

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Química



“VALIDACIÓN Y OBTENCIÓN DE LA INCERTIDUMBRE PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEINA EN HARINA DE PESCADO, POR EL MÉTODO DUMAS (COMBUSTIÓN)”

INFORME DE COMPETENCIA PROFESIONAL
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA

Presentado por:

JOSÉ LUIS RAMIREZ CAMPOS

LIMA-PERU

2010

DEDICATORIA

Dedico mi informe de titulación a Dios quien me guía día tras día permitiéndome seguir adelante, a la memoria de mis tíos Víctor y Julia, sus consejos los llevo presentes en el corazón. A mis padres Honorato y Emiliana, hermanos Gino, Nelida y Etson por haberme apoyado en todo momento y a mi futura esposa Karina por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al apoyo de los profesores Adolfo la Rosa toro y Christian Jacinto por la paciencia, el apoyo y la orientación que me brindaron para realizar este trabajo.

Gracias a mis amigos por darme su apoyo moral y humano que me dieron fuerza y ganas de seguir adelante.

A todos, muchas gracias.

INDICE

RESUMEN DEL INFORME DE COMPETENCIA PROFESIONAL.....	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS.....	5
CAPITULO 1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	6
1.1 PROTEINA	7
1.2 MÉTODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEINA EN HARINA DE PESCADO.....	8
1.2.1 Determinación de nitrógeno en proteínas por el método de Kjeldahl	8
1.2.2 Determinación de nitrógeno en proteínas por el método de Dumas	9
1.3 TECNICAS DE VALIDACIÓN.....	10
1.3.1 Principales parámetros analíticos utilizados para la validación de un método de ensayo	11
1.4 HERRAMIENTAS DE LA VALIDACIÓN	18
1.5 INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN.....	19
1.5.1 El Mensurando	19
1.5.2 Modelo físico	20
1.5.3 Modelo matemático	20
1.5.4 Identificación de las fuentes de incertidumbre.....	21
1.5.5 Cuantificación.....	23
1.5.6 Distribuciones de probabilidad	25
1.5.7 Reducción	26
1.5.8 Combinación	27
1.5.9 Coeficiente de sensibilidad.....	28
1.5.10 Propagación de la incertidumbre para magnitudes de entrada no correlacionadas	28
1.5.11 Magnitudes de entrada relacionadas con más de una fuente de incertidumbre.....	29
1.5.12 Cálculo con incertidumbres relativas.....	30
1.5.13 Propagación de la incertidumbre para magnitudes de entrada correlacionadas	31
1.5.14 Incertidumbre expandida.....	32
1.5.15 Factor de cobertura y nivel de confianza.....	32
1.5.16 Distribución t de Student	33
1.5.17 Grados de libertad.....	34
1.5.18 Incertidumbre expandida.....	35
CAPÍTULO 2. DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PROTEINA EN MUESTRA DE HARINA DE PESCADO.....	44
2.1 PREPARACION DE LA MUESTRA DE HARINA DE PESCADO	45

2.2	ESCRUTINIO DE RESULTADOS PARA DETERMINAR LA CONSISTENCIA DE VALORES REZAGADOS, ERRÁTICOS O ATÍPICOS.....	46
2.3	NORMALIDAD Y HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS.....	52
2.4	PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	58
2.5	VERACIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO.....	62
2.6	INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO.....	70
2.7	COMPARACIÓN DE RESULTADOS EN LECO 1 CON EL LECO 2.....	78
2.8	LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	81
2.9	LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN EN LOS EQUIPOS LECO 1 Y LECO 2.....	92
2.10	SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.....	96
2.11	ROBUSTEZ DEL MÉTODO.....	97
2.12	RANGO DEL MÉTODO.....	102
	CONCLUSIONES.....	103
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	106

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Diagrama para la estimación de incertidumbres de la medición	22
Fig. 2. Diagrama de flujo del proceso de determinación de porcentaje de proteína en muestras de harina de pescado.....	40
Fig. 3 el sistema de chequeo del equipo para continuar con el análisis debe existir una diferencia de presión menor a 4 atm en un tiempo de análisis de 60 segundos. Para helio y oxígeno.	41
Fig. 4. Se analizan blancos para estabilizar al equipo y limpiar cualquier impureza que exista de algún análisis anterior, al finalizar el análisis de los blancos y obtener una diferencia entre los valores de los blancos menor a 0.05% de proteína se procede a analizar la curva de calibración. .	41
Fig. 5. Se realiza con estándares certificados o patrones caracterizados en el laboratorio que poseen una concentración de proteína caracterizada u con una variación ya determinada.	42
Fig. 6. Se pesa aproximadamente 0.2g. De muestra que luego es analizada por el equipo.	42
Fig. 7. El equipo lee el porcentaje de nitrógeno presente en la muestra y lo convierte a porcentaje de proteína multiplicando la cantidad de nitrógeno por el factor 6.25.....	43
Fig. 8. Valores de h para los resultados de proteína	48
Fig. 9 Valores de k para los resultados de proteína	48
Fig. 10 Gráficos de probabilidad que muestran la normalidad de los datos realizados en los cuatro niveles de concentración de proteína (tabla N° 12).....	55
Fig. 11. Tendencia de la Desviación Estándar de Repetibilidad (S_r)	58
Fig. 12. Tendencia de la Desviación Estándar de Reproducibilidad (SR)	59
Fig. 13 Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad.....	60
Fig. 14 Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad.....	61
Fig. 15. Prueba de correlación entre los métodos de Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl vs. AOAC 984.13.....	64
Fig. 16. Diagrama de causa y efecto para determinar las fuentes de incertidumbre que afectan al método de determinación de proteínas por el método Dumas.....	71

Fig. 17 Gráfico del aporte de las fuentes importantes de incertidumbre de la balanza. Donde se observa que la calibración de la balanza contribuye en mayor significancia a la incertidumbre. 75

Fig. 18. Comparación de resultados en ambos LECO 80

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: Prueba de Youden-Steiner para analizar los efectos de factores que influyen en el resultado del método.....	16
TABLA N° 2: Valores de $t_p(v_{ef})$ para $p=95,45\%$	36
TABLA N° 3: Estándares utilizados para el desarrollo del método: Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.....	38
TABLA NO 4: Reactivos utilizados para el desarrollo del método: Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.....	39
TABLA N° 5: Datos obtenidos por tres analistas en tres distintos niveles de concentración de proteínas.....	45
TABLA NO 6: Valores Críticos h, k	47
TABLA N° 7: 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.....	47
TABLA N° 8: Valores Críticos de la Prueba de Cochran.....	49
TABLA NO 9: 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.....	49
TABLA N° 10: Valores Críticos de la prueba de Grubbs.....	51
TABLA N° 11: Resultados de Grubbs para el ensayo de muestras.....	51
TABLA N° 12: Residuales de los datos obtenidos por el método Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.....	53
TABLA N° 13: Resultados de la Prueba de Bartlett.....	57
TABLA N° 14: Resultados de la media general. Desviación Estándar de Repetibilidad y Reproducibilidad.....	58

TABLA N° 15: Resultados de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad y Desviación Estándar de Reproducibilidad	59
TABLA N° 16: Resumen de la Repetibilidad y Reproducibilidad por niveles	61
TABLA N° 17: Comparación del Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl vs. AOAC 984.13	63
TABLA N° 18: Resultados de Proteínas en porcentaje de muestras independientes y de los sesgos correspondientes.....	65
TABLA N° 19: Resultados de los sesgos después del escrutinio de resultados.....	67
TABLA N° 20: Resultados de la homogeneidad de los sesgos después del escrutinio de resultados	68
TABLA N° 21: Curva de calibración mensual del equipo.....	75
TABLA N° 22: Resultados de los patrones obtenidos en LECO1	78
TABLA N° 23: Resultados de los patrones obtenidos en LECO2	79
TABLA N° 24: Análisis de varianza para comparación de resultados en ambos equipos LECO FP 528	81
TABLA N° 25: Curvas del estándar EDTA para evaluación de linealidad	82
TABLA N° 26: Análisis de Regresión Lineal LECO 1.....	83
TABLA N° 27: Análisis de varianza para demostrar regresión y desvío de linealidad en LECO1... 86	
TABLA N° 28: Curvas del estándar EDTA para evaluación de linealidad.....	87
TABLA N° 29: Análisis de Regresión Lineal	88
TABLA N° 30: Análisis de varianza para demostrar regresión y desvío de linealidad en LECO2... 91	
TABLA N° 31: Áreas de la concentración más baja del estándar	92
TABLA N° 32: Límites de Detección y Cuantificación AOAC 990.03:2000	94
TABLA N° 33: Áreas de la concentración más baja del estándar	94
TABLA N° 34: Límites de Detección y Cuantificación AOAC 990.03:2000.....	95
TABLA N° 35: Datos de la Regresión Lineal en LECO1	96
TABLA N° 36: Datos de la Regresión Lineal en LECO2.....	96

TABLA Nº 37: Factores a evaluar y niveles por cada factor.....	97
TABLA Nº 38: Combinación de Factores para la evacuación de la Robustez	98
TABLA Nº 39: Resultados de las combinaciones para evaluación de la robustez.....	98
TABLA Nº 40: Resultados del t calculado para el Nivel I	100
TABLA Nº 41: Resultados del t calculado para el Nivel II	101

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Método Kjeldahl.- Método de análisis de proteínas.

Método Dumas.- El método se basa en la destrucción de la materia orgánica a través de una combustión.

Validación.- Proceso de definición de las necesidades analíticas y la confirmación de que el método en cuestión ha considerado capacidades consistentes con las que la aplicación requiere.

Límite de detección.- Concentración más pequeña del analito o el valor de propiedad que puede ser confiablemente detectada por el método.

Límite de cuantificación.- Concentración más baja de analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y de veracidad.

Exactitud.- Cercanía de un resultado al valor verdadero.

Veracidad.- Comparación de los resultados promedio de un método con valores conocidos.

Sesgo.- Diferencia entre el valor promedio del método y el valor verdadero.

Precisión.- Dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud.

Repetibilidad.- Condiciones bajo las cuales se obtienen resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, en el mismo laboratorio, por el mismo operador usando el mismo equipo en intervalos de tiempo cortos.

Reproducibilidad.- Condiciones bajo las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, en un material idéntico, en diferentes laboratorios por diferentes operadores usando diferentes equipos.

Selectividad.- Habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés.

Sensibilidad.- Respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo.

Robustez.- Capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método.

Prueba de Youden-Steiner.- Método en el que pueden utilizarse ocho análisis distintos para determinar el efecto de la variación de siete etapas diferentes en un proceso analítico.

Prueba T de Student.- Determina las diferencias entre dos medias muestrales.

Incertidumbre.- Parámetro que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos razonablemente al mensurando.

Distribución normal.- Distribución normal, distribución de Gauss o distribución gaussiana, a una de las distribuciones de probabilidad de variable continua que con más frecuencia aparece en fenómenos reales.

Factor de cobertura k .- Factor que multiplica a la incertidumbre y esta íntimamente ligado al número de grados de libertad de la medición y el nivel de confianza con el que se desea reportar el resultado.

Coficiente de sensibilidad.- Describe, qué tan sensible es el mensurando con respecto a variaciones de la magnitud de entrada.

Grados de libertad.- Es un estimador del número de categorías independientes en una prueba particular o experimento estadístico.

Consistencia de datos.- Se determina utilizando los estadísticos de h y k de Mandel.

Prueba de Cochran.- Prueba estadística utilizada para identificar valores rezagados.

Prueba de Grubbs.- Prueba estadística utilizada para identificar datos anómalos.

Prueba de Anderson-Darling.- Evalúa si los datos generados siguen una distribución normal.

Prueba de Barlett.- Evalúa la Homogeneidad de Varianzas.

Hipótesis nula.- Hipótesis que se presume verdadera hasta que una evidencia estadística en la forma de una prueba empírica de la hipótesis indique lo contrario.

Hipótesis Alterna.- Es cualquier hipótesis que difiera de la hipótesis nula.

RESUMEN DEL INFORME DE COMPETENCIA PROFESIONAL

VALIDACIÓN Y OBTENCIÓN DE LA INCERTIDUMBRE PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA EN HARINA DE PESCADO, POR EL MÉTODO DUMAS (COMBUSTIÓN)

1. OBJETIVO

Establecer los requisitos de calidad para la determinación de Proteína en Harina de Pescado según el método AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl con el equipo Analizador de Nitrógeno / Proteína (LECO).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica a través de una combustión en una atmósfera rica en oxígeno. Todo el producto de la combustión pasa a través de un tamiz molecular conformado por perclorato de magnesio anhidro e hidróxido de sodio en base de tierras raras. Una vez que el tamiz molecular retiene los gases no deseados, el nitrógeno es arrastrado hacia la celda de detección con gas helio o argón y es cuantificado por conductividad térmica. Tiempo del ensayo 4 minutos

3. APARATOS Y MATERIALES

Equipo analizador de Proteína vía Combustión (LECO FP 528), este instrumento está 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.

4. DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PROTEÍNA EN MUESTRA DE HARINA DE PESCADO

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. Con estos datos se realizó la determinación de los parámetros de precisión. El rango de estudio que se realizó es de 56.30 % hasta 76.30 % de proteína. Rango en el que se encuentran comúnmente los valores de proteína de harina de pescado.

- Desviación Estándar de Repetibilidad: 0.16
- 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, %): 0.81%
- Límite de Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad (LRSDR, %): 0.95%

Se realizó el estudio de los límites de detección y cuantificación encontrados luego de realizar los datos del análisis de la regresión lineal de las curvas de calibración del estándar EDTA y realizar el estudio de las áreas de la concentración más baja del estándar , y aplicar la ecuación Ec.(5) : $LD = Y_b + 3S_b$ se obtienen los límites de Detección y Cuantificación.

- Límite de detección(LD): 0.2 % de proteína
- Límite de cuantificación(LC):0.8 de proteína

La incertidumbre del método es: U (expandida) = 0.69 % proteína incertidumbre que es hallada luego de evaluar todas las fuentes de incertidumbre, los factores que más influyen en la incertidumbre del método es la aportada por los analistas (SR: 0.188) y los equipos ($U_{(EQUIPO)}$:0.29).

Se evaluaron distintos factores críticos que pudieran influir en el desarrollo del método para identificar cuál de estos factores son los que más influirán y aportan mayor variabilidad.se procedió a realizar la combinación de los factores. Se encontró que el método es Robusto a los siguientes factores:

- Peso de muestra (g) = 0.185 – 0.215
- Presión de gas Helio (psi) = 35 – 45
- Presión de gas Oxígeno (psi) = 35 – 45
- Temperatura de Combustión (°C) = 945 – 955
- Temperatura de Reducción (°C) = 745 – 755

INTRODUCCIÓN

Una de las principales actividades productivas del Perú es la pesquería. Debido a las diversas condiciones climáticas y a la gran variedad de especies marinas [1].

El principal producto de exportación del sector pesquería es la harina de pescado, del cual el Perú está entre los primeros productores del mundo [2].

La ampliación del uso de la harina de pescado como complemento dietético para la alimentación de animales, especialmente el desarrollo de la acuicultura, incrementó la demanda mundial de esta, por lo que este producto se encuentra en el segundo lugar de participación del total de exportaciones del país[3].

Gracias a sus numerosas ventajas en su utilización y su gran fuente proteica, energética entre otras, la harina de pescado posee un amplio mercado siendo China y la Unión Europea los principales destinos de este insumo. 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[4].

La producción del sector pesquero depende de manera considerable a la pesca de la anchoveta, la que en su gran mayoría es destinada para la elaboración de la harina, es decir, la producción de harina de pescado depende de la pesca de anchoveta cuyo nivel varía por temporadas, siendo necesario la veda de esta[5].

Tradicionalmente, la demanda de la harina de pescado se debía a su utilización como alimento de aves, cerdos, ganado vacuno, rumiante y ovino, sin embargo; el actual desarrollo de la acuicultura ha constituido un factor importante para el aumento de la demanda mundial de este producto[6].

En la actualidad existen varios métodos para determinar el porcentaje de proteína en harina de pescado, entre los que tenemos el método Kjeldahl. Este ensayo determina el nitrógeno total en una muestra. El único componente de la mayoría de los alimentos el cual contiene nitrógeno son las proteínas (las grasas, los carbohidratos y la fibra dietética no contienen nitrógeno). Si la cantidad de nitrógeno es multiplicada por un factor dependiente del tipo de proteína esperada en el alimento, la cantidad total de proteínas puede ser determinada [7].

El otro método de ensayo es el Dumas (combustión), basado en la conversión de los gases de combustión. La liberación de Nitrógeno se lleva a cabo mediante pirólisis en una cámara de combustión, el nitrógeno es transportado con la ayuda de un gas hacia un detector en donde se realiza la medición [8].

OBJETIVOS

Establecer los requisitos de calidad para la determinación de Proteína en Harina de Pescado según el método AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl con el equipo Analizador de Nitrógeno / Proteína (LECO).

CAPITULO PRIMERO

FUNDAMENTO TEORICO

1.1 PROTEINA

Las proteínas son poli péptidos de peso molecular elevado, son los materiales que desempeñan un mayor número de funciones en las células de todos los seres vivos. Por un lado, forman parte de la estructura básica de los tejidos (músculos, tendones, piel, uñas, etc.) y, por otro, desempeñan funciones metabólicas y reguladoras (asimilación de nutrientes, transporte de oxígeno y de grasas en la sangre, inactivación de materiales tóxicos o peligrosos). También son los elementos que definen la identidad de cada ser vivo, ya que son la base de la estructura del código genético (ADN) y de los sistemas de reconocimiento de organismos extraños en el sistema inmunitario. Son macromoléculas orgánicas, constituidas básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); aunque pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y en menor proporción hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (I) [9].

Si bien hay ligeras variaciones en diferentes proteínas, el contenido de nitrógeno representa, por término medio, 16% de la masa total de la molécula; es decir, cada 6,25 g de proteína contienen 1 g de N. El factor 6,25 se utiliza para estimar la cantidad de proteína existente en una muestra a partir de la medición de N de la misma.

Las proteínas son largas cadenas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo (-COOH) y el grupo amino (-NH₂) de residuos de aminoácido adyacentes. La secuencia de aminoácidos en una proteína está codificada en su gen (una porción de ADN) mediante el código genético.

Bastan algunos ejemplos para dar idea de la variedad y trascendencia de las funciones que desempeñan. Son proteínas:

- Casi todas las enzimas, catalizadores de reacciones químicas en organismos vivos.
- Muchas hormonas, reguladores de actividades celulares.
- La hemoglobina y otras moléculas con funciones de transporte en la sangre.
- Los anticuerpos, encargados de acciones de defensa natural contra infecciones o agentes extraños.
- Los receptores de las células, a los cuales se fijan moléculas capaces de desencadenar una respuesta determinada.

- La actina y la miosina; responsables finales del acortamiento del músculo durante la contracción.

