. Gráficos y tablas a reportar.

- Gráfica de control del porcentaje de recobro vs los días.
- El porcentaje de recobro.



c. Criterios de aceptación.

- Gráfica de control: debe de demostrar que la solución será estable durante el tiempo en el cual el proceso se mantenga bajo control estadístico.
- El porcentaje de recobro debe de estar dentro del rango de 98 a 102%.

5.11.9. Incertidumbre.

a. Determinación experimental.

La estimación de la incertidumbre se realizó a través de los siguientes pasos:

- ❖ Identificación del mensurado.
- ❖ Establecimiento de un modelo matemático.
- ❖ Identificación de las fuentes de incertidumbres (Diagrama de causa y efecto).
- ❖ Cuantificación de los componentes de la incertidumbre.
- ❖ Cálculo de los coeficientes de sensibilidad.
- ❖ Cálculo de la incertidumbre combinada.
- ❖ Cálculo de la incertidumbre expandida de un nivel de confianza del 95% en cuyo caso el factor de cobertura es $k=2$.



6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

6.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Una vez realizada la linealidad del sistema como se menciona en el **acápite 5.11.2** del diseño metodológico se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Tabla N°1**, los cuales se analizaron mediante la aplicación de diversas pruebas estadísticas.

N°	1.36 ppm	1.56 ppm	1.76 ppm	1.92 ppm	2.54 ppm
1	0.5642	0.6216	0.6891	0.7319	0.8967
2	0.5641	0.6224	0.6864	0.7349	0.8992
3	0.5626	0.6237	0.6883	0.7362	0.8978
Media	0.5636	0.6226	0.6879	0.7343	0.8979
S	8.96E-04	1.06E-03	1.39E-03	2.21E-03	1.25E-03
S²	8.03E-07	1.12E-06	1.92E-06	4.86E-06	1.57E-06

Tabla N°1. Lecturas de intensidad de soluciones de Litio vs Concentración del estándar de Carbonato de Litio.

Conforme a la **Tabla N°1** procedimos a realizar un análisis de mínimos cuadrados para obtener los parámetros de regresión de la recta de Concentración (ppm) vs Intensidad, lo que se muestran en la **Tabla N°2** y en el **Gráfico N°1** se muestra la recta de los valores de Intensidad de soluciones de Litio vs Concentración del estándar de Carbonato de Litio.

Parámetros de regresión	
r² =	0.9977
a =	0.1840
b =	0.2830
Sy/x =	0.0059
Sa =	0.0071
Sb =	0.0038

Tabla N°2. Parámetros de regresión obtenidos a partir de los datos de tabla N°1

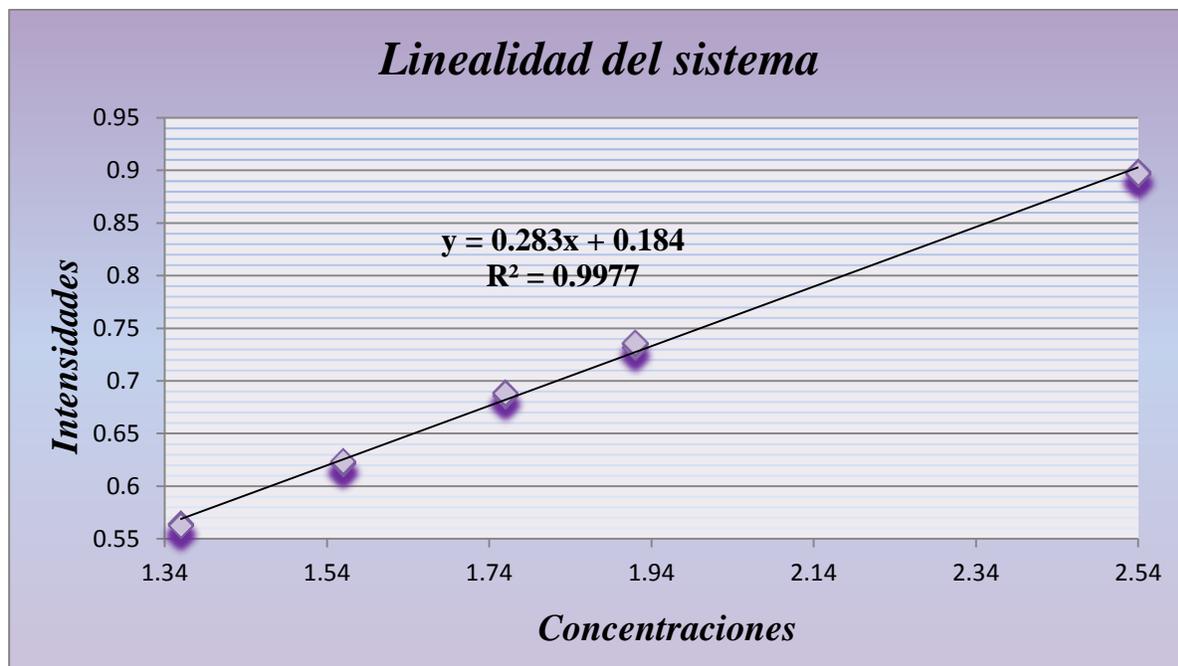


Gráfico N°1. Gráfico de Concentraciones del estándar de Carbonato de Litio vs Intensidad de soluciones de Litio.

Para evaluar la linealidad de los datos de la recta de regresión consideramos los siguientes tratamientos estadísticos:

- a) Coeficiente de determinación (r^2).
- b) Gráfico de residuales.
- c) Análisis de Varianza (ANOVA).
- d) Test de Linealidad:
 - Coeficiente de variación de los factores de respuesta.
 - Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente.
- e) Test de Proporcionalidad.

6.1.1. COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r^2)

El coeficiente de determinación (r^2) es un parámetro que expresa la proporción de la variación total de los datos de Y en relación a los datos de X, explicados por el modelo, es decir que el valor de r^2 , indica cuan ajustados, se encuentran los valores de X e Y a una recta. Se considera que los datos se encuentran ajustados a un modelo lineal cuando $r^2 > 0.995$ en el área de Espectrofotometría de Absorción Atómica de Emisión debido a la traza.



Como se muestra en la **Tabla N°2** y se observa en el **Gráfico N°1**, el coeficiente de determinación del ajuste de los datos de las variables es de **0.9977**, lo que indica que los datos de la recta se ajustan a un modelo lineal, situación que se puede observar perfectamente en el **Gráfico N°1**.

6.1.2 GRÁFICO DE RESIDUALES (e_i)

La representación de los residuales (e_i) proporciona información acerca de la validez de modelo de regresión lineal. Si la representación de estos se realiza frente a la concentración, proporciona información sobre el comportamiento de una recta de regresión. Si la distribución de los residuales es aleatoria y no sigue una determinada tendencia, indica que el modelo sigue un comportamiento lineal, en caso contrario se aleja de la linealidad. Los residuos se calculan mediante la siguiente la siguiente ecuación:

$$e_i = Y_i - \hat{Y}_i$$

Dónde:

Y_i : Es el valor de la intensidad de emisión experimental de la recta.

\hat{Y}_i : Es el valor de la intensidad de emisión pronosticada por el modelo de la recta.

El valor de la intensidad de emisión pronosticada por el modelo se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\hat{Y}_i = a + (b * X_i)$$

Dónde:

a: Es el intercepto del modelo de la recta.

b: Es la pendiente del modelo de la recta.

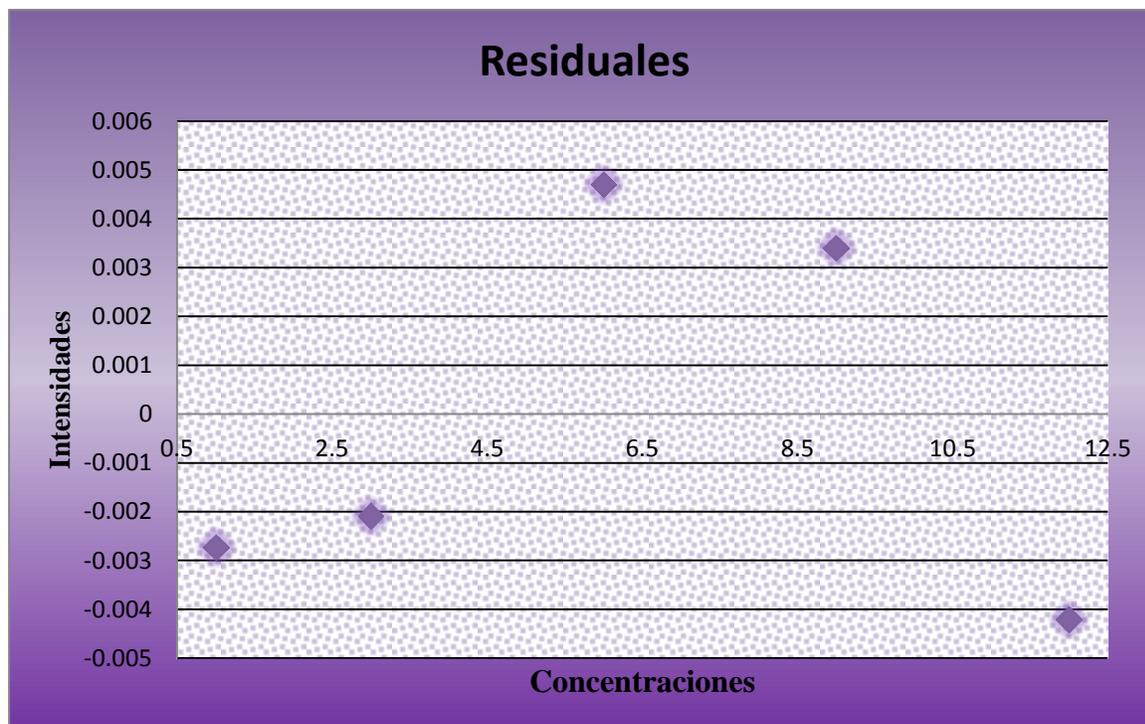


Gráfico N°2. Gráfico de residuales del sistema.

Como se observa en el **Gráfico N°2**, los residuos se distribuyen aleatoriamente en el espacio del gráfico y no siguen una tendencia por lo que se confirma que el modelo sigue un comportamiento lineal.

6.1.3 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Para realizar el ANOVA a los datos de la recta de regresión de la **Tabla N°1**, inicialmente determinamos la homogeneidad de la varianzas de los resultados mediante el test de Cochran. Para aplicar este test, planteamos inicialmente las siguientes hipótesis:

H₀: Las varianzas del conjunto de resultados son iguales u homogéneas.

H₁: Las varianzas del conjunto de resultados son diferentes o heterogéneas.

Posteriormente calculamos el estadístico G de Cochran, mediante la siguiente fórmula:



$$G_{\text{cal}} = \frac{S_{i \text{ max}}^2}{S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_k^2}$$

Dónde:

S_i^2 : Es la mayor varianza del conjunto de resultados.

S_1^2 a S_k^2 : Son cada una de las variables de cada grupo de resultados.

Finalmente el estadístico calculado lo relacionamos con el estadístico tabulado a un nivel de significación de 0,05, n-1 grados de libertad y k serie de resultados, concluyendo que:

Si $G_{\text{cal}} < G_{\text{tab (n-1,k)}}$ se acepta H_0

Si $G_{\text{cal}} > G_{\text{tab (n-1,k)}}$ se acepta H_1

El valor de la $G_{(n-1, k)}$ de Cochran se busca en la correspondiente tabla. Los resultados de la aplicación del test de Cochran se muestran en la **Tabla N°3** y se puede observar que el estadístico de Cochran tabulado (0.6838) es mayor que el estadístico calculado (0.4729) es decir no existe significancia estadística al nivel de confianza elegido por lo que se puede aceptar la hipótesis nula (H_0) y concluimos que las varianzas de los datos de la regresión son homogéneas.

Test Cochran	
G_{cal}	0.4729
$G_{(2;5)}$	0.6838

Tabla N°3. Resultados del test de Cochran

Una vez que concluimos que las varianzas de los datos de la regresión son homogéneas, procedimos a aplicar **ANOVA** a los resultados de acuerdo a las fórmulas presentadas en el **Anexo N°9**, con el objetivo de confirmar que estos se ajustan a un modelo lineal, obteniendo el cuadro de ANOVA que se muestra en la **Tabla N°4**.



Fuente de Variación	Gl	SC	CM	F _{cal}	F _{tab}
Regresión	1	0.1950	0.1950	9648.05	4.67
Residual	13	0.0003	0.0000		
Falta de Ajuste	3	0.4791	0.1597	-3.34	3.71
Error Experimental	10	-0.4789	-0.0479		
Total	14	0.1952	0.0139		

Tabla N°4. Resultados de ANOVA realizado a los datos de la recta de regresión.

Los estadísticos calculados se contrastan con los tabulados, en base a las siguientes hipótesis:

a) PARA EL CASO DE LA REGRESIÓN:

Las hipótesis nula y alternativa planteadas para este caso fueron:

H₀: La pendiente de la recta es distinta de cero y tiene inclinación respecto al eje y.

H₁: La pendiente de la recta es igual a cero y no tiene inclinación respecto al eje y.

Los criterios de aceptación y rechazo planteados son:

Si $F_{cal} > F_{(0.05; 1; 13)}$, se acepta H_0 .

Si $F_{cal} < F_{(0.05; 1; 13)}$, se rechaza H_0 .

b) PARA EL CASO DE LA FALTA DE AJUSTE:

Las hipótesis nula y alternativa planteadas para este caso fueron:

H₀: Los datos de la recta se ajustan a un modelo de regresión lineal.

H₁: Los datos de la recta no se ajustan a un modelo de regresión lineal.



Los criterios de aceptación y rechazo planteados son:

- Si $F_{\text{cal}} > F_{(0.05; 3; 10)}$, se rechaza H_0
- Si $F_{\text{cal}} < F_{(0.05; 3; 10)}$, se acepta H_0 .

Como se muestra en la **Tabla N°4**, el F calculado de la regresión ($F_{\text{Regresión}}$) es mayor que el F tabulado ($9648.05 > 4.67$), puesto que no existe significación estadística al nivel de confianza elegido se puede aceptar la H_1 , y concluimos que la recta tiene una pendiente distinta de cero y tiene inclinación respecto al eje Y. Lo que se confirma con una observación del gráfico de la recta mostrado en la **Gráfico N°1**.

Por otra parte, también en la **Tabla N°4**, podemos observar que el F calculado de la **Falta de Ajuste** ($F_{\text{Falta Ajuste}}$) es menor que el F tabulado ($-3.34 < 3.71$), puesto que no existe significación estadística al nivel de confianza elegido se puede aceptar la H_0 y concluimos que los datos de la recta se ajustan a un modelo de regresión lineal. Lo que se confirma con lo ya observado con el coeficiente de determinación r^2 que es mayor de 0.995 (0.9977).

6.1.4 TEST DE LINEALIDAD

En este caso realizamos los siguientes test de linealidad:

6.1.4.1 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la lectura (Intensidad de Emisión) y la Concentración y es una expresión de la sensibilidad del calibrado. En un modelo lineal los factores de respuesta deben ser cercanos a la pendiente. Valores de coeficiente de variación (CV) de los factores respuesta menores del 2% son indicativos de linealidad de un modelo.

Los factores de respuesta se calculan mediante:

$$f = \frac{Y_i}{X_i}$$

Una vez obtenidos se calcula el coeficiente de variación mediante:

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



$$CV = \frac{S_f}{\bar{f}} \times 100$$

Dónde:

S_f : Es la desviación estándar de los factores de respuesta

\bar{f} : Es la media de los factores de respuesta

En la **Tabla N°5**, se muestran los valores de los factores de respuesta obtenido para las Intensidades de la **TablaN°1**

SISTEMA			
X	Yi	Yi correg	Fi
1.36	0.5642	0.3802	0.2795
1.36	0.5641	0.3801	0.2795
1.36	0.5626	0.3786	0.2784
1.56	0.6216	0.4376	0.2805
1.56	0.6224	0.4384	0.2810
1.56	0.6237	0.4397	0.2818
1.76	0.6891	0.5051	0.2870
1.76	0.6864	0.5024	0.2854
1.76	0.6883	0.5043	0.2865
1.95	0.7319	0.5479	0.2810
1.95	0.7349	0.5509	0.2825
1.95	0.7362	0.5522	0.2832
2.54	0.8967	0.7127	0.2806
2.54	0.8992	0.7152	0.2816
2.54	0.8978	0.7138	0.2810
b	0.2820	media	0.2820
a	0.1840	s	0.0026
r2	0.9984	CV	0.9084

Tabla N°5. Factores de respuesta de los datos de la recta de regresión.



