

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA

FACULTAD DE CIENCIAS



TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL, PARA

TITULO PROFESIONAL

“VALIDACION Y ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE EN LA
DETERMINACION DEL CONTENIDO DE NITROGENO TOTAL EN HARINA DE
PESCADO EMPLEANDO LA TECNICA DE COMBUSTION Y DETECTOR DE
CONDUCTIVIDAD TERMICA”

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN QUÍMICA

ELABORADO POR

EDBER ABEL CARDENAS SULCA

ASESOR

CHRISTIAN JACINTO HERNANDEZ

LIMA – PERU

2014

DEDICATORIA

A mí adorada hija Adriana por ser mi motor para poder mejorar en la vida y darme fuerzas para poder vencer las adversidades.

A mi madre por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

AGRADECIMIENTOS

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Un agradecimiento especial a mi asesor Cristian Jacinto, por la colaboración, paciencia, apoyo que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre.

De igual forma, a mis Padres, a quien le debo toda mi vida, les agradezco el cariño y su comprensión, a ustedes quienes han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante buscando siempre el mejor camino.

INDICE

INTRODUCCION	9
RESUMEN	11
OBJETIVOS	12
CAPITULO 1: MARCO TEORICO	
1.1. HARINA DE PESCADO	14
1.1.1. RAZONES PARA SU USO	14
1.1.2. PROCESO PRODUCTIVO	15
1.1.3. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES	16
1.2. TÉCNICA EMPLEADA PARA EL ANALISIS DE NITROGENO EN HARINA DE PESCADO	17
1.3. VENTAJAS DEL METODO DE DUMAS COMPARADAS CON EL MÉTODO KJELDAHL CLASICO	17
1.3.1 PRINCIPALES COMPONENTES DEL EQUIPO LECO FP-528	19
1.3.2. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO MARCA LECO MODELO FP- 528.	21
1.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO	22
1.4.1. PLANIFICACIÓN PARA LA VALIDACIÓN	23
1.4.2. CRITERIOS PARA LA REVALIDACION	25
1.4.3. INFORME DE VALIDACIÓN	25
1.5. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	26
1.5.1. INTERVALO DE TRABAJO Y LINEALIDAD	26
1.5.1.1. INTERVALO DE TRABAJO	26
1.5.1.2. LINEALIDAD	26
1.5.2. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO	26
1.5.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO	27
1.5.4. SENSIBILIDAD DEL MÉTODO	28
1.5.5. PRECISIÓN - REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	28
1.5.6. VERACIDAD (SESGO)	31
1.5.7. SELECTIVIDAD	30
1.5.8. ROBUSTEZ	31

1.6. ATIPICIDAD Y CONSISTENCIA DE DATOS.	33
1.6.1. EVALUACIÓN DE LA ATIPICIDAD	33
1.6.1.1.PRUEBA DE COCHRAN	33
1.6.1.2.PRUEBA DE GRUBBS	34
1.6.2. EVALUACIÓN DE LA CONSISTENCIA h Y k DE MANDEL	35
1.6.2.1.EVALUACIÓN DEL h DE MANDEL.	35
1.6.2.2.EVALUACIÓN DEL k DE MANDEL	36
1.7. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS METODOS DE ENSAYO (MÉTODO DE LA CAJA NEGRA)	36
1.7.1. VARIABILIDAD DEL PROCESO: (PRECISIÓN)	37
1.7.2. TRAZABILIDAD: (VERACIDAD)	37
1.7.3. MUESTRA	37
CAPITULO 2: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
2.1. ALCANCE DEL MÉTODO DE ENSAYO	41
2.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	41
2.2.1. EQUIPOS Y MATERIALES	41
2.2.2. REACTIVOS	41
2.2.3. EXACTITUD DEL SISTEMA	42
2.2.4. PRECISIÓN DEL PROCESO DE ANALISIS	42
2.2.5. ANALISIS DE MUESTRAS	42
2.2.6. EXPRESIÓN DE RESULTADOS	42
2.2.7. CONDICIONES AMBIENTALES	43
2.2.8. CONDICIONES DE SEGURIDAD	43
2.3. DIAGRAMA DEL PROCESO EXPERIMENTAL	44
CAPITULO 3: OPTIMIZACION DE LA TECNICA ANALITICA	
3.1. CONDICIONES INICIALES DEL EQUIPO	46
3.2. IDENTIFICACIÓN DE FUGAS EN LAS LINEAS DE GASES	46
3.3. MANTENIMIENTO DEL EQUIPO Y CAMBIO DE CONSUMIBLES	47
3.4. VIDA UTIL DE LOS CONSUMIBLES	48

CAPITULO 4: VALIDACION DEL METODO DE ENSAYO

4.1. TABLA DE DATOS VÁLIDOS 52

4.2. ESCRUTINIO DE RESULTADOS PARA DETERMINAR LA CONSISTENCIA DE VALORES REZAGADOS, ERRÁTICOS O ATÍPICOS. 52

4.2.1. CÁLCULO DE LA ESTADÍSTICA DE CONSISTENCIA ENTRE LABORATORIOS (MANDEL: H) Y DE CONSISTENCIA DENTRO DE LABORATORIOS (MANDEL:

K) 52

4.2.2. PRUEBA NUMÉRICA PARA DAR VALIDEZ A LOS RESULTADOS – PRUEBA DE COCHRAN

54

4.2.3. PRUEBA NUMÉRICA DE OBSERVACIÓN DE VALORES ERRÁTICOS O ATÍPICOS. PRUEBA DE GRUBBS 54

4.3. NORMALIDAD Y HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS 55

4.3.1. NORMALIDAD DE LOS DATOS. PRUEBA DE ANDERSON

-DARLING 55

4.3.2. HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS 58

4.3.2.1. TÉCNICA NUMÉRICA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS. PRUEBA DE BARLETT 59

4.4. PRECISIÓN DEL MÉTODO 59

4.4.1. EVALUACIÓN DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REPETIBILIDAD Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REPRODUCIBILIDAD 60

4.4.2. EVALUACIÓN DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE REPETIBILIDAD Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE REPRODUCIBILIDAD. 61

4.4.3. EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD 63

4.4.4. LÍMITE DE DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE REPETIBILIDAD Y LÍMITE DE DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE REPRODUCIBILIDAD 63

4.5. VERACIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO 64

4.5.1. COMPARACIÓN CON OTRO MÉTODO O UN VALOR DE REFERENCIA EN DOS O MÁS MUESTRAS DE DIFERENTE CONCENTRACIÓN T-PAREADA 64

4.5.2. PRUEBA DE HIPOPTESIS PARA LA CORRELACIÓN ENTRE METODOS	64
4.5.3. DETERMINACIÓN DE SESGO DE LABORATORIO	69
4.6. INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO – METODO DE LA CAJA NEGRA	70
4.6.1. FUENTES DE INCERTIDUMBRE	71
4.6.1.1. INCERTIDUMBRE DE LA MUESTRA	71
4.6.1.2. INCERTIDUMBRE DEL PROCESO	71
4.6.1.3. INCERTIDUMBRE DE TRAZABILIDAD	71
4.6.2. INCERTIDUMBRE TOTAL	72
4.7. LINEALIDAD DEL MÉTODO	72
4.7.1. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD	72
4.8. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	78
4.8.1. LIMITE DE DETECCIÓN	78
4.8.2. LIMITE DE CUANTIFICACION	79
4.9. SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	80
4.10. ROBUSTEZ DEL MÉTODO.	80
4.11. RANGO DEL MÉTODO	84
4.12. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO	84
CAPITULO 5: ASEGURAMIENTO DE CALIDAD DEL METODO DE ENSAYO	
5.1. EXACTITUD DEL SISTEMA	87
5.2. EVALUACIÓN DE DUPLICADOS	87
5.3. EVALUACIÓN DEL MATERIAL DE REFERENCIA	87
CONCLUSIONES	90
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	93

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1:

Figura N°1.1: Equipo Leco Modelo FP-528

Figura N°1.2: IZQUIERDA: Tubo de combustión. DERECHA: Tubo de reducción

Figura N°1.3: IZQUIERDA: Contenido de filtros de humedad. DERECHA: Modo de cambiar los tubos de cuarzo del Equipo

Figura N°1.4: Diagrama de funcionamiento del Equipo Leco Modelo FP-528

Figura N°1.5: Diseño de la prueba de Youden & Steiner.

Figura 1.6: Esquema para el cálculo de la Incertidumbre - Método caja negra

CAPITULO 3:

Figura N°3.1: Diagnostico de fugas del Equipo Leco Modelo FP-528

Figura N°3.2: IZQUIERDA: Consumibles dentro de los filtros. DERECHA: Modo de cambiar los tubos de cuarzo del Equipo

Figura N°3.3: IZQUIERDA: Reactivos del tubo de combustión. DERECHA: Consumibles del tubo de reducción

CAPITULO 4:

Figura N °4.1.- Valores de h para los resultados de proteína

Figura N °4.2. Valores de k para los resultados de proteína

Figura N °4.3.- Histogramas correspondientes a las muestras analizadas por el método

Figura N °4.4. Tendencia de la Desviación Estándar de Repetibilidad

Figura N °4 5. Tendencia de la Desviación Estándar de Reproducibilidad

Figura N °4.6.- Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad

Figura N °4.7.- Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad

INTRODUCCION

La harina de pescado es reconocida por los nutricionistas como el ingrediente predilecto de la más alta calidad y de digestibilidad que se incorpora en la dieta de la mayoría de los animales de granja y actualmente de manera creciente en la acuicultura; posee grandes cantidades de energía por unidad de peso y es una excelente fuente de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas.[2]

El Perú es el primer exportador de harina de pescado del mundo y su producción es una de las actividades más importantes del sector pesquero en términos de divisas y empleo así como de nuestra economía.[2]

En este sentido el análisis cuantitativo de nitrógeno y de proteínas juega un rol muy importante, en particular para la evaluación de productos agrícolas y de pesquería. Por lo tanto es importante conocer el contenido preciso, exacto y confiable ya que el precio de este insumo aumenta de acuerdo al porcentaje de proteínas que posee.

A diferencia de otras determinaciones de elementos que hoy se efectúan por medios espectroscópicos tales como Absorción Atómica o ICP, todavía se utiliza ampliamente el tradicional método Kjeldahl de química húmeda para el importante análisis de nitrógeno. Pero, desde hace algunos años, tiene cada vez más éxito el rápido, preciso y totalmente automático método Dumas por combustión.[1]

La compañía LECO Corporation (St. Joseph, MI, 2002) tiene en el mercado el determinador de Nitrógeno/Proteína FP-528, utilizado para éste trabajo, y que cuantifica el Nitrógeno de forma sistematizada y automatizada basándose en el método de combustión Dumas, AOAC 990.03(3)

El equipo FP-528 consta de una cámara de oxígeno donde se lleva a cabo la combustión a una temperatura de 850°C, una celda de termoconductividad y un microprocesador para llevar a cabo los cálculos y controlar los parámetros operativos. Los gases requeridos para su operación son Oxígeno (para la cámara de combustión) aire comprimido (control de presión neumática) y Helio (gas de transporte). El tiempo de análisis para una muestra es de aproximadamente 3 a 4 minutos y los resultados se expresaron como % de proteína (de acuerdo al factor de conversión).

El objetivo del presente trabajo es comprobar mediante evidencia objetiva que el equipo FP-528 proporciona valores comparables del contenido de proteína bruta en harina de pescado.

Para ello se procederá a evaluar los parámetros de validación según indica la guía EUROCHEM (Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados).[12]

RESUMEN

El desarrollo de la validación del presente método para la determinación de Nitrógeno en harina de pescado mediante la técnica de combustión Dumas y usando el equipo FP-528 ,se realizó desde la planificación de las actividades hasta la presentación del estudio de validación del método y así mismo los criterios de aseguramiento de calidad necesarios para asegurar resultados confiables y de acuerdo a los lineamientos de la ISO/IEC 17025: 2005 – “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y/o calibración” y los requerimientos del ente acreditador en nuestro país el INDECOPI, que a la fecha ya es reconocido internacionalmente.

En el marco teórico se hablara sobre la importancia, uso y actualidad de la harina de pescado. También se explicara en qué consiste la técnica de Combustión por Dumas, técnica que emplea el equipo instrumental de la marca LECO modelo FP-528 y finalmente lo que concierne a la implementación y la validación del método de ensayo.

En la parte experimental, se presentan los resultados de los parámetros de validación, los criterios de aseguramiento de calidad resultantes y las respectivas conclusiones del estudio de validación.

El intervalo de trabajo del método para la harina de pescado va desde 57.30% a 83.74 %, El límite de detección del método abarca valores desde 0.2 % y el de cuantificación desde 0.7% como contenido de proteína.

El cálculo de la incertidumbre fue hallado mediante el método de la caja negra que toma como un todo al proceso analítico y es de 0.34%.

La Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad es el promedio: $DSR_r = 0.289$. Así como también la Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad: $DSR_R = 0.339$. Los límites de DSR_r y DSR_R también fueron calculados.

La selectividad y la robustez fueron evaluadas demostrando que el método es selectivo y robusto.

OBJETIVOS GENERAL

- Implementar el método para la determinación del contenido de Proteínas en Harina de Pescado por el método de combustión de Dumas de acuerdo a los lineamientos de la NTP-ISO/IEC 17025: 2006.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Dar a conocer una visión global sobre la importancia de la harina de pescado como alimento de animales de granja.
- Demostrar la capacidad del laboratorio para realizar el ensayo analítico mediante el estudio de validación.
- Evaluar los parámetros de validación requeridos mediante pruebas estadísticas de fuentes reconocidas.
- Establecer criterios de aseguramiento de calidad que permitan mantener bajo control los resultados emitidos para este método de ensayo.

CAPITULO 1: MARCO TEÓRICO

1.1. HARINA DE PESCADO [7]

La harina de pescado es un producto obtenido del procesamiento de pescados, eliminando su contenido de agua y aceite.

La harina de pescado tiene diversos usos como complemento dietético para la alimentación de animales, especialmente en el desarrollo de la acuicultura, que incrementó la demanda mundial de esta.

El incremento de la demanda en los últimos años de la harina de pescado, abre los ojos a los demás países que la producen en menores cantidades, convirtiéndose así en una de las materias primas más importantes a nivel mundial.

Tiene numerosas ventajas en su utilización y su gran fuente protéica, energética entre otras, la harina de pescado posee un amplio mercado siendo China y la Unión Europea los principales destinos de este insumo.

La proteína en la harina de pescado tiene una alta proporción de aminoácidos esenciales en una forma altamente digerible, particularmente metionina, cisteína, lisina, treonina y triptófano. Presentes en la forma natural de péptidos, éstos pueden ser usados con alta eficiencia para mejorar el equilibrio en conjunto de los aminoácidos esenciales dietéticos.

1.1.1. RAZONES PARA SU USO [6]

La harina de pescado ofrece muchos beneficios en la nutrición animal ya que aporta muchos proteínas y nutrientes; como ingrediente de alimentos para aves, aves ponedoras, cerdos, rumiantes, vacas lecheras, ganado vacuno, ovino, y animales acuáticos (camarón, pescado y otros), disminuyendo notablemente los costos de producción industrial de estos animales por su rápido crecimiento, su mejor nutrición, la mejora de la fertilidad y la notoria disminución de posibilidades de enfermedades.

Elevado contenido proteico (sobre 65%) y una composición de aminoácidos esenciales excelente, solo inferior a la de la proteína de la leche y los huevos, y muy superior a la de cualquier otro producto vegetal proteico.

Su contenido de vitaminas, sobre todo las del complejo B es muy conveniente, además de ser la única que contiene cantidades importantes de vitamina D.

Posee cantidades importantes de elementos minerales, como el selenio y otros, que actúan como elementos coadyuvantes (cooperadores) en los procesos enzimáticos.

La harina de pescado, natural y sostenible, proporciona una fuente concentrada de proteína de alta calidad y una grasa rica en ácidos grasos omega-3, DHA (Acido Docosahexaenoico) y EPA(Acido Eicosapentaenoico).

Estudios recientes han demostrado que el DHA es la base para la elaboración de una sustancia llamada neuroprotectina D1, que reduce la producción de la proteína responsable de la enfermedad de Alzheimer. La neuroprotectina protege las células del cerebro contra otros subproductos celulares dañinos, prolonga la vida de las células del cerebro y reduce la inflamación, que son procesos que ocurren al empezar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Es también una sustancia clave en la comunicación entre las células del cerebro.

1.1.2. PROCESO PRODUCTIVO [8]

El proceso normal de fabricación se inicia con el picado o molido del pescado, seguido de su cocción a 100°C durante unos 20 minutos. Posteriormente el producto se prensa y centrifuga para extraer parte del aceite. En el proceso se obtiene una fracción soluble que puede comercializarse independientemente (solubles de pescado) o reincorporarse a la harina. El último paso es la desecación de la harina hasta un máximo de un 10% de humedad. En las primeras etapas del proceso se añade un antioxidante para evitar el enranciamiento de la grasa y la posible combustión de la harina. Recientemente, se han desarrollado nuevos

procedimientos (harinas especiales, harinas LT) basados en la utilización de pescado entero fresco bien conservado y desecados a baja temperatura ($< 70^{\circ}\text{C}$).