El colágeno, integrante de fibras altamente resistentes en tejidos de sostén. Los aminoácidos se caracterizan por poseer un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) [9].

Los péptidos están formados por la unión de aminoácidos mediante un enlace peptídico. Es un enlace covalente que se establece entre el grupo.

Carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, dando lugar al desprendimiento de una molécula de agua.

1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN HARINA DE PESCADO.

Existen actualmente varios métodos analíticos para la determinación del porcentaje de proteína en harina de pescado, pero los métodos principales que se tratará en este texto son [8]:

- Determinación de nitrógeno en proteínas por el método Kjeldahl.
- Determinación de nitrógeno en proteínas por el método Dumas.

1.2.1 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE KJELDAHL

En 1883 el investigador danés Johann Kjeldahl desarrolló el proceso básico del conocido método actual de análisis de proteínas por el método Kjeldahl, más propiamente, para analizar nitrógeno orgánico. En esta técnica se digieren las proteínas y otros componentes orgánicos de los alimentos en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El nitrógeno orgánico total es convertido en sulfato de amonio [10]. La mezcla digerida se neutraliza con una base y se destila posteriormente en una solución de ácido bórico. Los aniones del borato así formado se titulan con HCl estandarizado, lo cual se convierte en el nitrógeno de la muestra. El resultado del análisis representa el contenido de proteína cruda del alimento ya que el nitrógeno también proviene de componentes no proteicos [11].

Reacciones Llevadas a Cabo en el método Kjeldahl [12]



Neutralización y Destilación



Titulación

El anión borato (proporcional a la cantidad de nitrógeno) es titulado con HCl estandarizado:



1.2.1.1 FUENTES DE ERROR

Constituyen fuentes de error en este método son: la inclusión de nitrógeno no protéico como parte de la proteína; la pérdida de nitrógeno durante la digestión, la digestión incompleta de la muestra.

Las proporciones excesivas de sulfato de sodio o potasio que se añaden al ácido (para elevar el punto de ebullición) pueden resultar en una descomposición por calor y la consecuente pérdida de amoníaco. Generalmente se recomiendan temperaturas de digestión de 370-410°C. Tiempo del Ensayo 3 a 6 horas [8].

1.2.2 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE DUMAS

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica a través de una combustión en una atmósfera rica en oxígeno. Todo el producto de la combustión pasa a través de un tamiz molecular conformado por perclorato de magnesio anhidro e hidróxido de sodio en base de tierras raras. Una vez que el tamiz molecular retiene los gases no deseados, el nitrógeno es arrastrado hacia la celda de detección con gas helio o argón y es cuantificado por conductividad térmica. Tiempo del ensayo 4 minutos [8]. Se utilizan los siguientes reactivos perclorato de magnesio anhidro, hidróxido de sodio

en base de tierras raras, virutas de cobre e hierro, oxígeno pureza 99,99, helio pureza 99,99 y aire comprimido.

1.3 TECNICAS DE VALIDACIÓN

Se puede interpretar la validación del método como el proceso de definición de las necesidades analíticas y la confirmación de que el método en cuestión ha considerado capacidades consistentes con las que la aplicación requiere. Está implícito que será necesario evaluar las capacidades de desempeño del método. Esto concuerda con la interpretación de la definición ISO por Morkowski [13]. El juicio de la aptitud del método es importante; en el pasado la validación del método tendía a concentrarse en el proceso de evaluación de los parámetros de desempeño [14].

El tipo de programa de validación depende enteramente del método en particular y sus posibles aplicaciones.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en él pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe ser validado y la incertidumbre del resultado, a un nivel de confianza dado, estimada. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método. Los principales parámetros analíticos empleados en el ensayo analítico son [14]:

- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Exactitud.
- Veracidad.
- Sesgo.
- Precisión
- Repetibilidad.
- Reproducibilidad.
- Robustez.
- Sensibilidad.

1.3.1 PRINCIPALES PARÁMETROS ANÁLITICOS UTILIZADOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ENSAYO

a) Límite de Detección (Ld).

Cuando las mediciones se realizan para niveles bajos del analito o sus propiedades, en análisis de trazas, es importante conocer cuál es la concentración más pequeña del analito o el valor de propiedad que puede ser confiablemente detectada por el método. La importancia al determinar esto y los problemas asociados a ello se elevan del hecho que la probabilidad de detección no cambia repentinamente de cero a la unidad ya que un umbral se está cruzando. ISO utiliza como término general “valor mínimo detectable del estado variable neto” el cual puede ser traducido para los químicos como la “concentración” mínima neta detectable.

El límite de detección, expresado como concentración c_L , o como cantidad q_L , se deriva de la medición más pequeña x_L , que puede ser detectada con certeza razonable para un procedimiento analítico dado. El valor de x_L está dado por la ecuación:

$$x_L = \bar{x}_{bl} + k s_{bl}$$

Ec.(05)

Donde \bar{x}_{bl} es la media de las mediciones del blanco y s_{bl} la desviación estándar de las mediciones del blanco, y k es un factor numérico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado.

Para propósitos de validación es suficiente proporcionar una indicación del nivel al cual la detección resulta problemática.

Para este propósito la aproximación que dice el “blanco + 3s” es suficiente. Cuando el trabajo está como apoyo para un acuerdo de regulación o especificación que requiere algo de mejor exactitud [14].

b) Límite de Cuantificación (LC).

El “límite de cuantificación” estrictamente es la concentración más baja de analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y de veracidad. También se define a través de diversas convenciones como la concentración del analito correspondiente al

valor del blanco más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Algunas veces esto es conocido como “límite de determinación”.

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de las concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre los cuales el método va a ser aplicado. Esto se refiere al intervalo de concentraciones o valores de las propiedades de las soluciones medidos recientemente más que de las muestras originales. Al término menor del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. Al término superior del intervalo de concentración, las limitaciones quedarán impuestas por varios efectos que dependerán del sistema de respuesta del instrumento [14].

c) Exactitud.

La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados mediante el establecimiento de efectos sistemáticos y aleatorios en los resultados.

Normalmente la exactitud se estudia como dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”. La veracidad (de un método) es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) del valor real. La veracidad normalmente se expresa en términos de sesgo. La “precisión” es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante mediciones tal como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados.

Adicionalmente una expresión común de exactitud es la medición de la incertidumbre, la cual proporciona una forma simple de expresión de exactitud [14].

d) Veracidad.

La asignación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de los resultados promedio de un método con valores conocidos, esto es, la veracidad se asigna contra un valor de referencia (un valor verdadero o un valor verdadero convencional). Se dispone de dos técnicas: la revisión con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado. Los valores de referencia son idealmente trazables a los estándares internacionales. Los materiales de referencia certificados por lo general se aceptan que proporcionan valores trazables y por lo tanto, el valor de referencia es el valor certificado del

MRC. Observe que los valores de referencia, certificados u otros pueden ser absolutos (trazables al Sistema Internacional) o convencionales, esto es, acordes para un fin en particular.

La validación requiere la adecuación a un propósito por lo tanto, la selección de un material de referencia está basada en el propósito de la validación. El material de referencia debe ser apropiado para este uso. Para un trabajo de regulación es relevante el empleo de un material de referencia certificado e idealmente con una matriz similar. Para métodos que se utilizarán por largos periodos de tiempo, deberá utilizarse un material interno de referencia que sea estable. Para corto plazo o para un trabajo no crítico un estándar preparado o la adición de material de referencia es suficiente por lo general [14].

e) Sesgo.

El sesgo del método surge de los errores sistemáticos inherentes al método cualquiera que sea el laboratorio que lo usa. El sesgo del laboratorio surge de errores sistemáticos característicos que son del laboratorio y de la interpretación que éste hace del método. Particularmente un laboratorio solo puede estimar el sesgo combinado, sin embargo, en la verificación del sesgo, es importante estar al tanto de las convenciones vigentes para el propósito presente.

Sin embargo, para la mayoría de los propósitos, la aceptación del sesgo debe decidirse sobre la base del sesgo total medido contra los materiales apropiados o los métodos de referencia, tomando en cuenta la precisión del método, cualquier incertidumbre en los valores de los materiales de referencia y la exactitud requerida para el uso final. Se recomiendan las pruebas estadísticas de significación [14].

f) Precisión.

La “precisión” se determina normalmente para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas.

Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. Ellas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se desarrolla por un solo analista, con equipo en un periodo corto de tiempo, por ejemplo es la clase de variabilidad que se espera entre resultados si las muestras se analizan por duplicado.

Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medición de precisión más significativa a usar es la reproducibilidad (esto es la medida de precisión más grande encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo). Puede ser posible que para algunos casos particulares sea más útil la medición de la precisión intermedia, por ejemplo la precisión medida entre diferentes analistas, en horarios prolongados dentro de un sólo laboratorio. Esto algunas veces se conoce como “precisión intermedia”, pero las condiciones exactas deben ser establecidas. La precisión se establece por lo general en términos de la desviación estándar o desviación estándar relativa. La reproducibilidad y la repetibilidad comúnmente dependen de la concentración del analito y deben determinarse a un número de concentraciones y, de ser relevante, establecer la relación entre la precisión y la concentración del analito. La desviación estándar relativa será más útil en este caso puesto que la concentración ha sido evaluada en diferentes concentraciones, lo que significa que debe ser constante sobre el intervalo de interés proporcionado [14].

Repetibilidad.

Condiciones bajo las cuales se obtienen resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, en el mismo laboratorio, por el mismo operador usando el mismo equipo en intervalos de tiempo cortos.

La desviación estándar de la repetibilidad (s_r), es útil calcular el límite de repetibilidad “ r ”, el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre el análisis de duplicados de la muestra determinados bajo condiciones de repetibilidad.

El límite de repetibilidad (r) es el valor menor que o igual que, al cual la diferencia absoluta entre los dos resultados de pruebas individuales obtenidas bajo condiciones de repetibilidad se espera se encuentre, con una probabilidad de 95% y se da por la fórmula:

$$r = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times \sigma_r$$

Ec. (06)

Donde t_{∞} es el valor de t de Student de dos colas para $u = \infty$ a una confianza dada (El nivel de confianza normalmente establecido es de 95% donde el valor es 1.96) y s_r es la desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad [14].

Reproducibilidad.

Condiciones bajo las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, en un material idéntico, en diferentes laboratorios por diferentes operadores usando diferentes equipos.

La desviación estándar de la reproducibilidad S_R , es útil calcular el límite de reproducibilidad "R", el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre el análisis de duplicados de la muestra determinados bajo condiciones de reproducibilidad.

El límite de reproducibilidad es el menor valor que o igual a, al cual la diferencia absoluta entre dos resultados de pruebas individuales obtenidas bajo condiciones de reproducibilidad puede esperarse, con una probabilidad de 95% y se da por la fórmula:

$$R = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times \sigma_R \quad \text{Ec.(07)}$$

Donde t_{∞} es el valor de t de Student de dos colas para $u = \infty$ a una confianza dada (El nivel de confianza normalmente establecido es de 95% donde el valor es 1.96), y S_R es la desviación estándar medida bajo condiciones de reproducibilidad [14].

g) Robustez.

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal [14].

La Association of Official Analytical Chemist ha sugerido un método para realizar este examen en el que pueden utilizarse ocho análisis distintos para determinar el efecto de la variación de siete etapas diferentes en un proceso analítico (prueba de Youden- Steiner) [16].

Al evaluar la robustez de un método, se trata de identificar las variables que tienen un efecto más crítico sobre su exactitud, precisión y selectividad. De modo que estas serán las variables que mas tendrán que ser controladas durante la aplicación rutinaria del método.

Al planificar el estudio de la robustez hay que tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Elegir factores cuya influencia se desea evaluar.

- Elegir valores de dichos factores. Generalmente se estudian dos valores situados alrededor del valor nominal. Por ejemplo si el valor nominal de la concentración de un reactivo es 0.2M es lógico estudiar la influencia de las concentraciones a 0.17 M y 0.23 M.
- Elegir la respuesta cuya variación se requiere controlar. Por ejemplo: la exactitud del resultado, precisión, la resolución de una separación cromatográfica.
- Planificar y llevar a cabo el análisis.
- Evaluar los efectos de los distintos factores. Una vez realizados los análisis y obtenidas las respuestas, es necesario tratar estadísticamente los datos obtenidos con el objeto de ver qué factores son los que producen efectos significativos sobre la respuesta.

Para realizar esta prueba se denotan a los valores iniciales de los factores con letras mayúsculas de la A a la G, y las variaciones con letras minúsculas correspondientes. A continuación se establece la siguiente tabla 1 los factores [15]:

TABLA N^o 1: Prueba de Youden-Steiner para analizar los efectos de factores que influyen en el resultado del método.

Factor/Ensayo	Repeticiones							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

A partir de los resultados de cada variable debe calcularse 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.

$$\begin{array}{rcccl}
 \frac{s+t+u+v}{4} & = & \frac{4A}{4} & = & A & D1 \\
 \frac{w+x+y+z}{4} & = & \frac{4a}{4} & = & a & \\
 \vdots & & \vdots & & \vdots & \\
 \frac{s+v+x+y}{4} & = & \frac{4G}{4} & = & A & D7 \\
 \frac{t+u+w+z}{4} & = & \frac{4g}{4} & = & a &
 \end{array}$$

Ec.(8)

Luego se deberá evaluar la significancia a través de una prueba T de Student:

$$T_{\text{calculado}} = \frac{\sqrt{n} (D)}{S} \quad \text{Ec.(9)}$$

Donde:

- S, es la desviación estándar de reproducibilidad o repetibilidad del método o una desviación experimental que se tenga de una serie de datos de ensayo.
- n: número de corridas (4).

La prueba es que $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tab}}$, para el 95% de probabilidad y n-1 grados de libertad.

Luego de evidenciar la diferencia de los resultados (efecto de cada variable). Cuanto mayor sea la diferencia (diferencias significativas) mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico.

h) Selectividad (o Especificidad).

La habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de la prueba [14].

i) Sensibilidad.

El cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo [14].

1.4 HERRAMIENTAS DE LA VALIDACIÓN

Blancos: Usar varios tipos de blancos permite asegurar que tanto de la señal medida se atribuye al analito y que tanto se debe a otras causas [14].

Muestras/ materiales de prueba: los materiales de prueba tomados de muestras reales son útiles debido a la información que proporcionan sobre las interferencias, las cuales pueden ser encontradas en la realidad con el trabajo diario. Si el contenido verdadero del analito de un material es conocido exactamente puede utilizarse para asignar la exactitud del método. Sin embargo el contenido real del analito difícilmente se determina a menos que exista la posibilidad de usar otros métodos los cuales se conoce que muestran un sesgo insignificante [14].

Materiales caracterizados independientemente: es difícil determinar el sesgo de un método sin conocer el contenido real del analito en el material de prueba. Si un material se ha caracterizado por otros medios, por ejemplo mediante un método que se sabe que posee un sesgo despreciable, entonces este puede ser usado como un material de referencia, se puede realizar entonces una comparación y asignar mediante un análisis el sesgo del método [14].

Patrones (Mediciones): Cuando el término es usado para referirse a una sustancia usada para propósitos de calibración o identificación, es conveniente referirse a ellos como Materiales de referencia de medida o calibración.

Tradicionalmente se piensa que son soluciones de una sola sustancia, pero en la práctica puede ser cualquier material en el que un parámetro o propiedad particular se ha caracterizado al punto de que

puede ser usado para propósitos de calibración o de referencia. El término patrón incluye accesorios en los cuales un amplio intervalo de parámetros físicos pueden ser calibrados [14].

Materiales de referencia: Los materiales de referencia pueden ser virtualmente cualquier material tomado como base para referencia y puede incluir reactivos de laboratorio de pureza conocida, químicos industriales u otros artefactos. La propiedad o el analito de interés, debe ser estable y homogéneo pero no necesita tener un alto grado de caracterización o trazabilidad y certificación asociados a los materiales de referencia certificados [14].

Materiales de referencia certificados: la caracterización del parámetro de interés en un material de referencia certificado generalmente es controlada más estrictamente que para un material de referencia, y adicionalmente el valor se certifica con una incertidumbre establecida por una institución reconocida. La caracterización normalmente se realiza usando varios métodos para que, tanto como sea posible, cualquier sesgo en la caracterización se reduzca o se elimine [14].

1.5 INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

1.5.1 El Mensurando

El propósito de una medición es determinar el valor de una magnitud, llamada el Mensurando. Es el atributo sujeto a medición de un fenómeno, cuerpo o sustancia que puede ser distinguido cualitativamente y determinado cuantitativamente. La definición del mensurando es vital para obtener buenos resultados de la medición.

La imperfección natural de la realización de las mediciones, hace imposible conocer con certeza absoluta el valor verdadero de una magnitud: Toda medición lleva implícita una incertidumbre, que es un parámetro que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos razonablemente al mensurando.

Una definición completa del mensurando incluye especificaciones sobre las magnitudes de entrada relevantes. El resultado de una medición incluye la mejor estimación del valor del mensurando y una estimación de la incertidumbre sobre ese valor. La incertidumbre se compone de contribuciones de diversas fuentes, algunas de ellas descritas por las magnitudes de entrada respectivas. Algunas contribuciones son inevitables por la definición del propio mensurando, mientras otras pueden

depender del principio de medición, del método y del procedimiento seleccionados para la medición [16].

1.5.2 Modelo físico

Pretender estudiar el proceso de medición de manera exacta y completa está usualmente fuera de las actividades rutinarias del metrólogo, más aún, es el propósito de la investigación científica, cuya solución pocas veces se vislumbra. Por lo tanto, es necesaria la simplificación del fenómeno o de la situación real conservando las características más relevantes para el propósito pretendido, mediante la construcción de un modelo para la medición.

Un modelo físico de la medición consiste en el conjunto de suposiciones sobre el propio Mensurando y las variables físicas o químicas relevantes para la medición. Estas suposiciones usualmente incluyen:

- Relaciones fenomenológicas entre variables.
- Consideraciones sobre el fenómeno como conservación de cantidades, comportamiento temporal, comportamiento espacial, simetrías.
- Consideraciones sobre propiedades de la sustancia como homogeneidad e isotropía.

Una medición física, por simple que sea, tiene asociado un modelo que sólo aproxima el proceso real [16].

1.5.3 Modelo matemático

El modelo físico se representa por un modelo descrito con lenguaje matemático. El modelo matemático supone aproximaciones originadas por la representación imperfecta o limitada de las relaciones entre las variables involucradas.

Considerando a la medición como un proceso, se identifican magnitudes de entrada denotadas por el conjunto $\{X_i\}$ expresión en la cual el índice i toma valores entre 1 y el número de magnitudes de entrada N .

La relación entre las magnitudes de entrada y el mensurando Y como la magnitud de salida se representa como una función

$$Y = f(\{X_i\}) = f(X_1, X_2, \dots, X_N)$$

Ec. (10)

Representada por una tabla de valores correspondientes, una gráfica o una ecuación, en cuyo caso y para los fines de este documento se hará referencia a una relación funcional.