Como se muestra en la **Tabla N°5**, los valores de los factores de respuesta calculados son similares al valor de la pendiente de la recta obtenida (0.2830), lo que viene a confirmar lo ya establecido en cuanto a que sus valores deben ser cercanos a la pendiente de la recta. La media de los factores resultó ser de 0.282 y la desviación estándar de los factores fue de 0.0026, por lo que el CV calculado fue 0.9084%, este valor es menor del 2%, lo que indica que los datos se ajustan a un modelo lineal y la variabilidad de las intensidades es muy baja.

6.1.4.2 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PENDIENTE

Para esta prueba sacamos los Intervalos de confianza de la pendiente a partir de la siguiente expresión:

$$b \mp t_{(0.05;n-2)} \times S_b$$

Si el intervalo incluye a la pendiente, se confirma que la recta tiene una pendiente distinta de cero. En la **Tabla N°6**, se muestran los resultados del intervalo calculado incluyendo el límite superior y el inferior. El intervalo calculado incluye a la pendiente, por lo que se confirma que la pendiente es significativamente distinta de cero.

Parámetro	Valor
$t * S_b$	0.008148
LS	0.2911
b	0.2830
LI	0.2748

Tabla N°6. Intervalo de confianza de la pendiente calculada.

6.1.5 TEST DE PROPORCIONALIDAD

Para el test de proporcionalidad se obtuvo los intervalos de confianza a partir de la siguiente expresión:



$$a \pm t_{(0.05;n-2)} \times S_a$$

Si el intervalo no incluye al intercepto, se confirma que la recta tiene un intercepto distinta de cero. En la **Tabla N° 7**, se muestran los resultados del intervalo calculado, incluyendo el límite superior y el inferior. El intervalo calculado incluye al intercepto, por lo que se confirma que el intercepto es estadísticamente igual a cero.

Parámetro	Valor
t * S_a	0.0153
LS	0.1993
a	0.1840
LI	0.1688

Tabla N°7. Intervalo de confianza del intercepto calculado.

6.2. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Una vez realizada la linealidad del método como se menciona en el **acápite 5.11.3** del diseño metodológico se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Tabla N°8**, los cuales se analizaron mediante la aplicación de diversas pruebas estadísticas.

N	1.36 ppm	1.56 ppm	1.76 ppm	1.92 ppm	2.54 ppm
1	0.577	0.649	0.700	0.761	1.007
2	0.576	0.648	0.702	0.760	1.009
3	0.573	0.651	0.704	0.761	1.012
Media	0.5754	0.649	0.702	0.7608	1.0094
S	1.71E-03	1.50E-03	2.07E-03	6.66E-04	2.55E-03
S²	2.92E-06	2.25E-06	4.30E-06	4.43E-07	6.52E-06

Tabla N°8. Lecturas de Intensidad de soluciones de Litio vs Concentración del estándar de Carbonato de Litio.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Los parámetros de la recta de regresión de Concentración (ppm) vs Intensidad, obtenidos mediante el análisis de mínimos cuadrados se muestran en la **Tabla N°9** y en la **Gráfico N°3** se muestra la recta de estos valores.

Parámetros de regresión	
r^2	0.9953
b	0.3672
a	0.0668
Sb	0.0070
Sa	0.0131
Sy/x	0.0109

Tabla N°9. Parámetros de regresión obtenidos a partir de los datos de tabla N°8.

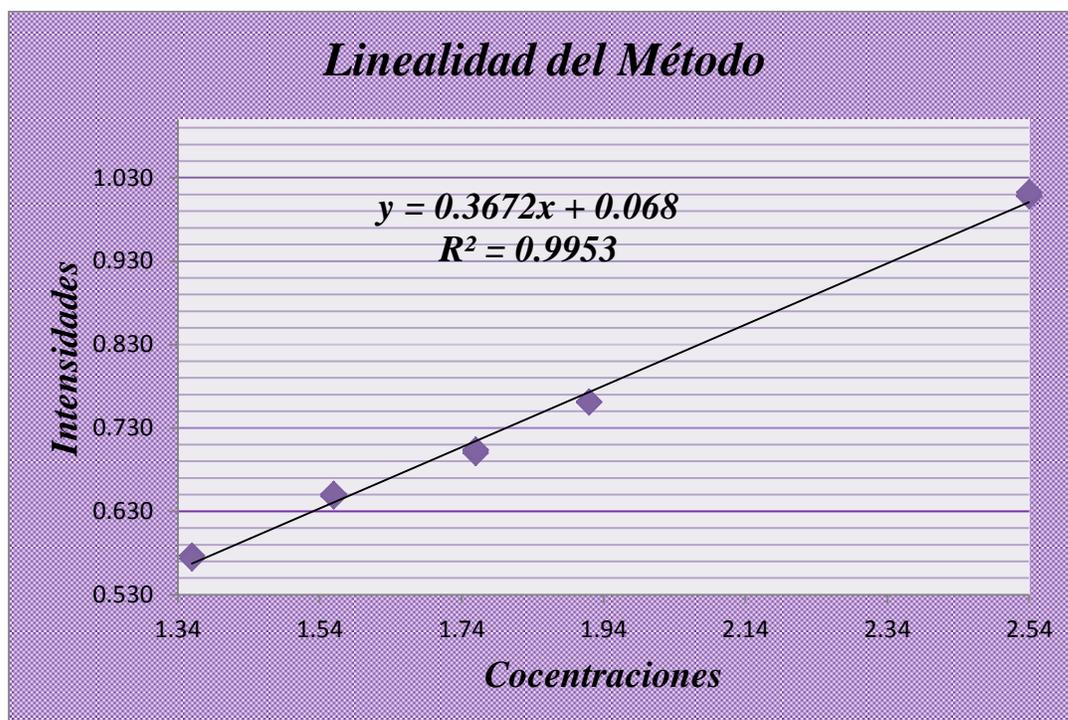


Gráfico N°3. Gráfico de Concentraciones del estándar de Carbonato de Litio vs Intensidad de soluciones de Litio.

Como se muestra en la **Tabla N°9**, el coeficiente de determinación del ajuste de los datos de las variables de Intensidad vs Concentración es de 0.9953 cumpliendo con el criterio de

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



aceptación en el área de Espectrofotometría de Absorción Atómica de Emisión $r^2 > 0.995$, lo que indica la calidad del ajuste del modelo a una recta, situación que puede observarse más detenidamente en el **Gráfico N°3**

En el caso específico del gráfico de los residuales del método, este se muestra en el **Gráfico N°4**. En la que se observa que los residuos se distribuyen aleatoriamente en el espacio del gráfico, y no siguen una tendencia por lo que de esta forma se confirma que el modelo sigue un comportamiento lineal.

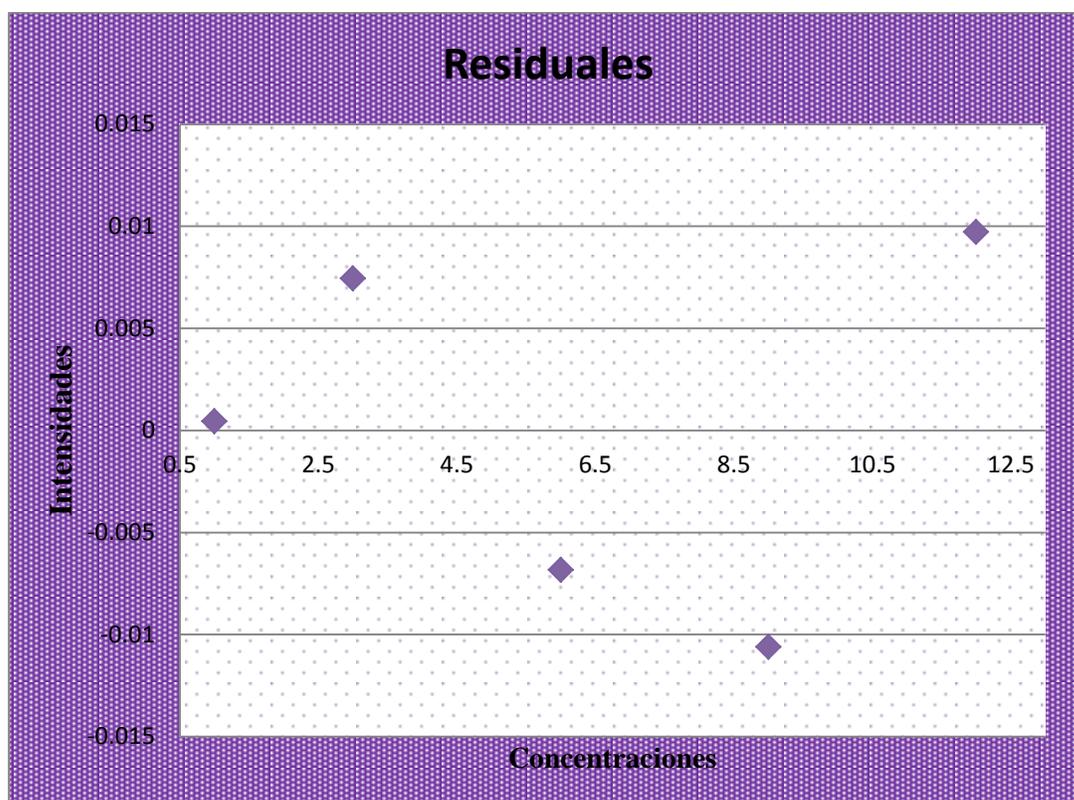


Gráfico N°4. Gráfico de residuales del método.

Al igual que en el caso del estudio de la linealidad de sistema, procedimos a realizar la prueba de ANOVA a los datos de la recta, realizando previamente el test de Cochran para determinar si las varianzas de los datos de la regresión eran homogéneas. Las hipótesis nula y alternativa planteadas en esta prueba fueron las siguientes:

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



H₀: Las varianzas del conjunto de resultados son iguales u homogéneas

H₁: Las varianzas del conjunto de resultados son diferentes o heterogéneas

Y se concluye:

Si $G_{cal} < G_{tab (n-1,k)}$ se acepta H₀

Si $G_{cal} > G_{tab (n-1,k)}$ se acepta H₁

Los resultados de la aplicación del test de Cochran se muestran en la **tabla N°10**.

Test Cochran	
G_{cal}	0.3967
G_(2;5)	0.6838

Tabla N°10. Resultados del test de Cochran

En la **Tabla N°10**, se puede observar que el estadístico de Cochran tabulado (0.6838) es mayor que el estadístico calculado (0.3967) puesto que no existe significación estadística al nivel de confianza estudiado se puede aceptar la hipótesis nula (H₀) y concluimos que las varianzas de los datos de la regresión son homogéneas.

Los resultados de la tabla de **ANOVA** obtenida a partir de los datos de la **Tabla N°8**, se muestran en la **Tabla N°11**.

Fuente de Variación	GI	SC	CM	Fcal	Ftab
Regresión	1	0.3281	0.3281	27411.28	4.67
Residual	13	0.0016	0.0001		
Falta de Ajuste	3	0.7312	0.2437	-3.34	3.71
Error Experimental	10	-0.7297	-0.0730		
Total	14	0.3296	0.0235		

Tabla N°11. Resultados de ANOVA realizado a los datos de la recta de regresión

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Como se muestra en la **Tabla N°11**, el F calculado de la regresión ($F_{\text{Regresión}}$) es mayor que el F tabulado ($27411.28 > 4.67$), puesto que no existe significación estadística se puede aceptar la H_1 , y concluimos que la recta tiene una pendiente distinta de cero. Lo que se confirma con una observación del gráfico de la recta mostrado en el **Gráfico N°3**.

Por otra parte, también en la **Tabla N°11**, podemos observar que el F calculado de la Falta de Ajuste ($F_{\text{Falta Ajuste}}$) es menor que el F tabulado ($-3.34 < 3.71$), puesto que no existe significación estadística se puede aceptar la H_0 , y concluimos que los datos de la recta se ajustan a un modelo de regresión lineal. Lo que se confirma con lo ya observado con el coeficiente de determinación r^2 que es mayor de 0.995 (0.9953)

6.2.1 TEST DE LINEALIDAD

En este caso realizamos los siguientes test de linealidad:

6.2.1.1 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA

En la **Tabla N°12**, se muestran los valores de los factores de respuesta obtenido para las intensidades de la **Tabla N°8**.

MÉTODO			
x	Yi	Yi correg	Fi
1.36	0.5765	0.5085	0.3739
1.36	0.5762	0.5082	0.3737
1.36	0.5734	0.5054	0.3716
1.56	0.6490	0.5810	0.3724
1.56	0.6475	0.5795	0.3715
1.56	0.6505	0.5825	0.3734
1.76	0.6997	0.6317	0.3589
1.76	0.7023	0.6343	0.3604
1.76	0.7038	0.6358	0.3612



1.92	0.7614	0.6934	0.3611
1.92	0.7601	0.6921	0.3605
1.92	0.7610	0.6930	0.3609
2.54	1.0074	0.9394	0.3698
2.54	1.0086	0.9406	0.3703
2.54	1.0123	0.9443	0.3718
b	0.3672	media	0.3674
a	0.0680	S	0.0060
r2	0.9945	CV	1.6239

Tabla N°12. Factores de respuesta de los datos de la recta de regresión

Como se muestra en la **Tabla N°12**, los valores de los factores de respuesta calculados, son similares al valor de la pendiente de la recta obtenida (0.3672), lo que viene a confirmar lo ya establecido en cuanto a que sus valores deben ser cercanos a la pendiente de la recta. La media de los factores resultó ser de 0.3674 y la desviación estándar de los factores fue de 0.0060, por lo que el coeficiente de variación calculado fue 1.6239%, este valor es menor del 2%, lo que indica que los datos se ajustan a un modelo lineal y hay una menor variabilidad de las intensidades.

6.2.1.2 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PENDIENTE

En la **Tabla N°13**, se muestran los resultados del intervalo de confianza de la pendiente calculada, incluyendo el límite superior y el inferior. El intervalo calculado incluye a la pendiente, por lo que se confirma que la pendiente es significativamente distinta de cero.



Parámetro	Valor
$t * S_b$	0.01515
LS	0.3824
b	0.3672
LI	0.3521

Tabla N°13. Intervalo de confianza de la pendiente calculada.

6.2.2 TEST DE PROPORCIONALIDAD

En la **Tabla N°14**, se muestran los resultados del intervalo de confianza del intercepto calculado, incluyendo el límite superior y el inferior. El intervalo calculado incluye al intercepto, por lo que se confirma que el intercepto es estadísticamente igual a cero.

Parámetro	Valor
$t * S_a$	0.02836
LS	0.0964
a	0.0680
LI	0.0397

Tabla N°14. Intervalo de confianza del intercepto calculado

6.3 PRECISIÓN

La precisión es la capacidad de un sistema o método para proporcionar resultados próximos entre sí. Esta se puede estudiar a tres niveles:

- **Repetibilidad:** Esta evalúa la capacidad de un sistema o método para proporcionar precisión en los resultados. Es considerada como precisión intralaboratorio o intraensayo.
- **Precisión intermedia:** Evalúa la precisión de los resultados frente a variaciones de analista, equipo o días. Es considerada como precisión interlaboratorio o interensayo.
- **Reproducibilidad:** Evalúa la precisión entre laboratorios.



Generalmente la precisión tanto de un sistema como de un método se expresa como valor porcentual de coeficiente de variación, se calcula mediante:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Dónde:

S: Es la desviación estándar de los resultados.

\bar{X} : Es la media de los resultados.

En este estudio, sólo se evaluaron la Repetibilidad y Precisión Intermedia, debido a la imposibilidad de realizar un estudio de Reproducibilidad, dada la extensión en el tiempo, los recursos y las gestiones necesarias para poder llevarlos a cabo.