1.1.3. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES [8]

El valor nutritivo de la harina depende en primer lugar del tipo de pescado. Por otra parte, la frescura del producto y la temperatura y condiciones de almacenamiento afectan a su deterioro por actividad bacteriana, enzimática o enranciamiento, y, como consecuencia, a su contenido en peróxidos, en nitrógeno volátil (TVN) y en aminas biogénicas tóxicas.

El componente nutritivo más valioso de la harina de pescado es la proteína. Tiene una proporción ideal de aminoácidos esenciales altamente digestibles, que varía relativamente poco con el origen de la harina. Además, la proteína tiene una escasa antigenicidad, por lo que resulta muy adecuada en piensos de animales jóvenes. La harina de pescado se considera una buena fuente de proteína, lisina y metionina by-pass en rumiantes, aunque por su baja palatabilidad (si no está bien procesada) su uso debe limitarse a 0,5 kg/d en vacas de leche. La degradabilidad media de la proteína está en torno a un 40%, pero es altamente variable ($\text{CV}=26\%$), dependiendo del grado de deterioro durante el almacenamiento y de la cantidad de solubles reciclados. La degradabilidad ruminal (D, %) puede estimarse a partir de su solubilidad en solución tampón (S, %), utilizando la siguiente ecuación obtenida con harinas procedentes del mercado nacional:

La harina de pescado aporta cantidades elevadas de fósforo altamente disponible, microminerales (Se, Zn, Cu, Fe y Mn) y vitaminas del grupo B (especialmente colina, biotina, riboflavina y B12). Su elevado contenido en P puede plantear problemas de contaminación por algas en acuicultura y ambientales en zonas de alta densidad animal donde la polución por fósforo esté penalizada.

En la actualidad, el uso de esta materia prima sólo está permitida en la alimentación de animales distintos de los rumiantes en plantas que no fabriquen piensos para rumiantes. La selección de proveedores y la tipificación del producto es esencial para este ingrediente, dada su elevada variabilidad. Los parámetros más importantes a determinar en el control de calidad son los relacionados con la frescura de la materia prima y la calidad de su procesado

(TVN, aminos biogénicos, digestibilidad y solubilidad de la proteína, enranciamiento y bacteriología). Deben también vigilarse las mezclas fraudulentas con otras harinas animales (p. ej. harina de plumas) o minerales, a través de la relación calcio:fósforo. El contenido en proteína, grasa y cenizas debe analizarse sistemáticamente.

1.2. TÉCNICA PARA EL ANALISIS DE NITROGENO EN HARINA DE PESCADO [10]

Empleando la técnica de combustión Dumas, el FP528 analizador de Nitrógeno / Proteína es una alternativa rentable a los métodos de digestión Kjeldahl. El FP528 está diseñado para pequeños tamaños de muestra de muestras orgánicas y entregar resultados en 3 a 4 minutos. Utilizado típicamente por los laboratorios de bajo volumen de muestras, el determinador de Nitrógeno / Proteína FP528 cumple con los métodos de análisis certificados AOAC 992.23, AOAC 992.15, AACC 46-30, AOAC 968.06, AOAC 993.13, DIN/ISO 13878 y otros para determinación de proteínas en Alimentos, Piensos, Forrajes, Fertilizantes, Granos y productos derivados de cereales.

1.3. VENTAJAS DEL METODO DE DUMAS COMPARADAS CON EL MÉTODO KJELDAHL CLASICO [1]

- Alternativa rentable a los métodos de digestión Dumas
- Cumple con los métodos aprobados AOAC, DIN, ISO, AACC, y ASBC
- Rápidos resultados en 4 minutos
- Muestras líquidas o sólidas
- Mínima rutina de mantenimiento

El método Kjeldahl comienza con una digestión de la muestra con ácido sulfúrico caliente y concentrado por un lapso de 1 a 2 horas. Históricamente, para completar la digestión se agregaban catalizadores como mercurio o selenio. Debido a los problemas de disposición de contaminantes como el mercurio y selenio, se utilizan catalizadores menos eficientes tales como el titanio y el cobre. Después de la digestión se agrega una base concentrada y el

amoníaco es destilado con vapor de agua, absorbido en ácido estándar y titulado con base. Comparado con este procedimiento, las ventajas del método Dumas son claras:

- Seguridad: Una de las grandes ventajas del método Dumas es que le permite a Ud. eliminar la necesidad de exponer a su personal al manipuleo de ácido sulfúrico y base concentrado, y el monitoreo de ácido hirviendo en recipientes de vidrio que con frecuencia se rompen durante el análisis o la transferencia.
- No Necesita Productos Químicos Para La Digestión: Dumas requiere agentes reductores no agresivos ni venenosos como cobre u óxido de cobre y tungsteno así como gases como helio o CO₂ y una cierta cantidad de oxígeno. No hay peligro en su manipulación, ni hay una costosa disposición de residuos contaminantes.
- Significativos Ahorros De Tiempo: Desde que llega la muestra hasta la impresión de los resultados analíticos, un analizador Dumas moderno solo requiere unos pocos minutos. Para Kjeldahl Ud. tendrá que esperar horas.
- Bajos Requerimientos De Instalación: Un analizador DUMAS de Elemental solo requiere 1 metro de espacio de mesada de su laboratorio, una fuente de energía eléctrica, así como dos gases no peligrosos. No requiere de sistema de extracción de gases corrosivos, ni de costoso espacio para los blocks de digestión, ni de espacio para almacenar productos químicos y sus desechos, ni siquiera se necesita una fuente de agua.
- Completa Automatización: Luego de pesar 39 muestras o más, y llenar el carrousel de muestras, el análisis es totalmente automático y sin atención, aún durante las horas de la noche. A la mañana siguiente tiene Ud. disponible el protocolo analítico de todas las muestras. No hay que rellenar, recargar ni limpiar los viales de digestión para cada muestra.
- Bajo Costo por Análisis: Los ahorros en tiempo de análisis, productos químicos, equipamiento de laboratorio, requerimientos de instalación y la disposición final de los residuos, agregarán una ventaja de costos significativa, particularmente cuando se lo compara con el costo del Kjeldahl.
- Resultados Analíticos Exactos: El método Dumas con un instrumento Elemental provee el 100% de recuperación del nitrógeno independientemente de su composición química (la única excepción: algunos nitruros). Los resultados del Kjeldahl dependen mucho del compuesto a ser analizado o del catalizador utilizado para la digestión, por Ej. algunos

compuestos heterocíclicos, nitratos, nitrosos, compuestos nitro- y azo no son digeridos o no lo son completamente.



Figura N°1.1: Equipo Leco Modelo FP-528 [3]

1.3.1 PRINCIPALES COMPONENTES DEL EQUIPO LECO FP-528

- Tubo de combustión: Donde se quema la muestra y se liberan los gases de combustión.
- Tubo de reducción: Aquí sucede la reducción de los gases liberados debido al cobre caliente.
- Filtros: Estos filtros retienen dióxido de carbono y agua.
- Sistema de detección: Sistema basado en la conductividad trmica del gas

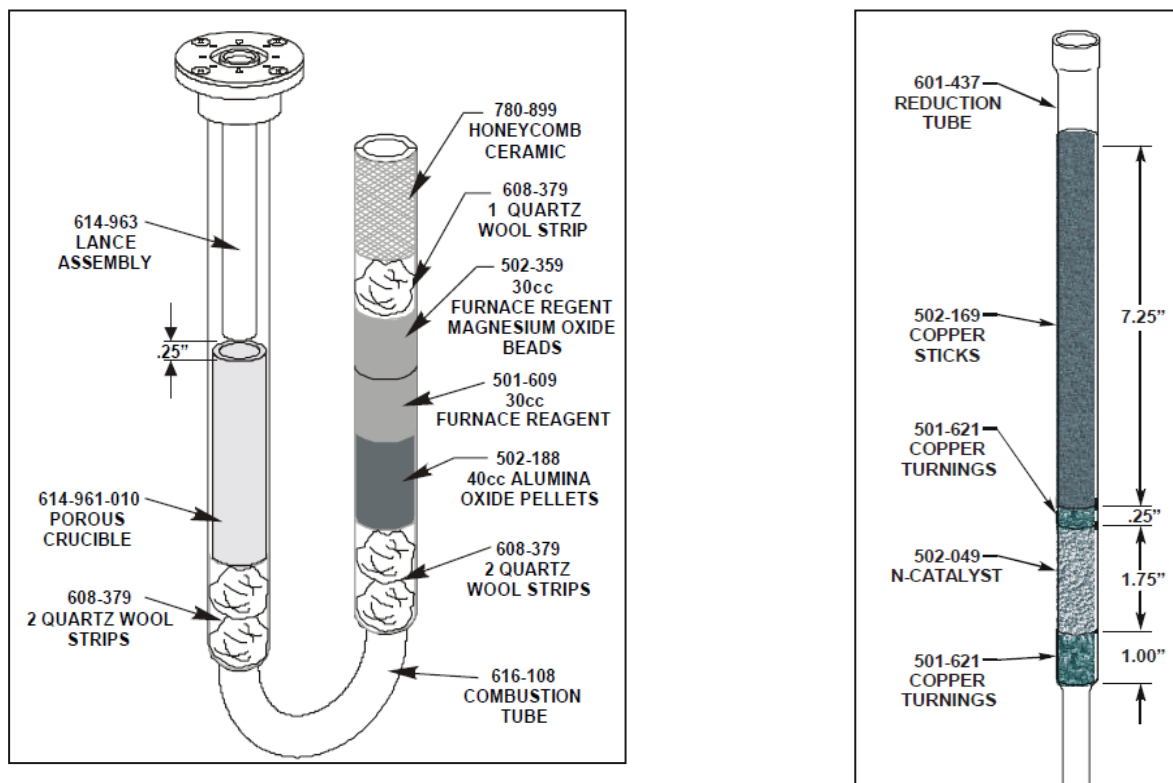


Figura N°1.2: IZQUIERDA: Tubo de combustión. DERECHA: Tubo de reducción[3]

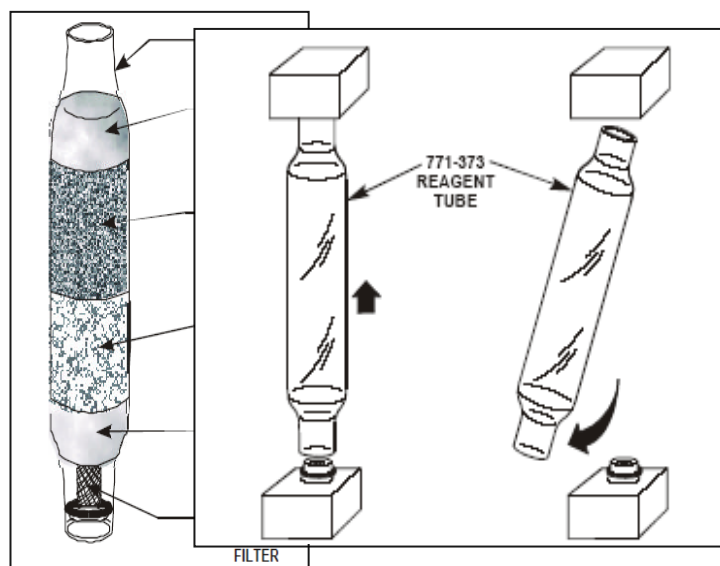


Figura N°1.3: IZQUIERDA: Contenido de filtros de humedad. DERECHA: Modo de cambiar los tubos de cuarzo del Equipo[3]

1.3.2. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO MARCA LECO MODELO FP- 528. [4]

Hay tres fases durante un ciclo del análisis: purga, combustión, y análisis. En la fase de la purga, la muestra encapsulada se coloca en el cabezal de carga, es sellado, y purgado de cualquier gas atmosférico que haya entrado durante la carga de la muestra. El volumen del Balastro (volumen cero en este punto) y las líneas de gas también se purgan.

Durante la fase de combustión, la muestra cae en un horno caliente (950°C) y se inyecta oxígeno para una rápida y completa combustión. Los productos de la combustión pasan al horno secundario (dispositivo de post combustión a 850°C) en donde se genera principalmente CO₂, H₂O, NO_x y N₂, los cuales son pasados a través de un filtro adicional al horno que se encarga de retener partículas residuales y un refrigerador termoeléctrico donde se retiene la humedad. Los gases de combustión son entonces recogidos en un recipiente de colección conocido como el Balastro.

En la fase de análisis, los gases de combustión se homogenizan en el Balastro, luego de lo cual son forzados a evacuar del mismo, en este momento una alícuota de 3cc es capturado en el lazo de la válvula dosificadora y el resto se purga. El gas capturado en la alícuota pasa a través del cobre caliente (Tubo de reducción) para remover el oxígeno y cambiar NO_x al N₂ y después pasa a través del Lecosorb y Anhydron para quitar el dióxido de carbono y el agua, respectivamente. El nitrógeno y helio remanente se determinan en la celda termo conductiva.

El resultado final se exhibe como un porcentaje del peso o en partes por millón según lo determinado por el operador.

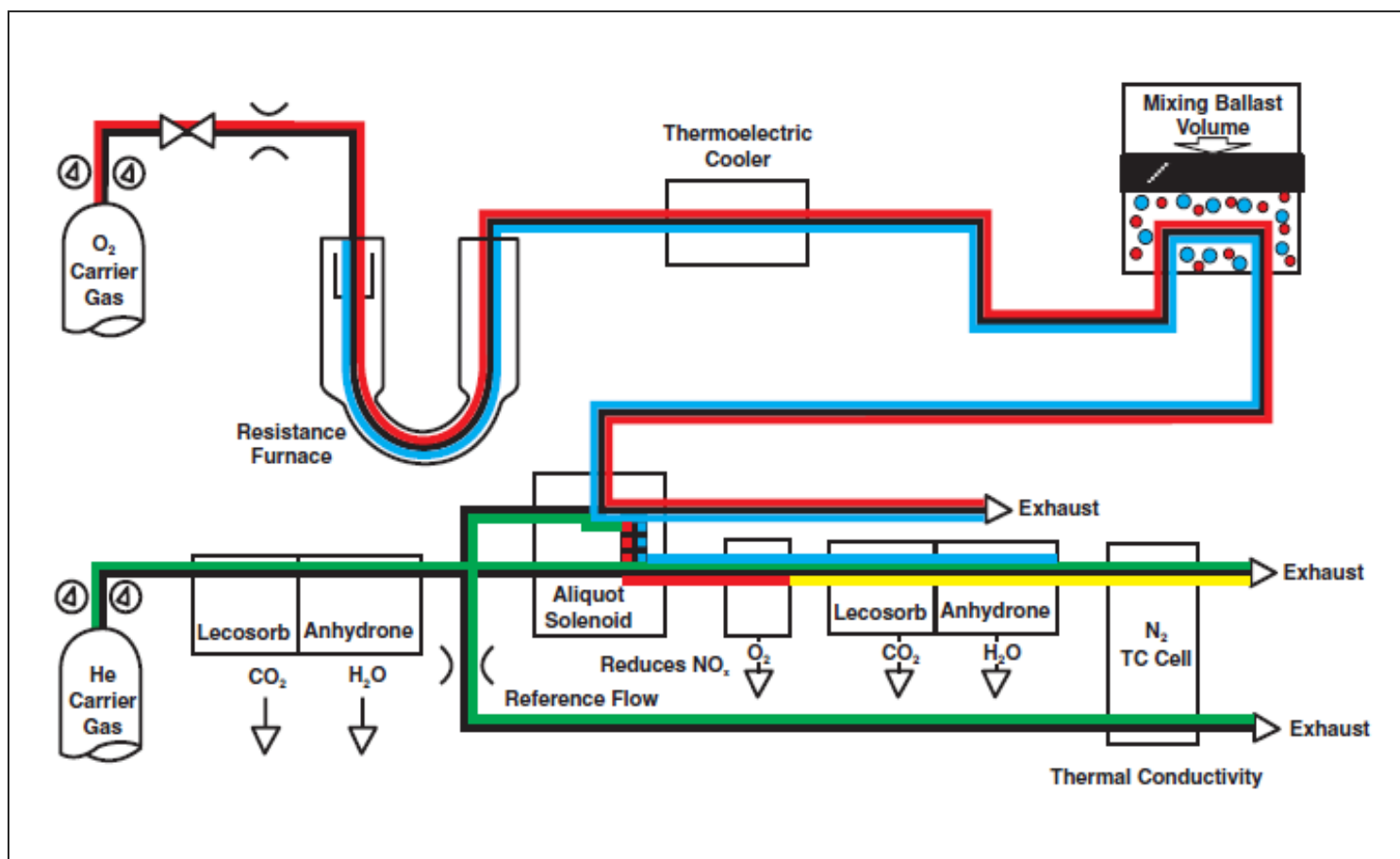


Figura N°1.4: Diagrama de funcionamiento del Equipo Leco Modelo FP-528

1.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO

Un método debe ser validado cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico en particular, tales como:

- Métodos desarrollados por el laboratorio para una aplicación específica.
- Métodos normalizados modificados a un nuevo problema o fuera del alcance del mismo.
- Métodos de textos, publicaciones científicas o proporcionados por el fabricante del equipo.