Aunque para el propósito de este trabajo se considerará Y como un escalar, puede aplicarse el mismo formalismo para elementos matemáticos más complejos como vectores o matrices.

En este trabajo se denota con x_i al mejor estimado de las magnitudes de entrada X_i .

Los valores de las magnitudes de entrada pueden ser resultados de mediciones recientes realizadas por el usuario o tomados de fuentes como certificados, literatura, manuales, etc.

El mejor estimado del valor del mensurando es el resultado de calcular el valor de la función f evaluada en el mejor estimado de cada magnitud de entrada:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_N)$$

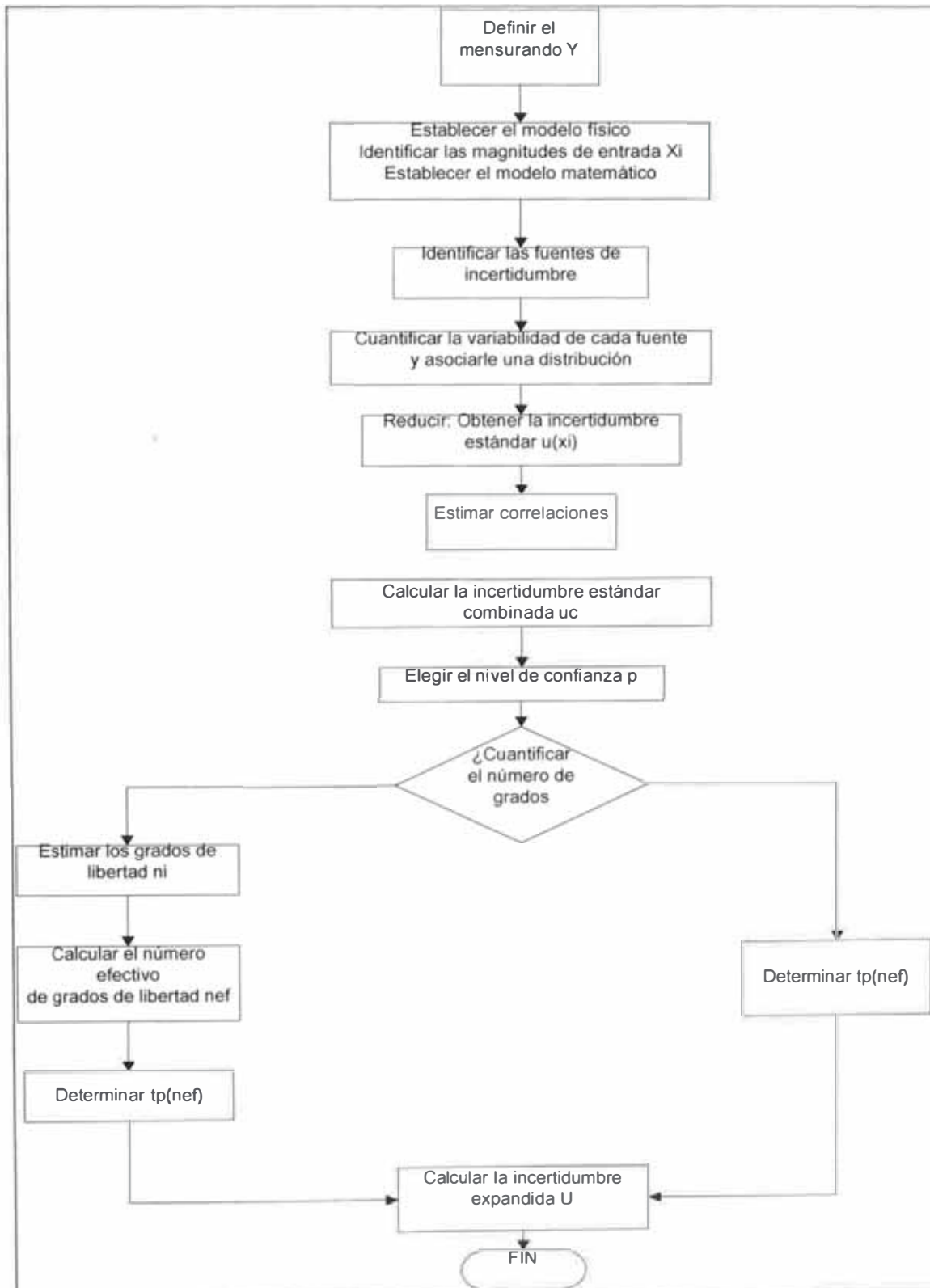
Ec.(11)

En algunas ocasiones se toma el mejor estimado de Y como el promedio de varios valores y_j del mensurando obtenidos a partir de diversos conjuntos de valores $\{X_i\}$ de las magnitudes de entrada [16].

1.5.4 Identificación de las fuentes de incertidumbre

Una vez determinados el mensurando, el principio, el método y el procedimiento de medición, se identifican las posibles fuentes de incertidumbre [16], para ello nos guiaremos de la figura 1.

Fig. 1. Diagrama para la estimación de incertidumbres de la medición



Los factores que influyen en la incertidumbre son:

- Los resultados de la calibración del instrumento.
- La incertidumbre del patrón o del material de referencia.
- La repetibilidad de las lecturas.
- La reproducibilidad de las mediciones por cambio de observadores, instrumentos u otros elementos.
- Características del propio instrumento, como resolución, histéresis, deriva.
- Variaciones de las condiciones ambientales.
- La definición del propio mensurando.
- El modelo particular de la medición.

1.5.5 Cuantificación

Se distinguen dos métodos principales para cuantificar las fuentes de incertidumbre: El Método de Evaluación Tipo A está basado en un análisis estadístico de una serie de mediciones, mientras el Método de Evaluación Tipo B comprende todas las demás maneras de estimar la incertidumbre [16].

a) Evaluación tipo A:

La incertidumbre de una magnitud de entrada X_i obtenida a partir de observaciones repetidas bajo condiciones de repetibilidad, se estima con base en la dispersión de los resultados individuales [16]

Si X_i se determina por n mediciones independientes, resultando en valores q_1, q_2, \dots, q_n , el mejor estimado x_i para el valor de X_i es la media de los resultados individuales:

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

Ec.(12)

La dispersión de los resultados de la medición q_1, q_2, \dots, q_n para la magnitud de entrada X_i se expresa por su desviación estándar experimental:

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

Ec.(13)

La incertidumbre estándar $u(x_i)$ de X_i se obtiene finalmente mediante el cálculo de la desviación estándar experimental de la media:

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

Ec.(14)

Así que resulta para la incertidumbre estándar de X_i :

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

Ec.(15)

Para una medición que se realiza por un método bien caracterizado y bajo condiciones controladas, es razonable suponer que la distribución (dispersión) de los q_j no cambia, o sea se mantiene prácticamente igual para mediciones realizadas en diferentes días, por distintos metrólogos, etc. (esto es, la medición está bajo control estadístico). En este caso esta componente de la incertidumbre puede ser más confiablemente estimada con la desviación estándar s_p obtenida de un solo experimento anterior, que con la desviación estándar experimental $s(q)$ obtenida por un número n de mediciones, casi siempre pequeño.

La incertidumbre estándar de la media se estima en este caso por:

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

Ec.(16)

b) Evaluación tipo B

Las fuentes de incertidumbre tipo B son cuantificadas usando información externa u obtenida por experiencia. Estas fuentes de información pueden ser [16]:

- Certificados de calibración.
- Manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento.
- Normas o literatura.
- Valores de mediciones anteriores.
- Conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición.

1.5.6 Distribuciones de probabilidad

La cuantificación de una fuente de incertidumbre incluye la asignación de un valor y la determinación de la distribución a la cual se refiere este valor. Las distribuciones que aparecen más frecuentemente son [16]:

- a) Distribución normal.- Los resultados de una medición repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen en buena aproximación una distribución normal. También la incertidumbre indicada en certificados de calibración se refiere generalmente a una distribución normal.
- b) Distribución rectangular.- En una distribución rectangular cada valor en un intervalo dado tiene la misma probabilidad, o sea la función de densidad de probabilidad es constante en este intervalo. Ejemplos típicos son la resolución de un instrumento digital o la información técnica sobre tolerancias de un instrumento. En general, cuando exclusivamente hay conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada, lo más conservador es suponer una distribución rectangular.
- c) Distribución triangular.- Si además del conocimiento de los límites superiores e inferior hay evidencia de que la probabilidad es más alta para valores en el centro del intervalo y se reduce hacia los límites, puede ser más adecuado basar la estimación de la incertidumbre en una distribución triangular.

1.5.7 Reducción

Antes de comparar y combinar contribuciones de la incertidumbre que tienen distribuciones diferentes, es necesario representar los valores de las incertidumbres originales como incertidumbres estándar. Para ello se determina la desviación estándar de la distribución asignada a cada fuente [16].

- a) Distribución normal.- La desviación estándar experimental de la media calculada a partir de los resultados de una medición repetida según la Ec. (11) ya representa la incertidumbre estándar. Cuando se dispone de valores de una incertidumbre expandida U , como los presentados por ejemplo en certificados de calibración, se divide U entre el factor de cobertura k , obtenido ya sea directamente o a partir de un nivel de confianza dado

$$u(x_i) = \frac{U}{k}$$

Ec.(17)

- b) Distribución rectangular:-Si la magnitud de entrada X_i tiene una distribución rectangular con el límite superior a_+ y el límite inferior a_- , el mejor estimado para el valor de X_i está dado por:

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2}$$

Ec.(18)

y la incertidumbre estándar se calcula por:

$$u(x_i) = \frac{a_+ - a_-}{\sqrt{12}}$$

Ec.(19)

O por

$$u(x_i) = \frac{a/2}{\sqrt{3}}$$

Ec.(20)

Donde $a/2$ es el semi-ancho del intervalo a con

$$a = a_+ - a_-$$

Ec.(21)

- c) Distribución triangular:-Como en una distribución rectangular, para una magnitud de entrada X_i que tiene una distribución triangular con los límites a_+ y a_- , el mejor estimado para el valor de X_i está dado por:

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2}$$

Ec.(22)

La incertidumbre estándar se calcula en este caso por:

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

Ec.(23)

1.5.8 Combinación

El resultado de la combinación de las contribuciones de todas las fuentes es la incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$, la cual contiene toda la información esencial sobre la incertidumbre del mensurando Y [16]. La contribución $u_i(y)$ de cada fuente a la incertidumbre combinada depende de la incertidumbre estándar $u(x_i)$ de la propia fuente y del impacto de la fuente sobre el mensurando. Es posible encontrar que una pequeña variación de alguna de las magnitudes de influencia tenga un impacto importante en el mensurando, y viceversa.

Se determina $u_i(y)$ por el producto de $u(x_i)$ y su coeficiente de sensibilidad c_i (o factor de sensibilidad):

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

Ec.(24)

1.5.9 Coeficiente de sensibilidad

El coeficiente de sensibilidad describe, qué tan sensible es el mensurando con respecto a variaciones de la magnitud de entrada correspondiente. Para su determinación existen dos métodos [16]:

- a) Determinación a partir de una relación funcional.- Si el modelo matemático para el mensurando $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N)$ describe la influencia de la magnitud de entrada X_i suficientemente bien mediante una relación funcional, el coeficiente de sensibilidad c_i se calcula por la derivada parcial de f con respecto a X_i :

$$c_i = \frac{\partial f(X_1, \dots, X_N)}{\partial X_i} \Big|_{X_1=x_1 \dots X_N=x_N} \quad \text{Ec. (25)}$$

- b) Otros métodos de determinación.- Si la influencia de la magnitud de entrada X_i en el mensurando Y no está representada por una relación funcional, se determina el coeficiente de sensibilidad c_i por una estimación del impacto de una variación de X_i en Y según:

$$c_i = \frac{\Delta Y}{\Delta X_i} \quad \text{Ec. (26)}$$

Esto es, manteniendo constantes las demás magnitudes de entrada, se determina el cambio de Y producido por un cambio en X_i por una medición o a partir de la información disponible (como una gráfica o una tabla).

1.5.10 Propagación de la incertidumbre para magnitudes de entrada no correlacionadas

En el caso de magnitudes de entrada no correlacionadas, la incertidumbre combinada $uc(y)$ se calcula por la suma geométrica de las contribuciones particulares [16]:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N u_i^2(y) \quad \text{Ec. (27)}$$

Resulta finalmente:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N [c_i \cdot u(x_i)]^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial X_i} \cdot u(x_i) \right]^2} \quad \text{Ec. (28)}$$

La regla presentada en Ec. (28) es llamada ley de propagación de incertidumbre. Note que la última expresión en esta ecuación se aplica cuando se dispone de la relación funcional entre Y y $\{X_i\}$.

1.5.11 Magnitudes de entrada relacionadas con más de una fuente de incertidumbre

En la mayoría de los casos una magnitud de entrada X_i es afectada por varias fuentes de incertidumbre, que pueden ser por ejemplo la resolución del instrumento, la dispersión de datos obtenidos por mediciones repetidas y la incertidumbre de la calibración del instrumento. En este caso hay dos maneras (equivalentes) de calcular la incertidumbre combinada [16].

- a) Como primera alternativa, se calcula la incertidumbre total (combinada) relacionada con cada magnitud de entrada X_i por la suma geométrica de las incertidumbres individuales:

$$u(x_i) = \sqrt{\sum_{j=1}^{M_i} [u_j(x_i)]^2} \quad \text{Ec. (29)}$$

Donde $u_j(x_i)$ es la incertidumbre estándar de la fuente de incertidumbre número j de las M_i fuentes relacionadas con la magnitud de entrada X_i . Después se introducen los valores de $u(x_i)$ la Ec. (26).

- b) Si uno está interesado en ver el efecto particular que tiene cada una de las fuentes en la incertidumbre combinada $u_c(y)$, cada fuente puede entrar individualmente en la Ec. (26), sustituyendo el número de magnitudes de entrada N en la suma por el número total de fuentes de incertidumbre. Cabe mencionar que el coeficiente de sensibilidad c_i es igual para todas las fuentes de incertidumbre relacionadas con la misma magnitud de entrada X_i .

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

Ec. (30)

Cuando el coeficiente de sensibilidad c_i es cero o cuando la función no admite una representación lineal adecuada (únicamente con la primera derivada) en el intervalo $\pm u(x_i)$ es conveniente y aun indispensable considerar términos de segundo orden (que dependen de las segundas derivadas).

1.5.12 Cálculo con incertidumbres relativas

Si el modelo matemático se compone de productos de las magnitudes de entrada X_i :

$$f(X_1, \dots, X_N) = \text{const} \cdot \prod_{i=1}^N (X_i)^{p_i}$$

Ec. (31)

Donde **const** es una constante y los exponentes p_i son constantes reales (positivas o negativas), el cálculo (numérico) de la incertidumbre combinada se facilita utilizando incertidumbres relativas. Los coeficientes de sensibilidad en este caso son p_i , y la ley de propagación de incertidumbre EC. (22), para calcular la incertidumbre combinada relativa $u_{c,rel}(y)$ se simplifica:

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

Ec. (32)

Un caso particular muy común es que todos los exponentes p_i son +1 o -1, o sea Y es un producto o cociente de las magnitudes de entrada, puesto que en este caso los coeficientes de sensibilidad son 1 y la incertidumbre combinada relativa $u_{c,rel}(y)$ es la suma geométrica de las incertidumbres relativas de las magnitudes de entrada [16]:

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

Ec. (33)

1.5.13 Propagación de la incertidumbre para magnitudes de entrada correlacionadas

Si algunas de las magnitudes de entrada están correlacionadas, hay que considerar las covarianzas entre las magnitudes correlacionadas y EC. (24) se modifica a:

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

Ec. (34)

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

Desde el punto de vista estadístico, dos variables son independientes cuando la probabilidad asociada a una de ellas no depende de la otra, esto es, si q y w son dos variables aleatorias independientes, la probabilidad conjunta se expresa como el producto de las probabilidades de las variables respectivas.

$$p(q, w) = p(q) \cdot p(w)$$

Ec. (35)

Frecuentemente, se encuentran magnitudes de entrada que no son independientes. La independencia lineal de dos variables puede estimarse estadísticamente con el coeficiente de correlación.

$$r(q, w) = \frac{u(q, w)}{u(q) \cdot u(w)}$$

Ec. (36)

En el denominador aparecen las incertidumbres estándar de las variables aludidas y en el numerador la covarianza de las mismas.

La covarianza puede ser estimada a partir de un conjunto de n valores de q y w según:

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

Ec. (37)

Un valor de $r = 0$ indica independencia de q y w . Los valores de $r = +1$ o -1 indican una correlación total [16].

1.5.14 Incertidumbre expandida

La forma de expresar la incertidumbre como parte de los resultados de la medición depende de la conveniencia del usuario. A veces se comunica simplemente como la incertidumbre estándar combinada, otras ocasiones como un cierto número de veces tal incertidumbre, algunos casos requieren se exprese en términos de un nivel de confianza dado, etc. En cualquier caso, es indispensable comunicar sin ambigüedades la manera en que la incertidumbre está expresada [16].

1.5.15 Factor de cobertura y nivel de confianza

La incertidumbre estándar uc representa un intervalo centrado en el mejor estimado del mensurando que contiene el valor verdadero con una probabilidad p de 68% aproximadamente, bajo la suposición de que los posibles valores del mensurando siguen una distribución normal.

Generalmente se desea una probabilidad mayor, lo que se obtiene expandiendo el intervalo de incertidumbre por un factor k , llamado factor de cobertura. El resultado se llama incertidumbre expandida U

$$U = k \cdot u_c$$

Ec. (38)

La incertidumbre expandida U indica entonces un intervalo que representa una fracción p de los valores que puede probablemente tomar el mensurando. El valor de p es llamado el nivel de confianza y puede ser elegido a conveniencia.

En el medio industrial, a menudo se elige el nivel de confianza de manera tal que corresponda a un factor de cobertura como un número entero de desviaciones estándar en una distribución normal [16].

1.5.16 Distribución t de Student

Frecuentemente, los valores del mensurando siguen una distribución normal. Sin embargo, el mejor estimado del mensurando, la media (obtenida por muestreos de n mediciones repetidas) dividida entre su desviación estándar, sigue una distribución llamada t de Student, la cual refleja las limitaciones de la información disponible debidas al número finito de mediciones. Esta distribución coincide con la distribución normal en el límite cuando n tiende a infinito, pero difiere considerablemente de ella cuando n es pequeña.

La distribución t de Student es caracterizada por un parámetro n llamado número de grados de libertad.

Considerando lo anterior, es necesario ampliar el intervalo correspondiente al nivel de confianza p , por lo que la Ec. (38) se transforma a.

$$U = t_p(v) \cdot u_c$$

Ec. (39)

El factor $t_p(v)$ indica los límites del intervalo correspondiente al nivel de confianza p de la distribución y su valor siempre es mayor o igual que el factor k (tomado de la distribución normal).