6.3.1. REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

Una vez realizada la repetibilidad del sistema como se muestra en el acápite 5.11.4.1 del diseño metodológico se obtuvieron una serie de datos los cuales fueron analizados mediante pruebas estadísticas para comprobar la variabilidad del sistema instrumental en las mismas condiciones operativas. Cabe destacar que a las lecturas de las intensidades se les calculó la concentración utilizando un patrón de Referencia de concentración de 1.92 ppm de Litio, esto se hizo mediante la siguiente ecuación:

$$C_{(Li)} = \frac{I_s}{I_p} C_P$$

Dónde:

I_s : Es la intensidad de emisión medida en las soluciones de Litio

I_p : Es la intensidad de emisión medida del Patrón de Litio

C_P : Es la concentración del Patrón de Referencia Litio (1.9200 ppm)

A partir de las concentraciones determinadas de Litio en las soluciones preparadas, se determinó el porcentaje de recobro de las soluciones a partir de la siguiente ecuación:

$$\%R_{(Li)} = \frac{C_e}{C_t} \times 100$$

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Dónde:

C_e : Es la concentración experimental determinadas en las soluciones de Litio en ppm

C_t : Es la concentración teórica determinadas en las soluciones de litio en ppm

Nº de lecturas	Intensidades	Conc (µg/ml)	% de Recobro
1	0.8173	1.9344	100.7520
2	0.8169	1.9335	100.7027
3	0.8235	1.9491	101.5163
4	0.8136	1.9257	100.2959
5	0.8083	1.9131	99.6425
6	0.8117	1.9212	100.0616
7	0.8168	1.9333	100.6903
8	0.8097	1.9164	99.8151
9	0.8095	1.9160	99.7904

Tabla N°15. Intensidad de emisión, concentración en ppm y %R de las soluciones de Litio

En la **Tabla N°15**, se muestran los datos de intensidad de emisión, concentración de Litio en ppm y %R de las soluciones de Litio, empleadas en este estudio. Los porcentajes de recobro (%R) de las soluciones de Litio se ubican entre 99.6425 % y 100.7520 %, encontrándose en el límite de aceptación de 97 a 103 %, por lo que los resultados presentan una buena aceptabilidad. Para determinar la repetibilidad de los datos obtenidos calculamos el CV de las Concentraciones de Litio de las soluciones, para observar la variabilidad de los resultados este se muestra en la **Tabla N°16**.

Parámetro	Valor
Media	1.9270
Desviación estándar	0.0117
CV (%)	0.6047

Tabla N°16. Coeficiente de Variación Global de los datos

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



El % CV obtenido fue 0.6047%, cumpliendo el criterio de aceptación menor del 2% lo que indica que la variabilidad de los resultados es buena es decir que existe repetibilidad y precisión ya que hay concordancia en los resultados efectuados por el mismo analista, el mismo equipo, los mismos reactivos, en el mismo laboratorio y en un solo día.

6.3.2. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

6.3.2.1 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Una vez realizada la repetibilidad del método como se muestra en el acápite 5.11.4.2 del diseño metodológico se obtuvieron una serie de datos los cuales fueron analizados mediante pruebas estadísticas para comprobar la variabilidad del método, en las mismas condiciones operativas. Los resultados se muestran en la siguiente **tabla N°17**:

	(1.56 µg/ml) 80%		(1.92 µg/ml) 100%		(2.34 µg/ml) 120%	
N° análisis	Intensidad	Ppm	Intensidad	ppm	Intensidad	Ppm
1	0.6318	1.6111	0.7719	1.9683	0.9073	2.3136
2	0.6290	1.6039	0.7660	1.9533	0.9088	2.3174
3	0.6298	1.6060	0.7498	1.9120	0.9067	2.3120

Tabla N°17. Intensidad de emisión y Concentración en ppm de las soluciones de Litio

Para determinar la concentración de las soluciones se realizó inicialmente la lectura de la intensidad de emisión de un Patrón de 1.9200 ppm de Litio que correspondía con el 100% del rango de concentración esperado. Las concentraciones y el %R fueron calculadas de manera similar que en el caso de la repetibilidad del sistema, pero usando la intensidad de emisión del patrón de 1.9200 ppm.

En la **Tabla N°17**, se muestran los datos de intensidad de emisión y concentración de Litio en ppm empleadas en este estudio y en la **Tabla N°18**, se muestran los porcentajes de recobro de las soluciones a tres niveles de concentración del rango estudiado.



H₀: Las varianzas del conjunto de resultados son iguales u homogéneas.

H₁: Las varianzas del conjunto de resultados son diferentes o heterogéneas.

Los criterios de aceptación y rechazo planteados son:

Si $\chi^2_0 > \chi^2_{(0.05, 2)}$, se acepta **H₁**

Si $\chi^2_0 < \chi^2_{(0.05, 2)}$, se acepta **H₀**

Los resultados de la aplicación del test de Bartlet se muestran en la **tabla N°26**.

χ^2	4.91
$\chi^2_{(0.05, 2)}$	5.99

Tabla N°22. Resultados del test de Bartlet

En la **Tabla N°22**, se puede observar que el estadístico de Bartlet tabulado (**5.99**) es mayor que el estadístico calculado (**4.91**) se puede aceptar la hipótesis **H₀** puesto que no existe significación estadística al nivel de confianza establecido y concluimos que las varianzas de los datos de la precisión intermedia del método son homogéneas.

Se realizó un ANOVA de dos factores para determinar si las medias de los resultados entre los días y analistas son iguales, esto para descartar posibles variaciones entre los días que nos podrían proporcionar resultados erróneos en la precisión intermedia.

Las hipótesis nula y alternativa planteadas para este caso fueron:

H₀: Las medias de los datos son iguales.

H₁: Las medias de los datos son diferentes.

Los criterios de aceptación y rechazo planteados son:

- Si $F_{cal} > F_{(0.05; 3; 10)}$, se rechaza **H₀**
- Si $F_{cal} < F_{(0.05; 3; 10)}$, se acepta **H₀**

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Fuente de Variación	GI	SC	CM	Fcal	Ftab
Filas (Analista)	1	0.001886	0.00189	0.8451	18.5128
Columnas (Días)	2	0.026408	0.01320	5.4192	19.0000
Error Experimental	2	0.004465	0.00223		
Total	5	0.032761			

Tabla N°23. Resultados de ANOVA de dos factores realizado a los datos de tabla N°22.

Como se muestra en la **Tabla N°23**, el F calculado entre filas es decir entre analistas, es menor que el F tabulado ($0.8451 < 18.5128$), se puede aceptar la H_0 puesto que no existe significación estadística al nivel de confianza seleccionado y concluimos que las medias de los resultados entre los analistas son iguales.

Igual situación ocurre con el F calculado entre columnas es decir entre días, ya que este es menor que el F tabulado ($5.4192 < 19.0000$), por lo que se puede aceptar la H_0 y concluimos que las medias de los resultados entre los días son iguales.

Una vez que determinamos que la variabilidad de los datos es homogénea (Prueba de Bartlett) y que las medias de los analistas y días son iguales (ANOVA de dos factores), procedimos a calcular el Coeficiente de Variación Global a partir de los Coeficientes de Variación de cada analista y de cada día.

Es necesario indicar que se aceptan Coeficientes de Variación global de la Precisión Intermedia menores del 3%.

En la **Tabla N°24**, se muestran los resultados de la media global, desviación estándar global y del Coeficiente de Variación Global (Precisión Intermedia).

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Parámetro	Valor
Media Global	1.9294
S Global	0.0457
CV Global	2.4292

Tabla N°24. Coeficiente de Variación Global de la precisión intermedia del sistema

Como se muestra en la **tabla N°24**, el Coeficiente de Variación Global de la Precisión Intermedia es menor del 3% (2.4292 %) por lo que consideramos que la variabilidad de los resultados es buena, es decir, que existe precisión intermedia del sistema.

6.3.2. PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO

Una vez realizada la precisión intermedia del método como se muestra en el acápite **5.11.4.4** del diseño metodológico se obtuvieron los siguientes resultados mostrado en la **Tabla.N°25**.

Analista	Día 1	Día 2	Día 3
1	1.927	1.896	1.866
	1.873	1.870	1.859
	1.874	1.890	1.855
2	1.966	1.898	1.839
	1.865	1.852	1.889
	1.885	1.901	1.895
Media	1.90	1.88	1.87
S	0.04	0.02	0.02
S²	1.58E-03	3.77E-04	4.52E-04

Tabla N°25. Concentraciones de Litio determinadas por 2 analistas en 3 días consecutivos.

Las concentraciones de las soluciones durante los 3 días de estudio, fueron determinadas como se ha mencionado anteriormente en el estudio de repetibilidad. Para el estudio de la precisión intermedia del método primero aplicamos el test de Bartlett para determinar si las varianzas son homogéneas tomando como criterio para la aplicación de esta prueba observamos la

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



normalidad de los resultados y la independencia de las variables y nos planteamos las siguientes hipótesis:

H₀: Las varianzas del conjunto de resultados son iguales u homogéneas.

H₁: Las varianzas del conjunto de resultados son diferentes o heterogéneas.

Los criterios de aceptación y rechazo planteados son:

Si $\chi^2_0 > \chi^2_{(0.05, 2)}$, se acepta **H₁**

Si $\chi^2_0 < \chi^2_{(0.05, 2)}$, se acepta **H₀**

Los resultados de la aplicación del test de Bartlet se muestran en la **Tabla N°26**.

χ^2_0	2.66
$\chi^2_{(0.05, 2)}$	5.99

Tabla N°26. Resultados del test de Bartlet

En la **Tabla N°26**, se puede observar que el estadístico de Bartlet tabulado (**5.99**) es mayor que el estadístico calculado (**2.66**) ya que no existe significación estadística al nivel de confianza establecido se puede aceptar la hipótesis nula (**H₀**) y concluimos que las varianzas de los datos de la precisión intermedia son homogéneas.

Se realizó un ANOVA de dos factores para determinar si las medias de los resultados entre los días son iguales, esto para descartar posibles variaciones entre los días que nos podrían proporcionar resultados erróneos en la precisión intermedia.

Las hipótesis nula y alternativa planteadas para este caso fueron:

H₀: Las medias de los datos son iguales.

H₁: Las medias de los datos son diferentes.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Los criterios de aceptación y rechazo planteados son:

- Si $F_{cal} > F_{(0.05; 3; 10)}$, se rechaza H_0
- Si $F_{cal} < F_{(0.05; 3; 10)}$, se acepta H_0

Fuente de Variación	Gl	SC	CM	Fcal	Ftab
Filas (Analista)	1	0.0001	0.0001	2.8356	18.5128
Columnas (Días)	2	0.0010	0.0005	11.6690	19.0000
Error Experimental	2	8.36E-05	4.18E-05		
Total	5	0.0012			

Tabla N°27. Resultados de ANOVA de dos factores realizado a los datos de tabla N°25.

Como se muestra en la **Tabla N°27**, el F calculado entre filas es decir entre analistas, es menor que el F tabulado ($2.8356 < 18.5128$), debido a que no existe significación estadística al nivel de confianza estudiado se puede aceptar la H_0 y concluimos que las medias de los resultados entre los analistas son iguales.

Igual situación ocurre con el F calculado entre columnas es decir entre días, ya que este es menor que el F tabulado ($11.6690 < 19.0000$), por lo que aceptamos la H_0 y concluimos que las medias de los resultados entre los días son iguales.

Una vez que determinamos que la variabilidad de los datos es homogénea (Prueba de Bartlett) y que las medias de los analistas y días son iguales (ANOVA de dos factores), procedimos a calcular el Coeficiente de Variación global, de los datos obtenidos.

En la **Tabla N°28**, se muestran los resultados de la media global, desviación estándar global y del Coeficiente de Variación Global (Precisión Intermedia).



Parámetro	Valor
Media Global	1.8833
S Global	0.0270
CV Global	1.4267

Tabla N°28. Coeficiente de Variación Global de la precisión intermedia.

Como se muestra en la **Tabla N°28**, el Coeficiente de Variación Global de la Precisión Intermedia es menor del 3% (1.4267 %) por lo que consideramos que la variabilidad de los resultados es buena y la precisión intermedia del método es excelente.

6.4. EXACTITUD DEL MÉTODO

Una vez realizada la exactitud como se muestra en el acápite **5.11.5** del diseño metodológico, se procedió a analizar los resultados obtenidos en las lecturas de las muestras del parámetro de exactitud mediante pruebas estadísticas para comprobar la proximidad entre un valor que es aceptado como verdadero respecto a un valor experimental encontrado. Esto se realizó adicionando una cantidad conocida de un analito a una muestra real de concentración conocida, a tres niveles de concentración dentro del rango estudiado, lo cual se conoce como Método de Adición Patrón (MAP).

En la **Tabla N°29**, se muestran los parámetros de regresión de la recta; mientras que en la **Tabla N°30**, se muestran los resultados de las intensidades de emisión de las soluciones realizadas con el MAP.

PARÁMETROS DE REGRESIÓN DE LA RECTA	
r²	0.9900
b	0.3568
a	0.0807
Sb	0.0082
Sa	0.0164
Sy/x	0.0148

Tabla N°29. Parámetros de regresión obtenidos en el estudio de exactitud.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



	X_(Muestra)	X + 0.5751 ppm	X + 0.9585 ppm	X + 1.3400 ppm
	0.4493	0.7493	0.8693	0.9928
	0.4385	0.7500	0.8699	0.9928
	0.4373	0.7493	0.8696	0.9929
Media	0.4439	0.7495	0.8696	0.9928
S	0.0066	0.0004	0.0003	0.0001
CV (%)	1.4889	0.0539	0.0345	0.0058

Tabla N°30. Intensidades de emisión obtenidas en el estudio de MAP para determinar exactitud de método.

Como se muestra en la **Tabla N°30**, la ecuación de la recta de regresión en este caso es:

$$Y = 0.0807 + 0.3568 X \quad (r^2 = 0.9900)$$

Esta recta fue utilizada para determinar las intensidades teóricas o esperadas de cada una de las soluciones mostradas en la **Tabla N°31**. Para el cálculo de la exactitud previamente determinamos las intensidades experimentales netas de cada solución restando la intensidad media de cada solución a la intensidad media de la muestra y calculando el porcentaje de recobro (%R) mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \left(\frac{\text{Intensidad experimental neta}}{\text{Intensidad teórica esperada}} \right) \times 100$$

Concentración	Intensidad Experimental neta	Intensidad Teórica	% Recobro
0.5751	0.3056	0.2859	106.9
0.9585	0.4257	0.4227	100.7
1.3400	0.5489	0.5589	98.2
		Media	101.9
		S	4.5
		CV (%)	4.4

Tabla N°31. Porcentajes de recobro (%R) obtenidos en el estudio de exactitud.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Como se muestra en la **Tabla N°31** la media de los porcentajes de recobro con un 101.9% cumple con el rango establecido de 98-102%, por lo que se puede decir que existe una buena exactitud.

Para confirmar lo antes expresado, aplicamos una prueba de t student, para lo cual empleamos la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = \frac{|100 - \%R| * \sqrt{n}}{CV}$$

Dónde:

%R Es el porcentaje de recobro medio.

Las hipótesis planteadas en este caso fueron:

H₀: el porcentaje de recobro medio no es diferente estadísticamente de 100, por lo que la exactitud del método es correcta.

H₁: el porcentaje de recobro medio es diferente estadísticamente de 100, por lo que la exactitud del método no es correcta.

Finalmente el estadístico calculado lo relacionamos con un estadístico tabulado a un nivel de significación de 0,05 y n-1 grados de libertad, concluyendo que:

Si $t_{cal} < t_{tab (0.05; n-1)}$ se acepta H_0

Si $t_{cal} > t_{tab (0.05; n-1)}$ se acepta H_1

Parámetro	Valor
Media de %R	101.9
CV	4.4
n	3
t_{cal}	0.77
t_(0.05; 3-1)	4.30

Tabla N°32. Resultados de la prueba t.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



En la **Tabla N°32** podemos observar que el estadístico calculado es menor que el estadístico tabulado ($4.30 > 0.77$), puesto que no existe significación estadística al nivel de confianza establecido se puede aceptar la H_0 , por lo que concluimos que la exactitud es correcta y no existe diferencia significativa entre la recuperación y 100.

