

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**EVALUACION DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DEL METODO
ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA LA DETERMINACION DE
BORO EN SUELOS AGRICOLAS**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
ROBERTO ANTONIO ESCALANTE VASQUEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA**

AGOSTO, 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LIC. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMÉTICOS

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

COORDINADORA DE AREA DE QUÍMICA AGRICOLA

MAE. María Elisa Vivar de Figueroa

DOCENTES ASESORES

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

Ing. Sandra Llanett Najarro Mijango

AGRADECIMIENTOS

Primeramente gracias a Dios Todopoderoso, a Jesús y a María santísima, por están siempre a mi lado en todo momento, por haber estado conmigo a lo largo de mi proceso de estudio de estudiante universitario y el periodo de desarrollo de mi trabajo de graduación, gracias por ser mi orientación en mi vida y mi ayuda en todo momento.

A mi madre y a mi padre por su paciencia en la realización de mi trabajo de graduación y por su ayuda durante mi periodo de estudio, como estudiante universitario de la carrera de Licenciatura en Química y Farmacia.

Para MAE. María Elisa Vivar de Figueroa y MSc. Ena Edith Herrera Salazar de la sección de Química Agrícola Aplicada, por haber sido parte en mi trabajo de graduación el cual fue enriquecido con sus sugerencias y aportes, por lo cual muchísimas gracias.

A los docentes de la sección de Control de Calidad: MSc. Rocío Ruano de Sandoval, Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez y MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía por su participación en mi trabajo de graduación y por su ayuda directa e indirecta para pudiera cumplir este trabajo de graduación.

A la Directora de trabajos de graduación Licda. Odette Rauda Acevedo, por las contribuciones y aportes que logro, que este trabajo de graduación fuera de mejor calidad académica.

Al personal técnico del laboratorio de Suelos del CENTA: Ing. Sandra Najarro, Licda. Yaneth Valencia, Ing. Margarita Alvarado, Licda. Sonia de Alegría, Ing. Quirino Argueta Portillo y Ing. Raúl Quintanilla, por la oportunidad de realizar mi trabajo de graduación en el laboratorio de suelos del CENTA, por sus aportes, observaciones y experiencias compartidas, que lograron que fuera una gran experiencia el haber hecho mi trabajo de graduación en el CENTA; así como

agradecer igualmente al personal auxiliar del laboratorio de suelos, Sra. Dolores Díaz (niña Lolita), Raúl Marroquín (Don Raulito), Irma, Don Amando Francia, Don Walter y con mención especial a Don Carlitos (Q.E.P.D).

Agradecimientos para el Lic. Luis Reyes Valiente del laboratorio de Química Agrícola del CENTA, por facilitar parte de los reactivos que fueron necesarios en la parte experimental de mi trabajo de graduación y por compartir parte de su experiencia profesional conmigo.

A la División del Café y programa de Agroindustrial, unidades del CENTA por haber facilitado la muestras de suelos, que se utilizaron en la parte experimental de este trabajo de graduación.

A Emerson Hernández y Daniel Torres, por colaborar en mi trabajo de graduación.

DEDICATORIAS

Para mi familia: mi madre Milagro del Carmen Vásquez, mi padre Roberto Escalante, mi hermana Beatriz Escalante, mi cuñado Jorge Cordero y mi sobrina Kathya Beatriz.

Para mis amigos y compañeros de la carrera de Licenciatura de Química y Farmacia con quienes, trabaje y compartí en cada una de las diferentes asignaturas de la carrera, muchos momentos de alegría, felicidad, trabajo académico, risas y esperanza.

Para diferentes docentes de la Facultad de la Química y Farmacia, entre ellos, para el personal docente de la secciones de Química Agrícola y Control de Calidad con mucha estimación, cariño, y por su participación en mi trabajo de graduación; a la Licda. Gloria de Chegüen por su amabilidad y dedicación admirable en el área docente; para el Lic. Mario Catota, Licda. María Isabel de Rodas y Lic. Danilo Ramírez por enseñar que una clase puede ser algo divertido.

Y con gran estimación para el Lic. Moisés Atonalt Guerra, por estar dispuesto siempre a conversar conmigo.

Para el personal que labora en el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA), por su labor a favor de la agricultura de El Salvador.