Cuando se combinan varias fuentes de incertidumbre con sus respectivas distribuciones para obtener la incertidumbre combinada u_c del mensurando, el Teorema del Límite Central permite

aproximar la distribución resultante por una distribución normal. La aproximación será mejor mientras más grande sea el número de fuentes y sus contribuciones sean similares, independientemente de la forma particular de sus distribuciones.

Nuevamente, la disponibilidad limitada de información hace necesario el uso de la distribución t de Student para determinar la incertidumbre expandida de manera rigurosa (con la suposición de que los valores del mensurando obedecen una distribución normal).

Cuando sólo es relevante la contribución de una fuente cuya distribución no sea normal, lo más conveniente es estimar la incertidumbre expandida directamente de los parámetros de la distribución [16].

1.5.17 Grados de libertad

De cierta manera el número n de grados de libertad asociado a una distribución de una magnitud (X_i o Y) puede considerarse una medida de incertidumbre de la incertidumbre de esa magnitud. Entre mayor sea n la estimación de la incertidumbre será más confiable.

El número efectivo de grados de libertad nef del mensurando considera el número de grados de libertad ni de cada fuente de incertidumbre.

En las incertidumbres tipo A, ni depende directamente del número de datos considerados y disminuye conforme el número de parámetros estimados a partir de los mismos datos. La repetibilidad de una medición, estimada por la desviación estándar experimental de n lecturas tiene $n-1$ grados de libertad. Una regresión lineal de M puntos mediante una ecuación de m parámetros tiene $M-m$ grados de libertad.

La determinación del número de grados de libertad de una incertidumbre tipo B implica el criterio del metrologo soportado por su experiencia, aun cuando sea subjetiva, para determinar la incertidumbre relativa de la propia incertidumbre, y calcular el número de grados de libertad para esa fuente específica i con la ecuación :

$$v_i \approx \frac{1}{2} \cdot \left[\frac{\Delta u(x_i)}{u(x_i)} \right]^{-2} = \frac{1}{2} \cdot \left[\frac{u(x_i)}{\Delta u(x_i)} \right]^2$$

Ec. (40)

La cantidad $Du(xi)$ es una estimación de la incertidumbre de la incertidumbre $u(xi)$ de la fuente i cuantificada por el metrologo. Es recomendable aproximar el resultado del cálculo con la ecuación anterior al entero cercano más bajo.

El número efectivo de grados de libertad se calcula según la ecuación de Welch-Satterthwaite, aun cuando existan observaciones sobre su validez merecedoras de atención, la cual puede escribirse en términos de la relación entre la contribución de la fuente i y la incertidumbre combinada como:

$$\frac{1}{v_{ef}} = \sum_{i=1}^N \frac{\left(\frac{u_i(y)}{u_c(y)} \right)^4}{v_i} \quad \text{Ec. (41)}$$

Si el valor de nef resultante no es entero, generalmente se considera nef como el entero menor más próximo.

Un análisis de la ecuación anterior muestra el dominio de las fuentes con pocos grados de libertad en el cálculo de nef , sobre todo de aquellas cuyas contribuciones son grandes a la incertidumbre combinada. De hecho una fuente cuya contribución es alta y con pocos grados de libertad, es determinante del valor de nef [16].

1.5.18 Incertidumbre expandida

Resumiendo, de manera rigurosa la incertidumbre expandida se calcula de acuerdo a la ecuación:

$$U = u_c \cdot t_p(v_{ef}) \quad \text{Ec. (42)}$$

Donde $tp(v_{ef})$ es el factor derivado de la distribución t de Student a un nivel de confianza p y nef grados de libertad y obtenido de tabla 2 [1]. Comparando la Ec. (36) con la Ec. (37) es evidente que el factor de cobertura k de la Ec. (36) corresponde al valor de $tp(v_{ef})$. Frecuentemente, cuando nef es suficientemente grande, no se encuentra diferencia significativa en los resultados numéricos

obtenidos con la Ec. (37) para un p dado de aquéllos obtenidos con la Ec. (36) tomando k de la distribución normal para el mismo p . Una buena práctica es realizar el cálculo riguroso con la Ec. (37) y entonces decidir sobre la conveniencia de usar simplemente la Ec. (36) [16].

a. Expresión de la incertidumbre

Es expresar los resultados de sus mediciones con un nivel de confianza no menor al 95%, en vista de la costumbre en laboratorios similares.

Es difícil asegurar un valor preciso de la incertidumbre debido a las múltiples aproximaciones realizadas durante su estimación. Por ello, generalmente los valores de $tp(vef)$ para $p = 95\%$ se aproximan por los que corresponden a $tp(vef)$ para $p = 95,45\%$ con el fin de obtener un valor de $k = 2,00$ en el límite de una distribución normal.

Los valores de $tp(vef)$ para $p=95,45\%$ se muestran en la siguiente tabla 2:

TABLA N° 2: Valores de $tp(vef)$ para $p=95,45\%$

v	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	50	100	∞
$tp(vef)$	13.97	4.53	3.31	2.87	2.65	2.52	2.43	2.37	2.32	2.28	2.13	2.05	2.025	2.00

La expresión de la incertidumbre expandida U incluye su indicación como un intervalo centrado en el mejor estimado y del mensurando, la afirmación de que p es del 95% (o el valor elegido) aproximadamente y el número efectivo de grados de libertad, cuando sea requerido. Una manera de expresar el resultado de la medición es:

$$Y = y \pm U$$

Ec. (43)

El número de cifras significativas en la expresión de la incertidumbre es generalmente uno, o dos cuando la exactitud es alta (si la primera cifra significativa es uno o dos, cabe la posibilidad de usar un dígito más para evitar la pérdida de información útil). Además debe asegurarse que el número de cifras significativas del valor del mensurando sea consistente con el de la incertidumbre [16].

CAPITULO SEGUNDO

DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE LA VALIDACION DE PROTEINAS EN MUESTRA DE HARINA DE PESCADO

a. Muestras de trabajo

Para la realización del presente trabajo se contó con muestras de harina de pescado pulverizadas a 0.5 mm. De diámetro.

b. Aparatos y materiales

Equipo analizador de Proteína vía Combustión (LECO FP 528), este instrumento está 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.
- Estándares y reactivos, a continuación en la Tabla 3 y 4 se detalla los estándares y reactivos utilizados.

TABLA N° 3: Estándares utilizados para el desarrollo del método: Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.

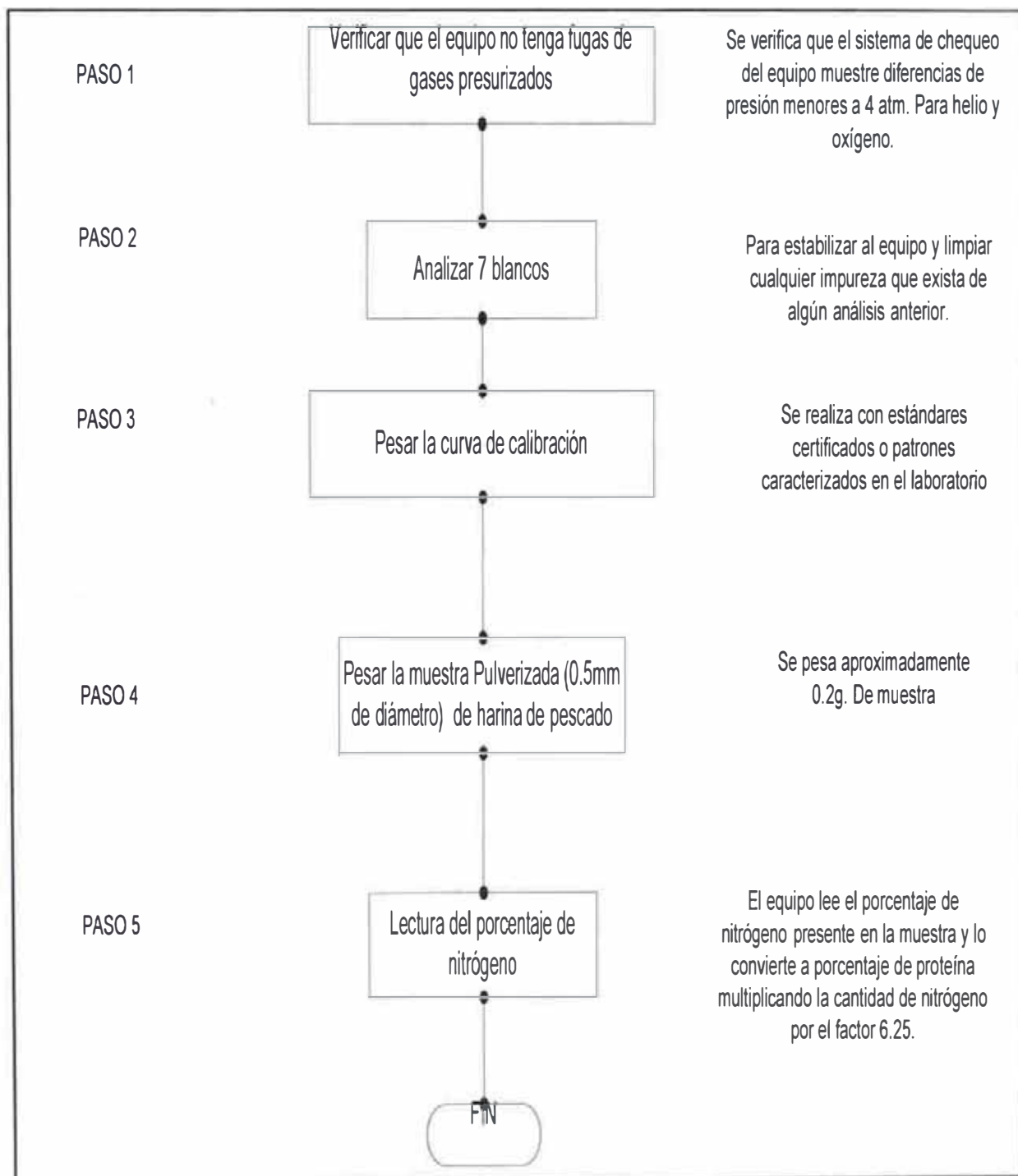
ESTANDAR	CONCENTRACION	TOLERANCIA	PUREZA	MARCA	LOTE
ACIDO NICOTINICO	11.372% N	+ / - 0.150	99.0	MERCK	S52358 14919
L-LISINA MONOCLORHIDRAT ADO	15.330% N	+ / - 0.150	99.6	MERCK	K38877 400
EDTA	9.580	+ / - 0.020	99.0	LECO	1052

TABLA NO 4: Reactivos utilizados para el desarrollo del método: Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.

REACTIVO	LOTE	MARCA
N-CATALYST	901	LECO
FURNACE REAGENT(CaCO ₃)	707	LECO
MAGNESIUM OXIDE	810	LECO
COPPER STICKS	1619	LECO
LECOSORB	78001	LECO
MAGNESIUM PERCLORATE	807	LECO
ALUMINA OXIDE	901	LECO
COPPER TURNINGS	11	LECO

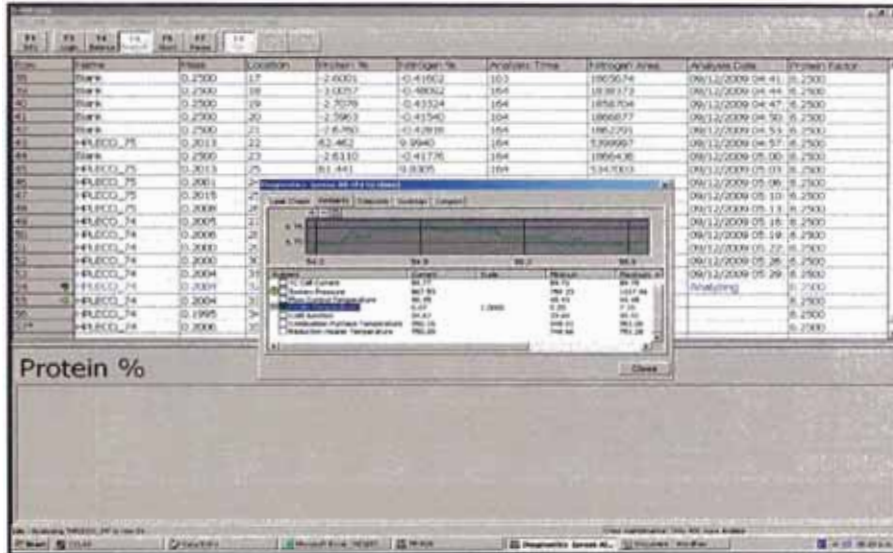
A continuación en el Diagrama 4.2 se presenta el proceso de análisis del porcentaje de proteína en muestra de harina de pescado.

Fig. 2. Diagrama de flujo del proceso de determinación de porcentaje de proteína en muestras de harina de pescado



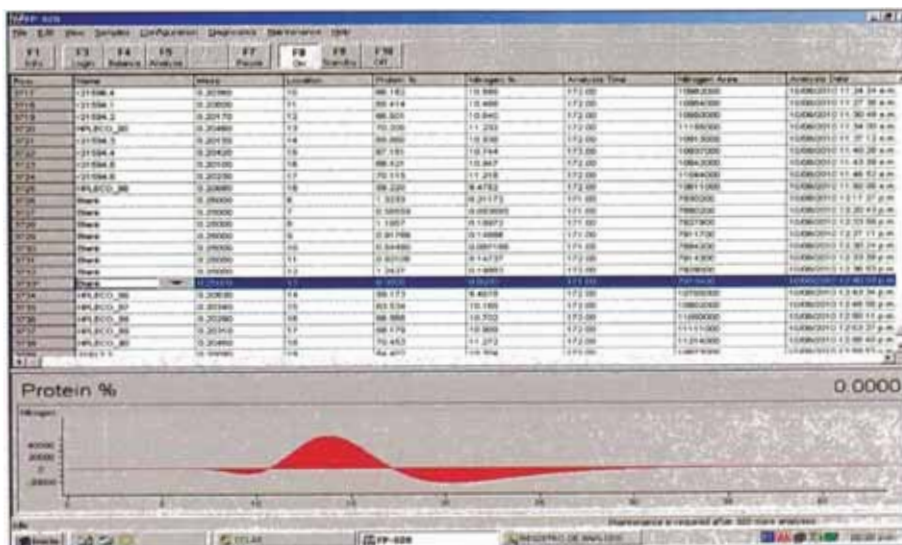
PASO 1: Chequeo de fugas de presión del equipo LECO FP 528.

Fig. 3 el sistema de chequeo del equipo para continuar con el análisis debe existir una diferencia de presión menor a 4 atm en un tiempo de análisis de 60 segundos. Para helio y oxígeno.



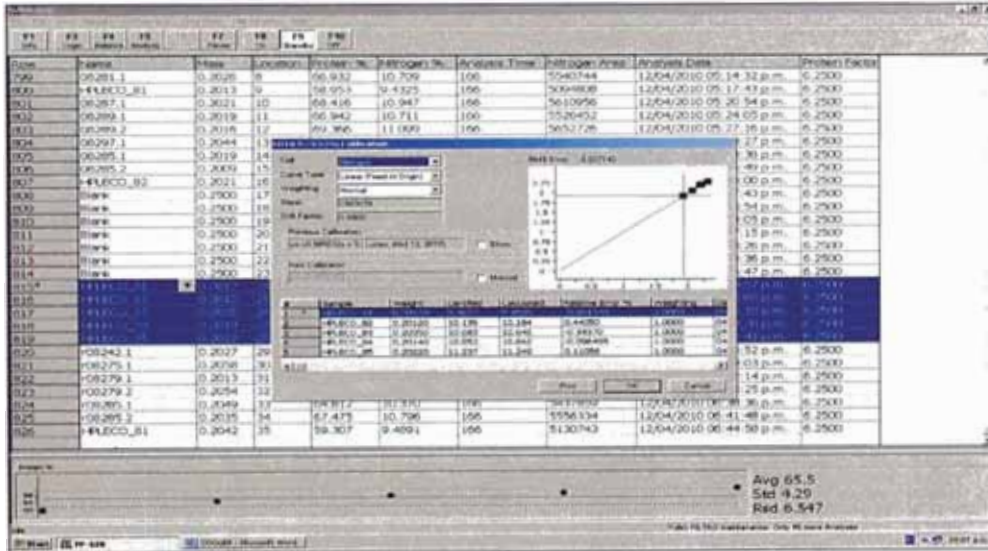
PASO 2: Análisis de blancos

Fig. 4. Se analizan blancos para estabilizar al equipo y limpiar cualquier impureza que exista de algún análisis anterior, al finalizar el análisis de los blancos y obtener una diferencia entre los valores de los blancos menor a 0.05% de proteína se procede a analizar la curva de calibración.



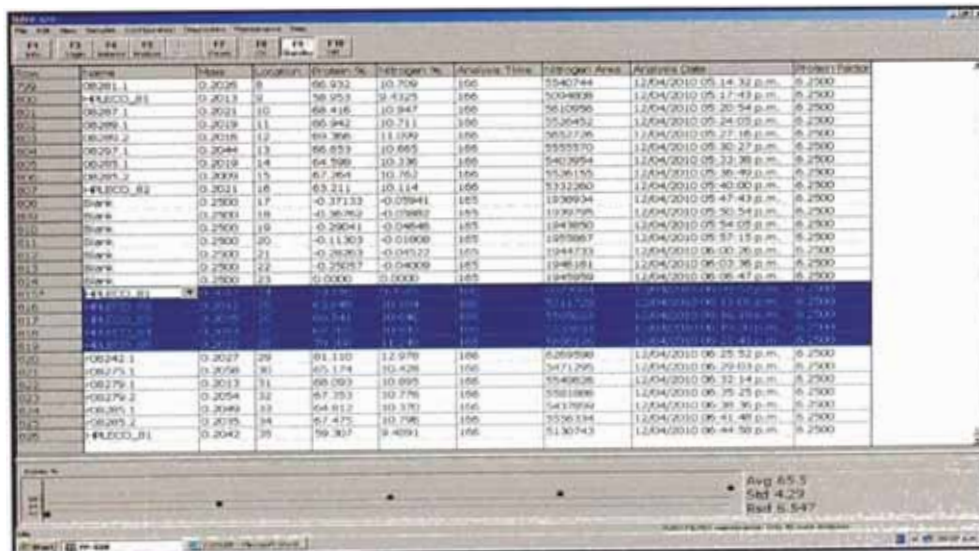
PASO 3: Pesar patrones con diferentes concentraciones para realizar la curva de calibración.

Fig. 5. Se realiza con estándares certificados o patrones caracterizados en el laboratorio que poseen una concentración de proteína caracterizada u con una variación ya determinada.