La representación de las concentraciones adicionadas en el MAP frente a la intensidad de emisión, se muestra en el **Gráfico N°5**, mientras que los parámetros de regresión de la recta de adición patrón se muestran en la **Tabla N°33**.

PARÁMETROS DE REGRESIÓN DE LA RECTA	
r²	0.9989
b	0.3180
a	0.5644
Sb	0.0104
Sa	0.0104
Sy/x	0.0056

Tabla N°33. Parámetros de regresión de la Recta de Adición Patrón.

Los resultados que se muestran en la **Tabla N°33**, permiten deducir que la recta de adición patrón presenta un buen ajuste lineal ya que su coeficiente de determinación es mayor que 0.995 ($r^2 = 0.9989$), esto se puede observar con más propiedad en el gráfico de la recta de adición patrón que se muestra en el **Gráfico N°5**, ya que claramente se observa que la recta se ajusta a un modelo lineal.

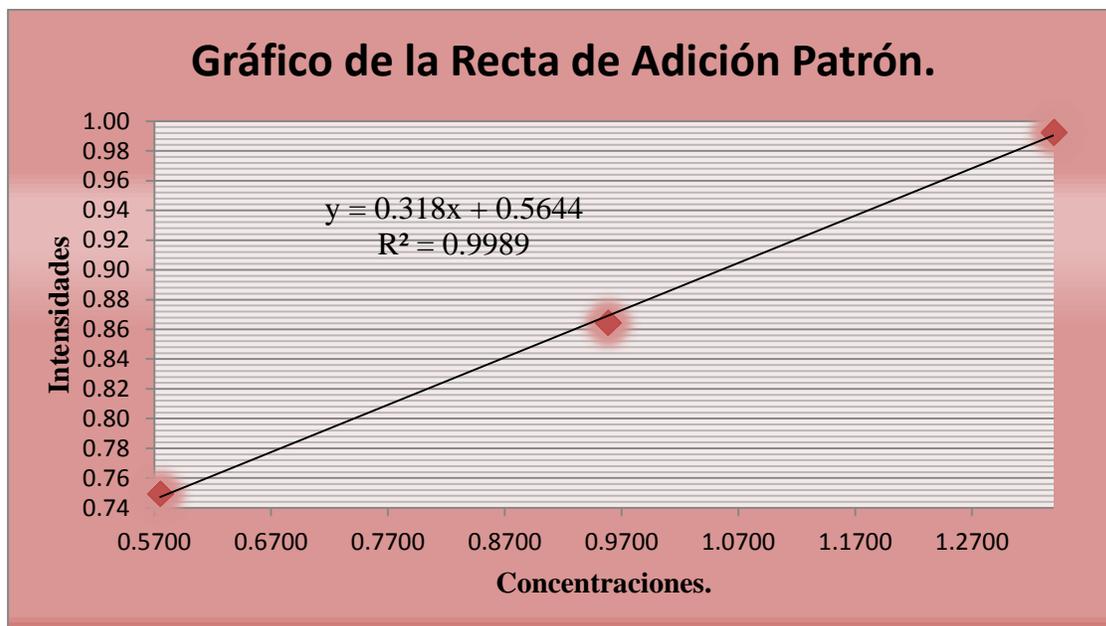


Figura N°5. Gráfico de la Recta del Método de Adición Patrón.

6.4.1. EFECTO MATRIZ DEL MÉTODO

El estudio del efecto matriz se realiza con el fin de determinar la existencia de interferencias en la matriz que pueden afectar la determinación del analito. Existen dos tipos de efecto matriz:

- **Intensificador:** si las interferencias producen aumento en la señal del analito adicionado en la matriz y la pendiente de la recta es mayor que la de la recta realizada con calibración normal.
- **Depresor:** si las interferencias de la matriz producen disminución en la señal del analito adicionado en la matriz y la pendiente de la recta es menor que la de la recta realizada con calibración normal.

Para realizar el estudio del efecto matriz tomamos los resultados del estudio de la exactitud del método, tanto los de la recta obtenida con el Método de Adición Patrón (RMAP), como los obtenidos con la Recta del Método de Calibración Normal (RMCN) de 7 puntos, los parámetros de las 2 rectas se muestran en la **Tabla N°34**.



Parámetros	RMCN	RMAP
b	0.3568	0.3180
a	0.0807	0.5644
r²	0.9900	0.9989
S_{YX}	0.0147	0.0056
Sa	0.0292	0.0104
Sb	0.0196	0.0104

Tabla N°34. Parámetros de las RMAP y RMCN.

El efecto matriz fue estudiado mediante:

1. Comparación directa de la pendiente de la RMAP frente a la pendiente de la RMCN.
2. Aplicación de una prueba de comparación estadística de la pendiente de la recta del RMAP frente a la pendiente de la recta del RMCN.

6.4.2. COMPARACIÓN DE LAS PENDIENTES DE LAS RECTAS DE LOS RMAP Y RMCN.

La comparación de las pendientes de las RMAP y RMCN, la realizamos empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto Matriz} = \frac{b_{(RMAP)}}{b_{(RMCN)}}$$

De esto podemos deducir tres posible situaciones:

1. Que, $b_{(RMAP)} = b_{(RMCN)}$, en este caso no existe efecto matriz y el resultado de la división es igual a 1. El grafico obtenido mostrará que las dos rectas se ubican paralelas entre sí.
2. Que, $b_{(RMAP)} > b_{(RMCN)}$, en este caso existe efecto matriz intensificador y el resultado de la división es mayor que 1. El grafico obtenido mostrará que la dos rectas no son paralelas entre sí, observándose alejamiento positivo de la recta de adición patrón respecto a la recta de calibración normal.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



3. Que, $b_{(RMAP)} < b_{(RMCN)}$, en este caso existe efecto matriz depresor y el resultado de la división es menor que 1. El gráfico obtenido mostrará que las dos no son paralelas entre sí, observándose alejamiento negativo de la recta de adición patrón respecto a la recta de calibración normal.

En algunos casos suele suceder, que las RMAP y RMCN son similares entre sí; sin llegar a ser iguales, en este caso se observa que las rectas son aparentemente paralelas.

En este caso existe un pequeño efecto matriz, que puede ser despreciable en función de los resultados de los análisis realizados. Para esta situación es recomendable calcular el porcentaje de efecto matriz, utilizando la siguiente ecuación.

$$\% EM = \left[1 - \left(\frac{b_{(RMAP)}}{b_{(RMCN)}} \right) \right] \times 100$$

En la **Tabla N°35**, se muestran los resultados del cálculo del efecto matriz y del porcentaje encontrado.

Relación	EM	%EF
$b_{(RMCN)}$ vs. $b_{(RMAP)}$	0.8912	10.88

Tabla N°35. Efecto matriz (EM) y porcentaje de efecto matriz (%EM).

Como se observa en la **Tabla N° 34**, existe un pequeño efecto matriz depresor en la muestra de fármaco analizada ya que las pendiente del $b_{(RMAP)} < b_{(RMCN)}$ ($0.3180 < 0.3568$) y la división de estas es menor que 1 ($0.8941 < 1$) como se observa en la **Tabla N° 35**, y el porcentaje de efecto matriz es menor del 11%, es decir que hay una disminución de la señal producto de las interferencias del analito.

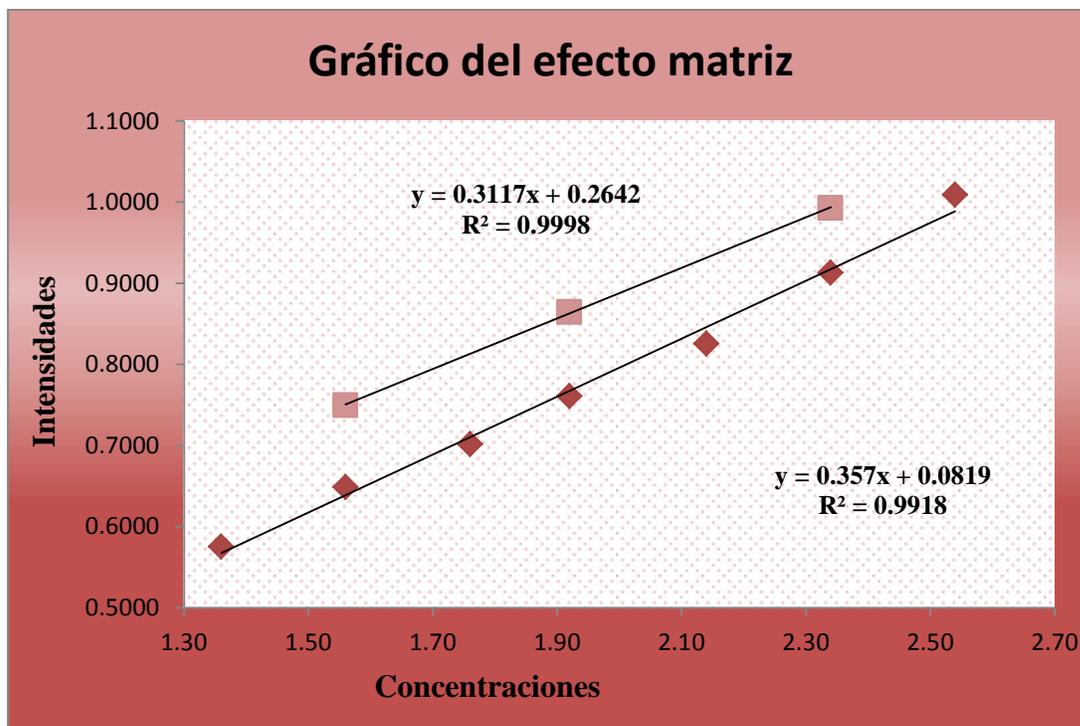


Figura N°6. Rectas de los Métodos de Adición Patrón (RMAP) y Calibración Normal (RMCN).

En el **Gráfico N° 6** se observa, que la recta del método de adición patrón de la muestra de fármaco analizada tiene un comportamiento bastante paralelo al de la recta del método de calibración normal. Esto nos induce a pensar que el efecto matriz es bastante pequeño y casi no tiene efecto en el análisis de las muestras, tanto si lo realizamos con el método de adición patrón como con el método de calibración normal.

6.4.3. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS PENDIENTES DE LAS RMAP y RMCN.

Para este fin aplicamos una prueba estadística de t de student, previo a la cual fue necesario realizar una comparación de varianzas esto con el fin de poder decidir de la forma de cálculo del estadístico t, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



F_{cal}	1.552
$F_{(0.05, n1-2, n2-2)}$	230.162

Tabla N°36. Test de homogeneidad de varianzas.

Como se puede observar en la **Tabla N°36** $F_{cal} < F_{(0.05, n1-2, n2-2)}$ (1.552 < 230.162) es decir las varianzas son homogéneas procediendo a realizar la prueba de t student y la hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H₀: Las pendientes son iguales

H₁: Las pendientes son diferentes

Para el caso de que las varianzas de los datos de las rectas a comparar sean homogéneas el estadístico t a ser calculado sería:

$$t_{cal} = \frac{|b_{RMCN} - b_{RMAP}|}{\sqrt{S_{b_{RM;CN}}^2 + S_{b_{RMAP}}^2}}$$

Para el caso de que las varianzas de los datos de las rectas a comparar sean heterogéneas el estadístico t a ser calculado sería:

$$t_{cal} = \frac{b_{RMCN} + b_{RMAP}}{S_{b_{RMCN}}^2 + S_{b_{RMAP}}^2}$$

Si $t_{cal} < t_{(0.05; n1+ n2- 4)}$, las pendientes son iguales y se acepta la H₀. Al realizar el análisis de las varianzas de RMAP y RMCN, determinamos que las varianzas son homogéneas por lo que aplicamos la fórmula de cálculo de t para este caso, los resultados se muestran en la **Tabla N°37**.

Relación	t_{cal}	$t_{(0.05; n1+n2-4)}$
b₁(RMCN) vs. b₁(RMAP)	1.752	2.447

Tabla N°37 Valor de t calculado para la relación de pendientes.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Como se muestra en la **Tabla N°37**, el valor de t calculado es menor que el t tabulado, ya que no existe significación estadística al nivel de confianza estudiado se acepta H_0 y establecemos que las pendientes son iguales, y por lo tanto asumimos que no hay efecto matriz.

6.5. LIMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para realizar el cálculo de los límites de detección y cuantificación del sistema, realizamos una recta de calibrado realizando un procedimiento similar al que se menciona en el apartado **6.1** de Linealidad del Sistema, pero empleando siete estándares de Litio en el rango de concentraciones de 1.36 a 2.54 ppm, los datos obtenidos se muestran en la **Tabla N°38**.

N°	Concentración Li (ppm)	Intensidades de emisión
1	1.36	0.5754
2	1.56	0.6490
3	1.76	0.7019
4	1.94	0.7608
5	2.14	0.8258
6	2.34	0.9134
7	2.54	1.0094

Tabla N°38. Lecturas de intensidad de soluciones de Litio

En la **Tabla N°39** se muestran los parámetros y valores utilizados para calcular los límites de detección y cuantificación:



Parámetro	Valores
b	0.2856
S _Y	0.0057
N	7
t _(0.05;5)	2.5706
$\sum X_i^2$	27.6512
$\sum XX$	1.0727
\bar{X}	1.9486

Tabla N°39. Parámetros y valores utilizados en el cálculo de LD y LC del sistema.

Con los datos de la **tabla N°39** calculamos los límites de detección y cuantificación del método resultando ser: LD = 0.09787 ppm es la mínima cantidad de litio que se puede detectar bajo las condiciones experimentales del sistema y LC = 0.1910 ppm. Se encuentra por debajo del primer punto de la recta de regresión, por lo que es adecuado a los resultados esperados es decir la mínima cantidad de litio que se puede cuantificar bajo las condiciones experimentales.

6.6. ROBUTEZ

Una vez realizada la robustez y evaluada la influencia de los factores mencionados en el **acápito 5.11.8** definimos los márgenes de variación de estos factores y los signos a ser considerados en el diseño factorial completo, estos se muestran en la **Tabla N°40**.

Factor 1 (A)		Factor 2 (B)		Factor 3 (C)	
VOLUMEN DE HCl (40 mL)		LONGITUD DE ONDA (670.8nm)		OPTIMIZACIÓN (0.9)	
Margen de variación 1		Margen de variación 2		Margen de variación 3	
35 mL	45mL	669.8	671.8	0.8	1.0

Tabla N°40. Factores, margen de variación y signos empleados en el diseño factorial completo

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Una vez definidos los factores, los márgenes de variación y los signos de los márgenes, establecimos una matriz del diseño factorial, en la que incluimos los factores como A, B y C con sus interacciones, así como los signos negativo (-) para indicar el nivel bajo y positivo (+) para indicar el nivel alto del margen de variación respectivamente, esto se muestra en la tabla del diseño metodológico.

Para calcular la influencia de cada factor, así como de sus interacciones, en el experimento empleamos las siguientes ecuaciones:

$$\text{Influencia de factor A} = \frac{1}{4} [-R_1 + R_2 - R_3 + R_4 - R_5 + R_6 - R_7 + R_8]$$

$$\text{Influencia de factor B} = \frac{1}{4} [-R_1 - R_2 + R_3 + R_4 - R_5 - R_6 + R_7 + R_8]$$

$$\text{Influencia de factor C} = \frac{1}{4} [-R_1 - R_2 - R_3 - R_4 + R_5 + R_6 + R_7 + R_8]$$

$$\text{Influencia de factor AB} = \frac{1}{4} [+R_1 - R_2 - R_3 + R_4 + R_5 - R_6 - R_7 + R_8]$$

$$\text{Influencia de factor AC} = \frac{1}{4} [+R_1 - R_2 + R_3 - R_4 - R_5 + R_6 - R_7 + R_8]$$

$$\text{Influencia de factor BC} = \frac{1}{4} [+R_1 + R_2 - R_3 - R_4 - R_5 - R_6 + R_7 + R_8]$$

$$\text{Influencia de factor ABC} = \frac{1}{4} [-R_1 + R_2 + R_3 - R_4 + R_5 - R_6 - R_7 + R_8]$$

Dónde: R es la respuesta de la lectura del experimento, que en nuestro caso son las lecturas de emisión.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Una vez definida la matriz y la forma de cálculo de las influencias de las interacciones procedimos a realizar los experimentos y calcular la influencia de cada uno de los factores y sus interacciones, obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla N°41**.