He combatido el buen combate, he terminado mi carrera, he guardado lo que depositaron en mis manos. (2 Tim. 4,7)

INDICE

Resumen	
CAPITULO I	
1.0. INTRODUCCION	xviii
CAPITULO II	
2.0. OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0. MARCO TEORICO	23
3.1. El boro en el suelo	23
3.2. Funciones del boro en las plantas	24
3.2.1. Necesidades de boro en las plantas	26
3.3. Fundamento del método espectrofotométrico rojo carmín	26
3.4. Validación	27
3.5. Parámetros de desempeño	27
3.6. Protocolo de validación	29
CAPITULO IV	
4.0. DISEÑO METODOLOGICO	33
4.1. Tipo de estudio	33
4.2. Investigación bibliográfica	33
4.3. Investigación de campo	34
4.3.1. Universo	34
4.3.2. Muestras	34
4.4. Descripción de toma de muestra de suelo	35

4.5. Parte experimental	35
4.5.1. Determinación de boro	35
4.5.2. Metodología de la evaluación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín	36
4.5.3. Precisión del método	37
4.5.4. Exactitud	38
4.5.5. Linealidad del método	39
4.5.6. Limite de cuantificación	40
4.5.7. Rango o intervalo de cuantificación de boro	41
4.5.8. Linealidad del sistema	41
CAPITULO V	
5.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
5.1. Repetibilidad	44
5.2. Precisión intermedia	45
5.3. Exactitud	46
5.4. Linealidad del método	48
5.5. Limite de cuantificación	50
5.6. Rango o Intervalo de cuantificación de boro	50
5.7. Linealidad del sistema	51
5.8. Protocolo de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín.	52
5.9. Interpretación de los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín.	71

6.0. Parámetros de desempeño del método espectrofotométrico Azometina-H (método alternativo).	72
CAPITULO VI	
6.0. CONCLUSIONES	75
CAPITULO VII	
7.0. RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INDICE ANEXOS

ANEXO N°

1. Interpretación de los niveles de boro en suelo manejados por el laboratorio de suelos del CENTA.
2. Exigencias de boro para diferentes cultivos agrícolas
3. Suelos bajos en boro total
4. Materiales, equipo y reactivos para la determinación de boro en suelos agrícolas.
5. Preparación de los reactivos para la determinación de boro en suelos.
6. Grado de representatividad de la media aritmética, para distintos coeficientes de variación.
7. Modelos triangular y rectangular para toma de muestra de suelo en un lote de terreno.
8. Tabla estadística de la distribución t de Student.
9. Grafico de linealidad del método

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° Pág.
1. Cantidad de boro en rocas en ppm	23
2. Alcance de la validación para métodos normalizados modificados o no normalizados.	31
3. Descripción de las muestras utilizadas en la parte experimental	34
4. Formato de cuadro de interpretación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín.	42
5. Interpretaciones de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín.	71

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pág.
1. Valores de absorbancias de estándares de boro utilizados, longitud de onda de 585 nm.	44
2. Datos obtenidos de repetibilidad del método espectrofotométrico rojo carmín	45
3. Datos obtenidos de precisión intermedia del método espectrofotométrico rojo carmín	46
4. Datos obtenidos de exactitud del método espectrofotométrico rojo carmín	47
5. Datos obtenidos de ppm de boro recuperadas del ensayo de linealidad del método	48
6. Datos de las diferentes curvas de linealidad del método del método espectrofotométrico rojo carmín	49
7. Datos de absorbancias de estándares del parámetro rango o intervalo de cuantificación de boro	51
8. Absorbancias obtenidas de los estándares de boro de la linealidad del sistema	51
9. Datos obtenidos de los resultados de la linealidad del sistema	52
10. Datos de los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico Azometina-H para determinación de boro en suelos agrícolas.	73

ABREVIATURAS

CENTA: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova”

OSA: Organismo Salvadoreño de Acreditación

ppm: partes por millón

SÍMBOLOS

S	=	Desviación estándar
CV	=	Coefficiente de variación
$CV_{y/x}$	=	Coefficiente de variación de regresión
L_c	=	Límite de cuantificación
$IC(\mu)$	=	Intervalo de confianza para la media poblacional
$IC(\beta_1)$	=	Intervalo de confianza de la pendiente poblacional
$IC(\beta_0)$	=	Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional
K	=	Constante para límite de cuantificación
S blanco	=	desviación estándar de la respuesta de los blancos
b	=	Pendiente de la recta de calibración
b_1	=	Pendiente
b_0	=	Ordenada al origen
n	=	Numero de ensayos realizados
$t_{0.975, n-2}$	=	Valor de la distribución t de Student y asociada a una confianza del 95 % y grados de libertad establecidos
$\sum y$	=	Sumatoria de componente y
\bar{y}	=	Media aritmética de y
$\sum x$	=	Sumatoria de componente x
\bar{x}	=	Media aritmética de x
r^2	=	Coefficiente de regresión lineal
Sb_1	=	Desviación estándar de la pendiente
$\% R$	=	Porcentaje de recobro
$S_{y/x}$	=	Desviación estándar de regresión
S_{b_0}	=	Desviación estándar de la ordenada al origen

RESUMEN

En el presente trabajo de graduación, se realizó la evaluación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín para la determinación de boro en suelos agrícolas, realizado la parte experimental en el laboratorio de suelos del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), la investigación se desarrollo en el periodo 2014-2015.