PASO 4: Analizar la muestra pulverizada

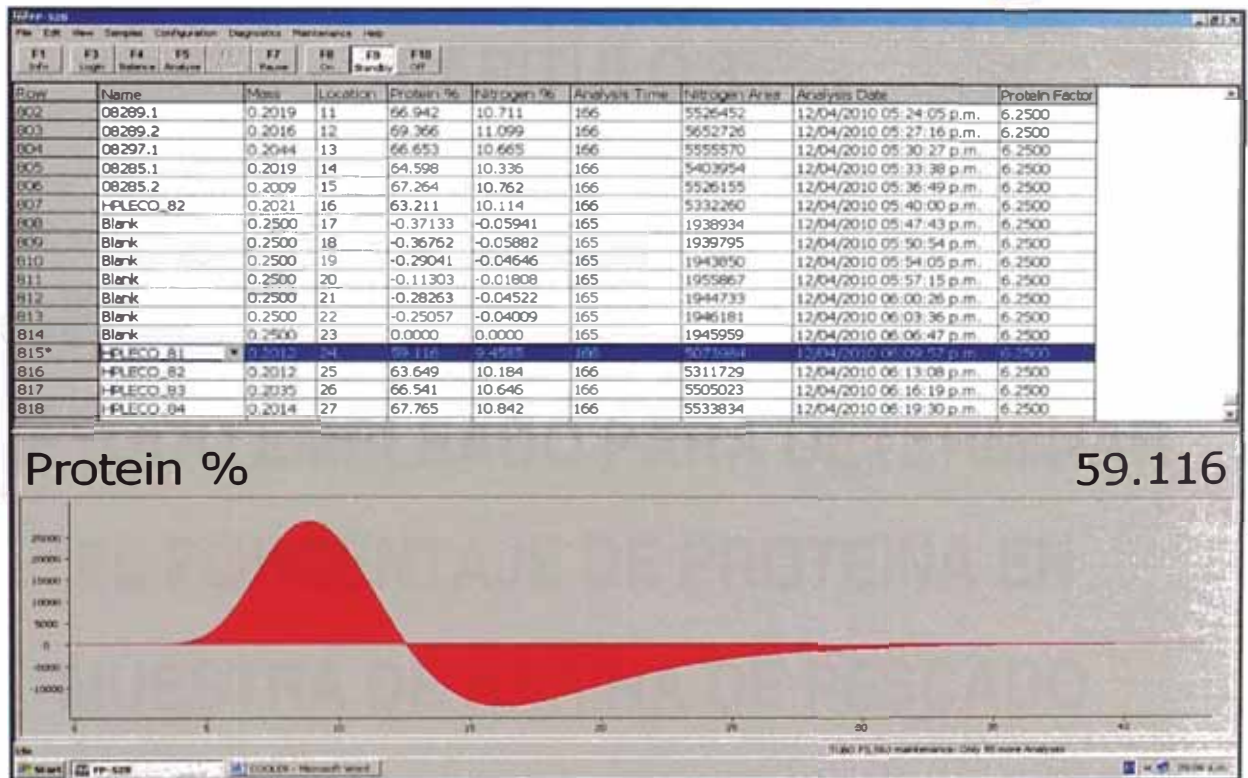
Fig. 6. Se pesa aproximadamente 0.2g. De muestra que luego es analizada por el equipo.



PASO 5: Lectura del porcentaje de nitrógeno. El nitrógeno es leído en una celda de termo conductividad, obteniendo un espectro como el que se muestra en la Fig. 4.7, el software del equipo integra el área que encierra el espectro y lo convierte a porcentaje de nitrógeno. Este porcentaje de nitrógeno multiplicado por un factor de 6.25 es transformado a porcentaje de proteína.

$$\% \text{ PROTEÍNA} = \% \text{ NITRÓGENO} \times 6.25 \text{ Ec. (44)}$$

Fig. 7. El equipo lee el porcentaje de nitrógeno presente en la muestra y lo convierte a porcentaje de proteína multiplicando la cantidad de nitrógeno por el factor 6.25



CAPITULO 3:

DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL METODO EMPLEADO PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PROTEINA EN MUESTRA DE HARINA DE PESCADO

2.1 PREPARACION DE LA MUESTRA DE HARINA DE PESCADO

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. En la tabla N° 5 se muestra los resultados obtenidos para ser usados en la validación.

Tabla de datos válidos: Resultados de Proteína por el método Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.

TABLA N° 5: Datos obtenidos por tres analistas en tres distintos niveles de concentración de proteínas.

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	57.3
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	76.4	76.35	76.31	76.33

2.2 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. Debido a las características del método (único método desarrollado en el país), tomaremos la reproducibilidad intermedia como una aproximación a la reproducibilidad del laboratorio basándonos en la norma técnica peruana ISO/NTP IEC: 2005.

2.2.1 Cálculo de la Estadística de Consistencia en el laboratorio (MANDEL: h , entre analistas), indicándonos que tan alejado esta el valor obtenido por un analista respecto al promedio de los demás analistas y de Consistencia dentro del Laboratorio (MANDEL: k , dentro de analistas), indicándonos que si alguno de los analistas tiene un valor de k más grande posee un repetibilidad mas pobre que los demás analistas. Calculo de la estadística de la consistencia entre analistas, h , para cada analista (ISO 5725-2/7.3.1.1).

$$h_i = \frac{X_i - X_m}{\sqrt{(1/p-1) \sum_{i=1}^p (X_i - X_m)^2}}$$

Ec.(45)

Donde:

X_i , es el promedio de datos de un analista.

X_m , es el promedio de todos los analistas participantes.

P , es el número de analistas participantes.

La consistencia estadística en el laboratorio (aplicado en condiciones de repetibilidad intermedia para cada analista) se calcula con el estadístico k mediante:

$$k_i = \frac{S_{L,i}}{S_r}$$

Ec.(46)

Donde:

$S_{L,i}$, es la desviación estándar de repetibilidad dentro de los valores obtenidos por un analista.

S_r , es la desviación estándar de repetibilidad

Los valores críticos y los resultados se presentan en la tabla N ° 6 y 7 respectivamente:

TABLA NO 6: Valores Críticos h, k

Valores	h	k
1%	1.15	1.49
5%	1.15	1.37

TABLA N° 7: 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° 7 se tienen los valores de h y k para cada muestra, calculados. Todos están dentro de los valores críticos tanto al 1% y al 5%.(No hay ningún valor inconsistente)

El análisis de las figuras 8 y 9 de h y k indican que los resultados no son marcadamente diferentes de los otros, por tanto conservaremos los datos por el momento.

Fig. 8. Valores de h para los resultados de proteína

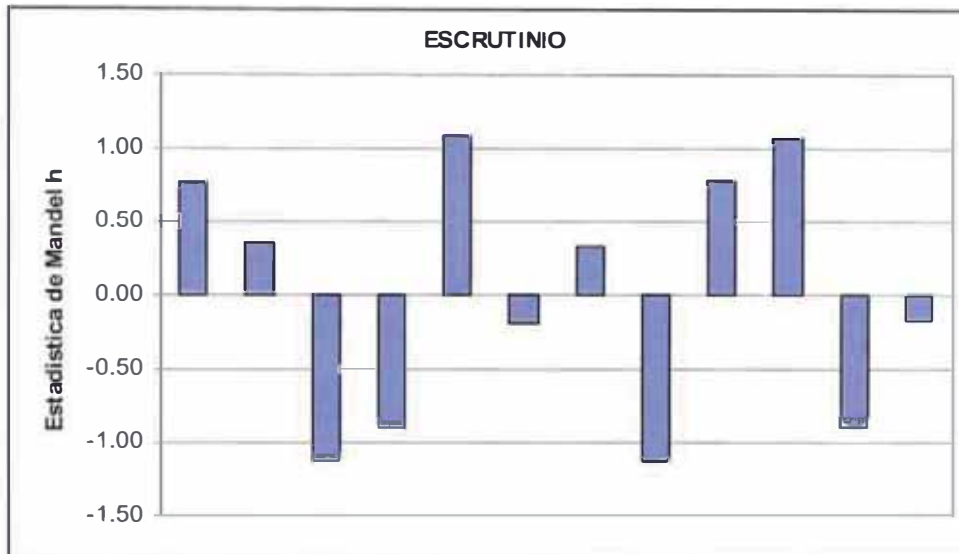
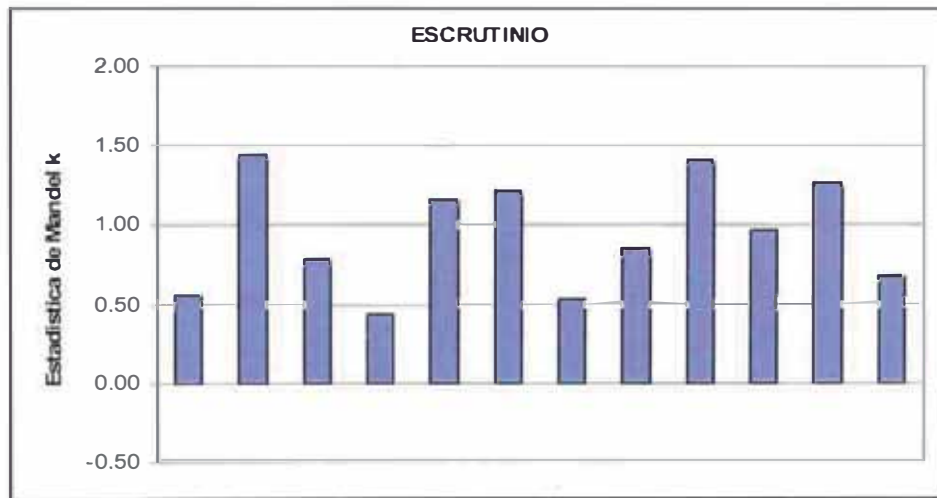


Fig. 9 Valores de k para los resultados de proteína



2.2.2 Prueba numérica para dar validez a los resultados - Prueba de Cochran

La prueba de Cochran la aplicaremos para identificar valores rezagados, erráticos o atípicos. Utilizaremos la siguiente fórmula en condiciones de reproducibilidad intermedia:

$$C = \frac{S^2_{max}}{\sum_{i=1}^p S^2_i} \text{ Ec.(47)}$$

Donde: S^2_{max} es la máxima desviación estándar del grupo y $\sum_{i=1}^p S^2_i$ es la suma de todas las desviaciones.

Los valores críticos y los resultados se presentan en la tabla 8 y 9 respectivamente:

TABLA N° 8: Valores Críticos de la Prueba de Cochran

Valores Críticos	
1%	0.793
5%	0.707

TABLA NO 9: 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	0.49
	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.

2.2.3 Prueba numérica de observación de valores erráticos o atípicos-prueba de Grubbs en condiciones de reproducibilidad intermedia.

Los valores críticos y los resultados se presentan en la tabla 10 respectivamente: Para verificar que nuestra serie de datos, alguno o algunos de los valores no difieran del resto de forma inexplicable (errores crasos) se aplica un contraste de datos anómalos, en el cual se plantea la hipótesis nula H_0 : todas las medidas proceden de la misma población, que se prueba mediante el contraste de Grubbs (formalmente simbolizado por una G , aunque a veces se emplea una T). Se ordenan los datos de menor a mayor y por definición los valores sospechosos serán el valor mínimo y el valor máximo, para los cuales se aplica la siguiente fórmula:

$$g = \frac{\text{Valor sospechoso} - Y_{\text{promedio}}}{S} \quad \text{Ec.(48)}$$

$$G = \left| \frac{\text{Valor sospechosomin} - Y_{\text{promedio}}}{S} \right| \quad \text{Ec.(49)}$$

Donde:

Valor sospechoso, es aplicado para el máximo valor y el mínimo valor de la serie de datos.

Y promedio, es el promedio de valores de la serie.

S, es la desviación estándar de la serie de datos.

Se acepta la hipótesis nula si G calculado es menor que el valor crítico para una probabilidad de 0,05 (nivel de confianza del 95%) y n mediciones

TABLA N° 10: Valores Críticos de la prueba de Grubbs

Valores Críticos	
1%	1.155
5%	1.155

TABLA N° 11: 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	1.08
	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.

2.3 NORMALIDAD Y HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS

Muchos eventos reales y naturales tienen una distribución de frecuencias cuya forma es muy parecida a la distribución normal. La distribución normal es llamada también campana de Gauss por su forma acampanada.

2.3.1 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 gráfico 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 Ho a un nivel de significación aproximado de 0,05 si p-value es inferior a 0.05

En la fig. 5.1, se observa los gráficos de probabilidad 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 obtiene valores de p-value mayores de 0.05 por lo que las muestras tienen una distribución normal.

TABLA N° 12: 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

Analista	Proteína %	RESI1
1	57.388	0.048
1	57.260	-0.082
1	57.311	-0.032
1	57.415	0.078
1	57.480	0.138
1	57.187	-0.152
2	57.546	0.247
2	57.182	-0.123
2	57.486	0.187
2	57.610	0.307
2	57.051	-0.253
2	56.937	-0.363
3	57.237	0.072
3	57.358	0.192
3	56.925	-0.238
3	57.182	0.012
3	57.057	-0.108
3	57.238	0.072

Muestra 2

Analista	Proteína %	RESI1
1	63.497	0.03
1	63.443	-0.03
1	63.374	-0.1
1	63.409	-0.06
1	63.608	0.14
1	63.493	0.02
2	63.849	0.122
2	63.504	-0.228
2	63.500	-0.228
2	64.006	0.282
2	63.599	-0.128
2	63.906	0.182
3	63.391	-0.173
3	63.903	0.337
3	63.776	0.217
3	63.378	-0.183
3	63.361	-0.203
3	63.567	0.007

Muestra 3

Analista	Proteína %	RESI1
1	70.141	0.05
1	69.986	-0.1
1	70.057	-0.03
1	70.170	0.08
1	70.045	-0.04
1	70.126	0.04
2	69.954	0.02
2	69.903	-0.03

Muestra 4

Analista	Proteína %	RESI1
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

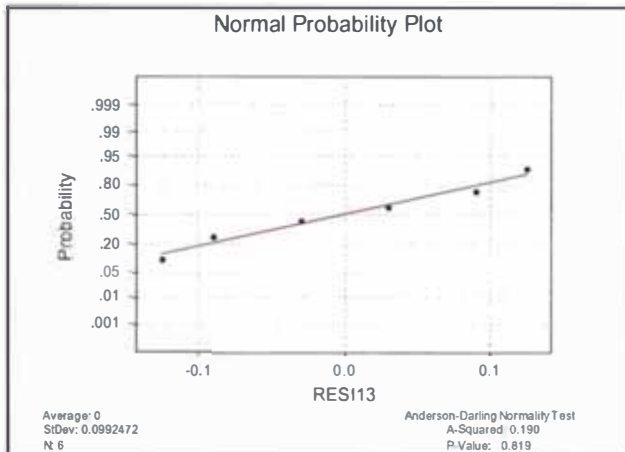
2	69.886	-0.04
2	70.045	0.12
2	69.746	-0.18
2	70.044	0.11
3	70.203	0.062
3	70.125	-0.008
3	69.910	-0.228
3	69.936	-0.198
3	70.379	0.242
3	70.271	0.132

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

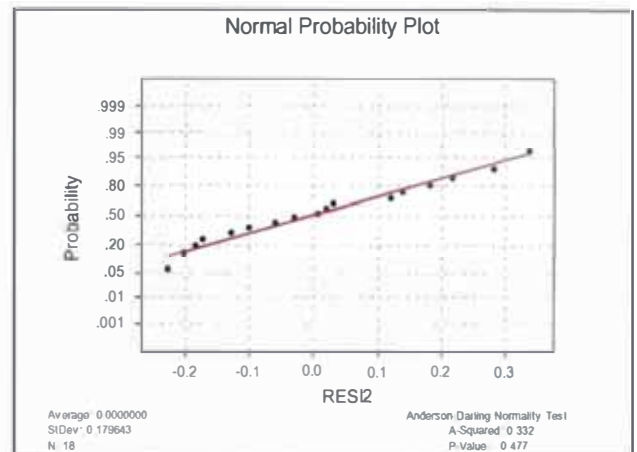
Gráficos de probabilidad de normalidad correspondientes a las muestras analizadas por el método Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.

Fig. 10 Gráficos de probabilidad que muestran la normalidad de los datos realizados en los cuatro niveles de concentración de proteína (tabla N° 12)

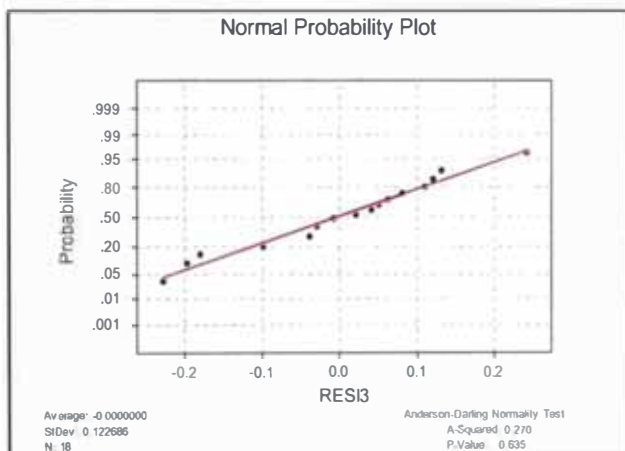
Muestra 1



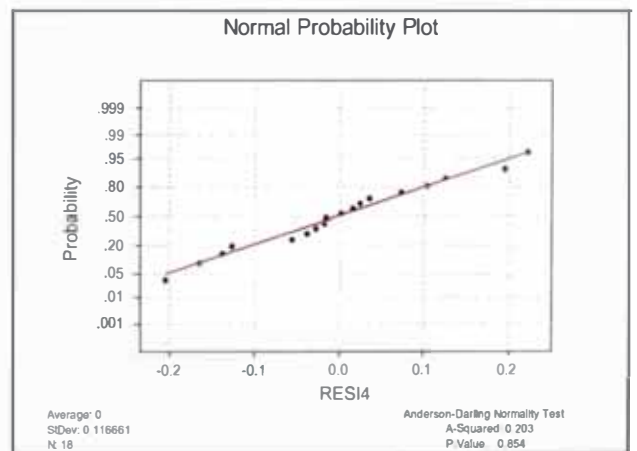
Muestra 2



Muestra 3



Muestra 4



2.3.2 Homogeneidad de los Datos

En las pruebas paramétricas de estadística, como la t de Student y el análisis de varianza de Fischer, se exige como requisito previo la homogeneidad de las varianzas. Esta técnica es un valioso auxiliar para decidir la homogeneidad o heterogeneidad del error estadístico.

Al respecto, se debe considerar que la varianza corresponde a la suma de las diferencias de los valores individuales en relación con el promedio, elevadas al cuadrado y divididas entre los grados de libertad, es decir, son variaciones alrededor de la medida de tendencia central.

Técnica Numérica de Homogeneidad de Varianzas. Prueba de Barlett, debido a los datos que se tiene (datos normales).