Experimento	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	0.6227	0.629	0.6203	0.6259	0.6215	0.6247	0.6240
2	0.6185	0.6069	0.6098	0.6127	0.6142	0.6084	0.6117
3	0.6151	0.6152	0.6144	0.6152	0.6148	0.6148	0.6149
4	0.6148	0.6113	0.6126	0.6131	0.6137	0.6120	0.6129
5	0.3038	0.2995	0.2957	0.3017	0.2998	0.2976	0.2997
6	0.2994	0.3119	0.3065	0.3057	0.3030	0.3092	0.3059
7	0.2926	0.3008	0.3054	0.2967	0.2990	0.3031	0.2996
8	0.3156	0.3182	0.2982	0.3169	0.3069	0.3082	0.3107
Influencia	0.0035	-0.0005	-0.3128	0.0068	0.0049	0.0027	-0.0014

Tabla N°41. Resultados de las lectura de emisiones de los experimentos del diseño factorial completo empleado.

En el caso de las interacciones, estas se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

Para el caso del experimento 1:

$$\text{Interacción } AB_{\text{Experimento 1}} = \frac{A_1 + B_1}{2}$$

$$\text{Interacción } AC_{\text{Experimento 1}} = \frac{A_1 + C_1}{2}$$

$$\text{Interacción } BC_{\text{Experimento 1}} = \frac{B_1 + C_1}{2}$$

$$\text{Interacción } ABC_{\text{Experimento 1}} = \frac{A_1 + B_1 + C_1}{3}$$

Operando de la misma forma en los restantes experimentos, hasta el 8.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Promedio Influencias	-0.0424
Desviación estándar	0.1193
2S	0.2386

Tabla N°42. 2s

Una vez determinadas las influencias de los factores y sus interacciones, calculamos las desviaciones estándar de los factores y el promedio de las influencias los cuales se muestran en la **Tabla N°42**

Se ha establecido que los factores o sus interacciones no tienen influencia en el análisis si su valor es menor que dos veces la desviaciones estándar de los factores (Influencia < 2S).

Como se observa en la **Tabla N°42**, los valores de la influencia de los factores y sus interacciones son menores que 2S de los factores (0.2386), por lo tanto el método es robusto y concluimos las influencias de los factores es insignificante.

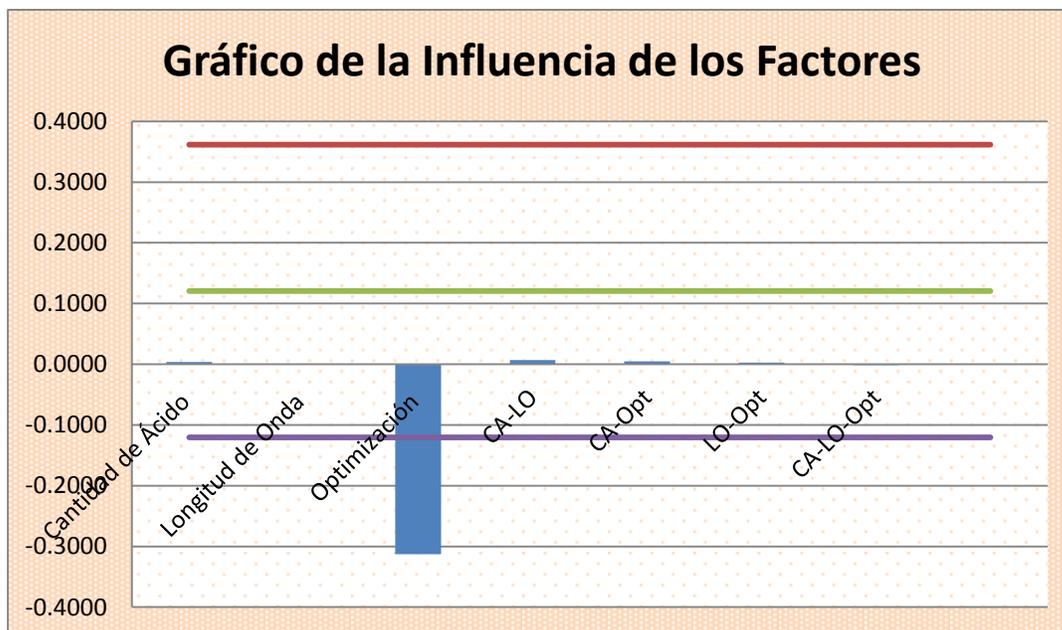


Gráfico N°7. Influencia de los factores y sus interacciones en la robustez del método.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



En el **Gráfico N°7** se observa que el factor 3 (optimización) tiene una influencia significativa en el método, esto nos quiere decir que se debe optimizar el equipo a 0.9 de intensidad para obtener una mejor lectura. La optimización es uno de las pruebas de verificación del equipo por lo tanto tiene que estar estable en el rango de concentración estudiado.

6.7 Estabilidad de la muestra

Una vez realizada la estabilidad de la muestra como se muestra en el acápite **5.11.9** del diseño metodológico, se procedió a analizar los resultados obtenidos en las lecturas de las muestras durante los tres días de estudios los cuales se muestran en la **Tabla N°43** y el **Gráfico N°8**.

Tiempo (día)	% R
1	101.34
2	101.70
3	101.91

Tabla N°43. Porcentaje de recobro del litio en su correspondiente matriz

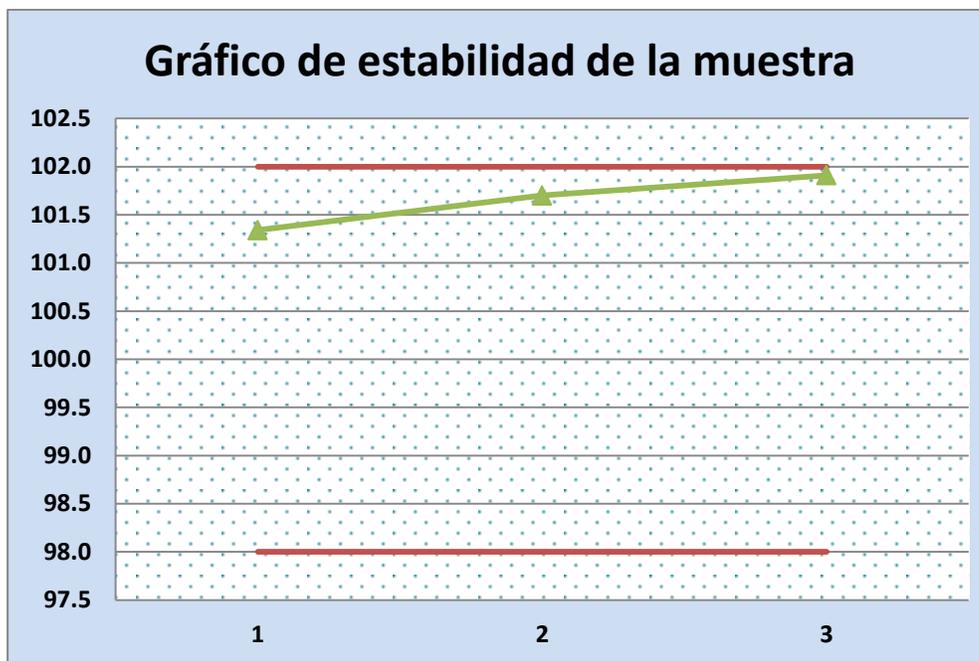


Gráfico N°8 Estabilidad del litio en su correspondiente matriz.

La muestra de litio es estable para la cuantificación por tres días, debido a que durante este tiempo el porcentaje recuperado se mantuvo dentro del rango establecido (98-102%), con un porcentaje de recuperado de 101.91%, cumpliendo éste con el criterio de aceptación.

6.8 Incertidumbre

6.8.1. Estimación de la Incertidumbre.

Para evaluar la incertidumbre de la medición de Carbonato de Litio en su correspondiente matriz, a través de la Técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Emisión se siguieron los pasos recomendados por la GUM: 2008 (Guía para la Medición de las Incertidumbres).

6.8.2. Definición del mensurado:

Se define como la cantidad en mg de Carbonato de litio en Tabletadas de 300mg.

6.8.3. Identificación del modelo matemático y las fuentes de incertidumbre.

Primeramente se encontró el modelo matemático que se utiliza para calcular el contenido en mg del activo de Carbonato de Litio presente en la tableta



El modelo matemático es el siguiente:

$$\text{mgLi}_2\text{CO}_3 = \frac{I_M C_E V_2 V_0 P_C P_T}{I_E V_1 P_{Li} m 1000}$$

Dónde:

mgLi₂CO₃: mg de Carbonato de Litio presente en la tableta.

I_M: Intensidad de Emisión promedio leída de la muestra de Carbonato de Litio.

C_E: Concentración del estándar de Carbonato de Litio.

V₂: Volumen del matraz de 100 mL en donde se realizó la dilución del **V₀**

V₀: Volumen de matraz de 100 mL donde se preparó la muestra.

P_C: Peso molecular del compuesto de Carbonato de Litio.

P_T: Peso promedio de las tabletas de Carbonato de Litio.

I_E: Intensidad de emisión promedio leída del Estándar de carbonato de Litio.

V_I: Volumen de alícuota tomada de la muestra matraz del **V₀**

P_{Li}: Peso del Litio en el carbonato de litio.

m: Peso de la muestra en mg de polvo de Carbonato de Litio.

1000: Factor de conversión.

6.8.4 Identificación de las fuentes de incertidumbre.

A partir del modelo matemático se identificaron las fuentes de incertidumbre para cada componente a través del diagrama causa/ efecto. Cada uno de estos componentes tiene otras fuentes de incertidumbre los cuales se detallan en el diagrama que se presenta en el **Gráfico N°9**.

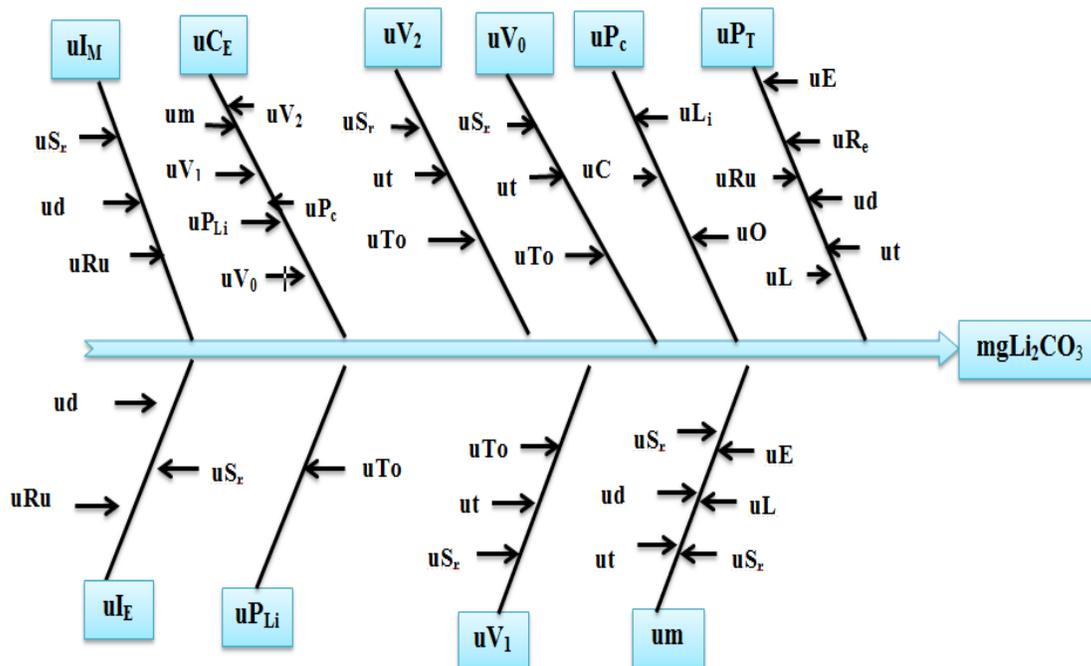


Gráfico N°9. Diagrama de causa-efecto para los componentes de la incertidumbre.

En el diagrama de causa-efecto podemos observar que existen diez componentes o variables que influyen en la incertidumbre de los miligramos de carbonato de Litio en una tableta y en él se aprecian las fuentes de incertidumbre que afectan cada una de las variables.

6.8.5 Cuantificación de los componentes de la incertidumbre.

Una vez identificadas las fuentes de incertidumbre procedimos a la cuantificación de cada componente.

Realizando primeramente el cálculo de la incertidumbre combinada de la concentración del estándar de carbonato de litio:

6.8.5.1. Identificación del modelo matemático de la concentración del estándar de carbonato de litio.

$$C_s = \frac{W * V_1 * P_{Li} * 1000}{V_0 * V_2 * P_c}$$



W : Peso en mg del estándar de carbonato de litio

V_1 : Volumen de alícuota tomada de la muestra matraz del V_0 .

P_{Li} : Peso del Litio en el carbonato de litio.

1000 : Factor de conversión.

V_0 : Volumen de matraz de 100 mL donde se preparó la muestra.

V_2 : Volumen del matraz de 100 mL en donde se realizó la dilución del V_0 .

P_C : Peso molecular del compuesto de Carbonato de Litio.

6.8.5.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre de la concentración del estándar de carbonato de litio

En el diagrama de causa-efecto podemos observar que existen 6 componentes o variables que influyen en la incertidumbre de la concentración del estándar de carbonato de litio y en él se aprecian las fuentes de incertidumbre que afectan cada una de las variables.

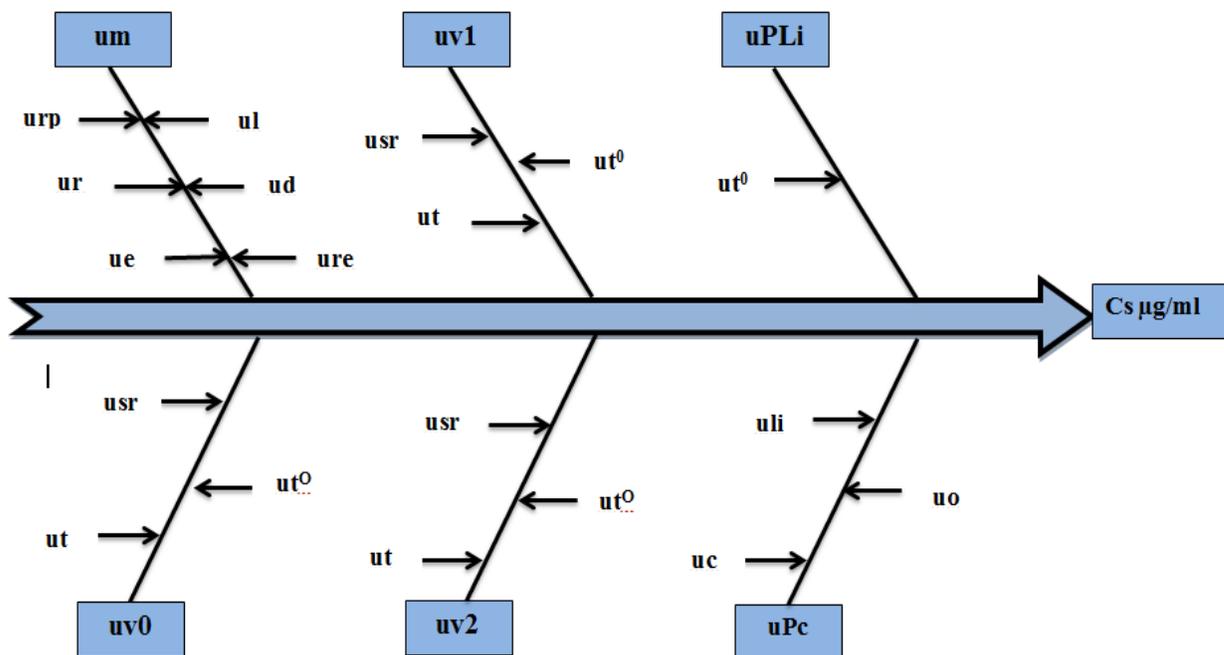


Gráfico N°10. Diagrama de causa-efecto para los componentes de la Incertidumbre del Estándar de Carbonato de Litio.