De acuerdo a la NORMA NTP-ISO/IEC 17025: 2006, cuando se usa métodos de referencia normalizados, no es necesario una validación completa del ensayo sino de algunos a este

proceso se le denomina validación parcial. Para un método de combustión son necesarios evaluar los siguientes parámetros:

Tabla N°1.1: Parámetros de validación para el presente método de combustión de Dumas.

PARÁMETRO	VALIDACIÓN COMPLETA	VALIDACIÓN PARCIAL
RANGO DE TRABAJO / LINEALIDAD	✓	✓
LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	✓	✓
SENSIBILIDAD	✓	✓
PRECISIÓN REPRODUCIBILIDAD	✓	✓
PRECISIÓN REPETIBILIDAD	✓	✓
VERACIDAD (SESGO)	✓	✓
SELECTIVIDAD	✓	
ROBUSTEZ	✓	
INCERTIDUMBRE	✓	✓

1.4.1 PLANIFICACIÓN PARA LA VALIDACIÓN:

Para el desarrollo de la implementación del presente método se realizaron una serie de actividades, las cuales fueron planificadas donde se evaluaron los recursos en infraestructura y materiales necesario, la capacitación del personal de manera de cumplir con los requerimientos de la NTP-ISO/IEC 17025: 2006, como se indica en la siguiente *Tabla N°1.2: Actividades involucradas a la implementación de un ensayo analítico.*

Tabla N°1.2: Actividades involucradas a la implementación de un ensayo analítico.

ACTIVIDADES	2014									
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O
Revisión y evaluación del método	X									
Instalaciones del laboratorio	X	X	X	X						
Compra de reactivos y solventes		X	X	X	X					
Compra de equipos y materiales			X	X	X	X				
Compra de materiales de referencia				X	X	X				
Capacitación del personal					X	X	X			
Implementación de documentos						X	X			
Calibración de equipos y material volumétrico						X	X	X		
Validación del método de ensayo						X	X	X		
Auditoria Interna								X	X	
Auditoria de Acreditación									X	X

Por consecuencia la ejecución de los parámetros de validación tiene la siguiente programación como tenemos en la *tabla N°1.3: Planificación de la ejecución de los parámetros de validación.*

Tabla N°1.3: Planificación de la ejecución de los parámetros de validación.

PARÁMETRO	2014		
	J	J	A
RANGO DE TRABAJO / LINEALIDAD	✓		
LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	✓		
SENSIBILIDAD	✓		
PRECISIÓN REPRODUCIBILIDAD	✓		
PRECISIÓN REPETIBILIDAD		✓	
VERACIDAD (SESGO)		✓	
SELECTIVIDAD		✓	
ROBUSTEZ			✓
INCERTIDUMBRE			✓

1.4.2. CRITERIOS PARA LA REVALIDACION

La revalidación del método se efectuara cuando se modifique alguna variable como puede ser:

- Renovación o cambios en la Instrumentación.
- Variación de las condiciones o ubicación del área de trabajo.
- Ingreso de personal inexperto en el análisis.
- Alteraciones en el procedimiento del método de ensayo.

La revisión de la validación se efectuara anualmente a fin de verificar que el procedimiento analítico continúa cumpliendo con las exigencias del fin para el que se ha propuesto.

1.4.3. INFORME DE VALIDACIÓN

El informe de validación es el documento de presentación con el cual el laboratorio resume todo el proceso de validación y consta de las siguientes partes:

- a) Información General: Entre las más importantes tenemos:
 - Objetivos.
 - Alcance del método propuesto.
 - Norma de Referencia.
 - Modificaciones efectuadas.
 - Equipo de personas involucradas en el estudio.
 - Fecha del estudio y de vigencia de la validación.
- b) Identificación de materiales, reactivos y equipos empleados mencionando sus características principales.
- c) Parámetros de validación: Breve descripción de las pruebas estadísticas empleadas para los parámetros y lo que se desea obtener para cumplir con dichas prueba.
- d) Resultados de los parámetros de validación: Presentación de los resultados finales de las pruebas.
- e) Criterios de aseguramiento de calidad: Resumen de los criterios obtenidos a partir de los resultados de la validación.
- f) Criterios de revalidación.

- g) Frecuencia de revalidación.
- h) Conclusiones.

1.5. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

La validación de un método de ensayo involucra el estudio de parámetros descritos a continuación y puede ser necesario evaluar todos o una parte de ellos dependiendo del tipo de método de ensayo con la finalidad de cumplir con el requisito 5.4 y 5.2 de la NTP ISO/IEC 17025:2006.

1.5.1. INTERVALO DE TRABAJO Y LINEALIDAD

1.5.1.1. INTERVALO DE TRABAJO

El intervalo de trabajo se define por el rango de muestras que se analizaran en el día a día. En la parte experimental se muestra el rango de valores que el cliente solicita históricamente.

1.5.1.2. LINEALIDAD

El análisis estadístico y los criterios de aceptación para evaluar la regresión lineal, el desvío de linealidad, la convergencia al origen y los límites de confianza para la recta, incluye las siguientes pruebas de hipótesis:

- 1.- Prueba de Hipótesis del Pendiente: $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tablas}}$
- 2.- Prueba de Límite de confianza para el Intercepto: $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tablas}}$
- 3.- Prueba de Hipótesis de la Coeficiente de Correlación: $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tablas}}$
- 4.- Prueba de Hipótesis para demostrar regresión y desvío de linealidad:

Regresión: $f_{\text{calculado}} > f_{\text{tablas}}$

Linealidad: $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tablas}}$

1.5.2. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

El límite de detección de un procedimiento analítico es la menor cantidad de analito en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

Para calcular el LDM se analizan 10 blancos independientes con la mínima concentración aceptable, siendo el límite de detección del método igual a la suma del promedio de los blancos fortificados más 3 veces la desviación estándar de los mismos.

$$LDM = X + 3S \quad (1.3)$$

Donde:

LDM: Limite de detección del método.

X: Promedio de los blancos fortificados.

S: Desviación estándar de los blancos fortificados.

Criterios de Decisión:

Si $10 * LDM < \text{Tolerancia restringida} \Rightarrow$ Se acepta el valor como límite de detección.

Si $10 * LDM > \text{Tolerancia restringida} \Rightarrow$ Se rechaza el valor como límite de detección.

1.5.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO

El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que puede ser determinada con un nivel de precisión y veracidad aceptables.

Para calcular el LCM se analizan 10 blancos independientes con la mínima concentración aceptable, siendo el límite de cuantificación del método igual a la suma del promedio de los blancos fortificados más 10 veces la desviación estándar de los mismos.

$$LCM = X + 10S \quad (1.4)$$

Donde:

LCM: Limite de cuantificación del método.

X: Promedio de los blancos fortificados.

S: Desviación estándar de los blancos fortificados.

La aprobación del límite de cuantificación queda sujeta a la evaluación del límite de detección.

1.5.4. SENSIBILIDAD DEL MÉTODO

La sensibilidad es cuantificada mediante el coeficiente de sensibilidad que es determinado de la siguiente manera:

$$Sensibilidad = \frac{\partial \text{Respuesta}}{\partial \text{Concentración}} = \frac{\partial Y}{\partial X}$$

Siendo el coeficiente de sensibilidad la pendiente de la recta de calibración.

1.5.5. PRECISIÓN - REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Las medidas de precisión más comunes son la precisión de repetibilidad y la precisión por reproducibilidad. Se diferencian por las condiciones en que son empleadas.

La precisión de repetibilidad está definida como aquella variabilidad mínima cuando se trabaja con un solo analista, con un solo equipo y en un corto intervalo de tiempo. Y la precisión de reproducibilidad como aquella variabilidad cuando se trabaja con diferentes analistas, distintos laboratorios y con periodos de tiempo mayores.

La precisión se calculará de acuerdo a los lineamientos de la ISO 5725-2 mediante una prueba inter-analistas donde se obtiene resultados de distintos analistas en muestras en distintos niveles de concentración. Es necesario calcular para el propósito las varianzas de repetibilidad (S_r), reproducibilidad (S_R) y entre laboratorios (S_L).

La varianza de repetibilidad está definida de la siguiente manera:

$$S_r^2 = \frac{\sum (n - 1) * S_i^2}{\sum (n - 1)} \quad (1.5)$$

Donde:

S_r : Varianza de repetibilidad.

S_i : Es la varianza de un analista i en un nivel de concentración j .

n : Es el número de réplicas de la medición.

La varianza entre laboratorios está definida de la siguiente forma:

$$S_d^2 = \left(\frac{1}{p-1} \right) * \sum n_i * (X_i - \bar{X}_i)^2 \quad (1.6)$$

$$n_j = \left(\frac{1}{p-1} \right) * \left[\sum n_i - \frac{\sum n_i^2}{\sum n_i} \right] \quad (1.7)$$

$$S_L^2 = \frac{S_d^2 - S_r^2}{n_j} \quad (1.8)$$

Donde:

S_L : Varianza entre laboratorios.

p : Es el número de analistas por nivel de concentración.

n_i : Es el número de réplicas de la medición.

X_i : Concentración en un nivel por analista.

\bar{x} : Promedio de las concentraciones por nivel.

Si debido a efectos aleatorios se obtiene un valor negativo se asume el valor cero [11] para S_L .

La varianza de reproducibilidad está definida de la siguiente forma:

$$S_R^2 = S_r^2 + S_L^2 \quad (1.9)$$

Donde:

S_R : Varianza de reproducibilidad.

La precisión puede ser expresada en términos de la desviación estándar relativa de repetibilidad (RSD_r) y la desviación estándar relativa de reproducibilidad (RSD_R):

$$RSD_r = \frac{S_r}{\bar{X}} \cdot 100\% \quad (1.10)$$

$$RSD_R = \frac{S_R}{\bar{X}} \cdot 100\% \quad (1.11)$$

Criterios de Decisión:

- Si el RSD_r es menor al 5% => se acepta el valor de la precisión de repetibilidad.
- Si el RSD_R es menor al 10% => se acepta el valor de la precisión de reproducibilidad.

1.5.6. VERACIDAD (SESGO)

La veracidad o el sesgo del método es la comparación entre el promedio de mediciones de un material de valor conocido y el promedio del certificado de dicho material de referencia.

La evaluación de la veracidad consta de realizar 10 mediciones de un material de referencia certificado (MRC) y comparar los promedios mediante la prueba t de student.

$$t = \frac{y - \mu}{s/\sqrt{n}} \quad (1.12)$$

y: Media de los resultados obtenidos.

μ : Valor del Material de Referencia.

s: Desviación Estándar de los resultados.

n: Números de datos por analista.

Criterios de Decisión:

- Si el valor de t calculado es $<$ a t tabulado => Los promedios son estadísticamente equivalentes.
- Si el valor de t calculado es $>$ a t tabulado => Los promedios no son estadísticamente equivalentes.

1.5.7. SELECTIVIDAD

La selectividad o especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad del método en presencia de interferencias.

Si las interferencias están presentes y no pueden ser separadas del analito o no son conocidas pueden tener efectos negativos en el análisis como los siguientes:

- Distorsionar la señal.
- Suprimir la señal del analito.

La selectividad del método se comprueba:

- Comparando los resultados de los análisis de un material de referencia empleando el procedimiento analítico adicionando una cantidad conocida de un interferente.
- Realizar 7 análisis del material de referencia con cada procedimiento analítico.
- Obtener los datos del valor promedio y la desviación estándar para cada grupo.
- Realizar la comparación de medias mediante la prueba t student presentada en 1.8.6.

Las hipótesis de la prueba son: H_0 : El interferente no afecta el resultado.

H_1 : El interferente afecta el resultado.

Criterios de Decisión:

Si t calculado es $< a$ t tablas \Rightarrow Se acepta H_0 y el interferente no afecta el resultado.

Si t calculado es $> a$ t tablas \Rightarrow Se rechaza H_0 y el interferente afecta el resultado.

1.5.8. ROBUSTEZ

En cualquier método analítico habrá ciertas etapas las cuales si no se llevan con suficiente cuidado, tendrán efectos adversos en el desempeño del método y en los resultados.

Estas etapas deben identificarse como parte del desarrollo del método y de ser posible evaluar su influencia mediante pruebas de robustez. Esto involucra hacer variaciones deliberadas al método y evaluar el efecto en el desempeño.

De esta forma se identifica que variables afectan el desempeño del método y en base a ello tomar medidas para controlarlas.

Para la determinación de la robustez emplearemos la prueba de Youden & Steiner quien define un mapa de diseño de trabajo para la evaluación de la robustez de un método de ensayo como el de la *figura 1.10: Diseño de la prueba de Youden & Steiner*.

Parámetro (Pi)	Máximo valor	Mínimo valor	Ensayo							
			1	2	3	4	5	6	7	8
P1	A	a	A	A	A	A	a	a	a	a
P2	B	b	B	B	b	b	B	B	b	b
P3	C	c	C	c	C	c	C	c	C	c
P4	D	d	D	D	d	d	d	d	D	D
P5	E	e	E	e	E	e	e	E	e	E
P6	F	f	F	f	f	F	F	f	f	F
P7	G	g	G	g	g	G	g	G	G	g
Respuesta			s	t	u	v	w	x	y	z

Figura N° 1.5: Diseño de la prueba de Youden & Steiner.

La prueba consiste en evaluar mediante la diferencia absoluta entre el valor máximo y el valor mínimo para cada variable:

Pasos a Seguir:

- Se define los factores.
- Se elabora el Diagrama de Youden.
- Se realizan los ensayos experimentales.
- Evaluación de los resultados.

Se calcula A, B, C, D, E, F y G siguiendo la tabla de Youden, ejemplo:

$$A = (s + t + u + v) / 4 \quad (1.13)$$

Se calcula a, b, c, d, e, f, g siguiendo la tabla de Youden, ejemplo:

$$a = (w + x + y + z) / 4 \quad (1.14)$$

Se calcula las diferencias (D) para cada Factor ejemplo.

$$D = (A - a) \quad (1.15)$$

Se calcula para cada Factor el t calculado, se compara con

El t tablas con grados de libertad (n-1) al 95% donde n es el número de datos que se usó para determinar el valor de S_R .

$$t_{\text{calculado}} = (n^{1/2} \times D) / (2^{1/2} \times S) \quad (1.16)$$

Donde:

n= Número de Factores de Youden

D=Diferencia ejemplo (A-a)

S : Es la desviación estándar de reproducibilidad del método: (S= SR)

Si no pasa algún factor se concluye que el método no es robusto en ese Factor.

REGLA DE DECISIÓN:

Se acepta H_0 si $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabla}}$ para un nivel de confianza de 95%.

1.6. ATIPICIDAD Y CONSISTENCIA DE DATOS.

La mayoría de pruebas estadísticas requieren comprobar la atipicidad y la consistencia de los datos experimentales antes de realizar la prueba correspondiente al parámetro de validación. Entre los parámetros de validación que necesitan ser evaluadas tenemos: Precisión, Veracidad, Selectividad y la Incertidumbre.

Se utilizarán las siguientes herramientas estadísticas con sus respectivos criterios de decisión de acuerdo al número de analistas y observaciones:

1.6.1. EVALUACIÓN DE LA ATIPICIDAD.

Para evaluar la atipicidad tenemos las siguientes pruebas:

1.6.1.1.PRUEBA DE COCHRAN:

Tiene como finalidad determinar si existen datos atípicos mediante la evaluación de la mayor varianza de un conjunto de datos.

$$C_p = \frac{\max(s_{pi}^2)}{\sum s_{pi}^2} \quad (1.17)$$

Donde:

C_p : Es el valor estadístico de la prueba.

$\text{Max}(S_{pi}^2)$: Varianza máxima dentro del conjunto de datos.

ΣS_{pi}^2 : Es la suma de todas las varianzas de los conjuntos de datos.

Para la evaluación se compara el valor de C obtenido con el crítico de tablas al 5% y 1%.

Criterios de Decisión:

- Si el estadístico C es menor o igual al valor crítico al 5% es aceptado como correcto.
- Si el estadístico C es mayor al valor crítico al 5% pero menor o igual al valor crítico al 1% es considerado rezagado.
- Si el estadístico C es mayor que el valor crítico al 1% es considerado como valor atípico.

1.6.1.2.PRUEBA DE GRUBBS:

Tiene como finalidad determinar la presencia de datos atípicos en los resultados obtenidos por los analistas mediante la comparación de promedios.

$$G = \frac{\text{Max}|(x_p - \bar{x})|}{s} \quad (1.18)$$

Donde:

G: Es el valor estadístico de la prueba.