La estadística de la prueba es:

$$X_{\sigma^2} = 2.3026 * \frac{q}{c} \quad \text{Ec. (50)}$$

Donde:

$$q = ((\sum(n_i) - p) * \text{Log}_{10}(S_p^2)) - (\sum(n_i - 1) * \log_{10} S_i^2) \quad \text{Ec. (51)}$$

$$c = 1 + \left(\frac{1}{3 * (p - 1)} \right) * (\sum(n_i - 1)^{-1} - (\sum(n_i) - p)^{-1}) \quad \text{Ec. (52)}$$

$$S_p^2 = \frac{\sum(n_i - 1) * S_i^2}{\sum(n_i) - p} \quad (53)$$

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 $\overline{(p-1)} = 2$

$$X_c^2 = 5.99 \text{ (valor critico)}$$

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° 13: Resultados de la Prueba de Bartlett

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 ° 13, 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.

2.4 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.

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° 14: 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	57.3	57.17	57.27	0.196	0.201
2	63.47	63.73	63.56	63.59	0.19	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	0.16	0.188

Gráficamente se tiene:

Fig. 11. Tendencia de la Desviación Estándar de Repetibilidad (S_r)

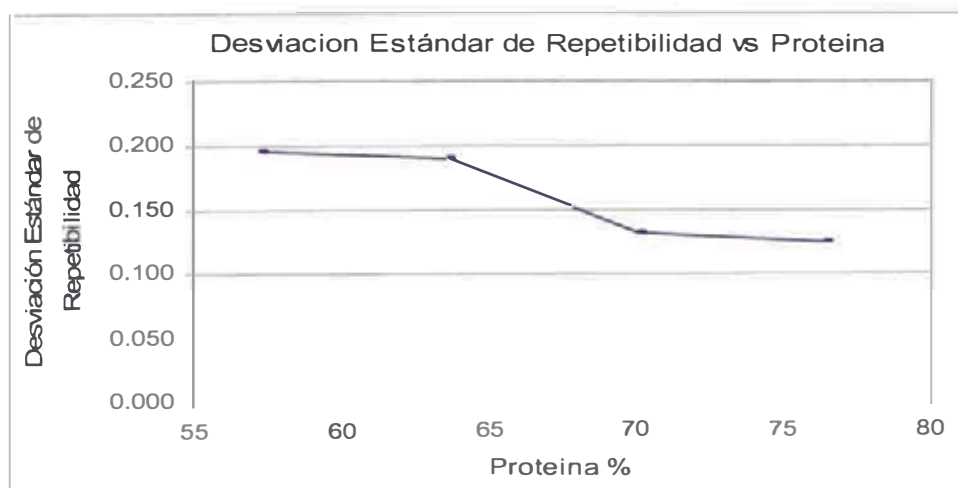
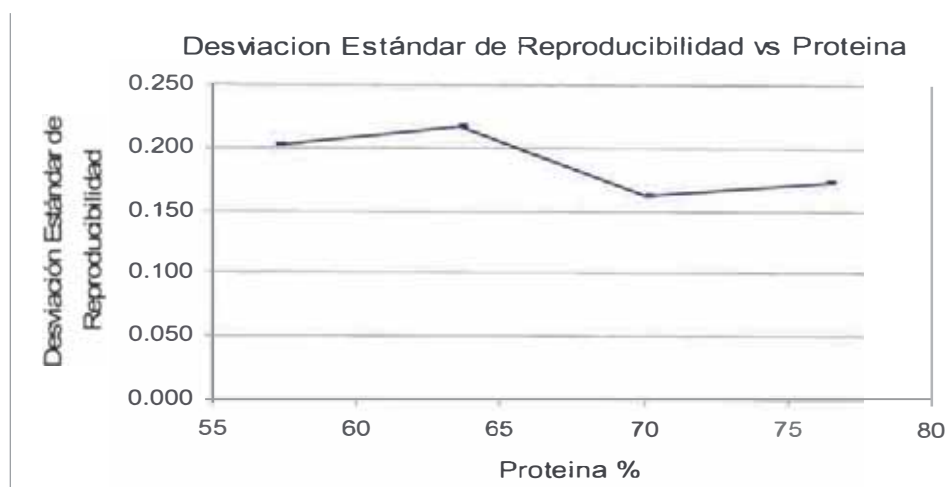


Fig. 12. Tendencia de la Desviación Estándar de Reproducibilidad (SR)



De la fig. 5.2 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: $SR = 0.188$

Evaluación de la desviación estándar relativa de repetibilidad y desviación estándar relativa de reproducibilidad: Cálculo de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad (DSR_r) y Reproducibilidad (DSR_R).

TABLA N° 15: 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

Muestra	Promedio (%)	RSD _r	RSD _R
4	76.35	0.268	0.388
	Media	0.289	0.339

En las **fig. N° 5.4 y 5.5** 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:

$$DSR_R = 0.339$$

Fig. 13 Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad

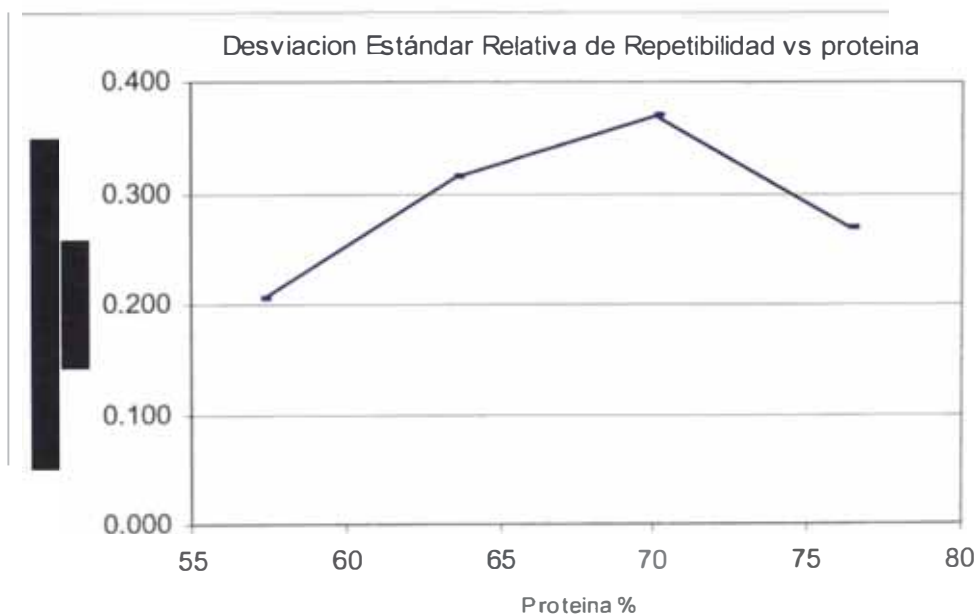
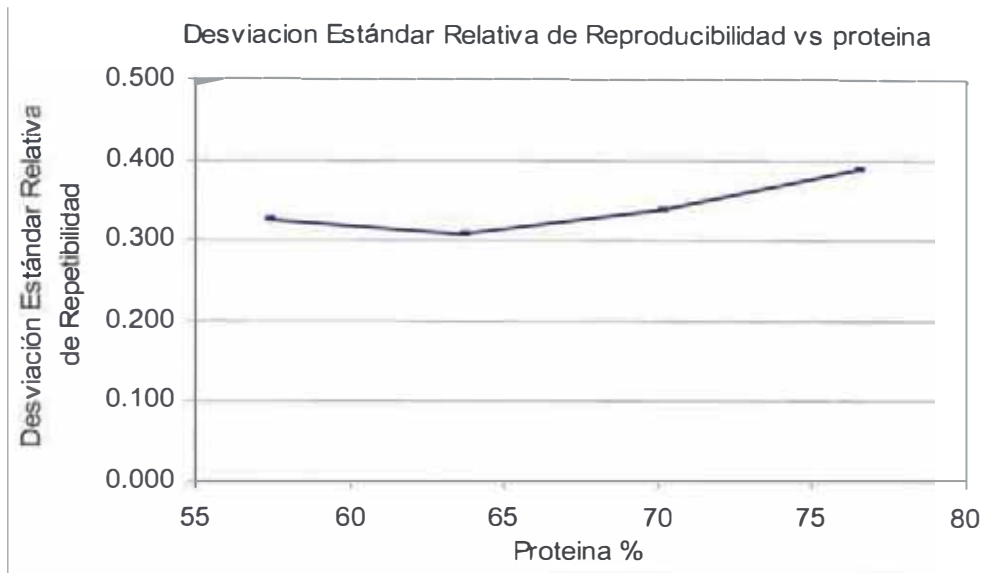


Fig. 14 Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad



Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad:

TABLA N° 16: Resumen de la Repetibilidad y Reproducibilidad por niveles

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

Límite de Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad y Límite de Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad

El Límite de Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad es:

$$\text{LDSR } r = 2.8 \times \text{DSR } r \quad \text{Ec.(54)}$$

De la ecuación Ec.(54) se obtiene el siguiente resultado

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

El Límite de Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad es:

$$\text{LDSR } R = 2.8 \times \text{DSR} \quad \text{Ec.(55)}$$

De la ecuación Ec.(55) se obtiene el siguiente resultado

$\text{LDSR } R = 2.8 \times 0.339 = 0.949 \%$, entonces cuando se repita el análisis de una muestra en condiciones de reproducibilidad, la desviación estándar de reproducibilidad no tendrá que ser mayor a 0.949% de proteína.

2.5 VERACIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO

Comparación con otro método o un Valor de Referencia en dos o más muestras de diferente concentración T-PAREADA.

De esta forma analizaremos si existe una diferencia significativa entre los valores que se obtienen del método AOAC 984.13 y los valores del método AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl(método candidato).

Primero analizaremos los datos para ver si existe alguna correlación entre los dos métodos con el fin de determinar una constante que pueda relacionarme un método con el otro.

TABLA N° 17: Comparación del Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl vs. AOAC 984.13

Muestra	Método AOAC 984.13	Método Candidato
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

Prueba de hipótesis para la correlación entre métodos

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

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

$$tr = \frac{r}{S_r} \quad \text{Ec. (56)}$$

$$S_r = \frac{1 - r^2}{N - 2} \quad (57)$$

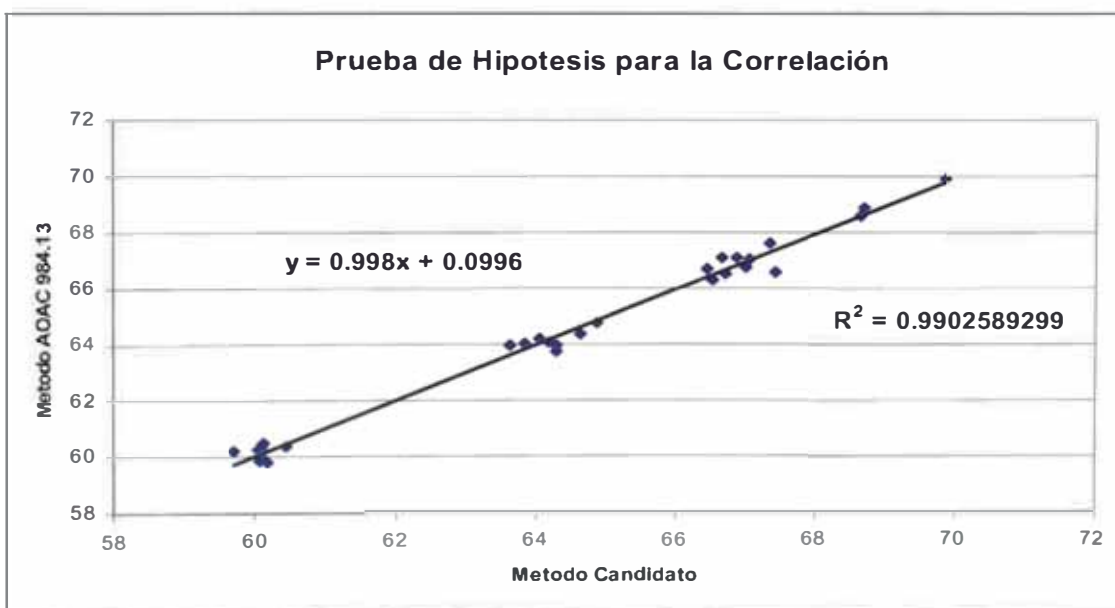
Donde los valores para r^2 , N son los siguientes:

$$r^2 = 0.9902589299,$$

$$N = 29$$

$$r = 0.99511755$$

Fig. 15. Prueba de correlación entre los métodos de Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl vs. AOAC 984.13



Reemplazando los valores de r y N en la ecuación Ec.(57) se obtiene:

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

Reemplazando los valores de r y Sr en la ecuación Ec.(56) se obtiene:

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

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

t calculado > t 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 candidato.

TABLA Nº 18: Resultados de Proteínas en porcentaje de muestras independientes y de los sesgos correspondientes.

Muestra	Método AOAC 984.13	Método Candidato	Diferencia absoluta
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	-0.15
6	66.59	67.41	0.828
7	60.35	60.45	0.107
8	63.92	64.29	0.37
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

Muestra	Método AOAC 984.13	Método Candidato	Diferencia absoluta
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

Realizamos el escrutinio de resultados utilizando el h de Mandel al 95% de confianza ($h= 1.91$) para hallar algún valor inconsistente.

TABLA N° 19: Resultados de los sesgos después del escrutinio de resultados.

Muestra	Método AOAC 984.13	Método Armonizado	Diferencia absoluta	$h= 1.91$
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 Nº 20: Resultados de la homogeneidad de los sesgos después del escrutinio de resultados

Muestra	Método AOAC 984.13	Método Armonizado	Diferencia absoluta	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	60.3	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	0.03	
		Sd	0.285	
		n (datos)	28	

Hipótesis planteada:

Hipótesis planteada ó nula $H_0: d = 0$

Hipótesis alternativa $H_1 :d \neq 0$

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

Una cola: α

Dos colas: $\alpha/2$

Realizando los cálculos y utilizando los datos de la tabla N ° 20 según la prueba estadística se tiene:

$$t_{exp} = \frac{\bar{d}}{S_d / \sqrt{n}}$$

Donde:

d: Promedio de las diferencias entre ambos métodos.

Sd: Desviación estándar de las diferencias entre ambos métodos.

n: Número de datos.

Reemplazando los valores de: d, Sd, y n en la ecuación Ec.(58) se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{0.030}{0.285 / \sqrt{28}}$$

$$t_{exp} = 0.553 \quad \text{y} \quad t_{critico} = 2.052$$

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).

Determinación de sesgo de laboratorio

$$\text{Sesgo} = \bar{d} \pm \frac{t_{exp} * S_d}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec.(59)}$$

Utilizando los datos de la tabla N °20 y reemplazando en Ec. (59), se realiza el cálculo del sesgo:

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

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

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

2.6 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

La estimación de la incertidumbre del método para determinar proteínas en harina de pescado por el método Dumas, está basado en la Guía para Determinar la Incertidumbre de la Medición CENAM.

2.6.1 **Método: AOAC OFFICIAL METHOD 990.03 PROTEIN (CRUDE) IN ANIMAL FEED**

Producto: Harina de pescado

Modelo físico: Se pesa aprox. 0,2000 gr, de harina de pescado en una balanza analítica calibrada y bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (21 +/-2oC Y humedad<73%). La muestra ingresa encapsulada en el cabezal del equipo LECO. Es sellada y purgada de cualquier gas atmosférico que haya podido entrar durante la carga. El ballast y la línea de gas también son purgadas.

La muestra cae en la cámara de combustión, en donde la temperatura del horno a 950.°C y el oxígeno presente, originan la combustión de la muestra. Estos gases atraviesan los filtros de partículas y cooler termoeléctrico, se recogen en el ballast. Luego los gases son homogenizados, una alícuota de 3 cc es recogida para el análisis esta pasa por cobre caliente para quitar el oxígeno y reducir los NOx a N₂, para después por Lecosorb y Anhidrona quitar el CO₂ y H₂O. El producto de combustión resultante es medido en una celda de termoconductividad diferencial. El resultado final se muestra como %Nitrógeno*6,25

Modelo matemático:

$$Y = (A1 \cdot X + A0) \cdot M \cdot B$$

Ec.(60)

Donde:

Y = Área

X = Concentración de proteína (%)

A1 = Pendiente de la recta

A0 = Ordenada de la recta

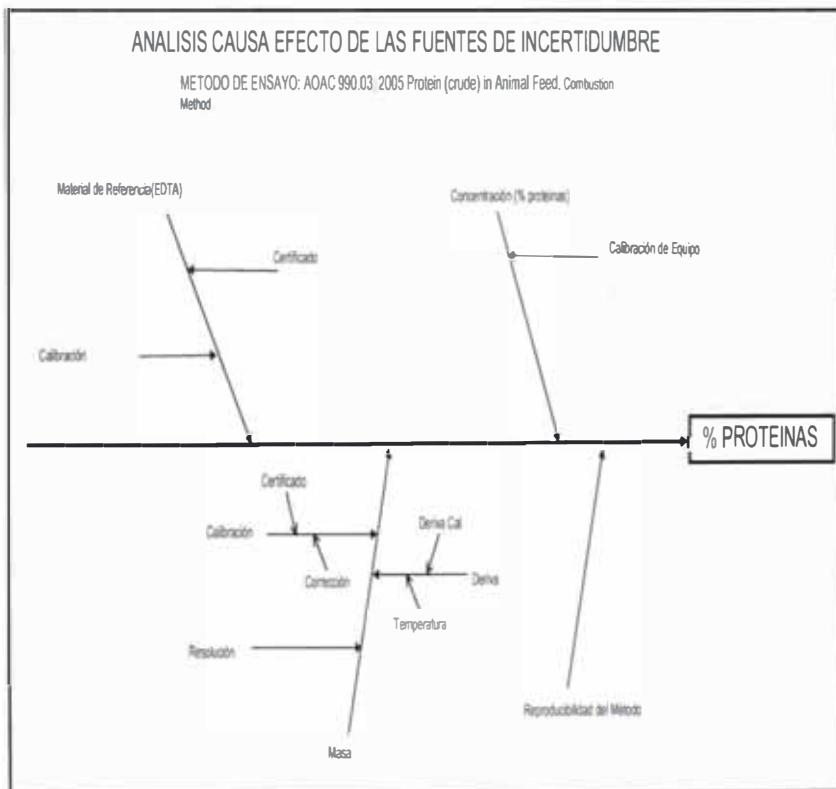
M = masa de la muestra en g.

B = Constante (6,25)

Para convertir nitrógeno a proteína

Fuentes de incertidumbre: Las fuentes de incertidumbre se determinaron con un diagrama causa efecto, como se muestra en la fig.5.6

Fig. 16. Diagrama de causa y efecto para determinar las fuentes de incertidumbre que afectan al método de determinación de proteínas por el método Dumas.