6.8.5.3 Cuantificación de las fuentes de incertidumbre del Estándar de Carbonato de Litio.

En la **Tabla N° 44** Se muestran los resultados para la cuantificación de la incertidumbre de cada componente que influye en la incertidumbre de la concentración del Estándar de Carbonato de Litio tomando en cuenta el certificado de calibración emitido por el Laboratorio Nacional de Metrología (LANAMET) para la balanza y los materiales volumétricos.

Variable	Fuente	Especificación	Distribución	Formula	Incertidumbre
<i>u_W</i>	Repetibilidad	0.36055512	Normal	$u_{S_r} = \frac{S_m}{\sqrt{n}}$	0.2081666
	Linealidad	0.1	Rectangular	$u_L = 2 \left(\frac{L_z}{2\sqrt{3}} \right)$	0.057735027
	Excentricidad	0,1	Rectangular	$u_E = \left(\frac{E}{\sqrt{3}} \right)$	0.057735027
	Resolución	1	Rectangular	$u_r = \frac{r}{2\sqrt{3}}$	0.028867513
	Temperatura	2.3	Rectangular	$u_T = m \frac{\alpha \Delta T^2}{\sqrt{3} \sqrt{3}}$	5.34367E-05
	Deriva	0.1	Rectangular	$u_D = 2 \left(\frac{D}{2\sqrt{3}} \right)$	0.057735027
<i>u_{V_I}</i>	Repetibilidad	0.00448	Normal	$u_{S_r} = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$	0.00224
	u de la u_{S_r}	0.00224	Rectangular	$u_{S_r \text{ 3mL}} = \frac{S_r}{\sqrt{3}}$	0.0012926
	Tolerancia	0.003	Triangular	$u_{T_{\text{res}}} = \frac{T}{\sqrt{6}}$	0.01224745

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



VOLANTE DE CÁLCULO DE INCERTIDUMBRES ESTADÍSTICAS Y SISTEMÁTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LITIO EN TABLETAS DE CARBONATO DE LITIO DE 300 MG, POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN EMISIÓN

	Temperatura	2.7	Rectangular	$u_{T_{100}} = \frac{V\alpha \Delta T^2}{\sqrt{3} \sqrt{3}}$	0.0005589
uP_{Li}	u_{li}	0.002	Rectangular	$uP_{li} = \frac{ua*2}{\sqrt{3}}$	0.0023094
uV_0	Repetibilidad	0.046	Normal	$u_{S_r} = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$	0.023
	u de la u_{sr}	0.023	Rectangular	$u_{S_r \cdot 3mL} = \frac{S_r}{\sqrt{3}}$	0.01327906
	Tolerancia	0.08	Triangular	$u_{T_{100}} = \frac{T}{\sqrt{6}}$	0.03265986
	Temperatura	2.7	Rectangular	$u_{T_{100}} = \frac{V\alpha \Delta T^2}{\sqrt{3} \sqrt{3}}$	0.01863
uV_2	Repetibilidad	0.046	Normal	$u_{S_r} = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$	0.023
	u de la u_{sr}	0.023	Normal	$u_{S_r \cdot 3mL} = \frac{S_r}{\sqrt{3}}$	0.01327906
	Tolerancia	0.08	Triangular	$u_{T_{100}} = \frac{T}{\sqrt{6}}$	0.03265986
	Temperatura	2.7	Rectangular	$u_{T_{100}} = \frac{V\alpha \Delta T^2}{\sqrt{3} \sqrt{3}}$	0.01863
	u_{li}	0.002	Rectangular	$uP_{li} = \frac{ua*2}{\sqrt{3}}$	0.0023094

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



uP_C :	u_C	0.0008	Rectangular	$u_C = \frac{u_a}{\sqrt{3}}$	0.00046188
	u_o	0.0003	Rectangular	$u_O = \frac{u_a * 3}{\sqrt{3}}$	0.00051962

Tabla N°44 Cuantificación de los componentes de la Incertidumbre para la concentración del Estándar de Carbonato de Litio.

Variable	Ecuación	Incertidumbre
W	$u_w = \sqrt{u_{sr}^2 + u_L^2 + u_E^2 + u_r^2 + u_t^2 + u_D^2}$	0.23273734
V_1	$u_{V1} = \sqrt{u_{sr}^2 + u_{sv3mL}^2 + u_{T100}^2 + u_{r^o100}^2}$	0.01232822
P_{Li}	$u_{Pli} = \sqrt{u_{Pli}^2}$	0.0023094
V_0	$u_{V0} = \sqrt{u_{sr}^2 + u_{sv3mL}^2 + u_{T100}^2 + u_{r^o100}^2}$	0.03987577
V_2	$u_{V2} = \sqrt{u_{sr}^2 + u_{sv3mL}^2 + u_{T100}^2 + u_{r^o100}^2}$	0.03987577
P_C	$u_{Pc} = \sqrt{u_{Pli}^2 + u_c^2 + u_o^2}$	0.00241178

Tabla N°45 Incertidumbre combinada para cada componente de la Incertidumbre de la concentración del estándar de carbonato de litio

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



	Deriva	0,1	Rectangular	$u_{D_i} = \frac{D_i}{\sqrt{3}}$	0.05773503
	Temperatura	2.3	Rectangular	$u_T = m \frac{\alpha \Delta T^{\circ}}{\sqrt{3} \sqrt{3}}$	0.00068639
uW	Repetibilidad	0.36055513	Normal	$u_{S_r} = \frac{S_m}{\sqrt{n}}$	0.2081666
	Linealidad	0.1	Rectangular	$u_L = 2 \left(\frac{L_2}{2\sqrt{3}} \right)$	0.05773503
	Excentricidad	0,1	Rectangular	$u_E = \left(\frac{E}{\sqrt{3}} \right)$	0.05773503
	Resolución	0,1	Rectangular	$u_r = \frac{r}{2\sqrt{3}}$	0.02886751
	Deriva	0,1	Rectangular	$u_{D_i} = \frac{D_i}{\sqrt{3}}$	0.05773503
	Temperatura	2.3	Rectangular	$u_T = m \frac{\alpha \Delta T^{\circ}}{\sqrt{3} \sqrt{3}}$	7.9898E-05
	u_{li}	0.002	Rectangular	$u_{P_{Li}} = \frac{Ua*2}{\sqrt{3}}$	0.0023094
u_{Co}		Rectangular	$u_{P_c} = \sqrt{u_{P_{Li}}^2} + u_{C^2} + u_{O^2}$	0.2327613	

Tabla N°48. Cuantificación de los componentes de la Incertidumbre de los mg de Carbonato de Litio presente en la tableta.

Las variables del **V₀**, **V₁**, **V₂**, **P_{Li}** y **P_c** se muestran en la **TablaN°44** de la cuantificación de los componentes de la concentración del Estándar de Carbonato de Litio.



6.8.7 Incertidumbre combinada para cada componente de la Incertidumbre de los mg de Carbonato de Litio presente en la Tableta.

Variable	Ecuación	Incertidumbre
<i>Blanco</i>	$u_B = \sqrt{u_{sr}^2 + u_{ru}^2 + u_D^2}$	0.005516228
<i>I_M</i>	$u_{I_M} = \sqrt{u_{sr}^2 + u_{ru}^2 + u_D^2 + u_B^2}$	0.00557643
<i>I_E</i>	$u_{I_E} = \sqrt{u_{sr}^2 + u_{ru}^2 + u_D^2 + u_B^2}$	0.00567263
<i>P_T</i>	$u_{P_T} = \sqrt{u_{sr}^2 + u_L^2 + u_E^2 + u_r^2 + u_t^2 + u_D^2}$	1.84546303
<i>W</i>	$u_W = \sqrt{u_{sr}^2 + u_L^2 + u_E^2 + u_r^2 + u_t^2 + u_D^2 + u_{Li}^2 + u_{CO}^2}$	0.2327613

Tabla N°49. Incertidumbre combinada para cada componente de la Incertidumbre de los mg de Carbonato de Litio presente en la Tableta.

Las variables del **V₀**, **V₁**, **V₂**, **P_{Li}** y **P_c** se muestran en la **Tabla N°45** de la cuantificación de los componentes de la concentración del estándar de carbonato de litio.

6.8.8. Coeficientes de sensibilidad de la incertidumbre de los mg de Carbonato de Litio presente en la tableta.

$c_{Imt} := \frac{\partial}{\partial Imt} mgM; c_{Imt} := \frac{1}{1000} \frac{Cs V2 V0 Pc Pt}{Is V1 Pli m}$	393.6506480
$c_{Cs} := \frac{\partial}{\partial Cs} mgM; c_{Cs} := \frac{1}{1000} \frac{Imt V2 V0 Pc Pt}{Is V1 Pli m}$	159.5454353
$c_{V2} := \frac{\partial}{\partial V2} mgM; c_{V2} := \frac{1}{1000} \frac{Imt Cs V0 Pc Pt}{Is V1 Pli m}$	3.057353381
$c_{V0} := \frac{\partial}{\partial V0} mgM; c_{V0} := \frac{1}{1000} \frac{Imt Cs V2 Pc Pt}{Is V1 Pli m}$	3.057353381

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



mg comp	305.735337		Promedio.	21.5124291
			uC	4.63814932
			u exp	9.27629864

Tabla N°51. Evaluación de la Incertidumbre combinada de la Incertidumbre de los mg de Carbonato de Litio presente en la tableta.

El valor de la incertidumbre combinada es de 4.63 mg de carbonato de Litio obtenida a partir de la ley de propagación del error.

6.8.5.7. Contribución de cada uno de los componentes.

El índice de contribución o porcentaje de contribución (% Ind.) nos indica la contribución que tiene cada variable en la incertidumbre combinada y esta se calcula a partir de la ecuación:

$$\text{Ind}\% = \frac{(U_i C_i)^2}{\sum (U_i C_i)^2} (100)$$

Variable	%IND	Acumulado %IND
C_E	27.8482905	27.8482905
I_E	25.3958882	53.2441787
I_M	22.3998248	75.6440035
m	9.10896933	84.7529728
P_T	7.75865554	92.5116284
V₁	7.3377019	99.8493303
V₂	0.06909076	99.918421
V₀	0.06909076	99.9875118
P_{Li}	0.01202532	99.9995371
P_C	0.0004629	100

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Como se puede observar las variables que contribuyen significativamente a la Incertidumbre son la intensidad del estándar, volumen 2, la concentración del estándar, el peso del carbonato, el volumen 1 y el volumen cero, prácticamente entre estas seis variables acumulan un 99.84% de contribución.

Luego cada contribución de cada componente se grafica en el diagrama de Pareto donde se observa la mayor contribución de las seis variables antes mencionada, en este diagrama aparece la contribución de cada variable y la contribución acumulada de las variables en estudio.

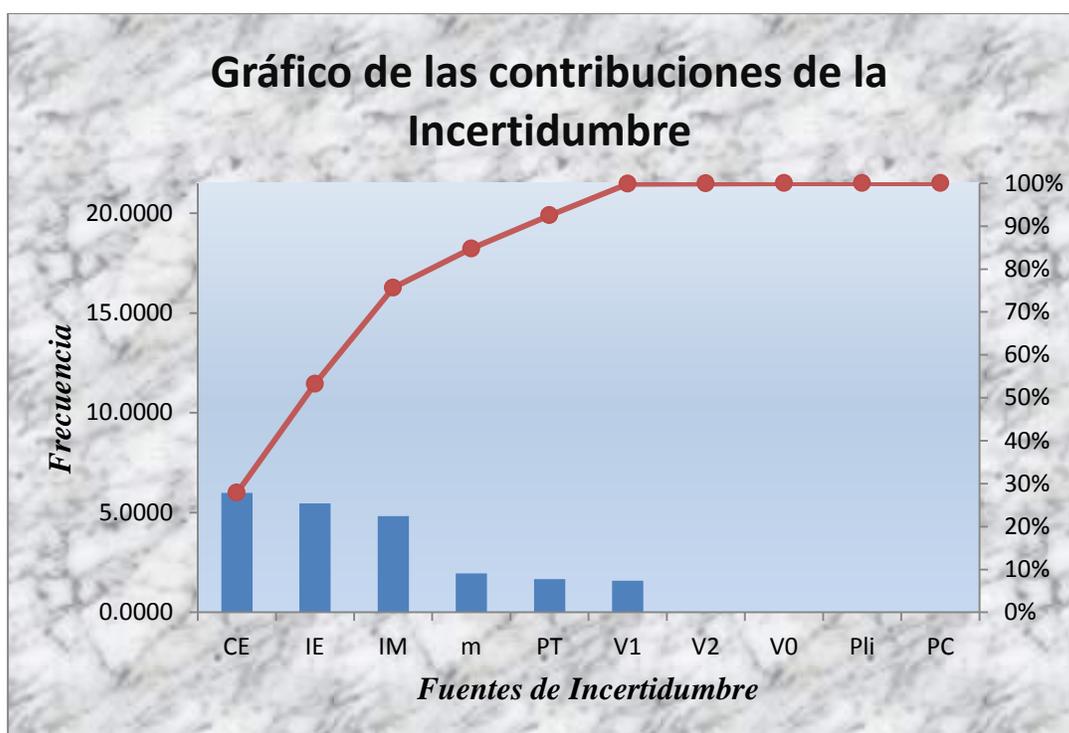


Gráfico N°10. Diagrama de Pareto de las contribuciones de las incertidumbres en la determinación de litio.

6.8.5.8 Cálculo de la incertidumbre expandida.

La incertidumbre expandida se calcula multiplicando la incertidumbre combinada por el factor de cobertura “k” que a un nivel de confianza del 95.45 % tiene el valor de 2. $U_{ex} = KU_C$

$U_{ex} = 2 * 4.6381 = 9.2762\text{mg de Li}_2\text{CO}_3$, $305.735 \pm 9.2762\text{mg de Li}_2\text{CO}_3$. El intervalo es $101.91 \pm 3.09\%$



7. CONCLUSIÓN

El método validado de cuantificación de Litio en tabletas de Carbonato de Litio 300mg por Espectrofotometría de Absorción Atómica en Emisión proporcionó resultados que fueron analizados estadísticamente y manifestaron ser exactos, precisos y confiables para cada una de los parámetros de desempeño cumpliendo con los criterios establecidos en el protocolo de validación interno del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, por tal razón éste puede utilizarse como método de rutina en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos debido a que se encuentra evidenciado y fundamentado.

En cuanto a la robustez de la metodología, ésta puede verse afectada por pequeñas variaciones introducidas respecto a la optimización del equipo empleada para proporcionar lecturas con intensidades adecuadas al rango de trabajo. Pero estadísticamente podemos comprobar que el método analítico es robusto.

Se estimó un límite de detección de Litio para el sistema bajo las condiciones experimentales descritas de 0.097 ppm y un límite de cuantificación de 0.1910 ppm.

La estimación de la incertidumbre en la determinación de Litio en tabletas de Carbonato de Litio por Espectrofotometría de Absorción Atómica fue basada en la guía GUM ISO 2008. Se tomaron en cuenta todas las variables que afectan la incertidumbre. Obteniendo una incertidumbre expandida en porcentaje de recuperado de $101.91\% \pm 3.09\%$, con un factor de cobertura de 2 y un intervalo de confianza del 95.45%.