X_p : Es un valor promedio de los datos de un solo analista.

\bar{x} : Es el promedio de promedios o la gran media del conjunto de datos.

$\text{Max} | (X_p - \bar{X}) |$: Es la máxima diferencia entre uno de los promedios y la gran media.

s: desviación estándar.

Para la evaluación se compara el valor de G obtenido con el crítico de tablas al 5% y 1%.

Criterios de Decisión:

- Si el estadístico G es menor o igual al valor crítico al 5% es aceptado como correcto.
- Si el estadístico G es mayor al valor crítico al 5% pero menor o igual al valor crítico al 1% es considerado dudoso.
- Si el estadístico G es mayor que el valor crítico al 1% es considerado como valor atípico.

1.6.2. EVALUACIÓN DE LA CONSISTENCIA h Y k DE MANDEL.

Su propósito es probar que los datos son consistentes entre laboratorios y dentro de los laboratorios en varios niveles de concentración. En este caso se usara para probar la consistencia entre analistas y de un analista en particular.

El valor de h representa la consistencia estadística entre analistas, mientras que k representa la consistencia estadística interna de un analista.

1.6.2.1. EVALUACIÓN DEL h DE MANDEL.

El estadístico de consistencia h es un indicador de cómo el promedio de los resultados de un analista en particular se compara con el promedio del resto de los analistas y está definido por:

$$h_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j}{\sqrt{\frac{1}{p_j - 1} \sum_{i=1}^{p_j} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2}} \quad (1.19)$$

Donde:

h_{ij} : Valor estadístico de la prueba.

\bar{y}_{ij} : Promedio de los datos de un analista.

\bar{y}_j : Promedio de los promedios de todos los analistas.

p : Número de Analistas participantes.

Para la evaluación se compara el h obtenido por cada analista con el h crítico de tablas al nivel de significancia establecido.

1.6.2.2. EVALUACIÓN DEL k DE MANDEL:

El estadístico de consistencia k es un indicador de cómo la desviación estándar de repetibilidad de un analista en particular se compara con el resto de analistas. Está definido por:

$$k_{ij} = \frac{s_{ij} \sqrt{p_j}}{\sqrt{\sum s_{ij}^2}} \quad (1.20)$$

Donde:

k_{ij} : Valor estadístico de la prueba.

s_{ij} : Desviación estándar de los resultados de un analista en particular.

s_{ij}^2 : Varianza de los resultados de un analista en particular.

p : Número de Analistas participantes.

Para la evaluación se compara el k obtenido por cada analista con el k crítico de tablas al nivel de significancia establecido.

En ambos los casos, los valores de h y k deben ser inferiores a los nivel del 1% y 5 %, para considerar que el conjunto de datos es consistente.

Criterios de Decisión:

- Si h calculado $<$ h crítico, entonces el conjunto de valores es consistente entre analistas.
- Si k calculado $<$ k crítico, entonces el conjunto de valores es consistente dentro de los analistas.

1.7. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS METODOS DE ENSAYO (MÉTODO DE LA CAJA NEGRA)

Consiste en considerar el proceso analítico como un todo o “caja negra” en el que se introducen muestras y salen resultados asociados a dichas muestras. Se requiere suponer la máxima simplificación del proceso de etapa por etapa,

Considerando la totalidad del proceso analítico como una sola etapa en la que la incertidumbre se estima conjuntamente (se han agrupado todas las etapas del proceso analítico en una sola). El esquema se muestra en la Figura 1.6. Se utilizan, en primer lugar, los datos obtenidos durante el proceso de validación para demostrar la trazabilidad del proceso analítico desarrollándose de la siguiente manera:

1.7.1. VARIABILIDAD DEL PROCESO: (PRECISIÓN)

Se empleará un material de referencia tipo matriz para tal finalidad. Lo que interesa no es el resultado en sí, sino su variabilidad (en condiciones de reproducibilidad estadística). Como el MRC se trata de una muestra ideal (esencialmente homogénea y estable), lo que se evalúa con esta variabilidad es realmente la asociada al proceso analítico intrínsecamente (con independencia de las muestras). Es posible obtener una incertidumbre de tipo A por repeticiones de series estadísticas asociada al proceso de medida y que se representa por U_{PROCESO} .

1.7.2. TRAZABILIDAD: (VERACIDAD)

Habría que incorporar también (en este caso) la incertidumbre de tipo b que acompaña al valor certificado en el MRC (U_{MRC}).

1.7.3. MUESTRA

A continuación, hay que evaluar la incertidumbre que introducen las muestras reales que se van a analizar mediante ese proceso analítico. para ello conviene clasificar las potenciales muestras a analizar por tipos, niveles de concentración, etc. en tantos grupos como creamos necesario y, con cada uno de esos grupos de muestras reales, hacer repeticiones para estimar la variabilidad asociada a las muestras, representada por U_{MUESTRA} . La combinación de estas tres incertidumbres nos proporcionará la incertidumbre final:

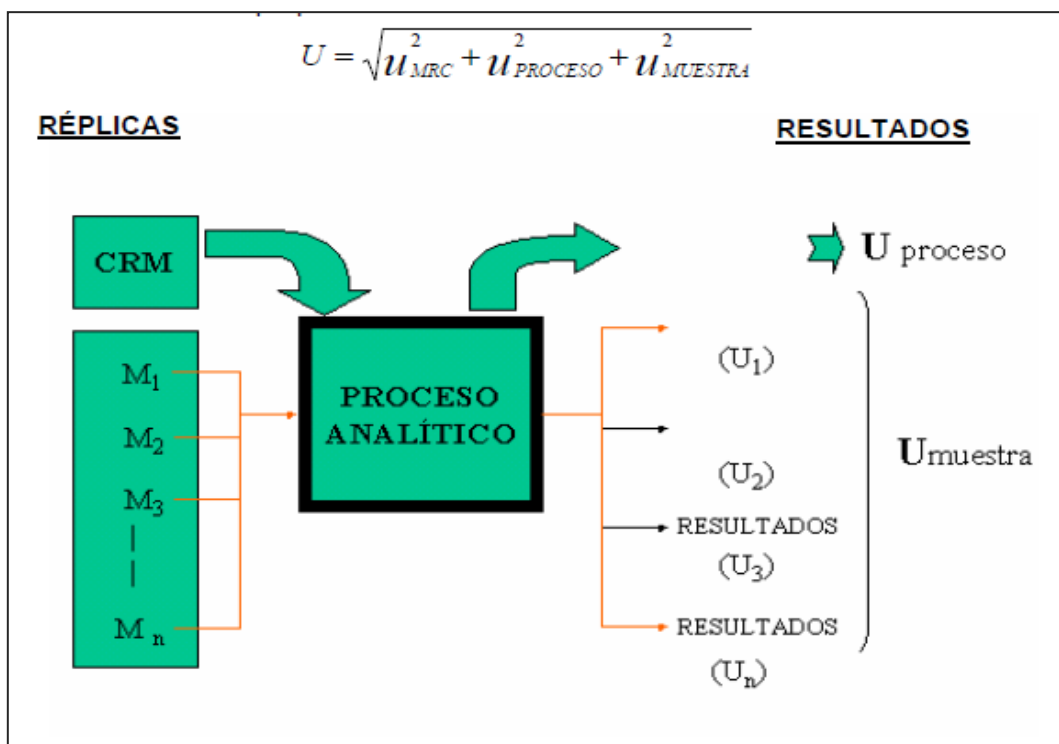


Figura 1.6:

Esquema para el cálculo de la Incertidumbre - Método caja negra

$U_{PROCESO} + U_{MUESTRA}$ = Variabilidad del Ensayo calculado en base a repeticiones realizadas en muestras (Por ejemplo S_R , RSD_R), es decir 1.7.1) y 1.7.3) son reemplazadas por la variabilidad y calcula en base a muestras no ideales sino reales.

En el análisis de rutina las muestras sólo son analizadas una vez, por lo que la incertidumbre anterior se asocian directamente a las determinaciones que se efectúan. El énfasis se pone en asegurar un valor realista de U_1 ya que nunca se podrían repetir un número significativo de determinaciones sobre la misma muestra para estimar una incertidumbre asociada a dicha muestra directamente.

Por tanto, si es muy conveniente establecer diversos valores de $U_{MUESTRA}$ (que será el término más importante en la expresión anterior). Así, por ejemplo, si el proceso analítico en cuestión es para la determinación de residuos de pesticidas en frutas, $U_{MUESTRA}$ puede ser diferente por tipo de fruta (naranjas, manzanas, melocotones, ciruelas, etc.) y, a su vez, dentro de cada tipo de fruta por niveles de concentración.

De esta forma, se puede caracterizar mejor la incertidumbre para cada tipo de muestra y nivel de concentración. Esta forma de proceder simplifica mucho el planteamiento para el cálculo de incertidumbres, lo hace más realista para ser abordado por laboratorios sin excesiva experiencia quimiométrica y, sobre todo, el sub-muestreo está claramente integrado en el proceso (que es causa de una gran variabilidad).

CAPITULO 2: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1. ALCANCE DEL MÉTODO DE ENSAYO

La presente metodología determina el contenido de Nitrógeno en Harina de pescado en los gases producidos de la combustión mediante un detector de conductividad térmica y que finalmente por un factor adecuado este se convierte a proteína.

2.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.2.1. EQUIPOS Y MATERIALES

Equipo analizador de Proteína vía Combustión, este instrumento esta equipado con las siguientes condiciones:

- Horno de Combustión: Para la combustión de la muestra en Oxígeno puro aproximadamente a 950°C.
- Horno de Reducción: Para convertir el gas NO_x en Nitrógeno aproximadamente a 750°C.
- Filtros de absorción de agua y CO₂.
- Detector: Detector de conductividad térmica para medir el contenido de Nitrógeno en la muestra.
- Balanza analítica con 1 mg de precisión.

2.2.2. REACTIVOS

- Estándar de Calibración EDTA LECO
- Estándar Lisina Clorhidrato
- Estándar Acido Nicotínico
- Oxígeno Puro (con un mínimo grado de 99.8%)
- Helio (con un mínimo grado de 99.9%)
- Aire Sintético

2.2.3. EXACTITUD DEL SISTEMA

La exactitud del sistema se demuestra efectuando 10 determinaciones sucesivas de Lisina Clorhidrato y 10 determinaciones sucesivas de Acido Nicotínico; el promedio de estas 10 determinaciones deben de estar dentro de ± 0.15 del valor teórico y sus desviaciones estándar deben ser menores de 0.15. Esta prueba de exactitud se realiza usando EDTA como estándar de calibración una vez al mes.

2.2.4. PRECISIÓN DEL PROCESO DE ANALISIS

La precisión del proceso de análisis se demuestra con la repetición del 10% del total de muestras analizadas.

2.2.5. ANALISIS DE MUESTRAS

- Analizar aproximadamente seis corridas de blancos(recomendado por el fabricante).
- Pesar aproximadamente 0.2 g de cuatro patrones de harina de pescado, de diferente nivel de proteína.
- Calibrar con los cuatro patrones iniciales, el cálculo es realizado por el software del equipo analizador de proteína y se expresa en % de Proteína.
- Pesar aproximadamente 0.2 g de muestra de harina de pescado.
- Colocar como mínimo un patrón de harina de pescado cada diez muestras.
- Realizar como mínimo el 10% de replicas de harina de pescado del total de muestras analizadas.
- Recalibrar las muestras con un mínimo de tres patrones de harina de pescado.

2.2.6. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El cálculo es realizado por el software del equipo analizador de proteína y se expresa en % de Proteína.

$$\text{Proteína Cruda (\%)} = \%N \times 6.25 \times Fc$$

Donde:

Fc: Factor de corrección *

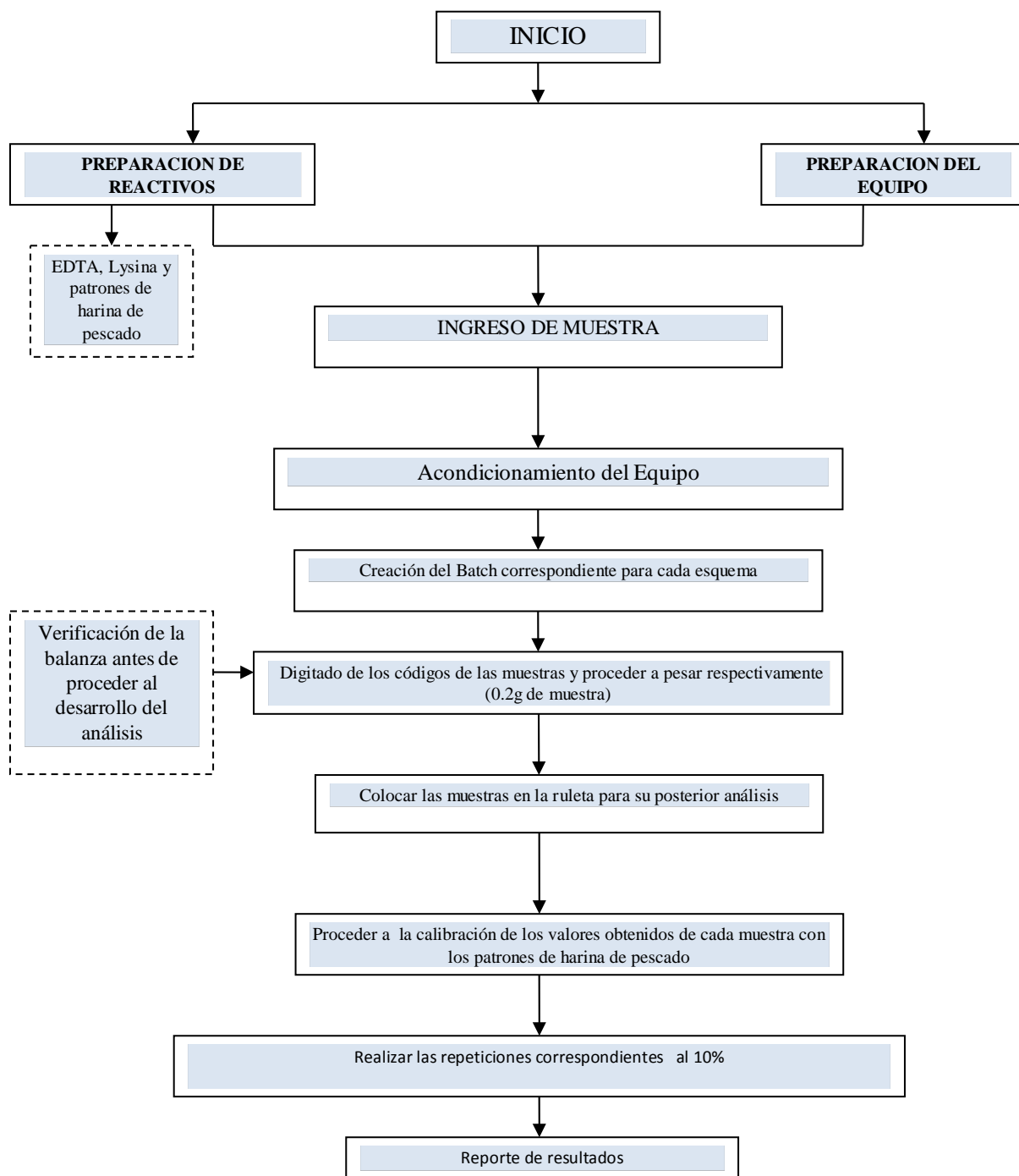
2.2.7. CONDICIONES AMBIENTALES

El Área donde se ubican los equipos como: Determinador de Nitrógeno, Balanza Analítica y reactivos como los solventes orgánicos y los estándares de calibración e internos tienen condiciones ambientales de temperatura y humedad específicas como lo indican los manuales del fabricante y certificados de análisis correspondientes.

2.2.8. CONDICIONES DE SEGURIDAD:

Para el manejo de reactivos y estándares se deben usar guantes de nitrilo o vinilo. En casos de mantenimiento de los sistemas como el de combustión o reducción los cuales están a altas temperaturas se deben usar guantes especiales de calor. El material particulado proveniente de la harina de pescado debe ser prevenido con mascarillas contra polvos.

2.3. DIAGRAMA DEL PROCESO EXPERIMENTAL



CAPITULO 3: OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

3.1. CONDICIONES INICIALES DEL EQUIPO:

A continuación se muestra las condiciones iniciales del equipo para asegurar el correcto funcionamiento del equipo.

Tabla N°3.1: Condiciones iniciales de funcionamiento

Range Limits

Parameters	Nominal Value	Range	Units
TC Cell Output	4.0	3.55 to 4.45	V
TC Cell Current	90	88 to 92	ma
System Pressure	Altitude Dependent	—	mmHg
Combustion Furnace Temp	850	825 to 875	°C
Reduction (Catalyst) Heater	750	725 to 750	°C
Flow Ctrl Temp	40	38 to 42	°C
Cold Junction	Ambient	—	—
Cooler Temp	5	2 to 10*	°C

**The ambient temperature must be below 30°C before the thermoelectric cooler will operate in this range.*

3.2. IDENTIFICACIÓN DE FUGAS EN LAS LINEAS DE GASES.

El leak check es una prueba que automáticamente chequea fugas de gas en el instrumento. Tenemos leak check para oxígeno y helio.