De la figura 5.6 se puede obtener que hay tres grandes fuentes de incertidumbre que son: la masa, la repetibilidad de la muestra y las variaciones que aporta el equipo. En la siguiente ecuación Ec.(61) se agrupan estas fuentes de incertidumbre.

$$U_{(TOTAL)}^2 = U_{(Balanza)}^2 + U_{(Equipo)}^2 + U_{(Repetibilidad\ de\ la\ muestra)}^2$$

Ec.(61)

Donde:

$U_{(Balanza)}$: debido a las fuentes de error se generan al momento de pesar la muestra.

$U_{(Equipo)}$: debido a las fuentes de error se generan al momento analizar la muestra en el equipo.

$U_{(Repetibilidad\ de\ la\ muestra)}$: están incluidas las fuentes de error de los analistas y la repetibilidad de la muestra.

2.6.2 Desarrollo de la incertidumbre por cada una de las fuentes determinadas

Con el diagrama de causa y efecto se determinaron tres fuentes principales que aportan variación en el resultado y que proporcionan a la incertidumbre del método que estamos estudiando (masa, la repetibilidad de la muestra y las variaciones que aporta el equipo). En este capítulo se hará el estudio de cada una de estas fuentes.

Incertidumbre debida a la masa: El aporte de incertidumbre debido a la masa se termina haciendo el estudio a la balanza que se utiliza para pesar las muestras y los estándares que se utilizan.

$$U_{(balanza)}^2 = U_{(calibración)}^2 + U_{(deriva)}^2$$

Ec.(62)

De donde podemos hallar cada una de las incertidumbres:

1.- Incertidumbre de la Calibración de la balanza $U_{(Calibración)}^2$

$$U_{(calibración)}^2 = U_{(Certificado)}^2 + U_{(Corrección)}^2$$

1.1- $U_{(Certificado)}^2$

W (g)	=	0.2067
-------	---	--------

Ecuación obtenida del Certificado de Calibración de la balanza

A=	0.08
B=	0.0025
I(L)=	0.206699793

$U(\text{calib}) = A m g + B * I(L) W m g$.. según la expresión dada en el certificado de calibración de octubre 2008

Incertidumbre Expandida(g) +/-	0.0005967
--------------------------------	-----------

Incertidumbre Estandar	0.00029835
------------------------	------------

1.2- $U_{(Corrección)}^2$

Corrección	-0.0001
------------	---------

$U_{(calibración)}$	0.000314663
---------------------	-------------

2.- Incertidumbre de Resolución

2.1.- $U_{(Resolución)}^2$

Resolución	0.0001
------------	--------

3.- Incertidumbre de la deriva $U_{(deriva)}^2$

$$U_{(Deriva)}^2 = U_{(Deriva de Calibración)}^2 + U_{(Temperatura)}^2$$

3.1- $U_{(Deriva)2}$

Corrección	-0.0001
Corrección del Año Anterior	

$U_{(Deriva)}$	0.000058
----------------	----------

3.2- $U_{(\text{Temperatura})}^2$

$$\mu_{\text{Temperatura}} = \frac{\Delta T \times \text{Coeficiente de deriva} \times \text{masa}}{\text{raiz}(3)}$$

Siendo:

Cof. de deriva por sensibilidad térmica =	0.000002
Masa	0.2025 g
Temperatura del Laboratorio:	22 ±2 = máx:

Temperatura de Calibración de la balanza:

Minima =	20
Máxima =	24

$$\mu_{\text{Temperatura}} = \frac{(24-20) \times 2 \times 10^{-6} \times 0.2025}{\text{raiz}(3)}$$

$U_{\text{Temperatura}} =$	0.0000009
----------------------------	-----------

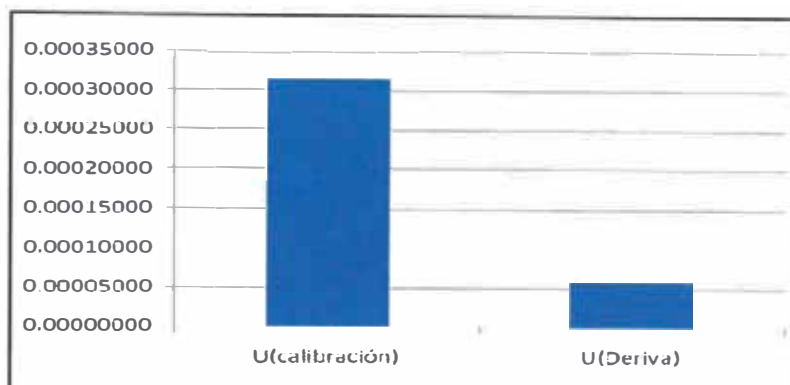
$U_{(\text{Deriva})}$	5.77426E-05
-----------------------	-------------

$U_{(\text{balanza})}^2 =$	$U_{(\text{calibración})}^2 + U_{(\text{deriva})}^2$
----------------------------	--

$U_{(\text{balanza})} =$	0.0000320
--------------------------	-----------

$U_{(\text{BALANZA})}$	Resumen
U(calibración)	0.00031466
U(Deriva)	0.00005774

Fig. 17 Gráfico del aporte de las fuentes importantes de incertidumbre de la balanza. Donde se observa que la calibración de la balanza contribuye en mayor significancia a la incertidumbre.



Incertidumbre debido al aporte del equipo (LECO FP 528): El aporte principal de las variaciones que se puede encontrar en el equipo con el cual analizamos las proteínas, se pueden cuantificar en la curva de calibración.

TABLA N° 21: Curva de calibración mensual del equipo

Cantidad	% Proteína (X)	Áreas (Y)	$Y_i = a+bX$	$Y-Y_i$	$(Y-Y_i)^2$	$(X-X_p)^2$
1	8.42	594285	603018	8733	76269132	1252
2	8.42	596355	603018	6663	44398501	1252
3	8.42	605150	603018	2132	4544486	1252
4	8.47	604250	606580	2330	5430158	1248
5	18.14	1282955	1295481	12526	156894163	658
6	18.16	1289255	1296906	7651	58531068	657
7	18.04	1295550	1288357	7193	51744428	663
8	18.11	1299950	1293344	6606	43645710	660
9	24.04	1715755	1715803	48	2270	390
10	24.16	1712655	1724352	11697	136809516	386
11	24.12	1733950	1721502	12448	154954696	387
12	24.02	1727050	1714378	12672	160584146	391
13	36.10	2543655	2574969	31314	980572859	59
14	36.10	2549355	2574969	25614	656082119	59
15	36.03	2591550	2569982	21568	465168703	60
16	35.94	2587650	2563571	24079	579820394	62

Cantidad	% Proteína (X)	Áreas (Y)	Yi = a+bX	Y-Yi	(Y-Yi)^2	(X-Xp)^2
17	48.18	3405855	3435560	29705	882409601	19
18	48.18	3420455	3435560	15105	228172505	19
19	47.85	3451550	3412051	39499	1560182851	16
20	47.87	3447550	3413476	34074	1161059965	17
21	59.88	4236355	4269080	32725	1070930861	259
22	59.84	4219655	4266230	46575	2169271611	257
23	59.98	4319050	4276204	42846	1835764291	262
24	59.86	4311150	4267655	43495	1891792408	258
25	71.78	5057455	5116848	59393	3527526073	783
26	72.25	5100755	5150331	49576	2457804564	810
27	71.89	5189350	5124684	64666	4181628184	789
28	71.92	5178250	5126822	51428	2644867984	791
29	83.95	5910755	5983851	73096	5343017906	1612
30	83.79	5903955	5972452	68497	4691892437	1599
31	83.81	6029450	5973877	55573	3088334988	1601
32	83.79	6035050	5972452	62598	3918460778	1599
Promedio	43.80	3123312.81				
Suma					44228569354	20128

Hallando la incertidumbre de **Y** respecto a **X** con la ecuación Ec.(63).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad \text{Ec.(63)}$$

Donde la incertidumbre de **Y** respecto a **X** es: $s_{y/x} = 38396.4275$

Hallando la incertidumbre del equipo con la ecuación Ec.(64).

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ec.(64)}$$

Donde:

Y_0 : es el área de la muestra analizada (Y_0 : 4348870)

m : número de datos por nivel ($m=4$)

n : número de niveles($n=8$)

b : pendiente de la ecuación

Al reemplazar estos valores en la ecuación Ec.(64) finalmente se puede determinar el aporte de la incertidumbre del equipo: $S_{X0} = 0.293$

Incertidumbre debida al aporte de los analistas: El aporte de los analistas a la incertidumbre total se puede estudiar por medio de cómo varia la desviación estándar de reproducibilidad en los distintos niveles de estudio (cuatro niveles). De los datos de la tabla N° 21 se obtiene la máxima variabilidad de los analistas en los distintos niveles en los que se realizó el estudio. Tomamos este valor como el que influye significativamente en la incertidumbre. Donde el valor máximo de SR es: 0.217

Finalmente de combinan las tres fuentes de incertidumbre para hallar la incertidumbre combinada (utilizando la ecuación Ec.(61)), y luego de multiplicar por su factor de cobertura hallar la incertidumbre expandida.

Resumen de las fuentes de incertidumbre del método y los valores de incertidumbre hallado para cada fuente

$$U_{(TOTAL)}^2 = U_{(Balanza)}^2 + U_{(Equipo)}^2 + U_{(Repetibilidad\ de\ la\ muestra)}^2$$

DATOS A INGRESAR DE LA MUESTRA

PESO (g)	0.2067
%PROTEINA	61
AREA	4348870

Fuentes de incert	Ui
Masa	0.0000320
Material de referencia	0.01
Concentración	0.29
Repetibilidad del Método	0.18
$U_{(COMBINADA)}$	0.35
$U_{(EXPANDIDA)}$	0.69

% PROTEINA=	61	+ / -	0.69
-------------	----	-------	------

2.7 COMPARACIÓN DE RESULTADOS EN LECO 1 CON EL LECO 2

Para la comparación de resultados de ambos LECO (equipos: LECO 1 y LECO 2) se evalúan 4 patrones de harina de pescado, analizados en ambos equipos.

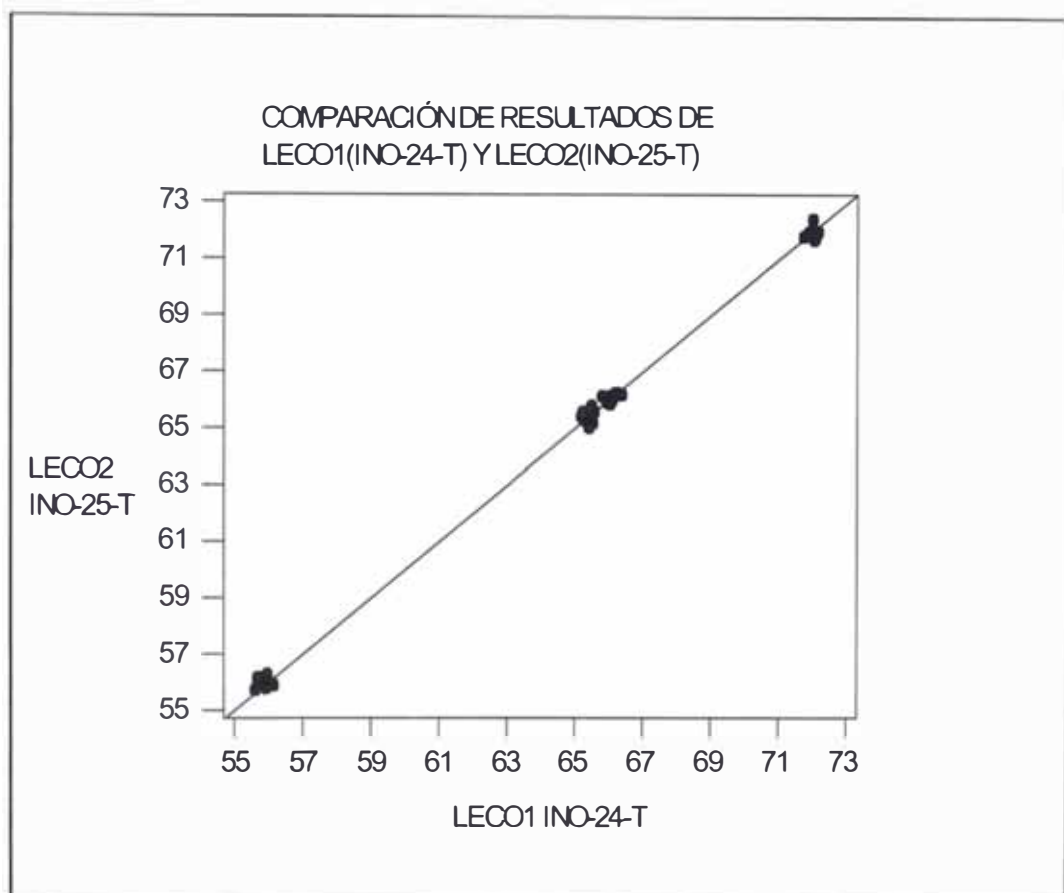
TABLA N° 22: Resultados de los patrones obtenidos en LECO1

HPLECO_7S	HPLECO_8S	HPLECO_9S	HPLECO_10S
55.88	71.73	66.27	65.29
55.88	71.93	66.37	65.39
55.95	71.99	66.02	65.35
55.71	72.02	66.12	65.54
55.68	72.04	65.81	65.20
56.15	72.06	66.03	65.58
55.61	72.04	66.18	65.49
55.94	72.00	65.95	65.41
55.74	72.16	66.06	65.49
55.91	71.87	65.79	65.23

TABLA N° 23: Resultados de los patrones obtenidos en LECO2

HPLECO_7S	HPLECO_8S	HPLECO_9S	HPLECO_10S
55.96	71.79	66.22	65.53
55.94	71.97	66.17	65.35
56.00	72.00	65.81	65.23
55.98	72.04	65.99	65.15
56.17	71.77	66.13	65.37
55.86	71.73	65.93	65.56
55.70	71.67	66.24	65.79
56.26	72.37	65.89	64.99
55.93	71.97	66.12	65.49
55.80	71.97	66.12	65.56

Fig. 18. Comparación de resultados en ambos LECO



Prueba de Hipótesis para demostrar regresión y desvío de linealidad

Regresión F calculado $>$ F tablas

F calculado $<$ F tablas

**TABLA Nº 24: Análisis de varianza para comparación de resultados en ambos equipos LECO
FP 528**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio	F c	FT	Significancia
Regresión	1	6.62E+13	6.62E+13	1.61E+06	4.17	Significativa
Error Residual	30	1232228228	41074274			
Linealidad	28	1172643228	41880115	1.41	19.45	No significativa
Error Puro	2	59585000	29792500			
Total	31	6.62E+13				

Se rechaza la hipótesis planteada y se concluye para un nivel de significancia de 0.05 (95%): que existe una gran regresión significativa entre X é Y

La linealidad no es significativa, es decir que la falta de ajuste es no significativa. La relación que existe es lineal.

2.8 LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl

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 calculado $>$ f tablas

Linealidad: t calculado $<$ t tablas

Evaluación de la Linealidad en LECO1:

TABLA N° 25: Curvas del estándar EDTA para evaluación de linealidad

Cantidad	% Proteína	Áreas	Cantidad	% Proteína	Áreas
1	8.42	485450	17	47.99	2765550
2	8.54	492750	18	47.92	2758650
3	8.57	488250	19	47.9	2747150
4	8.45	484150	20	48.07	2754250
5	17.99	1040650	21	59.93	3442250
6	17.99	1041250	22	59.91	3446950
7	18.04	1034650	23	59.96	3436350
8	18.09	1036050	24	59.88	3432250
9	24.00	1393650	25	71.89	4137950
10	24.07	1388250	26	71.87	4130550
11	24.12	1378050	27	71.85	4122050
12	24.04	1379750	28	71.8	4121350
13	35.98	2074250	29	83.81	4808750
14	35.96	2075450	30	83.76	4815850
15	35.98	2063350	31	83.9	4809750
16	36.08	2064450	32	83.74	4805250

Análisis de la regresión lineal: Los resultados de la regresión lineal son los que se detallan en la tabla N° 26:

TABLA N° 26: Análisis de Regresión Lineal LECO 1

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

S = 100 R-Sq =100% R-Sq(adj) = 100 %

$$t_b = \frac{b - \beta}{S_b} \quad \text{Ec.(65)}$$

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, no hay regresión)

$H_1: \beta \neq 0$ (Hipótesis alternativa, hay regresión)

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

$$t_b = 1269.45$$

Para $n-2 = 30$, se obtiene una 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

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

Ec.(66)

Donde:

$$b = 57381.9$$

$$Sb = 45.2$$

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

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

$$IC(\beta) = 57381 \pm 92.32$$

$$\text{Límite Superior: } 57474$$

$$\text{Límite Inferior: } 57290$$

Prueba de Hipótesis para demostrar la convergencia al origen

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

Ec.(67)

$$a : \text{valor estimado del intercepto} = 2873$$

$$\alpha : \text{valor del parámetro intercepto} = 0$$

$$S_a : \text{desviación estándar del intercepto} = 2280$$

Hipótesis:

$$H_0: \alpha = 0 \text{ (Hipótesis nula)}$$

$$H_1: \alpha \neq 0 \text{ (Hipótesis alternativa)}$$

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

$$t_a = 1.26$$

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

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

Ec.(68)

Donde:

$$a = 2873$$

$$S_a = 2280$$

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

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

$$IC(\alpha) = 2873 \pm 4656$$

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)

$H_1: r \neq 0$ (hipótesis alterna)

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

Ec.(69)

Donde:

$r =$ correlación lineal $= 0.99999$

N = número de datos = 32

Reemplazando r y N en la ecuación Ec.(61) se obtiene.

Sr = 0.00078

Entonces la prueba t para la correlación es:

$$Tr = r/Sr = 1269$$

Para un t tabular = 2.0423 < 1269 = t 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° 27: Análisis de varianza para demostrar regresión y desvío de linealidad en LECO1

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 está 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.