8. RECOMENDACIONES

1. Aplicar las Buenas Prácticas de Laboratorio y de Medición utilizando equipos calibrados y materiales de referencia certificados conservándolos de acuerdo a las condiciones de temperatura recomendadas en el certificado.
2. Realizar la verificación correcta del equipo determinando el tiempo de integración adecuada para cada lectura y que éstas estén dentro del rango de trabajo, mantener controlada la presión del gas y del equipo debido a que éstas nos indicaran cuando debemos iniciar y detener el análisis. En el sistema de flujo, es importante verificar el buen estado de las mangueras.
3. Preparación de las muestras y estándar en balones de la misma clase y la misma tolerancia, con una pesada y un afore correcto para recuperar la mayor cantidad posible de litio u obtener la concentración deseada para cada uno de estos.
4. Realizar estudios de reproducibilidad para comprobar que los resultados tienen concordancia bajo condiciones de medición diferente.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Norma Jurídica Nacional de la República de Nicaragua. (1999). Ley de medicamentos y farmacias. #292. Capitulo IV. Registro de medicamentos. Recuperado el 26 de junio del 2014, de <http://legislacion.asamblea.gob.ni/normaweb.nsf/b92aaea87dac762406257265005d21f7/2bbd6963b51aaa7b062572130058f5d6?OpenDocument>.
2. Reglamento Técnico Centroamericano. (2011). Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos. Recuperado el 26 de junio del 2014, de <http://www.mific.gob.ni/LinkClick.aspx?fileticket=O9Us2nbt1rs%3D&tabid=437&language=en-US>.
3. Mariani, Luis I. (1999-2014). Eutemia salud mental. Recuperado el 13 de abril 2014 de <http://www.eutimia.com/psicofarmacos/anticiclicos/litio.htm#.U7HOrJR5Ne8>.
4. Asociación Española de Farmacéuticos de España de la industria A.E.F.I (2001). Validación de métodos analíticos. Barcelona: A.E.F.I.
5. Guía Técnica de validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición (2010). Aspectos generales sobre la validación de métodos. Recuperado el 25 de junio del 2014 de <http://www.ispch.cl/content/guia-tecnica-de-validacion-de-metodos-y-determinacion-de-la-incertidumbre-de-la-medicion>.
6. Beltrán, J. (2004). La gestión de los procesos metrológicos. Análisis e integración e un sistema de gestión de las mediciones (ISO 10012:2003). Publicado en Madrid, España: editorial AENOR.
7. S, Ellison. M, Roesslein, y A, Williams. (2000). Guía EURACHEM/CITAC. Cuantificación de la incertidumbre en la medición analítica.

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



8. Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 32/NF 27. (2009). Vol. I. edición 32. Pág. 724.
9. Pacheco, M. y peralta, M. (2010). Cuantificación de hierro elemental en tabletas de sulfato ferroso aplicando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica. Para optar al título de químico-farmacéutico. UNAN-león.
10. Armienda, M.A. y Farias, S.S. (2009). Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelo. Recuperado el 13 de abril del 2014 de http://paginas.fe.up.pt/~cigar/html/documents/Monografia2_000.pdf.
11. Skoog, D y leary, J. (1994). Análisis instrumental. impreso en España: Editorial Isabel capella compuesto en monocomp, S.A.
12. Razmilic, Blago. (2012). Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. Recuperado el 20 de abril del 2014 de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/ab482s04.htm>.
13. Farmacopea de los estados unidos de américa USP 36/ NF 31. Vol. II. Edición 36. Pág. 4130-4131.
14. Elementos de la tabla periódica y sus propiedades. (2010).Elementos. Recuperado el 28 de abril del 2014 de <http://elementos.org.es/litio>.
15. Centro español de metrología GUM (2008).Guía para la expresión de la incertidumbre de la medida. Recuperado el 6 de septiembre del 2014 de <http://www.cem.es/sites/default/files/gum20digital1202010.pdf>.



10. ABREVIATURAS.

- mgLi₂CO₃:** mg de Carbonato de Litio presente en la tableta.
- u_M:** Incertidumbre de la Intensidad de Emisión promedio leída de la muestra de Carbonato de Litio.
- u_E:** Incertidumbre de la Concentración del estándar de Carbonato de Litio.
- u_{V₂}:** Incertidumbre del Volumen del matraz de 100 mL en donde se realizó la dilución del V₀
- u_{V₀}:** Incertidumbre del Volumen de matraz de 100 mL donde se preparó la muestra.
- u_{P_C}:** Incertidumbre del Peso molecular del compuesto de Carbonato de Litio.
- u_{P_T}:** Incertidumbre del Peso promedio de las tabletas de Carbonato de Litio.
- u_{I_E}:** Incertidumbre de la Intensidad de emisión promedio leída del Estándar de carbonato de Litio.
- u_{V_I}:** Incertidumbre del Volumen de alícuota tomada de la muestra matraz del V₀
- u_{P_{Li}}:** Incertidumbre del Peso del Litio en el carbonato de litio.
- u_m:** Incertidumbre del Peso de la muestra en mg de polvo de Carbonato de Litio.
- u_t^o:** Incertidumbre de la temperatura.
- u_{To}:** Incertidumbre de la tolerancia.
- u_{Sr}:** Incertidumbre de la repetibilidad.
- u_R:** Incertidumbre de la resolución.
- u_D:** Incertidumbre de la deriva.
- u_E:** Incertidumbre de la excentricidad.
- u_L:** Incertidumbre de la linealidad.
- u_{Ru}:** Incertidumbre del ruido.



11. GLOSARIO.

- ❖ **Monografía:** (Del griego mono, 'uno' y grapho, 'escritura') es un documento que trata un tema en particular porque está dedicado a utilizar diversas fuentes compiladas y procesadas por uno o por varios autores.
- ❖ **Espectrofotometría:** Es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda; es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y bioquímicas.
- ❖ **Profilaxis:** Conjunto de medidas que se toman para proteger de una enfermedad y para evitar que se extienda.
- ❖ **Ciclotimia:** Estado mental que se caracteriza por fuertes oscilaciones de ánimo, que pasan de periodos de exaltación a otros de depresión.
- ❖ **Litemia:** Es un control de la cantidad de litio que poseemos en la sangre, y debería realizarse periódicamente ya que su rango terapéutico para que sea eficiente debe acercarse a la dosis que en muchas personas puede resultar tóxica.
- ❖ **Cromatógrafos:** Es el equipo que permite una separación sofisticada. Por ejemplo, un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de líquidos.
- ❖ **Placebo:** Sustancia sin valor medicinal que puede producir efecto curativo si el enfermo la toma creyendo que es un medicamento eficaz.
- ❖ **Liofilizar:** Separar el agua de un alimento u otra sustancia para su conservación sometiénolo a una rápida congelación que convierte el agua en hielo, el cual se elimina posteriormente mediante un ligero calentamiento al vacío.



- ❖ **Analito:** Es un componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra. Es una especie química cuya presencia o contenido se desea conocer, identificable y cuantificable, mediante un proceso de medición química.
- ❖ **Absorbancia:** Es la intensidad de la luz con una longitud de onda específica y que es pasada por una muestra (intensidad de la luz transmitida) entre la intensidad de la luz antes de que entre a la muestra (intensidad de la luz incidente).
- ❖ **Trazabilidad:** Serie de procedimientos que permiten seguir el proceso de evolución de un producto en cada una de sus etapas.
- ❖ **Diseminar:** Extender o esparcir sin orden y en diferentes direcciones [los elementos de algo que está amontonado, ordenado o que forma un conjunto], de modo que queden separados.
- ❖ **Fotoeléctricos:** (fotoeléctrico) m. ing. photoelectric; val. fotoelèctric. Efecto causado por una sustancia que libera electrones, cuando se somete a una radiación luminosa.
- ❖ **Espectro:** Es la imagen o registro gráfico que presenta un sistema físico al ser excitado y posteriormente analizado. El emitido por el Sol, que equivale al luminoso con más líneas oscuras originadas por la absorción de determinadas radiaciones de la luz blanca al atravesar ésta la envoltura externa del Sol.
- ❖ **Cromóforo:** Es la parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color. También se puede definir como una sustancia que tiene muchos electrones capaces de absorber energía o luz visible, y excitarse para así emitir diversos colores, dependiendo de las longitudes de onda de la energía emitida por el cambio de nivel energético de los electrones, desértado a estado fundamental o basal.
- ❖ **Monocromática:** Que está compuesto de vibraciones de la misma frecuencia.



12. ANEXOS

Anexo N°1. Test de correlación de la linealidad del método

El t calculado es mayor que el t crítico, y NO estamos seguros que los resultados de nuestras pruebas sean significativos.

$t_{cal} < t_{tab}$ Se acepta H0 y los datos de las variables no se correlacionan entre sí.

$t_{cal} > t_{tab}$ Se acepta H0 y los datos de las variables se correlacionan entre sí.

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

r =	0.9988	t_{cal}	t_{tab}	Prueba
r² =	0.9977	75.03	2.16	Se rechaza H0 y hay correlación
n =	15			
n - 2 =	13			

Porcentaje de linealidad.

$$\% \text{ Linealidad} = \left(1 - \frac{S_{b1}}{b_1}\right) \times 100$$

Parámetros de regresión	
r ² =	0.9977
a =	0.1840
b =	0.2830
Sy/x =	0.0059
Sa =	0.0071
Sb =	0.0038

% Linealidad =	98.67
-----------------------	--------------



Anexo N°2. Test de correlación de la linealidad del sistema.

El t calculado es mayor que el t crítico, y NO estamos seguros que los resultados de nuestras pruebas sean significativos.

$t_{cal} < t_{tab}$ Se acepta H0 y los datos de las variables no se correlacionan entre sí.

$t_{cal} > t_{tab}$ Se rechaza H0 y los datos de las variables se correlacionan entre sí.

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

r =	0.9976	t_{cal}	t_{tab}	Prueba
r² =	0.9953	52.36	2.16	Se rechaza H0 y hay correlación
n =	15			
n -2 =	13			

Porcentaje de linealidad

$$\% \text{ Linealidad} = \left(1 - \frac{S_{b1}}{b_1}\right) \times 100$$

Parámetros de regresión	
r ² =	0.9953
a =	0.0680
b =	0.3672
Sy/x =	0.0109
Sa =	0.0131
Sb =	0.0070

% Linealidad =	98.09%
-----------------------	---------------

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Anexo N°3 de la tabla N°2

x	Yi	Ŷ	(Yi-Ŷ) ²	Sy/x	X _i ²	(X _i -X _{med}) ²	Sa	Sb
1.36	0.5642	0.569	2.15555E-05	0.0058825	1.8496	0.219024	0.00706	0.00377
1.36	0.5641	0.569	2.2494E-05	S ² y/x	1.8496	0.219024	S ² a	S ² b
1.36	0.5626	0.569	3.89724E-05	0.0000	1.8496	0.219024	0.0000	0.0000
1.56	0.6216	0.625	1.47228E-05		2.4336	0.071824		
1.56	0.6224	0.625	9.22359E-06		2.4336	0.071824		
1.56	0.6237	0.625	3.0173E-06		2.4336	0.071824		
1.76	0.6891	0.682	4.99667E-05		3.0976	0.004624		
1.76	0.6864	0.682	1.90856E-05		3.0976	0.004624		
1.76	0.6883	0.682	3.92968E-05		3.0976	0.004624		
1.92	0.7319	0.727	2.10985E-05		3.6864	0.008464		
1.92	0.7349	0.727	5.76584E-05		3.6864	0.008464		
1.92	0.7362	0.727	7.9091E-05		3.6864	0.008464		
2.54	0.8967	0.903	3.65888E-05		6.4516	0.506944		
2.54	0.8992	0.903	1.25945E-05		6.4516	0.506944		
2.54	0.8978	0.903	2.44913E-05		6.4516	0.506944		
Promedio X	1.828	Sumatoria	10.519	0.000449857	52.5564	2.43264		
	Promedio y	0.701						
b =	0.282971258							
a =	0.184001875							
n =	15							
r² =	0.997695853							
r =	0.998847262							

Anexo N°4 de la tabla N°11.

x	Yi	Ŷ	(Yi-Ŷ) ²	Sy/x	X _i ²	(X _i -X _{med}) ²	Sa	Sb
1.36	0.577	0.567	8.18942E-05	0.0109395	1.8496	0.219024	0.01313	0.00701
1.36	0.576	0.567	7.65544E-05	S ² y/x	1.8496	0.219024	S ² a	S ² b
1.36	0.573	0.567	3.5397E-05	0.0001	1.8496	0.219024	0.0002	0.0000
1.56	0.649	0.641	6.56727E-05		2.4336	0.071824		
1.56	0.648	0.641	4.36111E-05		2.4336	0.071824		
1.56	0.651	0.641	9.22343E-05		2.4336	0.071824		
1.76	0.700	0.714	0.000214382		3.0976	0.004624		
1.76	0.702	0.714	0.000145005		3.0976	0.004624		
1.76	0.704	0.714	0.00011113		3.0976	0.004624		
1.92	0.761	0.773	0.000136851		3.6864	0.008464		
1.92	0.760	0.773	0.000168957		3.6864	0.008464		
1.92	0.761	0.773	0.00014637		3.6864	0.008464		
2.54	1.007	1.001	4.38254E-05		6.4516	0.506944		
2.54	1.009	1.001	6.11536E-05		6.4516	0.506944		
2.54	1.012	1.001	0.000132712		6.4516	0.506944		
Promedio X	1.828	Sumatoria	11.090	0.00155575	52.5564	2.43264		
	Promedio y	0.739						
b =	0.367228361							
a =	0.06801989							
n =	15							
r² =	0.995280078							
r =	0.997637248							

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Anexo N°5. Coeficiente de Variación global de las intensidades de la linealidad del sistema.

n	70%	80%	90%	100%	130%
1	0.5642	0.6216	0.6891	0.7319	0.8967
2	0.5641	0.6224	0.6864	0.7349	0.8992
3	0.5626	0.6237	0.6883	0.7362	0.8978
Media	0.56363333	0.622567	0.687933	0.734333	0.8979
S	0.00089629	0.00106	0.001387	0.002205	0.001253
S²	8.0333E-07	1.12E-06	1.92E-06	4.86E-06	1.57E-06
CV	0.15901981	0.170243	0.201596	0.300313	0.139547

CV Global 0.194144 %

Coeficiente de Variación global de las intensidades de la linealidad del método.

n	70%	80%	90%	100%	130%
1	0.577	0.649	0.700	0.761	1.007
2	0.576	0.648	0.702	0.760	1.009
3	0.573	0.651	0.704	0.761	1.012
Media	0.5753667	0.649	0.701933	0.760833	1.009433
S	0.0017098	0.0015	0.002074	0.000666	0.002554
S²	2.923E-06	2.25E-06	4.3E-06	4.43E-07	6.52E-06
CV	0.2971628	0.231125	0.295533	0.087514	0.253021

CV Global 0.232871 %

Anexo N° 6 de la figura N°2

Observación	Pronóstico 0.5642	Residuos
1	0.566076202	-0.001976202
2	0.566076202	-0.003476202
3	0.62465341	-0.00305341
4	0.62465341	-0.00225341
5	0.62465341	-0.00095341
6	0.683230618	0.005869382

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



7	0.683230618	0.003169382
8	0.683230618	0.005069382
9	0.794527314	0.002872686
10	0.794527314	0.002372686
11	0.794527314	0.004972686
12	0.853104523	-0.005404523
13	0.853104523	-0.004304523
14	0.853104523	-0.002904523

Anexo N°7 de la figura N°4.