Todo leak check deberá presurizar el sistema y luego monitorearlo por 60 segundos, si la presión no varía en +/- 5 mmHg el equipo no tendrá fugas considerables.

The screenshot shows the FP-528 software interface. The main window displays a table of samples with columns for Row, Name, Method, Mass, Location, Protein %, and Nitrogen %. A large 'Protein %' label is visible at the bottom left. A 'Diagnostics' window is open, showing the 'Leak Check' progress for Oxygen. The window includes a 'View possible leak locations' button and a 'Close' button.

Row	Name	Method	Mass	Location	Protein %	Nitrogen %
187	EDTA 502-092 LOTE 1054	4036	0.2006	27	59.601	9.54
188	EDTA 502-092 LOTE 1054	4036	0.2007	28	59.687	9.55
189	HP LECO 88	4036	0.2002	29	67.175	10.7
190	HP LECO 88	4036				
191	HP LECO 88	4036				
192	HP LECO 88	4036				
193	HP LECO 88	4036				
194	HP LECO 88	4036				
195	HP LECO 89	4036				
196	EDTA 502-092 LOTE 1054	4036				
197*	EDTA 502-092 LOTE 1054	4036				

Protein %

Diagnostics (press Alt+F4 to close)

Leak Check | Ambients | Solenoids | Switches | Comport

Actions

Oxygen Leak Check

Ballast

Cooler

Furnace

Helium Leak Check

Stop Leak Check

View possible leak locations

View

Leak check progress

Checking

Oxygen

Starting system pressure: 819 mm Hg

Initial pressurization: 993 mm Hg

Current pressurization: 992 mm Hg

Change in pressurization: 1 mm Hg

Elapsed time: 69 sec.

Results

Oxygen: Passed

Close

Figura N°3.1: Diagnostico de fugas del Equipo Leco Modelo FP-528

3.3. MANTENIMIENTO DEL EQUIPO Y CAMBIO DE CONSUMIBLES

Todas las trampas del equipo tienen la misma dinámica y principio de manejo, el cual es alzar el tubo de cuarzo hacia arriba para desprender el o-ring inferior y seguidamente bajarlo de forma inclinada para poder sacarlo de su posición (como se indica en la figura del costado derecho).

Una vez con el tubo fuera se procede a desechar el contenido adecuadamente siguiendo especificaciones técnicas indicadas en cada HOJA DE DATOS DEL MATERIAL y luego se procede a llenarlo con material nuevo para ubicarlo en su respectiva posición.

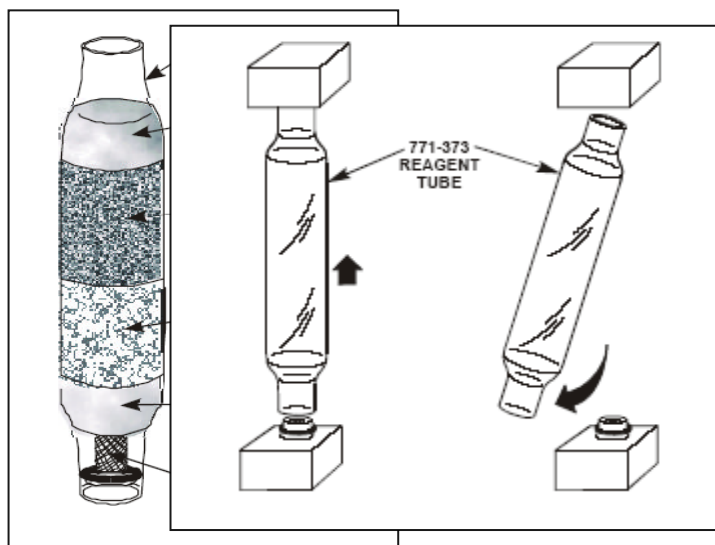


Figura N° 3.2: IZQUIERDA: Consumibles dentro de los filtros. DERECHA: Modo de cambiar los tubos de cuarzo del Equipo

3.4. VIDA UTIL DE LOS CONSUMIBLES

A medida que los consumibles son cambiados a tiempo, el equipo no presentara desviaciones que puedan alterar el resultado del contenido de Nitrógeno en las muestras analizadas. Por ello es importante determinar la vida útil de todos los consumibles utilizados en el equipo, de manera que se pueda anticipar el cambio preventivo de los mismos.

Se ha determinado que para un total de 5 mil a 6 mil análisis el cambio de los consumibles en el tubo de combustión debe ser realizado. De igual manera 3 mil análisis para el tubo de reducción y 2mil para los filtros de humedad y CO₂.

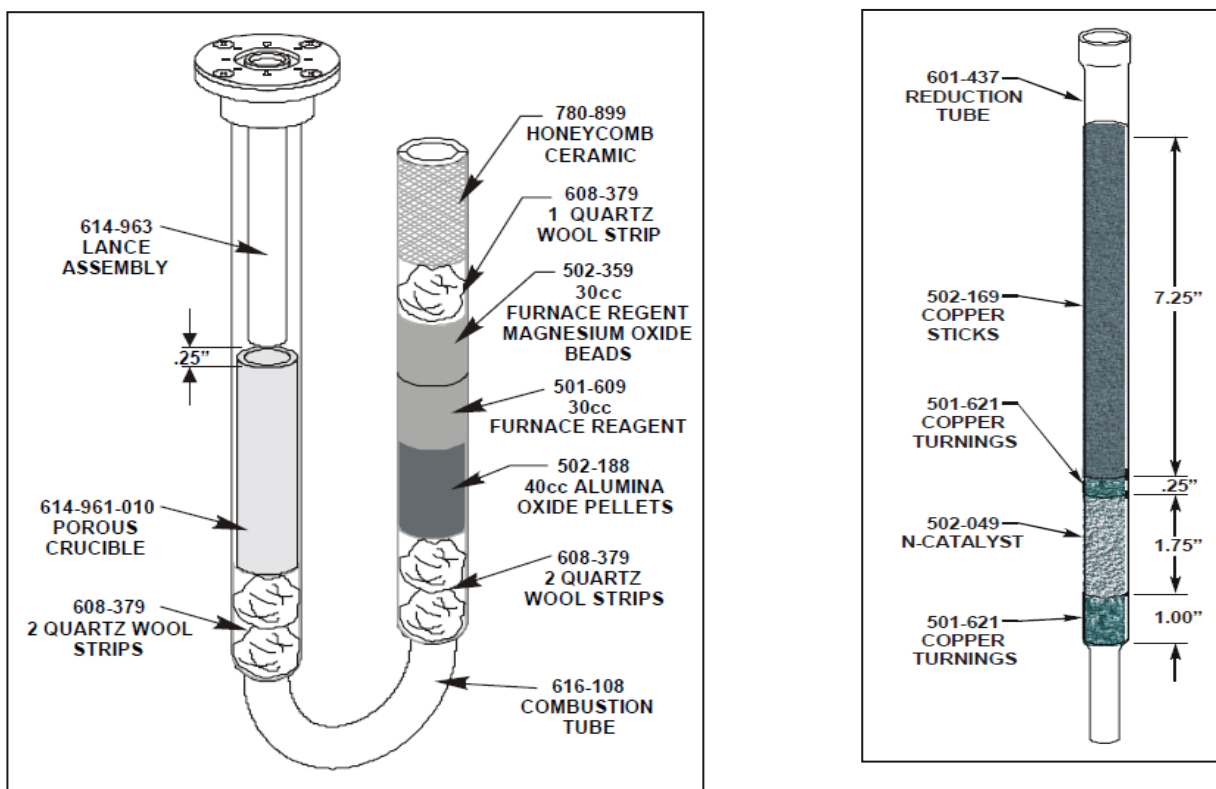


Figura N°3.3: IZQUIERDA: Reactivos del tubo de combustión. DERECHA: Consumibles del tubo de reducción

CAPITULO 4: VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

4.1. TABLA DE DATOS VÁLIDOS

Se seleccionan muestras de Harina de Pescado en diferentes niveles de concentración de proteína, los cuales se analizan por el método “Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl, realizándose seis lecturas por tres analistas.

Tabla N °4.1 Resultados obtenidos para ser usados en la validación.

Analista	1er	2do	3er	4to	5to	6to	Promedio General
	resultado	resultado	resultado	resultado	resultado	resultado	
	Nivel 1						
1	57.39	57.26	57.31	57.42	57.48	57.19	57.34
2	57.55	57.18	57.49	57.61	57.05	56.94	57.30
3	57.24	57.36	56.93	57.18	57.06	57.24	57.17
	Nivel 2						
1	63.50	63.44	63.37	63.41	63.61	63.49	63.47
2	63.85	63.50	63.50	64.01	63.60	63.91	63.73
3	63.39	63.90	63.78	63.38	63.36	63.57	63.56
	Nivel 3						
1	70.14	69.99	70.06	70.17	70.05	70.13	70.09
2	69.95	69.90	69.89	70.05	69.75	70.04	69.93
3	70.20	70.13	69.91	69.94	70.38	70.27	70.14
	Nivel 4						
1	76.45	76.35	76.46	76.49	76.71	76.47	76.49
2	76.03	76.07	76.36	76.25	76.27	76.43	76.23
3	76.20	76.43	76.27	76.40	76.35	76.31	76.33

4.2. ESCRUTINIO DE RESULTADOS PARA DETERMINAR LA CONSISTENCIA DE VALORES REZAGADOS, ERRÁTICOS O ATÍPICOS.

Esta evaluación se realiza antes de proceder a la evaluación estadística para eliminar datos inconsistentes

4.2.1. CÁLCULO DE LA ESTADÍSTICA DE CONSISTENCIA ENTRE LABORATORIOS (MANDEL: H) Y DE CONSISTENCIA DENTRO DE LABORATORIOS (MANDEL: K)

Los valores críticos y los resultados se presentan en la tabla N ° 4.2 y 4.3 respectivamente:

Tabla N °4.2. Valores Críticos h, k

Valores	h	k
1%	1.15	1.49
5%	1.15	1.37

Tabla N °4.3. Resultados de h y k para el ensayo de muestra realizadas con el método Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.

Muestras	Analista	h	k
1	1	0.77	0.55
	2	0.36	1.34
	3	-1.13	0.78
2	1	-0.89	0.43
	2	1.08	1.16
	3	-0.19	1.21
3	1	0.33	0.53
	2	-1.12	0.85
	3	0.79	1.31
4	1	1.07	0.97
	2	-0.90	1.27
	3	-0.17	0.67

En la tabla N° 4.3 se tienen los valores de h y k para cada muestra. Todos están dentro de los valores críticos tanto al 1% y al 5%.(No hay ningún valor inconsistente)

El análisis de los gráficos N° 4.1 y 4.2 de h y k indican que los resultados no son marcadamente diferentes de los otros, por tanto conservaremos los datos por el momento.

Figura N° 4.1.- Valores de h para los resultados de proteína

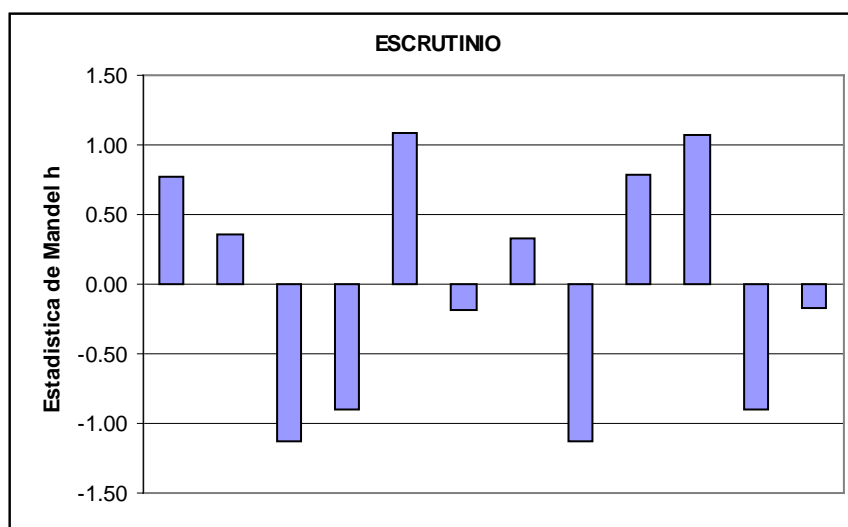
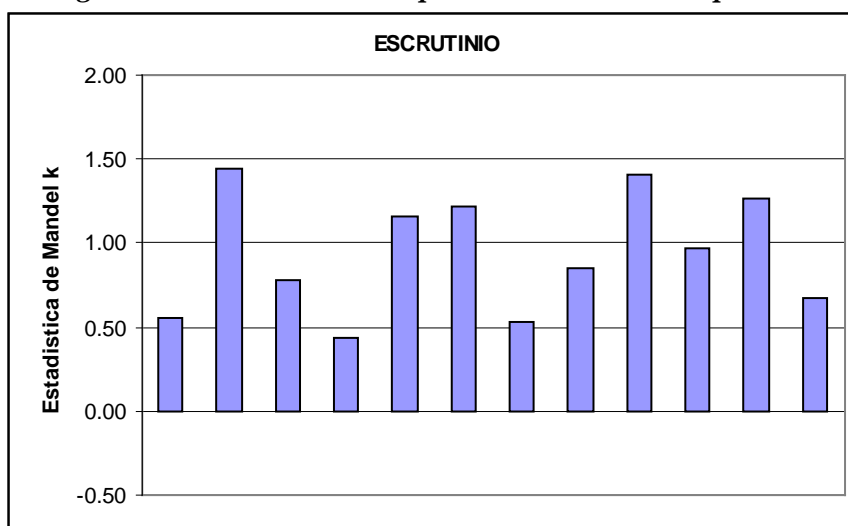


Figura N° 4.2. Valores de k para los resultados de proteína



4.2.2 PRUEBA NUMÉRICA PARA DAR VALIDEZ A LOS RESULTADOS - PRUEBA DE COCHRAN

Tabla N ° 4.4. Valores Críticos de la Prueba de Cochran

Valores Críticos	
1%	0.793
5%	0.707

Tabla N °4.5. Resultados de Cochran para el ensayo de muestras realizadas con el método Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.

Nivel	Promedio por analista	Prueba de Cochran
1	57.34	0.694
	57.30	
	57.17	
2	63.47	0.490
	63.73	
	63.56	
3	70.09	0.664
	69.93	
	70.14	
4	76.49	0.535
	76.23	
	76.33	

La aplicación de la prueba de Cochran muestra que no hay ningún valor rezagado. Todos los valores obtenidos están dentro de los valores críticos.

4.2.3 PRUEBA NUMÉRICA DE OBSERVACIÓN DE VALORES ERRÁTICOS O ATÍPICOS. PRUEBA DE GRUBBS

Tabla N ° 4.6. Valores Críticos de la prueba de Grubbs

Valores Críticos	
1%	1.155
5%	1.155

Tabla N °4.7. Resultados de Grubbs para el ensayo de muestras

Muestras	Promedio por analista	S	Prueba de Grubbs
1	57.34	0.11	0.773
	57.30	0.28	
	57.17	0.15	-1.129
2	63.47	0.08	1.080
	63.73	0.22	
	63.56	0.23	-0.894
3	70.09	0.07	0.792
	69.93	0.11	
	70.14	0.19	-1.124
4	76.49	0.12	1.074
	76.23	0.16	
	76.33	0.08	-0.904

La aplicación de la prueba de Grubbs muestra que no hay ningún valor errático o atípico.

4.3.NORMALIDAD Y HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS

4.3.1. NORMALIDAD DE LOS DATOS. PRUEBA DE ANDERSON-DARLING

Para evaluar si los datos generados siguen una distribución normal se utiliza el Test de Anderson-Darling. Esta prueba se realiza haciendo un histograma con los residuales de los datos obtenidos.

Asunción: La muestra es una muestra aleatoria

Hipótesis:

Ho: La muestra aleatoria tiene una distribución normal

Ha: La función de distribución de los Y no es normal

Regla de Decisión: Se rechaza H_0 a un nivel de significación aproximado de 0,05 si p-value es inferior a 0.05

En los gráficos obtenidos ($N = 3$) se observa los histogramas de los residuos que indica que la distribución de los mismos se ajusta de forma suficiente a la curva normal. La diagonal principal representa a la distribución normal teórica donde los residuos muestrales se ajustan a esta diagonal. En ninguno de los gráficos aparecen desviaciones entre ambas distribuciones (la teórica y la muestral)

Además, según el Test de Anderson-Darling se obtienen valores de p-value mayores de 0.05 por lo que las muestras tienen una distribución normal.

Tabla N ° 4.8. Residuales de los datos obtenidos por el método Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.