Evaluación de la linealidad en LECO2:

TABLA Nº 28: Curvas del estándar EDTA para evaluación de linealidad

Cantidad	% Proteína	Áreas
1	8.42	594285
2	8.42	596355
3	8.42	605150
4	8.47	604250
5	18.14	1282955
6	18.16	1289255
7	18.04	1295550
8	18.11	1299950
9	24.04	1715755
10	24.16	1712655
11	24.12	1733950
12	24.02	1727050
13	36.10	2543655
14	36.10	2549355
15	36.03	2591550
16	35.94	2587650

Cantidad	% Proteína	Áreas
17	48.18	3405855
18	48.18	3420455
19	47.85	3451550
20	47.87	3447550
21	59.88	4236355
22	59.84	4219655
23	59.98	4319050
24	59.86	4311150
25	71.78	5057455
26	72.25	5100755
27	71.89	5189350
28	71.92	5178250
29	83.95	5910755
30	83.79	5903955
31	83.81	6029450
32	83.79	6035050

Análisis de la regresión lineal: Los resultados de la regresión lineal son los que se detallan en la tabla N° 29:

TABLA N° 29: Análisis de Regresión Lineal

Parámetro	Coefficiente	DS	t	P
Intercepto	3169	13659	0.23	0.810
Pendiente	71241	270.63	263.23	0.000

S = 38396 R-Sq = 100.0% R-Sq(adj) = 100.0%

$$t_b = (b - \beta) / S_b$$

b = valor estimado de la pendiente = 71241

β = valor del parámetro pendiente

S_b = desviación estándar de la pendiente: 270.63

Hipótesis:

H₀: $\beta = 0$ (Hipótesis nula)

H₁: $\beta \neq 0$ (Hipótesis alternativa)

$$t_b = (71241 - 0) / 270.63$$

$$t_b = 263.23$$

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 H₀, de que la pendiente es igual a cero, debido a que $t_b = 263.23 > t_{\text{tabular}} = 2.0423$ 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:

$$b = 71\,241$$

$$S_b = 270.636$$

$$t_{(n-2)} = 2.0423$$

$$IC(\beta) = 71\,241 \pm 2.0423 \times 270.636$$

$$= 71\,241 \pm 552.719$$

Límite Superior: 71793

Límite Inferior: 70688

Prueba de Hipótesis para demostrar la convergencia al origen

$$t_a = (a - \alpha) / S_a$$

$$a = \text{valor estimado del intercepto} = 3169$$

$$\alpha = \text{valor del parámetro intercepto} = 0$$

$$S_a = \text{desviación estándar del intercepto} = 13659$$

Hipótesis:

$H_0: \alpha = 0$ (Hipótesis nula)

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

$$t_a = (3169 - 0) / 13659$$

$$t_a = 0.23$$

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 $t_a = 0.23 < t_{\text{tabular}} = 2.0423$, 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:

$$a = 3169$$

$$S a = 13\ 659$$

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

$$\begin{aligned} IC(\beta) &= 3169 \pm 2.0423 \times 13659 \\ &= 3169 \pm 27896 \end{aligned}$$

Límite Superior: 31065

Límite Inferior: -24727

Prueba de hipótesis para la correlación:

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

$H_a : r = 0$ (Hipótesis alterna)

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

Donde:

$r =$ correlación lineal $= 0.9998$

$N =$ número de datos $= 32$

$S_r = 0,0038$

Prueba t :

$T_r = r/S_r = 263.23$

Para un t tabular $= 2.0423 < 263.23 = t$ 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 Nº 30: Análisis de varianza para demostrar regresión y desvío de linealidad en LECO2

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados(SC)	Cuadrado Medio	F c	FT	Significancia	P-value
Regresión	1	1.02E+14	1.02E+14	6.93E+04	4.17	Significativa	0
Error Residual	30	4.4229E+10	1474285454				
Linealidad	25	3.5446E+10	1417849096	0.81	4.53	No significativa	0.679
Error Puro	5	8782336229	1756467246	6.93E+04	4.17		
Total		1.02E+14					

Donde:

Fc = Valor F calculado

Para la regresión:

Como $F_c = 6.93 \text{ E}+04 > 4,17$, entonces se concluye que la regresión es estadísticamente significativa, es decir que la variable concentración está influyendo de manera significativa sobre el resultado del ensayo.

Para la Linealidad

Como $F_c = 0.81 < 4.53$ entonces se concluye que la falta de ajuste no es significativa y que la relación existente entre ambas variables es lineal.

2.9 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN EN LOS EQUIPOS LECO 1 Y LECO 2

Hallaremos el límite de detección de los equipos de combustión y del método para poder cual es la mínima cantidad de proteína que se puede determinar. La mayoría de las muestras de harina tiene un valor de proteína entre 56 y 72%, en algunos casos el valor es mucho menor debido a la alteración o mezcla con otros compuestos como la merma de producción (huesos, plumas, otro tipo de harina, etc.). para poder determinar cuál es la mínima cantidad de proteína que se determinar, hallaremos el límite de detección con la concentración del estándar que tenga la concentración de nitrógeno mas baja.

Límite de detección del equipo LECO 1: Se determinará usando los datos del análisis de la regresión lineal de las curvas de calibración del estándar EDTA, con el fin de hallar la mínima cantidad de analito que se pueda detectar (nitrógeno) por el equipo, y poder definir nuestro rango de trabajo.

Ecuación de regresión Lineal

$$Y = 2873 + 57382 X \quad \text{Ec.(62)}$$

Considerando las áreas de la concentración más baja:

TABLA Nº 31: Áreas de la concentración más baja del estándar

ST- 8.42 %	Sb
485450	3806.14
492750	
488250	
484150	

Según la ecuación siguiente(a partir de la ecuación Ec.(5)) : $LD = Yb + 3Sb$

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

$Sb = \text{Desviación Estándar de las áreas del estándar más bajo} = 3806.14$

Calculando el Limite de Detección en concentración, mediante la ecuación Ec.(5)

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

Limite de cuantificación LECO 1: Se determinará usando los datos del análisis de la regresión lineal de las curvas de calibración del estándar de EDTA

Usando la ecuación(a partir de la ecuación Ec.(5)):

$LC = Yb + 10Sb$

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

$Sb = \text{Desviación estándar de las áreas del estándar más bajo} = 3806.14$

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

Calculando el Limite de Cuantificación mediante la ecuación (3)

$LC = Yb + 10Sb = 2873 + (10 * 3806.14) = 40934$

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

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

$X = 0.7 \%$ proteína

$LC = 0.1 \%$ nitrógeno

TABLA N° 32: Límites de Detección y Cuantificación AOAC 990.03:2000

Límites	% proteína	% nitrógeno
Detección	0.2	0.03
Cuantificación	0.7	0.1

Límite de detección LECO 2: Se determinará usando los datos del análisis de la regresión Lineal de las curvas de calibración de EDTA

Ecuación de regresión Lineal

$$Y = 3169 + 71241 X$$

Considerando las áreas de la concentración más baja:

TABLA N° 33: Áreas de la concentración más baja del estándar

ST- 8.42 %	Sb
594285	5493.39
596355	
605150	
604250	

Según la ecuación siguiente(a partir de la ecuación Ec.(5)): $LD = Yb + 3Sb$

Para $X = 0$, $Yb = \text{intercepto} = 3169$

$Sb = \text{Desviación Estándar de las áreas del estándar más bajo} = 5493.39$

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

$$LD = Y_b + 3S_b = 3169 + (3 * 5493.39) = 19649$$

Y = 19649 es el valor de Y en el límite de detección

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

$$X = \frac{Y - 3169}{71241} = \frac{19649 - 3169}{71241}$$

$$X = 0.2 \% \text{ proteína}$$

$$LD = 0.04 \% \text{ nitrógeno}$$

Limite de cuantificación en LECO 2: Se determinará usando los datos del Análisis de la Regresión Lineal de las Curvas de Calibración del Estándar de EDTA

Usando la ecuación(a partir de la ecuación Ec.(5)):

$$LC = Y_b + 10S_b$$

$$\text{Para } X = 0, Y_b = \text{intercepto} = 3169$$

$$S_b = \text{Desviación Estándar de las áreas del estándar más bajo} = 5493.39$$

Calculando el Limite de Cuantificación mediante la ecuación 3

$$LC = Y_b + 10S_b = 3169 + (10 * 5493.39) = 58103$$

Y = 58103 es el valor de Y en el límite de detección

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

$$X = \frac{Y - 3169}{71241} = \frac{58103 - 3169}{71241} = (126175 - 31697)/71241$$

$$X = 0.8 \% \text{ proteína}$$

$$LC = 0.1 \% \text{ nitrógeno}$$

TABLA N° 34: Límites de Detección y Cuantificación AOAC 990.03:2000

Límites	% proteína	% nitrógeno
Detección	0.2	0.04
Cuantificación	0.8	0.1

2.10 SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.

Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl

Sensibilidad en LECO1: La sensibilidad del método está definida por la pendiente de la curva, entonces este es igual a:

TABLA N° 35: Datos de la Regresión Lineal en LECO1

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

SENSIBILIDAD (LECO1) = 57381.9

Sensibilidad en LECO2: La sensibilidad del método está definida por la pendiente de la curva, entonces este es igual a:

TABLA N° 36: Datos de la Regresión Lineal en LECO2

Parámetro	Coficiente	DS	t	P
Intercepto	3169	13659	0.23	0.810
Pendiente	71241	270.63	263.23	0.000

SENSIBILIDAD (LECO2) = 71241

2.11 ROBUSTEZ DEL MÉTODO.

Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl.

La robustez mide la sensibilidad que presenta el método ante pequeñas variaciones en los factores que intervienen en la realización del método. Utilizaremos la prueba de Youden-Steiner.

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° 5.37.

TABLA N° 37: Factores a evaluar y niveles por cada factor

FACTOR CRÍTICO	VALOR			RESPUESTA A CONTROLAR
	NOMINAL	VARIACIÓN DEL FACTOR		
A/a (Peso de muestra)	0.200 g	0.215g	0.185g	SR
B/b (Presión del gas helio)	40 psi	45psi	35psi	SR
C/c (Presión del gas oxígeno)	40 psi	45psi	35psi	SR
D/d (Temperatura de Combustión)	950°C	955°C	945°C	SR
E/e (Temperatura de reducción)	750°C	755°C	745°C	SR
F/f	--	F	f	SR
G/g	--	G	g	SR

Se procede a realizar la combinación de los factores según la tabla N° 38

TABLA N° 38: Combinación de Factores para la evacuación de la Robustez

Factor/Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
(Peso de muestra)	0.215 g	0.215 g	0.215 g	0.215 g	0.185 g	0.185 g	0.185 g	0.185 g
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
(Presión del gas helio)	45 psi	45 psi	35 psi	35 psi	45 psi	45 psi	35 psi	35 psi
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
(Presión del gas oxígeno)	45 psi	35 psi	45 psi	35 psi	45 psi	35 psi	45 psi	35 psi
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
(Temperatura de Combustión)	955 °C	955 °C	945 °C	945 °C	945 °C	945 °C	955 °C	955 °C
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
(Temperatura de reducción)	755 °C	745 °C	755 °C	745 °C	745 °C	755 °C	745 °C	755 °C
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado								
	s	t	u	v	w	x	y	z

TABLA N° 39: 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:

$$\begin{array}{rcccl}
 \frac{s+t+u+v}{4} & = & \frac{4A}{4} & = & A \\
 \frac{w+x+y+z}{4} & = & \frac{4a}{4} & = & a
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{r} A \\ a \end{array}} \right\} D1$$

Ec.(70)

II).- t calculado = $(n^{1/2} \times D) / (2^{1/2} \times s)$

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

D : Diferencia calculada por cada factor

SR: Desviación estándar de reproducibilidad 0.199

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 Nº 40: 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					
Peso de muestra : 0.185 g				55.97	0.116	0.82			$t_{calculado} < t_{critico}$
Presión del gas oxigeno : 45 psi				55.84					$t_{calculado} < t_{critico}$
presión del gas oxigeno : 35 psi				55.98	0.139	0.99			$t_{calculado} < t_{critico}$
Presión del gas helio : 45 psi				55.97					$t_{calculado} < t_{critico}$
presión del gas helio : 35 psi				55.86	0.108	0.77			$t_{calculado} < t_{critico}$
Temperatura de combustión : 955°C				55.99					$t_{calculado} < t_{critico}$
Temperatura de combustión : 945°C				55.84	0.152	1.08			$t_{calculado} < t_{critico}$
Temperatura de reducción : 755°C				55.89					$t_{calculado} < t_{critico}$
Temperatura de reducción : 745°C				55.93	0.042	0.3			$t_{calculado} < t_{critico}$
F				55.88					$t_{calculado} < t_{critico}$
f				55.94	0.059	0.42			$t_{calculado} < t_{critico}$
G				55.86					$t_{calculado} < t_{critico}$
g				55.96	0.101	0.72			$t_{calculado} < t_{critico}$

TABLA N° 41: 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_{x1}	t calculado	Efecto Significativo al 95% $t_{critico} = 2.36$		
Peso de muestra :0.215 g				66.15					
Peso de muestra :0.185 g				66.21	0.061	0.430	$t_{calculado} < t_{critico}$		
Presión del gas oxigeno : 45 psi				66.21					
presión del gas oxigeno : 35 psi				66.15	0.059	0.420	$t_{calculado} < t_{critico}$		
Presión del gas helio : 45 psi				66.16					
presión del gas helio : 35 psi				66.20	0.032	0.230	$t_{calculado} < t_{critico}$		
Temperatura de combustión : 955°C				66.25					
Temperatura de combustión : 945°C				66.11	0.135	0.960	$t_{calculado} < t_{critico}$		
Temperatura de reducción : 755°C				66.19					
Temperatura de reducción : 745°C				66.16	0.030	0.210	$t_{calculado} < t_{critico}$		
F				66.14					
f				66.22	0.078	0.560	$t_{calculado} < t_{critico}$		
G				66.16					
g				66.20	0.049	0.350	$t_{calculado} < t_{critico}$		

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

2.12 RANGO DEL MÉTODO

Determinación de Proteína Cruda en Harina de Pescado según AOAC 990.03 (Dumas) Armonizado a Kjeldahl

El intervalo de trabajo para el cual queda aprobado el método es de 57.30% de proteína hasta 76.30 % de proteína, rango en el cual se encuentra el porcentaje de proteína de la mayoría de muestras de harina de pescado, en conformidad a los datos de la validación del presente método.

CONCLUSIONES

a) **Conclusiones del proceso de validación:**

Del escrutinio de datos realizado para detectar valores críticos y la Consistencia (h,k de Mandel), se puede concluir que los datos son consistentes. Al realizar la prueba numérica para dar validez a los resultados (prueba de Cochran), no se encontró valores atípicos.

Se realizó la prueba de normalidad (prueba de Anderson-Darling demostrándose que los datos siguen una distribución normal. Al aplicar la prueba de Barlett (Tabla N ° 13) se concluyó que las varianzas son homogéneas.

Se determinó la precisión del método en las tablas N ° 15 y 16 se encuentran los parámetros estadísticos que permiten controlar el proceso del análisis.

También se puede concluir de la observación de las figuras 11 y 12 que no existe tendencia alguna de la desviación estándar de repetibilidad y reproducibilidad.

En la tabla N° 17 se encuentran valores de proteína hallados por los métodos AOAC 984.13 y por el método candidato que estamos proponiendo. Luego de realizar la prueba de correlación entre ambos métodos (fig. 15), se puede concluir que existe un grado de asociación entre el método AOAC 984.13 y el método candidato. Se determinó el sesgo del laboratorio (0.030) y que el intervalo de confianza cubre el valor cero, entonces el sesgo de laboratorio no es significativo.

Al realizar la prueba de linealidad para ambos equipos (LECO 1 y LECO 2), analizado con el estándar EDTA en el rango de 8.4% a 83.9% de Proteína (Tabla N° 25 y 28), se realizó el análisis de regresión lineal cuyo resumen de resultados se mencionan en la Tabla N° 26 y 29. Se le realizó la prueba t-studen para la pendiente (Ec.65) y el intercepto (Ec.66), concluyendo que hay una pendiente que es diferente de cero y un intercepto que no es significativamente diferente de cero. 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), se concluye que la variable concentración está influyendo de manera significativa sobre el resultado del ensayo. Los límites de detección y cuantificación encontrados luego de realizar el estudio de las áreas de la concentración más baja del estándar (Tabla N0 31) son: LD: 0.2 y LC: 0.8% de proteína.

Se determinó que el método es Robusto para las condiciones mostradas en las tablas N°: 40 y 41
El rango de estudio que se realizó es de 56.30 % hasta 76.30 % de proteína. Rango en el que se encuentran comúnmente los valores de proteína de harina de pescado.

b) Conclusiones del proceso de determinación de la incertidumbre :

La incertidumbre del método es: U (expandida) = 0.69 % proteína, incertidumbre que es hallada luego de identificar y evaluar todas las fuentes de incertidumbre (fig. 16). Se puede concluir que los factores que más influyen en la incertidumbre del método es la aportada por los analistas (SR: 0.188) y los equipos ($U(\text{EQUIPO}):0.29$).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

-
- 1) El Desarrollo Pesquero en el Perú y el Mercado Exterior, Ing. Rafael Plaza M, 2006
 - 2) Estudio de Prospectividad para la cadena Productiva de la Industria Pesquera en la Región de la Costa de América del Sur (Diagnostico Nacional, O.N.U., Departamento de Promoción Industrial y Tecnología, del Perú). 2005, pg. 14.
 - 3) Negocios Internacionales Especial N° 18, Mario Perotti Canaval, 2009. pg. 2.
 - 4) Boletín Estadístico Mensual Noviembre 2009, PRODUCE (Ministerio de la Producción), Pg. 30.
 - 5) Boletín del Sector Pesca y Acuicultura, ADEX (Asociación de Exportadores) Enero-Octubre 2009. Pg. 4
 - 6) Utilización de la Harina de Pescado en la Formulación de Alimentos para el Crecimiento y Engorde Animal, Crucita Graü de Marín, Hilda Marval y Aracelys Zerpa de Marcano,. Enero-Diciembre 2007.Pg. 1-3.
 - 7) Nueva Tecnología en la Producción de Harina de Pescado para Piensos: Implicaciones Sobre la Evaluación de la Calidad, P. Sandbol, Fiskerihavnsgade, 1993. Pg. 1-4
 - 8) Comparación entre los métodos Kjeldahl y Dumas para el análisis de Proteína, INBOX, Technology and services (LECO), 2008.
 - 9) Bioquímica de Harper, Robert K. Murray, Peter A. Mayes, Edición No: 20, 1992. Pg. 40-43.
 - 10) Química Analítica, Douglas A. Skoog, Donald M West, F. James Holler; Ed. McGraw-Hill, 1997. Pg. 575.
 - 11) Determinación de Proteínas (Método Kjeldahl), Instituto de Salud Pública de Chile, Subdepartamento Laboratorios de Medio Ambiente, Sección Química de Alimentos, PTR-701.02-150, Rev. No: 0 pg. 1 a 2.
 - 12) Determinación de Proteína Bruta por el Método Kjeldahl, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Departamento de Ciencias Básicas Laboratorio de Bioquímica 502504, Guía No: 3.2.
 - 13) Characterisation and Validation of Test Methods, J.S. Morkowski, Paper Presentated at the EUROLAB Simposium, Berlin, 5-7 June 1996.

-
- 14) Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito, Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Tópicos Relacionados, Guía EURACHEM, Primera Edición en inglés 1.0 – 1998. pg. 3-78.
 - 15) Métodos Normalizados Para el Análisis de Aguas Potables y Residuales, APHA, AWWA, WPCF, 20th edición, 1998. Pg. 1-25
 - 16) Guía para Estimar la Incertidumbre de la Medición, Wolfgang A. Schmid y Ruben J. Lazos Martínez, Centro Nacional de Metrología, Mayo 2000. Pg. 3-27.