En la primera parte, se elaboró un protocolo de parámetros de desempeño del método propuesto, con el fin que sirviera de guía para realizar la metodología de la evaluación de parámetros de desempeño, luego se realizó la parte experimental aplicado la Guía de Validación de Métodos Físicoquímicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA), en la cual se evaluaron los parámetros de desempeño siguientes: repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, linealidad del método, limite de cuantificación, rango y linealidad del sistema.

Según los ensayos realizados se obtuvieron los siguientes resultados: coeficiente de variación para repetibilidad y precisión intermedia fue de 40.85 % y 36.86 % respectivamente, la exactitud presentó un coeficiente de variación de 34.55 % y un intervalo de confianza entre (21.89 - 47.21) %, la linealidad del método tuvo un coeficiente de regresión 0.681, intervalo de confianza de la pendiente de - 0.3060 – 2.2394, intervalo de confianza de la ordenada al origen de - 4.0939 - 3.0759 y coeficiente de variación de regresión de 47.69 %, linealidad del sistema con un coeficiente de regresión de 0.822 y intervalo de confianza de la pendiente de - 0.2482 – 0.3582. El límite de cuantificación y rango no se logró determinar debido a los resultados de los demás parámetros analizados los cuales no cumplieron sus criterios de aceptación.

Después de realizar la parte experimental y de acuerdo a los resultados se concluye que el método rojo carmín no es adecuado para determinar boro en suelos; sin embargo, se realizó una prueba con un método alternativo para cuantificar boro suelos agrícolas utilizando Azometina-H, obteniendo resultados conformes en la evaluación de parámetros de desempeño.

Se recomienda realizar la validación del método alternativo como fue el de Azometina-H y de manera general cumplir con los criterios de Validación que establece el Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA), con respecto a los métodos fisicoquímicos, actualmente establece 10 repeticiones de prueba para los parámetros de precisión y exactitud.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0. INTRODUCCION

El suelo contiene diferentes nutrientes y micronutrientes que son absorbidos por las plantas para lograr su crecimiento y desarrollo. Uno de esos micronutrientes presentes en el suelo es el boro, el cual tiene varias funciones fisiológicas en las plantas, siendo la más importante el buen desarrollo del fruto.

Actualmente los productores agrícolas, recurren a la fertilización del suelo para obtener rendimientos en los cultivos agrícolas. Sin embargo, para hacer una fertilización adecuada se necesita realizar un análisis fisicoquímico del suelo agrícola, que comprende la cuantificación de macronutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) y micronutrientes (calcio, magnesio y boro, entre otros).

El laboratorio de suelos del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), no contaba con un método de cuantificación de boro en suelo debido, a la falta de demanda de dicho análisis; pero en el año 2014 surgió la necesidad de realizar este análisis debido a la demanda de los productores de cultivo de café.

Se realizó la evaluación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín como solución a la problemática de laboratorio de suelos del CENTA, para lo cual se siguió la Guía de Validación de Métodos Analíticos Fisicoquímicos de Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA), para desarrollar la metodología de análisis del método rojo carmín; el presente trabajo de graduación será muy útil para los diferentes laboratorios del CENTA, que se encuentran en proceso de acreditación.

La evaluación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín se llevó a cabo, en el laboratorio de suelos del CENTA, se realizaron los siguientes parámetros: repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, linealidad del método, límite de cuantificación, rango y linealidad del

sistema, especificados en la guía de validación de la OSA, se realizó la investigación durante el periodo 2014-2015.

Según los resultados obtenidos el método espectrofotométrico rojo carmín no es apto para la determinación de boro en suelo, sin embargo se hizo una evaluación de parámetros de desempeño de un método alternativo llamado Azometina-H el cual dio resultados conformes a los criterios de aceptación establecidos.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín para la determinación de boro en suelos agrícolas.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1 Elaborar el protocolo de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín para la determinación de boro en suelos agrícolas en el laboratorio de suelos del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA).
- 2.2.2 Desarrollar los parámetros de desempeño: repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, linealidad del método, límite de cuantificación, rango y linealidad del sistema especificados en la guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA).
- 2.2.3 Interpretar los resultados de los parámetros de desempeño analizados.
- 2.2.4 Entregar un ejemplar del trabajo de graduación al laboratorio de suelos del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA).