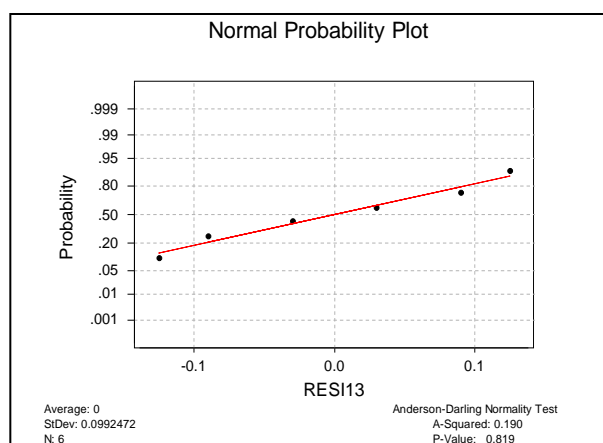
Muestra 1			Muestra 2		
Analista	Proteína %	RESI1	Analista	Proteína %	RESI1
1	57.388	0.048	1	63.497	0.030
1	57.260	-0.082	1	63.443	-0.030
1	57.311	-0.032	1	63.374	-0.100
1	57.415	0.078	1	63.409	-0.060
1	57.480	0.138	1	63.608	0.140
1	57.187	-0.152	1	63.493	0.020
2	57.546	0.247	2	63.849	0.122
2	57.182	-0.123	2	63.504	-0.228
2	57.486	0.187	2	63.500	-0.228
2	57.610	0.307	2	64.006	0.282
2	57.051	-0.253	2	63.599	-0.128
2	56.937	-0.363	2	63.906	0.182
3	57.237	0.072	3	63.391	-0.173
3	57.358	0.192	3	63.903	0.337
3	56.925	-0.238	3	63.776	0.217
3	57.182	0.012	3	63.378	-0.183
3	57.057	-0.108	3	63.361	-0.203
3	57.238	0.072	3	63.567	0.007

Muestra 3		
Analista	Proteína %	RES11
1	70.141	0.050
1	69.986	-0.100
1	70.057	-0.030
1	70.170	0.080
1	70.045	-0.040
1	70.126	0.040
2	69.954	0.020
2	69.903	-0.030
2	69.886	-0.040
2	70.045	0.120
2	69.746	-0.180
2	70.044	0.110
3	70.203	0.062
3	70.125	-0.008
3	69.910	-0.228
3	69.936	-0.198
3	70.379	0.242
3	70.271	0.132

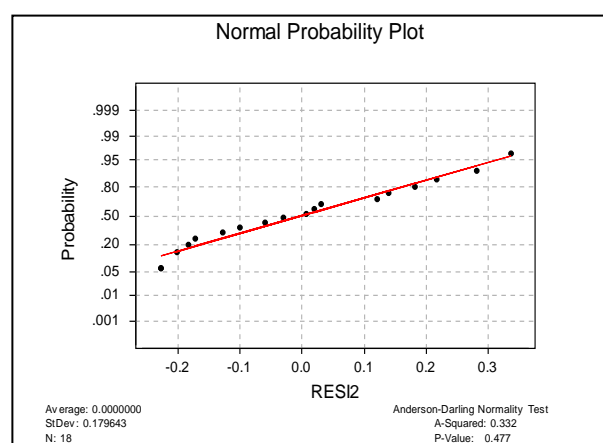
Muestra 4		
Analista	Proteína %	RES11
1	76.448	-0.038
1	76.351	-0.138
1	76.457	-0.028
1	76.492	0.002
1	76.714	0.222
1	76.468	-0.018
2	76.028	-0.205
2	76.066	-0.165
2	76.358	0.125
2	76.246	0.015
2	76.270	0.035
2	76.426	0.195
3	76.202	-0.127
3	76.426	0.103
3	76.270	-0.057
3	76.403	0.073
3	76.350	0.023
3	76.312	-0.017

Figura N°4.3.- Histogramas correspondientes a las muestras analizadas por el método

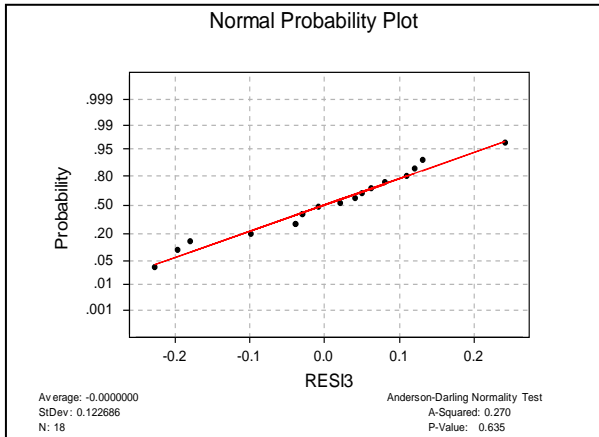
Muestra 1



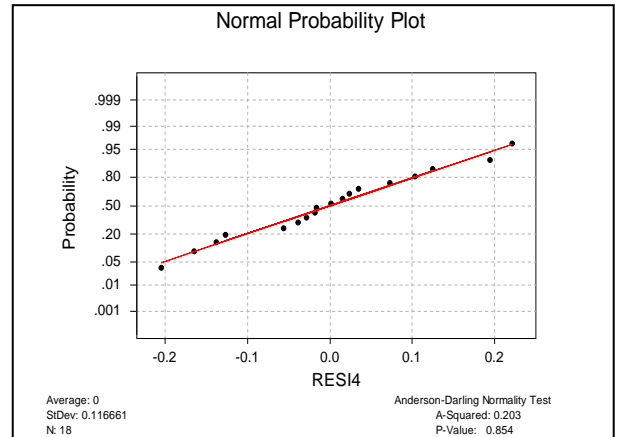
Muestra 2



Muestra 3



Muestra4



4.3.2. HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS

4.3.2.1 TÉCNICA NUMÉRICA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS. PRUEBA DE BARLETT

La estadística de la prueba es:

$$X_0^2 = 2.3026 * \frac{q}{c} \dots\dots\dots (1)$$

Donde $q = ((\sum(n_i) - p) * \text{Log}_{10}(S_p^2)) - (\sum(n_i - 1) * \log_{10} S_i^2) \dots\dots (2)$

$$c = 1 + \left(\frac{1}{3 * (p - 1)} \right) * (\sum(n_i - 1)^{-1} - (\sum(n_i) - p)^{-1}) \dots\dots (3)$$

$$S_p^2 = \frac{(\sum(n_i - 1) * S_i^2)}{\sum(n_i) - p} \dots\dots\dots (4)$$

Siendo:

S_i^2 : Varianza muestral de la i-ésima población.

N : Número de resultados de ensayo obtenidos por un analista en un nivel.

p : Número de analistas que participan en la prueba.

Grados de Libertad $(p-1) = 2$

$X_c^2 = 5.99$ (valor crítico)

Hipótesis

Ho : Existe Homogeneidad de variancias

Ha: Al menos una variancia es diferente de las demás

Regla de Decisión.-El valor de q es grande cuando hay una gran diferencia entre las variancias muestrales. S_i^2 y es igual a cero si todas las S_i^2 son iguales. Por lo tanto debe rechazarse Ho para valores grandes de X_0^2 , en otras palabras se rechaza Ho si:

$$X_0^2 \text{ mayor que } X_c^2$$

Tabla N °4.9. Resultados de la Prueba de Bartlet

Muestra	S_p^2	q	C	X_0^2	X_c^2
1	0.04	2.06	1.09	4.35	5.99
2	0.04	2.15	1.09	4.56	5.99
3	0.02	1.96	1.09	4.15	5.99
4	0.02	0.82	1.09	1.73	5.99

Como se puede observar en la tabla N °4.9, X_0^2 es menor que X_c^2 en todos los casos, por lo tanto se aprueba Ho: existe Homogeneidad de Variancias en las muestras trabajadas.

4.4. PRECISIÓN DEL MÉTODO

Luego de determinar que no existe ningún valor rezagado o atípico y además los resultados siguen un comportamiento normal se procede a determinar la precisión, hallando la desviación estándar de repetibilidad y reproducibilidad, así como también la desviación estándar relativa de repetibilidad y desviación estándar de reproducibilidad.

4.4.1 EVALUACIÓN DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REPETIBILIDAD Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REPRODUCIBILIDAD

Cálculo de la Media General (m), Desviación Estándar de Repetibilidad (S_r) y Reproducibilidad (S_R).

Tabla N ° 4.10. Resultados de la media general. Desviación Estándar de Repetibilidad y Reproducibilidad.

Nivel	Promedio de Analista			Promedio	S_r	S_R
	1	2	3			
1	57.34	57.30	57.17	57.27	0.196	0.201
2	63.47	63.73	63.56	63.59	0.190	0.217
3	70.09	69.93	70.14	70.05	0.132	0.162
4	76.49	76.23	76.33	76.35	0.124	0.172
				Media	0.160	0.188

Gráficamente se tiene:

Figura N °4.4. Tendencia de la Desviación Estándar de Repetibilidad

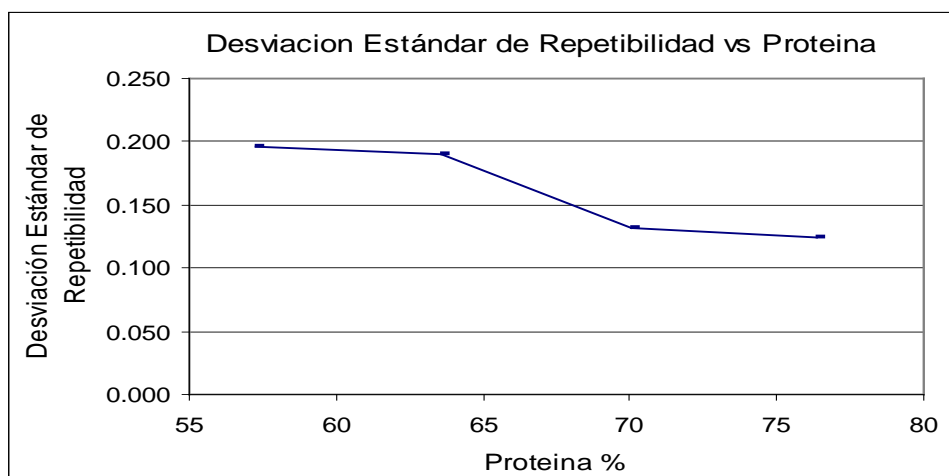
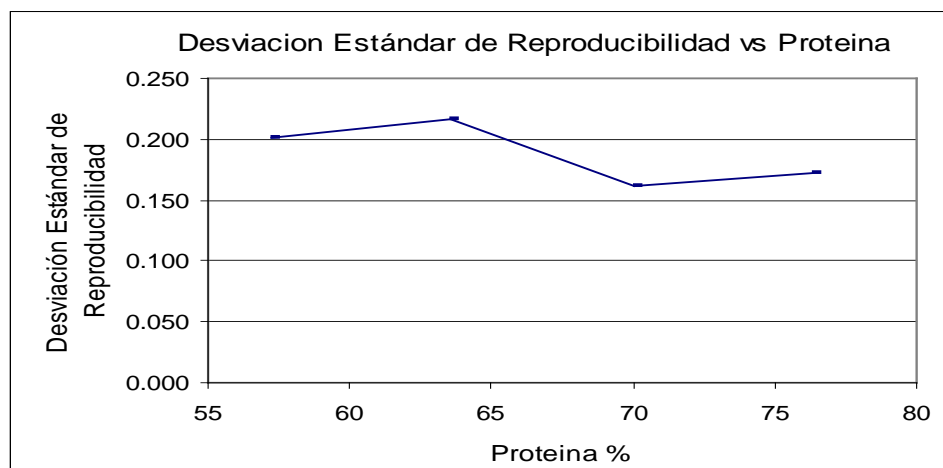


Figura N °4 5. Tendencia de la Desviación Estándar de Reproducibilidad



Del gráfico N °4.4 se tiene que la Desviación Estándar de Repetibilidad es el promedio: $S_r = 0.160$

De la misma manera se determina que no hay una tendencia de la Desviación Estándar de Reproducibilidad en los diferentes niveles de proteína por lo que se asume que es el promedio: $S_R = 0.188$

4.4.2. EVALUACIÓN DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE REPETIBILIDAD Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DEREPRODUCIBILIDAD.

Cálculo de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad (DSR_r) y Reproducibilidad (DSR_R).

Tabla N ° 4.11. Resultados de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad y Desviación Estándar de Reproducibilidad

Muestra	Promedio (%)	RSD _r	RSD _R
1	57.27	0.205	0.324
2	63.59	0.315	0.307
3	70.05	0.369	0.337
4	76.35	0.268	0.388
	Media	0.289	0.339

En los gráficos N° 4.6 y 4.7 se tiene la tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad y Reproducibilidad respectivamente. Se observa que no hay una tendencia en ambas desviaciones relativas por lo que:

La Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad es el promedio:

$$DSR_r = 0.289$$

Así como también la Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad:

$$DSR_R = 0.339$$

Figura N° 4.6.- Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad

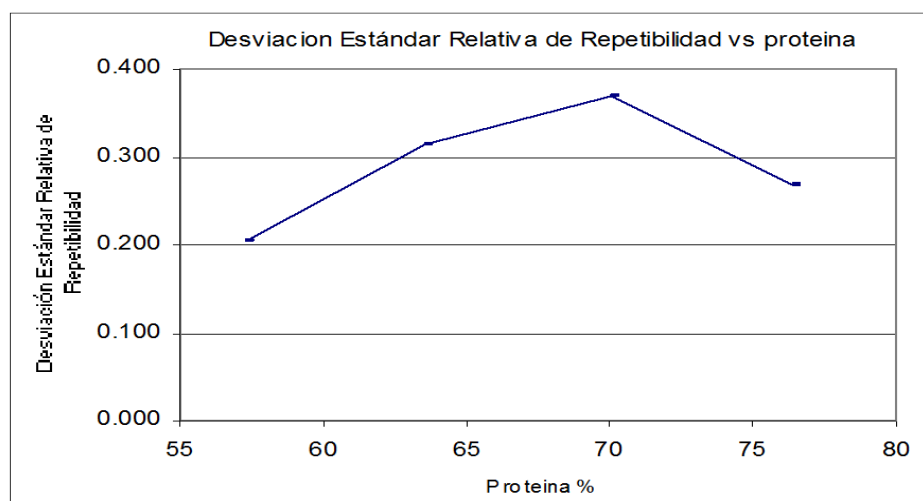
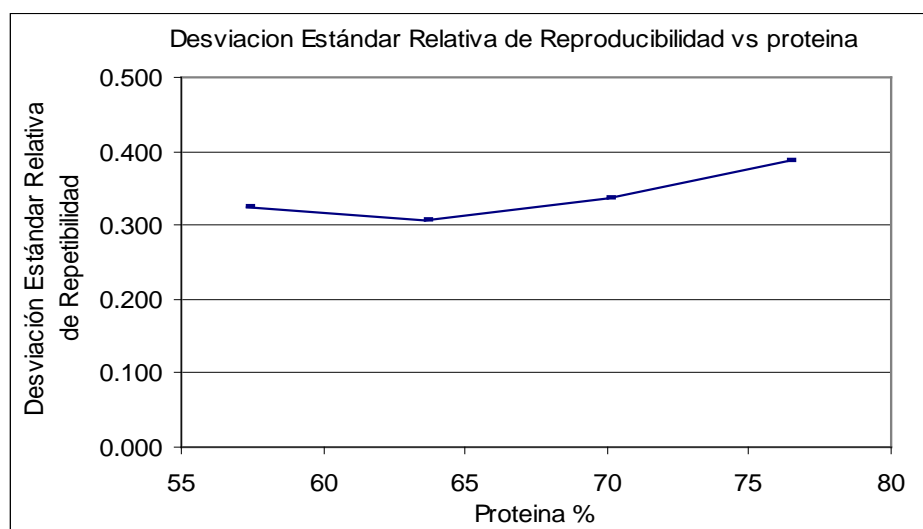


Figura N° 4.7.- Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad



4.4.3. EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Tabla N °12.- Repetibilidad y Reproducibilidad

Muestra	Promedio (%)	r	R
1	57.27	0.55	0.56
2	63.59	0.53	0.61
3	70.05	0.37	0.45
4	76.35	0.35	0.48
	Media	0.45	0.53

4.4.4. LÍMITE DE DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE REPETIBILIDAD Y LÍMITE DE DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE REPRODUCIBILIDAD

El Límite de Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad es:

$$\text{LDSR}_r = 2.8 \times \text{DSR}_r = 2.8 \times 0.289 = 0.810 \%$$

El Límite de Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad es:

$$\text{LDSR}_R = 2.8 \times \text{DSR}_R = 2.8 \times 0.339 = 0.949 \%$$

4.5. VERACIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO

4.5.1. COMPARACIÓN CON OTRO MÉTODO O UN VALOR DE REFERENCIA EN DOS O MÁS MUESTRAS DE DIFERENTE CONCENTRACIÓN T-PAREADA

Tabla N °4.13. Comparación del Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC(Dumas) vs Kjeldahl AOAC 984.13