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico 0.5765</i>	<i>Residuos</i>
1	0.57436327	0.00183673
2	0.57436327	-0.00096327
3	0.641564237	0.00743576
4	0.641564237	0.00593576
5	0.641564237	0.00893576
6	0.708765203	-0.0090652
7	0.708765203	-0.0064652
8	0.708765203	-0.0049652
9	0.83644704	-0.01304704
10	0.83644704	-0.00834704
11	0.83644704	-0.01044704
12	0.903648007	0.00905199
13	0.903648007	0.01175199
14	0.903648007	0.00835199



Anexo N°8 de la tabla N°4.

	x	Y _i	Ŷ	(Y _i -Ŷ) ²	(Ŷ-y _(media total)) ²	Y _i (media)	(ymedia-Ŷ) ²	SC _{RES} - SC _{FA}	SC _{RES} + SC _{REG}
	1.36	0.5642	0.568	1.15E-05	1.79E-02		1.57E-05	-4.17E-06	1.79E-02
	1.36	0.5641	0.568	1.22E-05	1.79E-02	0.56	1.57E-05	-3.48E-06	1.79E-02
	1.36	0.5626	0.568	2.49E-05	1.79E-02		1.57E-05	9.25E-06	1.79E-02
	1.56	0.6216	0.624	5.75E-06	5.97E-03		3.64E-03	-3.64E-03	5.98E-03
	1.56	0.6224	0.624	2.56E-06	5.97E-03	0.62	3.64E-03	-3.64E-03	5.97E-03
	1.56	0.6237	0.624	8.92E-08	5.97E-03		3.64E-03	-3.64E-03	5.97E-03
	1.76	0.6891	0.680	7.56E-05	4.36E-04		1.36E-02	-1.36E-02	5.11E-04
	1.76	0.6864	0.680	3.60E-05	4.36E-04	0.69	1.36E-02	-1.36E-02	4.72E-04
	1.76	0.6883	0.680	6.24E-05	4.36E-04		1.36E-02	-1.36E-02	4.98E-04
	1.95	0.7319	0.734	4.36E-06	1.07E-03		2.90E-02	-2.90E-02	1.07E-03
	1.95	0.7349	0.734	8.32E-07	1.07E-03	0.73	2.90E-02	-2.90E-02	1.07E-03
	1.95	0.7362	0.734	4.89E-06	1.07E-03		2.90E-02	-2.90E-02	1.08E-03
	2.54	0.8967	0.900	1.36E-05	3.96E-02		1.13E-01	-1.13E-01	3.97E-02
	2.54	0.8992	0.900	1.40E-06	3.96E-02	0.90	1.13E-01	-1.13E-01	3.96E-02
	2.54	0.8978	0.900	6.67E-06	3.96E-02		1.13E-01	-1.13E-01	3.97E-02
Promedio X	1.83	Sumatoria	10.519	0.0003	0.1950		0.4791	-0.4789	0.1952
	Promedio y	0.701		$\Sigma(\hat{Y}_i - Y_i)^2$	$\Sigma(\hat{Y}_i - y_{media})^2$		$\Sigma(y_{media} - \hat{Y}_i)^2$		
b	0.282024101			Residuales	Regresion		Falta de ajuste	Error Exp	Total
a	0.184041132								
r2	0.99865439								

Anexo N°9. Fórmulas utilizadas para el cálculo del ANOVA.

a) Suma de cuadrados Residual (SC_{Residual}):

$$SC_{Residual} = \sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2$$

b) Suma de cuadrados de la Regresión (SC_{Regresión}):

$$SC_{Regrsión} = \sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$$

c) Suma de cuadrados de la Falta de Ajuste (SC_{Falta Ajuste}):

$$SC_{Falta Ajuste} = \sum (\bar{Y}_i - \hat{Y}_i)^2$$

d) Suma de cuadrados del Error Experimental (SC_{Error Experimental}):

$$SC_{Error Experimental} = \left(\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \right) - \left(\sum (\bar{Y}_i - \hat{Y}_i)^2 \right)$$

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



$$SC_{\text{Error Experimental}} = SC_{\text{Residual}} - SC_{\text{Falta Ajuste}}$$

e) Suma de cuadrados Total (SC_{Total}):

$$SC_{\text{Total}} = \left(\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \right) + \left(\sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2 \right)$$

$$SC_{\text{Total}} = SC_{\text{Residual}} + SC_{\text{Regrsión}}$$

f) Cuadrados medios de Regresión ($CM_{\text{Regresión}}$):

$$CM_{\text{Regresión}} = \frac{SC_{\text{Regrsión}}}{2 - 1}$$

g) Cuadrados medios Residual (CM_{Residual}):

$$CM_{\text{Residual}} = \frac{SC_{\text{Residual}}}{N - 2}$$

N es el número total de datos de la recta de regresión

h) Cuadrados medios de la Falta de Ajuste ($CM_{\text{Falta Ajuste}}$):

$$CM_{\text{Falta Ajuste}} = \frac{SC_{\text{Falta Ajuste}}}{n - 2}$$

n es el número de puntos de la recta de regresión

i) Cuadrados medios del Error Experimental ($CM_{\text{Error Experimental}}$):

$$CM_{\text{Error Experimental}} = \frac{SC_{\text{Error Experimental}}}{N - n}$$

j) Cuadrados medios Total (CM_{Total}):

$$CM_{\text{Total}} = \frac{SC_{\text{Total}}}{N - 1}$$

k) Estadístico de Fisher calculado de la Regresión ($F_{\text{Regresión}}$):

$$F_{\text{Regresión}} = \frac{CM_{\text{Regresión}}}{CM_{\text{Residual}}}$$

l) Estadístico de Fisher calculado de la Falta de Ajuste ($F_{\text{Falta Ajuste}}$):

$$F_{\text{Falta Ajuste}} = \frac{CM_{\text{Falta Ajuste}}}{CM_{\text{Error Experimental}}}$$

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



m) Estadístico de Fisher tabulado para la Regresión ($F_{\text{Tab Regresión}}$):

$$F_{\text{Tab Regresión}} = (0.05; 1; N - 2) = (0.05; 1; 13) = 4.67$$

n) Estadístico de Fisher tabulado para la Falta de Ajuste ($F_{\text{Tab Falta Ajuste}}$):

$$F_{\text{Tab Falta Ajuste}} = (0.05; n - 2; N - n) = (0.05; 3; 10) = 3.71$$

Anexo N°10. Tabla G de Cochran.

TABLA G TABLA G DE COCHRAN

$\nu \backslash k$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30
1	0.9985 0.9999	0.9669 0.9933	0.9065 0.9676	0.8412 0.9279	0.7808 0.9029	0.7271 0.8376	0.6798 0.7945	0.6385 0.7544	0.6020 0.7175	0.5410 0.6628	0.4709 0.5747	0.3894 0.4789	0.2929 0.3632
2	0.9750 0.9950	0.8709 0.9423	0.7679 0.8643	0.6838 0.7895	0.6161 0.7218	0.5612 0.6644	0.5157 0.6152	0.4775 0.5727	0.4450 0.5358	0.3924 0.4751	0.3346 0.4069	0.2705 0.3297	0.1980 0.2412
3	0.9392 0.9794	0.7977 0.8831	0.6841 0.7814	0.5981 0.6957	0.5321 0.6258	0.4800 0.5685	0.4377 0.5209	0.4027 0.4810	0.3733 0.4469	0.3264 0.3919	0.2758 0.3317	0.2205 0.2654	0.1593 0.1913
4	0.9057 0.9586	0.7457 0.8335	0.6287 0.7212	0.5441 0.6329	0.4803 0.5635	0.4307 0.5080	0.3910 0.4627	0.3584 0.4251	0.3311 0.3934	0.2880 0.3428	0.2419 0.2882	0.1921 0.2288	0.1377 0.1635
5	0.8772 0.9373	0.7071 0.7933	0.5895 0.6761	0.5065 0.5875	0.4447 0.5195	0.3974 0.4659	0.3595 0.4226	0.3286 0.3870	0.3029 0.3572	0.2624 0.3099	0.2195 0.2593	0.1735 0.2048	0.1237 0.1454
6	0.8534 0.9172	0.6771 0.7606	0.5598 0.6410	0.4783 0.5531	0.4184 0.4866	0.3726 0.4347	0.3362 0.3932	0.3067 0.3592	0.2823 0.3308	0.2439 0.2851	0.2034 0.2386	0.1602 0.1877	0.1137 0.1327
7	0.8332 0.8988	0.6530 0.7335	0.5365 0.6169	0.4564 0.5359	0.3980 0.4608	0.3535 0.4100	0.3185 0.3704	0.2901 0.3378	0.2666 0.3100	0.2299 0.2680	0.1911 0.2228	0.1501 0.1748	0.1061 0.1232
8	0.8159 0.8823	0.6333 0.7107	0.5175 0.5987	0.4387 0.5037	0.3817 0.4401	0.3384 0.3911	0.3043 0.3522	0.2768 0.3207	0.2541 0.2945	0.2187 0.2535	0.1815 0.2104	0.1422 0.1646	0.1002 0.1157
9	0.8010 0.8674	0.6167 0.6912	0.5017 0.5782	0.4241 0.4859	0.3682 0.4229	0.3259 0.3752	0.2926 0.3373	0.2659 0.3067	0.2439 0.2813	0.2098 0.2419	0.1736 0.2002	0.1357 0.1567	0.0958 0.1100
10	0.7880 0.8539	0.6025 0.6743	0.4884 0.5536	0.4118 0.4697	0.3568 0.4084	0.3154 0.3616	0.2829 0.3248	0.2568 0.2950	0.2353 0.2704	0.2020 0.2320	0.1671 0.1918	0.1303 0.1501	0.0921 0.1054
16	0.7341 0.7949	0.5466 0.6059	0.4366 0.4884	0.3645 0.4094	0.3135 0.3529	0.2756 0.3105	0.2462 0.2779	0.2226 0.2514	0.2032 0.2297	0.1737 0.1961	0.1429 0.1612	0.1108 0.1248	0.0771 0.0867
36	0.6602 0.7067	0.4748 0.5153	0.3720 0.4057	0.3066 0.3351	0.2612 0.2858	0.2278 0.2494	0.2022 0.2214	0.1820 0.1992	0.1655 0.1811	0.1403 0.1535	0.1144 0.1251	0.0879 0.0960	0.0604 0.0658
144	0.5813 0.6062	0.4031 0.4230	0.3093 0.3261	0.2513 0.2644	0.2119 0.2229	0.1833 0.1929	0.1616 0.1700	0.1446 0.1521	0.1308 0.1376	0.1100 0.1157	0.0889 0.0934	0.0675 0.0709	0.0457 0.0480
∞	0.5000 0.5000	0.3333 0.3333	0.2500 0.2500	0.2000 0.2000	0.1667 0.1667	0.1429 0.1429	0.1250 0.1250	0.1111 0.1111	0.1000 0.1000	0.0833 0.0833	0.0667 0.0667	0.0500 0.0500	0.0333 0.0333

$\alpha = 0.05$ (redonda) primer valor de las filas $\alpha = 0.01$ (cursiva) segundo valor de las filas

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Anexo N°11. Tabla de t de Student, en función de los grados de libertad.

v	α							
	0.50	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
1	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289	636.578
2	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.328	31.600
3	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214	12.924
4	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894	6.869
6	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.689
28	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.660
30	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
50	0.679	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261	3.496
60	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
70	0.678	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211	3.435
80	0.678	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
90	0.677	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.183	3.402
100	0.677	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
∞	0.675	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.290

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



Anexo N°12. Tabla chi cuadrado, en función de los grados de libertad.

V	Nivel de significación											
	0.995	0.99	0.975	0.95	0.9	0.75	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.10	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88
2	0.01	0.02	0.05	0.10	0.21	0.58	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21	10.60
3	0.07	0.11	0.22	0.35	0.58	1.21	4.11	6.25	7.81	9.35	11.34	12.84
4	0.21	0.30	0.48	0.71	1.06	1.92	5.39	7.78	9.49	11.14	13.28	14.86
5	0.41	0.55	0.83	1.15	1.61	2.67	6.63	9.24	11.07	12.83	15.09	16.75
6	0.68	0.87	1.24	1.64	2.20	3.45	7.84	10.64	12.59	14.45	16.81	18.55
7	0.99	1.24	1.69	2.17	2.83	4.25	9.04	12.02	14.07	16.01	18.48	20.28
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.49	5.07	10.22	13.36	15.51	17.53	20.09	21.95
9	1.73	2.09	2.70	3.33	4.17	5.90	11.39	14.69	16.92	18.92	21.67	23.59
10	2.16	2.56	3.25	3.94	4.87	6.74	12.56	15.99	18.31	20.48	23.21	25.19
11	2.60	3.05	3.82	4.57	5.58	7.58	13.70	17.28	19.68	21.92	24.73	26.76
12	3.07	3.57	4.40	5.23	6.30	8.44	14.85	18.55	21.03	23.34	26.22	28.30
13	3.57	4.11	5.01	5.89	7.04	9.30	15.98	19.81	22.36	24.74	27.69	29.82
14	4.07	4.66	5.63	6.57	7.79	10.17	17.12	21.06	23.68	26.12	29.14	31.32
15	4.60	5.23	6.26	7.26	8.55	11.04	18.25	22.31	25.00	27.49	30.58	32.80
16	5.14	5.81	6.91	7.96	9.31	11.91	19.37	23.54	26.30	28.85	32.00	34.27
17	5.70	6.41	7.56	8.67	10.09	12.79	20.49	24.77	27.59	30.19	33.41	35.72
18	6.26	7.01	8.23	9.39	10.86	13.68	21.60	25.99	28.87	31.53	34.81	37.16
19	6.84	7.63	8.91	10.12	11.65	14.56	22.72	27.20	30.14	32.85	36.19	38.58
20	7.43	8.26	9.59	10.85	12.44	15.45	23.83	28.41	31.41	34.17	37.57	40.00
21	8.03	8.90	10.28	11.59	13.24	16.34	24.93	29.62	32.67	35.48	38.93	41.40
22	8.64	9.54	10.98	12.34	14.04	17.24	26.04	30.81	33.92	36.78	40.29	42.80
23	9.26	10.20	11.69	13.09	14.85	18.14	27.14	32.01	35.17	38.08	41.64	44.18
24	9.89	10.86	12.40	13.85	15.66	19.04	28.24	33.20	36.42	39.36	42.98	45.56
25	10.52	11.52	13.12	14.61	16.47	19.94	29.34	34.38	37.65	40.65	44.31	46.93
26	11.16	12.20	13.84	15.38	17.29	20.84	30.43	35.56	38.89	41.92	45.64	48.29
27	11.81	12.88	14.57	16.15	18.11	21.75	31.53	36.74	40.11	43.19	46.96	49.65
28	12.46	13.56	15.31	16.93	18.94	22.66	32.62	37.92	41.34	44.46	48.28	50.99
29	13.12	14.26	16.05	17.71	19.77	23.57	33.71	39.09	42.56	45.72	49.59	52.34
30	13.79	14.95	16.79	18.49	20.60	24.48	34.80	40.28	43.77	46.98	50.89	53.67
40	20.71	22.16	24.43	26.51	29.05	33.66	45.62	51.81	55.76	59.34	63.69	66.77
50	27.99	29.71	32.36	34.76	37.69	42.94	56.33	63.17	67.50	71.42	76.15	79.49
60	35.53	37.48	40.48	43.19	46.66	52.29	66.98	74.40	79.08	83.30	88.38	91.95
70	43.28	45.44	48.76	51.74	55.33	61.70	77.58	85.53	90.53	95.02	100.43	104.21
80	51.17	53.54	57.15	60.39	64.28	71.14	88.13	96.58	101.88	106.63	112.33	116.32
90	59.20	61.75	65.65	69.13	73.29	80.62	98.65	107.57	113.15	118.14	124.12	128.30
100	67.33	70.06	74.22	77.93	82.36	90.13	109.14	118.50	124.34	129.56	135.81	140.17



Anexo N°13. Distribución de F de Snedecor. Valores que dejan un área de cola de 0.05 en función de los grados de libertad de la distribución

v ₂	v ₁														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	30	40	50	100
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767	238.884	240.543	241.882	248.016	250.096	251.144	251.774	253.043
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.446	19.463	19.471	19.476	19.486
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.660	8.617	8.594	8.581	8.554
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.803	5.746	5.717	5.699	5.664
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.558	4.496	4.464	4.444	4.405
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	3.874	3.808	3.774	3.754	3.712
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.445	3.376	3.340	3.319	3.275
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.150	3.079	3.043	3.020	2.975
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	2.936	2.864	2.826	2.803	2.756
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.774	2.700	2.661	2.637	2.588
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.124	2.039	1.994	1.966	1.907
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	1.932	1.841	1.792	1.761	1.695
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	1.839	1.744	1.693	1.660	1.589
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.784	1.687	1.634	1.599	1.525
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.676	1.573	1.515	1.477	1.392

Anexo N° 14. Control de las condiciones ambientales en el laboratorio

Parámetros	Área de Balanza		Área de Absorción Atómica	
	T °C	%HR	T °C	%HR
Cuantificación	27.9 °C	56.70%	28.3 °C	56.80%
Linealidad	27.3 °C	56.2%	27.0 °C	57.1%
Repetibilidad	28 °C	57.5%	28.3 °C	57.7%
Precisión intermedia	29.2 °C	58.3%	29.1 °C	58.5%
Exactitud	26.9 °C	57.2%	26.5 °C	56.2%
Robustez	28.5 °C	58.6%	26.6 °C	58.4%

“Validación del método analítico de cuantificación de litio, en tabletas de carbonato de litio de 300mg, por espectrofotometría de absorción atómica en emisión”



WU | WIRTSCHAFTS UNIVERSITÄT WIEN | VIENNA UNIVERSITY OF ECONOMICS AND BUSINESS

Anexos N° 15. Figuras del Equipo y cristalerías utilizadas.

Cristalería



Espectrofotómetro de Absorción Atómica de Llama