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0. MARCO TEORICO

3.1. El boro en el suelo ⁽²⁾⁽⁵⁾

El boro, único elemento no metal entre los micronutrientes, tiene una valencia constante de 3+ y un radio iónico muy pequeño. Estrictamente un elemento litofilo, se presenta siempre en combinación con oxígeno, generalmente coordinado tres veces, en algunos minerales cuatro veces. Sus minerales de alta temperatura son principalmente borosilicatos y boratos anhidros; sus minerales de baja temperatura son borohidruros.

El contenido total de boro en los suelos varía entre 2-100 ppm y está relacionado con el contenido en boro de los materiales de origen (roca madre), los cuales se puede dar una idea en la siguiente tabla:

Cuadro N°1. Cantidad de boro en rocas en ppm

Tipo de roca	ppm B
Rocas basálticas	5
Rocas graníticas	15
Rocas calizas	20
Areniscas	35
Pizarras	100
Corteza terrestre	10

El boro está presente en el suelo básicamente en tres formas: dentro de los minerales silicatos, adsorbido en los minerales arcillosos, en los hidróxidos de hierro y aluminio, y en la materia orgánica. El boro que forma parte de estos minerales no está prácticamente disponible para las plantas a corto plazo.

En la determinación del boro disponible para las plantas, el boro adsorbido representa la mayor parte. El BO_3H_3 o el anión tetrahidroxiborato $\text{B}(\text{OH})_4^-$ pueden ser absorbidos en los bordes de los minerales aluminosilicatos, en los

hidróxidos de hierro y aluminio o en los grumos de hidróxidos de magnesio y en las superficies amorfas de hidróxidos. La adsorción de boro se ve claramente afectada por el pH, siendo máximo entre 8-9.

El boro también se encuentra asociado con la materia orgánica la cual, al mineralizarse puede ser una importante fuente de boro asimilable.

El boro puede ser fácilmente lixiviado en suelos de texturas ligeras, mientras que en suelos arcillosos el movimiento es prácticamente nulo.

3.2. Funciones del boro en las plantas ⁽²⁾

El boro tiene una diversidad de funciones en las plantas, entre ellas se pueden mencionar:

A. Actividad meristemática

El boro está íntimamente relacionado con la actividad de los meristemas, sobre todo de los meristemas apicales. Cuando el suministro de boro es escaso, la división celular no se produce correctamente. Las células se dividen pero no se produce una completa separación quedando cortas las paredes longitudinales. Esto tiene como resultado un desarrollo incompleto e irregular de las hojas, las cuales aparecen distorsionadas y una falta de elongación de los entrenudos.

B. Polinización y cuajado

Durante muchos años se ha observado que un suministro adecuado de boro resulta esencial para un correcto cuajado y desarrollo normal del fruto, siendo estas, dos características que aparecen normalmente como síntomas de deficiencia de boro. Se ha establecido que el boro es necesario para el crecimiento del tubo polínico. El boro es absorbido por el tubo a medida que este crece a través del tejido del estigma y en algunos casos la germinación del grano de polen depende de la presencia de boro en el estigma.

C. Rotura de tejidos

Aparte de la degeneración y la desorganización de los tejidos que rodean los meristemas apicales, la falta de boro causa normalmente la rotura de las paredes del parénquima celular. La lignificación (asociada a la acumulación de fenol) se reduce. La rotura de tejidos tiene como resultado manchas marrones o descoloridas, puntos necróticos, aéreas descompuestas húmedas y nódulos acorchados, que se pueden percibir en frutos, tubérculos, raíces y medulas deficientes en boro. A pesar de que las paredes celulares pueden espesarse en los casos de deficiencia en boro, la lamela central queda a menudo desorganizada. Un síntoma común es la fragilidad del tallo y de la hoja.

D. Resistencia a enfermedades

Muchos informes hacen referencias al aumento de resistencias a enfermedades tras la aplicación de boro. Algunos efectos observados, tales como la reducción del cornezuelo en la cebada han sido comprobados; otros informes afirman que la resistencia del tomate, pimiento y col, al ataque de hongos después de un tratamiento de boro se debe al aumento de las actividades del polifenol oxidasa y peroxidasa, las cuales están influenciadas por este elemento, pero la mayoría son simplemente observaciones aisladas realizadas dentro de investigaciones que en un principio no estaban dirigidas al estudio de la influencia de la nutrición sobre las enfermedades.