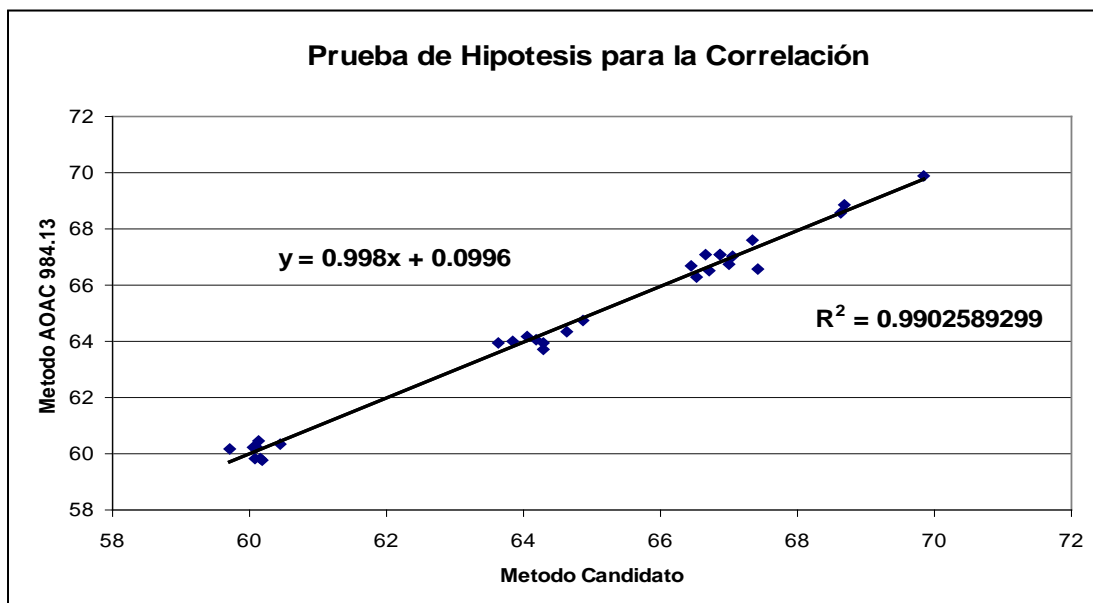
Muestra	Método <i>Kjeldahl</i> AOAC 984.13	Método Candidato <i>DUMAS</i>
1	60.23	60.11
2	64.77	64.88
3	66.27	66.52
4	63.98	63.83
5	66.59	67.41
6	60.35	60.45
7	63.92	64.29
8	60.24	60.04
9	63.74	64.29
10	66.52	66.72
11	59.83	60.17
12	60.44	60.13
13	63.94	63.63
14	67.01	67.05
15	64.32	64.64
16	64.04	64.18
17	66.75	66.99
18	67.11	66.67
19	59.77	60.19
20	68.56	68.63
21	67.10	66.86
22	67.10	66.86
23	60.18	59.71
24	69.88	69.83
25	64.15	64.05
26	66.68	66.44
27	67.62	67.35
28	59.85	60.09
29	68.85	68.68

4.5.2. PRUEBA DE HIPOPTESIS PARA LA CORRELACIÓN ENTRE METODOS

Ho: $r = 0$ (No existe correlación entre el método AOAC 984.13 y el método candidato)

Ho: $r \neq 0$ (Existe correlación lineal)

$$tr = \frac{r}{S_r} \quad S_r = \frac{1 - r^2}{N - 2} \quad r^2 = 0.9902589299, N = 29, r = 0.99511755$$



$$S_r = \frac{1 - r^2}{N - 2} = \frac{1 - 0.9902589299}{29 - 2} = 0.00036078$$

$$tr = \frac{0.99511755}{0.00036078} = 2758.24 \dots t \text{ calculado}$$

$$t \text{ tablas} = 2.052 (27, 0.025)$$

$t \text{ calculado} > t \text{ tablas}$ para $n-2$ grados de libertad a un nivel de significancia de 0.05 con dos colas.

Por lo tanto existe un grado de asociación entre el método AOAC 984.13 y el método de combustión de Dumas bajo el equipo FP-528 (Método Candidato)

Tabla N • 4.14. Resultados de Proteínas en porcentaje de muestras independientes y de los sesgos correspondientes.

Muestra	Método AOAC 984.13	Método Candidato	D abs
1	60.23	60.11	-0.118
2	64.77	64.88	0.109
3	66.27	66.52	0.252
4	59.88	60.30	0.422
5	63.98	63.83	-0.150
6	66.59	67.41	0.828

7	60.35	60.45	0.107
8	63.92	64.29	0.370
9	60.24	60.04	-0.191
10	63.74	64.29	0.558
11	66.52	66.72	0.203
12	59.83	60.17	0.345
13	60.44	60.13	-0.315
14	63.94	63.63	-0.303
15	67.01	67.05	0.041
16	64.32	64.64	0.328
17	64.04	64.18	0.149
18	66.75	66.99	0.246
19	67.11	66.67	-0.433
20	59.77	60.19	0.429
21	68.56	68.63	0.073
22	67.10	66.86	-0.237
23	60.18	59.71	-0.468
24	69.88	69.83	-0.046
25	64.15	64.05	-0.097
26	66.68	66.44	-0.244
27	67.62	67.35	-0.272
28	59.85	60.09	0.243
29	68.85	68.68	-0.168
Media			0.057
S.D			0.316

Realizando el escrutinio de resultados.

Tabla N° 4.15. Resultados de los sesgos después del escrutinio de resultados.

Muestra	Método AOAC 984.13	Método Dumas	d abs	h= 1.91
1	60.23	60.11	-0.118	-0.556

2	64.77	64.88	0.109	0.162
3	66.27	66.52	0.252	0.617
4	59.88	60.30	0.422	1.154
5	63.98	63.83	-0.15	-0.654
6	66.59	67.41	0.828	2.435
7	60.35	60.45	0.107	0.155
8	63.92	64.29	0.37	0.99
9	60.24	60.04	-0.191	-0.786
10	63.74	64.29	0.558	1.582
11	66.52	66.72	0.203	0.459
12	59.83	60.17	0.345	0.907
13	60.44	60.13	-0.315	-1.176
14	63.94	63.63	-0.303	-1.139
15	67.01	67.05	0.041	-0.05
16	64.32	64.64	0.328	0.854
17	64.04	64.18	0.149	0.29
18	66.75	66.99	0.246	0.598
19	67.11	66.67	-0.433	-1.548
20	59.77	60.19	0.429	1.176
21	68.56	68.63	0.073	0.051
22	67.10	66.86	-0.237	-0.932
23	60.18	59.71	-0.468	-1.66
24	69.88	69.83	-0.046	-0.328
25	64.15	64.05	-0.097	-0.489
26	66.68	66.44	-0.244	-0.951
27	67.62	67.35	-0.272	-1.039
28	59.85	60.09	0.243	0.587
29	68.85	68.68	-0.168	-0.71
		Media	0.057	
		S.D	0.316	
		n (datos)	29	

Tabla N° 4.16. Resultados de la homogeneidad de los sesgos después del escrutinio de resultados

Muestra	Método AOAC 984.13	Método Armonizado	D abs	h= 1.91
1	60.23	60.11	-0.118	-0.556
2	64.77	64.88	0.109	0.162
3	66.27	66.52	0.252	0.617
4	59.88	60.30	0.422	1.154
5	63.98	63.83	-0.15	-0.654
6	66.59	67.41	0.828	2.435
7	60.35	60.45	0.107	0.155
8	63.92	64.29	0.37	0.99
9	60.24	60.04	-0.191	-0.786
10	63.74	64.29	0.558	1.582
11	66.52	66.72	0.203	0.459
12	59.83	60.17	0.345	0.907
13	60.44	60.13	-0.315	-1.176
14	63.94	63.63	-0.303	-1.139
15	67.01	67.05	0.041	-0.05
16	64.32	64.64	0.328	0.854
17	64.04	64.18	0.149	0.29
18	66.75	66.99	0.246	0.598
19	67.11	66.67	-0.433	-1.548
20	59.77	60.19	0.429	1.176
21	68.56	68.63	0.073	0.051
22	67.10	66.86	-0.237	-0.932
23	60.18	59.71	-0.468	-1.66
24	69.88	69.83	-0.046	-0.328
25	64.15	64.05	-0.097	-0.489
26	66.68	66.44	-0.244	-0.951
27	67.62	67.35	-0.272	-1.039
28	59.85	60.09	0.243	0.587
29	68.85	68.68	-0.168	-0.71

Media	0.030
S _d	0.285
n (datos)	28

Hipótesis planteada:

Hipótesis planteada ó nula H₀: d = 0

Hipótesis alternativa H₁ :d ≠ 0

Criterio de Evaluación: t_{exp.} < t_{critico}

Una cola: α

Dos colas: α/2

Realizando los cálculos y utilizando los datos de la tabla N °4.16 según la prueba estadística se tiene:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{d}}{S_d / \sqrt{n}} \qquad t_{\text{exp}} = \frac{0.030}{0.285 / \sqrt{28}}$$

$$t_{\text{exp}} = 0.553 \qquad \text{y} \qquad t_{\text{crítico}} = 1.703 \text{ (g.l: n-1, 0.05)}$$

Por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula y, por tanto los métodos conducen a los mismos resultados (existe trazabilidad entre ellos para un 95% de nivel de confianza).

4.5.3. DETERMINACIÓN DE SESGO DE LABORATORIO

$$\text{Sesgo} = \bar{d} \pm \frac{t_{\text{exp}} * S_d}{\sqrt{n}}$$

Utilizando los datos de la tabla N °4.16 se realiza el cálculo del sesgo:

$$\text{Sesgo} = 0.030 \pm \frac{0.553 * 0.285}{\sqrt{2}}$$

$$\text{Sesgo} = 0.030 \pm 0.11 \quad (-0.08....0.14)$$

El intervalo de confianza cubre el valor cero, entonces el sesgo de laboratorio no es significativo.

4.6 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO – METODO DE LA CAJA NEGRA

4.6.1 FUENTES DE INCERTIDUMBRE

4.6.1.1 INCERTIDUMBRE DE LA MUESTRA

Fuente:

Tabla N° 4.17 Resultados de proteína del patrón HPLECO por el método Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl

Día 1 Analista 1	Día 2 Analista 2	Día 3 Analista 3
71.98	72.11	71.95
72.08	72.15	72.16
72.12	72.16	72.20
72.15	72.14	72.11
72.11	72.08	72.27
72.18	72.09	72.14
72.02	72.08	72.20
71.97	72.20	72.30
72.11	72.02	72.25

Se tiene:

$$X = 72.12 \%$$

$$n = 27$$

$$s = 0.08709$$

$$u (\text{muestra}) = 2 \times s = 2 \times 0.08709 = 0.17418$$

4.6.1.2 INCERTIDUMBRE DEL PROCESO

Fuente: Estándar primario EDTA

Tabla N° 4.18. Valores obtenidos del Estándar primario de EDTA

EDTA, % Proteína			
59.865	59.788	59.729	59.745
59.692	59.974	59.866	59.711
60.110	59.632	60.021	59.763
60.027	59.787	60.026	59.859

Se tiene:

$$X = 59.85 \% \quad X \text{ Teórico} = 58.975 \% (9.58 \% \text{ Nitrógeno})$$

$$n = 16$$

$$s = 0.14328$$

$$u (\text{proceso}) = 2 \times s = 2 \times 0.14328 = 0.28656$$

4.6.1.3 INCERTIDUMBRE DE TRAZABILIDAD

Datos del certificado de análisis EDTA

$$X = 9.58 \%$$

$$2s = 0.04 \quad s = 0.02$$

$$n = 40$$

$$U \text{ trazabilidad} = \pm t \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

t tablas para n-1 grados de libertad a un nivel de significancia de 0.05 con una cola .

$$t \text{ tablas} = 1.684$$

$$U \text{ trazabilidad} = \pm 1.684 \times \frac{0.2}{\sqrt{40}}$$

$$U \text{ trazabilidad} = \pm 0.05325$$

4.6.2. INCERTIDUMBRE TOTAL

$$U \text{ (TOTAL): } \pm \sqrt{U(\text{muestra})^2 + U(\text{proceso})^2 + U(\text{trazabilidad})^2}$$

$$U \text{ (TOTAL): } \pm \sqrt{(0.17418)^2 + (0.28656)^2 + (0.05325)^2}$$

$$U \text{ (TOTAL): } \pm \sqrt{0.11529}$$

$$U \text{ (TOTAL): } \pm 0.34$$

4.7. LINEALIDAD DEL MÉTODO

El análisis estadístico y los criterios de aceptación para evaluar la regresión lineal, el desvío de linealidad, la convergencia al origen y los límites de confianza para la recta, incluye las siguientes pruebas de hipótesis:

- 1.- Prueba de Hipótesis del Pendiente: $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tablas}}$
- 2.- Prueba de Límite de confianza para el Intercepto: $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tablas}}$
- 3.- Prueba de Hipótesis de la Coeficiente de Correlación: $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tablas}}$
- 4.- Prueba de Hipótesis para demostrar regresión y desvío de linealidad:

Regresión: $f_{\text{calculado}} > f_{\text{tablas}}$

Linealidad: $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tablas}}$

4.7.1. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD

Tabla N °4.19 Curvas del estándar EDTA para evaluación de linealidad

Cantidad	% Proteína	Áreas
1	8.42	485450
2	8.54	492750
3	8.57	488250

4	8.45	484150
5	17.99	1040650
6	17.99	1041250
7	18.04	1034650

8	18.09	1036050
9	24.00	1393650
10	24.07	1388250
11	24.12	1378050
12	24.04	1379750
13	35.98	2074250
14	35.96	2075450
15	35.98	2063350
16	36.08	2064450
17	47.99	2765550
18	47.92	2758650
19	47.90	2747150
20	48.07	2754250
21	59.93	3442250
22	59.91	3446950
23	59.96	3436350
24	59.88	3432250
25	71.89	4137950
26	71.87	4130550
27	71.85	4122050
28	71.80	4121350
29	83.81	4808750
30	83.76	4815850
31	83.90	4809750
32	83.74	4805250

ESTANDAR EDTA LECO = 9.57% N₂ (Valor Teórico).

Análisis de la Regresión Lineal

Los resultados de la regresión lineal son:

Tabla. N °4.20 Análisis de Regresión Lineal

Parámetro	Coficiente	DS	t	P
Intercepto	2873	2280	1.26	0.217
Pendiente	57381.9	45.2	1269.45	0.000

$$S = 100 \quad R-Sq = 100\% \quad R-Sq(adj) = 100 \%$$

$$t_b = \frac{b - \beta}{S_b}$$

$$S_b$$

b = valor estimado de la pendiente = 57381.9

β = valor del parámetro pendiente

S_b = desviación estándar de la pendiente: 45.2

Hipótesis:

$H_0 : \beta = 0$ (Hipótesis nula)

$H_1 : \beta \neq 0$ (Hipótesis alternativa)

$$t_b = \frac{57381.9 - 0}{45.2}$$

$$t_b = 1269.45$$

Para $n-2 = 30$, se obtiene un t tabular con 30 grados de libertad bajo un nivel de significancia 0,05 con dos colas, se tiene:

$$t_{\text{tabular}} = 2.0423$$

Por lo tanto se rechaza la hipótesis planteada H_0 , de que la pendiente es igual a cero, debido a que $t_b = 1269.45 > t_{\text{tab.}} = 2.0423$ y se acepta la hipótesis alternativa de que existe la suficiente evidencia estadística para afirmar que la pendiente es significativamente diferente de cero.

Intervalo de Confianza para la pendiente

$$IC(\beta) = b \pm t \times S_b$$

Donde:

$$b = 57381.9$$

$$S_b = 45.2$$

$$t(n-2) = 2.0423$$

$$IC(\beta) = 57381.9 \pm 2.0423 \times 45.2$$

$$= 57381 \pm 92.32$$

Límite Superior: 57474

Límite Inferior : 57290

Prueba de Hipótesis para demostrar la convergencia al origen

$$t_a = \frac{a - \alpha}{S_a}$$

$$t_a = \frac{a - \alpha}{S_a}$$

a = valor estimado del intercepto = 2873

α = valor del parámetro intercepto = 0

S_a = desviación estándar del intercepto = 2280

Hipótesis:

H_0 : $\alpha = 0$ (Hipótesis nula)

H_1 : $\alpha \neq 0$ (Hipótesis alternativa)

$$t_a = \frac{2873 - 0}{2280}$$

$$t_a = 1.26$$

Para $n-2 = 30$, se obtiene un t tabular con 30 grados de libertad bajo un nivel de significancia 0,05 con dos colas, se tiene:

$$t_{\text{tabular}} = 2.0423$$

Por lo tanto se acepta la hipótesis nula, debido a que $t_a = 1.26 < t_{\text{tab.}} = 2.0423$, es decir que el valor de a no es significativamente diferente de cero, pasando por el origen.

Intervalo de Confianza para el intercepto

$$IC(\alpha) = a \pm t \times S_a$$

Donde:

$$\begin{aligned} a &= 2873 \\ S_a &= 2280 \end{aligned}$$

$$t(n-2) = 2.0423$$

$$IC(\beta) = 2873 \pm 2.0423 \times 2280$$

$$= 2873 \pm 4656$$

Límite Superior : 7529

Límite Inferior : -1783

Prueba de hipótesis para la correlación

$H_0 : r = 0$ (Hipótesis nula: no existe correlación entre X e Y)

$H_0 : r \neq 0$ (hipótesis alterna)

$$S_r = \sqrt{\frac{1-r^2}{N-2}}$$

Donde:

r = correlación lineal = 1.000

N = número de datos = 32

$$S_r = 0.00078$$

Prueba t :

$$T_r = \frac{\bar{x}}{S_r} = 1269$$

$$S_r$$

Para un $t_{\text{tabular}} = 2.0423 < 1269 = t_{\text{calculado}}$, existe un grado de asociación entre la concentración y el grado de respuesta. Cumple los requerimientos.

Prueba de hipótesis para demostrar regresión y desvío de linealidad

Para demostrar que la concentración de un compuesto influye en el resultado del ensayo y que esta relación es lineal, se realiza el análisis de varianza para la regresión lineal (relación F), el cual evalúa todas las fuentes, dentro de las respuestas para una misma concentración-replicas y entre las diferentes concentraciones.

Tabla. N °4.21. Análisis de varianza para demostrar regresión y desvío de linealidad

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados(SC)	Cuadrado Medio	F c	FT	Significancia	P-value
Regresión	1	6.62E+13	6.62E+13	1.61E+06	4.17	Significativa	0
Error Residual	30	1232228228	41074274				
Linealidad	28	1172643228	41880115	1.41	19.45	No significativa	0.5
Error Puro	2	59585000	29792500				
Total		6.62E+13					

Donde:
 $F_c =$ Valor F calculado

Para la regresión

Como $F_c = 1.61 \text{ E}+06 > 4,17$, entonces se concluye que la regresión es estadísticamente significativa, es decir que la variable concentración esta influyendo de manera significativa sobre el resultado del ensayo.

Para la Linealidad

Como $F_c = 1.41 < 19.45$ entonces se concluye que la falta de ajuste no es significativa y que la relación existente entre ambas variables es lineal.

4.8 .LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

4.8.1 LIMITE DE DETECCIÓN

Se determinará usando los datos del análisis de la regresión lineal de las curvas de calibración del estándar EDTA

Ecuación de regresión Lineal

$$Y = 2873 + 57382 X \dots\dots\dots(1)$$

Considerando las áreas de la concentración más baja:

Tabla. N °4.22. Áreas de concentración mas bajas

ST- 8.42 %	S_b
485450	3806.14
492750	
488250	
484150	

Según la ecuación siguiente: $LD = Y_b + 3S_b \dots\dots\dots(2)$

Para $X = 0$, $Y_b = \text{intercepto} = 2873$

S_b = Desviación Estándar de las áreas del estándar más bajo = 3806.14

Calculando el Limite de Detección en concentración, mediante la ecuación (2)

$LD = 2873 + (3 \times 3806.14) = 14291.2$ es el valor de Y en el limite de detección

Reemplazando en la ecuación (1), y despejando X:

$$X = \frac{Y - 2873}{57382} = \frac{14291.2 - 2873}{57382}$$

$X = 0.2$ % proteína

$LD = 0.03$ % nitrógeno

4.8.2. LIMITE DE CUANTIFICACION

Se determinará usando los datos del análisis de la regresión lineal de las curvas de calibración del estándar de EDTA

Usando la ecuación:

$$LC = Y_b + 10S_b \dots\dots\dots(3)$$

Para $X = 0$, Y_b = intercepto = 2873

S_b = Desviación estándar de las áreas del estándar más bajo = 3806.14

$Y = 40934$ el valor de Y en el limite de detección

Calculando el Limite de Cuantificación mediante la ecuación (3)

$$LC = Y_b + 10S_b = 2873 + (10 * 3806.14) = 40934$$

Reemplazando en la ecuación (1), y despejando X:

$$X = \frac{Y - 2873}{57382} = \frac{40934 - 2873}{57382}$$

$$X = 0.7 \text{ \% proteína}$$

$$LC = 0.1 \text{ \% nitrógeno}$$

Tabla N °4.2.3 Límites de Detección y Cuantificación

Límites	% proteína	% nitrógeno
Detección	0.2	0.03
Cuantificación	0.7	0.1

4.9. SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.

La sensibilidad del método está definida por la pendiente de la curva, entonces este es igual a:

Tabla N °4.24.- Datos de la Regresión Lineal

Parámetro	Coficiente	DS	t	P
Intercepto	2873	2280	1.26	0.217
Pendiente	57381.9	45.2	1269.45	0.000

$$\text{SENSIBILIDAD (LECO1)} = 57381.9$$

4.10. ROBUSTEZ DEL MÉTODO.

Se seleccionan muestras de harina de pescado en dos niveles de concentración.

Los factores que tendrían una incidencia mayor en los resultados de ensayo además de los niveles por cada factor, un nivel alto y uno bajo se muestran en la tabla N°4.25

	s	t	U	v	w	x	y	z

Tabla N °4.27. Resultados de las combinaciones para evaluación de la robustez

NIVEL	S	t	U	v	w	x	y	z
I	55.71	56.02	55.85	55.84	55.81	55.84	56.06	56.17
II	66.21	66.28	66.15	65.96	66.16	66.19	66.26	66.23

Cálculo del promedio de los análisis que contiene la variable en un nivel alto y en nivel bajo.

I) A partir de los resultados de cada variable se debe calcular el promedio de los análisis que contiene la variable en un valor más alto y el promedio que corresponde al valor más bajo.

Por ejemplo:

$$\frac{s + t + u + v}{4}$$

$$\text{II).- } t_{\text{calculado}} = (n^{1/2} \times D) / (2^{1/2} \times S_R)$$

Donde: n : Número de experimentos llevados a cabo para cada nivel y por cada factor

D: Diferencia calculada por cada factor

S_R: Desviación estándar de reproducibilidad 0.188

El t crítico: para n-1 gl al 95% de probabilidad = 2.36

La condición es que: t calculado < t crítico

Resultados de la Evaluación

Tabla N °4.28. Resultados del t calculado para el Nivel I

Primer nivel	Factor	55.71	56.02	55.85	55.84	55.81	55.84	56.06	56.17
				Prom.	D _{xi}	t calculado	Efecto Significativo al 95% t _{critico} = 2.36		
Peso de muestra : 0.215 g				55.86			t calculado < t _{critico}		
Peso de muestra : 0.185 g				55.97	0.116	0.82			
Presión del gas oxígeno : 45 psi				55.84			t calculado < t _{critico}		
presión del gas oxígeno : 35 psi				55.98	0.139	0.99			
Presión del gas helio : 45 psi				55.97					

presión del gas helio : 35 psi				55.86	0.108	0.77	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$
Temperatura de combustión : 955°C				55.99			$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$
Temperatura de combustión : 945°C				55.84	0.152	1.08	
Temperatura de reducción : 755°C				55.89			$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$
Temperatura de reducción : 745°C				55.93	0.042	0.3	
F				55.88			$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$
F				55.94	0.059	0.42	
G				55.86			$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$
G				55.96	0.101	0.72	

Tabla N°4.29.- Resultados del t calculado para el Nivel II

Segundo nivel	Factor	66.21	66.28	66.15	65.96	66.16	66.19	66.26	66.23
				Prom.	D_{x_i}	$t_{\text{calculado}}$	Efecto Significativo al 95% $t_{\text{critico}} = 2.36$		
Peso de muestra :0.215 g				66.15					
Peso de muestra :0.185 g				66.21	0.061	0.430	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$		
Presión del gas oxígeno : 45 psi				66.21					
presión del gas oxígeno : 35 psi				66.15	0.059	0.420	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$		
Presión del gas helio : 45 psi				66.16					
presión del gas helio : 35 psi				66.20	0.032	0.230	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$		
Temperatura de combustión : 955°C				66.25					
Temperatura de combustión : 945°C				66.11	0.135	0.960	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$		
Temperatura de reducción : 755°C				66.19					
Temperatura de reducción : 745°C				66.16	0.030	0.210	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$		
F				66.14					
F				66.22	0.078	0.560	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$		
G				66.16					
G				66.20	0.049	0.350	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$		

De los resultados obtenidos se concluye que el método es robusto para los 5 factores propuestos.

4.11. RANGO DEL MÉTODO

El intervalo de trabajo para el cual queda aprobado el método es de 57.30% hasta 83.74 % de proteína, en conformidad a los datos de la validación del presente método.

4.12. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

Para la evaluación de la selectividad del método se realizaron los siguientes ensayos:

- 7 blancos de Método
- 7 Blancos de muestra de concentración: 65.51%
- 7 Blancos de Patrón de concentración : 65.31 %

Tabla N °4.30. Resultados de la evaluación de la Selectividad

Selectividad – Valor Esperado	Número de muestra	Concentración Observado (%)
7 Blancos de método	1	0.0
	2	0.0
	3	0.0
	4	0.0
	5	0.0
	6	0.0
	7	0.0
7 Blancos de patrón de concentración 65.31%	1	65.32
	2	65.30
	3	65.34
	4	65.31
	5	65.29
	6	65.33
	7	65.32
7 Blancos de muestra de concentración positiva de 65.51%	1	65.51
	2	65.55
	3	65.52
	4	65.53
	5	65.51
	6	65.52
	7	65.50

Luego de esto se procede a evaluar los resultados.

Se observa que no existe interferencia alguna, el analito es el único responsable de la respuesta.

CAPITULO 5:
ASEGURAMIENTO DE
CALIDAD DEL METODO
DE ENSAYO

5.1. EXACTITUD DEL SISTEMA

La exactitud del sistema se demuestra efectuando 10 determinaciones sucesivas de Lisina Clorhidrato y 10 determinaciones sucesivas de Acido Nicotínico; el promedio de estas 10 determinaciones deben de estar dentro de ± 0.15 del valor teórico y sus desviaciones estándar deben ser menores de 0.15. Esta prueba de exactitud se realiza usando EDTA como estándar de calibración una vez al mes.

5.2. EVALUACIÓN DE DUPLICADOS.

Para ello evaluamos la precisión de los resultados en base a los parámetros de calidad hallados en la validación del método y son:

Parámetros Estadísticos	Proteína
Desviación Estándar de Repetibilidad	0.160
Desviación Estándar de Reproducibilidad	0.188
Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad	0.289
Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad	0.339
Repetibilidad	± 0.45
Reproducibilidad	± 0.53
Límite de Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad (LRSDr, %)	0.810%
Límite de Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad (LRSDR, %)	0.949%

5.3. EVALUACIÓN DEL MATERIAL DE REFERENCIA.

El material de referencia empleado en los análisis son compositos trazables al EDTA y validados previamente. Son 4 compositos en 4 niveles de contenido de proteína en %, de tal manera de cubrir el rango de trabajo del método. Los valores obtenidos son seguidos en el tiempo en cartas de control estableciéndose límites preventivos y límites de acción.

Media X (ppm)	Reproducibilidad RSD _R
59.16	0.337

RESULTADOS DE LA
EVALUACION

PATRON	PROMEDIO %	RSD _R %	Límites		LÍMITE S DE ACCIÓN %	LÍMITES PREVENTIVOS		LÍMITE S DE ACCIÓN %
			S _R *2 (preventivo) %	S _R *3 (acción) %		MAXIM O %	MÍNIM O %	
HP_1	59.16	0.337	0.40	0.60	59.76	59.56	58.76	58.56

Media X (ppm)	Reproducibilidad RSD _R
63.27	0.32

RESULTADOS DE LA
EVALUACION

PATRON	PROMEDIO %	RSD _R %	Límites		LÍMITE S DE ACCIÓN %	LÍMITES PREVENTIVOS		LÍMITE S DE ACCIÓN %
			S _R *2 (preventivo) %	S _R *3 (acción) %		MAXIMO %	MÍNIM O %	
HP_2	63.27	0.32	0.40	0.60	63.86	63.66	62.87	62.67

Media X (ppm)	Reproducibilidad RSD _R
66.43	0.30

RESULTADOS DE LA
EVALUACION

PATRON	PROMEDIO %	RSD _R %	Límites		LÍMITE S DE ACCIÓN %	LÍMITES PREVENTIVOS		LÍMITE S DE ACCIÓN %
			S _R *2 (preventivo) %	S _R *3 (acción) %		MAXIMO %	MÍNIM O %	
HP_3	66.43	0.30	0.40	0.60	67.03	66.83	66.04	65.84

Media	Reproducibilidad
-------	------------------

X (ppm)	RSD _R
70.12	0.29

RESULTADOS DE LA
EVALUACION

PATRON	PROMEDIO %	RSD _R %	Límites		LÍMITE S DE ACCIÓN %	LÍMITES PREVENTIV OS		LÍMITE S DE ACCIÓN %
			S _R *2 (preventivo) %	S _R *3 (acción) %		MAXIMO %	MÍNIM O %	
HP_4	70.12	0.29	0.40	0.60	70.73	70.53	69.72	69.52

CONCLUSIONES

Se implementó el método para la determinación de Proteínas en harina de pescado cruda mediante el principio de combustión (DUMAS) usando un detector de conductividad térmica siguiendo los lineamientos de la NTP ISO/IEC 17025:2006, validando el método y comprobando los parámetros de validación mediante pruebas estadísticas reconocidas y vigentes.

La precisión del método Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl es:

Parámetros Estadísticos	Proteína
Desviación Estándar de Repetibilidad	0.160
Desviación Estándar de Reproducibilidad	0.188
Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad	0.289
Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad	0.339
Repetibilidad	± 0.45
Reproducibilidad	± 0.53
Límite de Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad (LRSDr, %)	0.810%
Límite de Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad (LRSDR, %)	0.949%

La linealidad del método es:

Equipo LECO analizado con el estándar EDTA en el rango de 8.4% a 83.9% de proteína.

A un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, existe una gran regresión significativa entre X e Y, es decir que la variable influye significativamente sobre el resultado del ensayo.

La falta de ajuste es no significativa y la relación existente entre ambas variables es lineal.

El coeficiente de determinación r^2 es 1.000 ó 100.00 %, esto significa que el 100.00% de la variación en la respuesta del instrumento es debida a la variación en la concentración del analito.

La Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad es el promedio: $DSR_r = 0.289$. Así como también la Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad: $DSR_R = 0.339$. Los límites de DSR_r y DSR_R también fueron calculados.

El cálculo de la incertidumbre fue hallado mediante el método de la caja negra que toma como un todo al proceso analítico y es de 0.34%.

La selectividad y la robustez fueron evaluadas demostrando que el método es selectivo y robusto.

Por último, se establecieron controles de calidad como parte del aseguramiento de calidad comparando los obtenidos de la validación con los resultantes del monitoreo de datos mediante gráficos de control permitiendo acotar más los rangos de aceptación de cada control de calidad.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

[1] *Análisis de proteínas por el método Dumas por combustión*

<http://www.coasin.com.ar/notas/7/analisis-de-proteinas-por-el-metodo-dumas-por-combustion>

[2] *Situación y perspectiva de la harina de pescado*

http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2313/1/taliedo_es.pdf

[3] *View*

<http://www.leco.com/component/edocman/?task=document.viewdoc&id=12&Itemid=0>

[4] *Correlaciones con Kjeldahl/El método LECO DUMAS*

<http://inboxsa.wordpress.com/correlaciones-con-kjeldahl/>

[5] *Exportaciones de harina de pescado y aceite de pescado-Gestión*

<http://gestion.pe/economia/exportaciones-harina-y-aceite-pescado-no-recuperaran-este-ano-niveles-2012-2103048>

[6] *Utilización de la harina de pescado*

http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion_proteica_y_con_nitrogeno_no_proteico/49-harina_pescado.pdf

[7] Zaldivar Larrain, F. J. *Las harinas y aceites de pescado en la alimentación acuícola. En: Simposium internacional de Nutrición Acuícola (3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, México). Memorias. Eds. Cruz-Suárez, I. E.; Ricque- Maried, D.; Tapia- Salazar, M.; Gaxiola – Cortez, M.g.; Simoes, N. Cancún, México. p. 516- 527*

[8] *Harina de pescado, FEDNA*

http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-pescado-70913

[10] *FP528/LECO Instrumentos S.L.*

<http://es.leco-europe.com/product/fp528/>

[11] *Supplies for Organic Analysis*

http://uk.leco-europe.com/wp-content/uploads/leco_docs/product-files/Organic-Supplies-Catalog-203-828.pdf

[12] EURACHEM Guide: “*The fitness for purpose of analytical methods.*”