E. Resistencia a heladas

De vez en cuando se ha señalado el bajo nivel de boro como un factor agravante del daño producido por las heladas, concretamente en los estudios sobre viña y manzano. Sin embargo, la prueba más evidente la presenta el eucalipto, del cual no hay duda de que la aplicación de boro puede aumentar considerablemente su resistencia a las heladas. También se ha asociado el boro con la tolerancia a heladas del pinus radiata. La influencia del boro en las

membranas celulares y sobre el movimiento de solutos podría ser una explicación a este efecto.

Además se menciona en la literatura las siguientes funciones:

Se sabe que uno de los primeros efectos de la escasez de boro es que la membrana externa del citoplasma de las células de la raíz, el plasmalema, se altera de tal forma que se reduce la absorción de fósforo, cloruro y rubidio (utilizado para mimetizar al potasio).

Otros autores creen que el papel primordial del boro es controlar el nivel de fenoles en las células y así impedir los efectos perjudiciales de la acumulación del fenol, característica común de la deficiencia en boro.

3.2.1. Necesidades de boro en las plantas ⁽²⁾

Las plantas difieren en sus necesidades de boro y en su tolerancia al exceso del mismo. En la actualidad resulta menos significativo hablar de diferencias entre especies, ya que se ha comprobado que la absorción de boro varía considerablemente entre los distintos fenotipos.

Sin embargo, en general, las monocotiledóneas tienen una necesidad de boro inferior a las dicotiledóneas cuyas raíces tienen una capacidad de absorción de boro superior. En los cereales de grano el crecimiento vegetativo parece tener un desarrollo más o menos normal en ausencia de boro y solamente se ve afectada la formación de semilla.

3.3. Fundamento del método espectrofotométrico rojo carmín ⁽⁵⁾

El ion borato reacciona con el rojo carmín en presencia de ácido sulfúrico concentrado (95 -97 %) a temperatura ambiente; se determina la concentración, a una longitud de onda de 585 nm en un espectrofotómetro o colorímetro.

La reacción transcurre lentamente y se necesita aproximadamente una hora para el desarrollo del color rojo, después de lo cual el color rojo desaparece muy gradualmente.

El Ion nitrato interfiere pero su efecto se puede prevenir mediante la adición de ácido clorhídrico; agentes oxidantes deben estar ausentes.

3.4. Validación ⁽¹³⁾

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en el laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

3.5. Parámetros de desempeño ⁽³⁾⁽¹¹⁾

Las características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad.

Según la Guía de Validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos de México los Parámetros de desempeño en la validación de métodos analíticos son:

1. Exactitud
2. Precisión del método
3. Especificidad
4. Límite de detención
5. Límite de cuantificación
6. Linealidad
7. Intervalo
8. Robustez
9. Tolerancia
10. Precisión del sistema

11. Linealidad del sistema

3.5.1. Precisión ⁽¹³⁾

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad.

Para determinar la precisión existen tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

3.5.2. Repetibilidad ⁽³⁾

Estudia la variabilidad del método efectuado una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, entre otros) en un mismo laboratorio y un periodo de tiempo corto.

3.5.3. Precisión intermedia ⁽³⁾

Estudia la variabilidad del método efectuado una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, entre otros) y en un mismo laboratorio.

3.5.4. Exactitud ⁽³⁾

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero.

Para determinar la exactitud se calcula el porcentaje de recobro que se realiza mediante la división entre el valor medio hallado y el valor aceptado como verdadero multiplicado por 100.

3.5.5. Limite de cuantificación ⁽¹⁰⁾

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito en la muestra.

3.5.6. Rango o intervalo ⁽³⁾

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento analítico.

3.5.7. Linealidad del método ⁽³⁾

Linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

3.5.8. Linealidad del sistema ⁽¹⁰⁾

Capacidad de un instrumento de medición para proporcionar una indicación que tenga una relación lineal con una magnitud determinada distinta de una magnitud de influencia.

3.6. Protocolo de validación ⁽¹⁰⁾

Es una descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistentes.

Los protocolos de validación deben tener las siguientes partes como mínimo:

- a. Objetivo
- b. Alcance
- c. Responsable
- d. Parámetros a estudiar
- e. Muestras
- f. Equipos involucrados
- g. Descripción del método
 - Reactivos
 - Estándares
 - Materiales
 - Preparación de estándar
 - Preparación de reactivos
 - Preparación de muestra
 - Procedimiento
 - Cálculos
- h. Procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar
- i. Criterios de aceptación

A continuación se escribe el alcance de validación para métodos normalizados modificados o no normalizados según la guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos del organismo salvadoreño de acreditación (OSA).

Cuadro N°2 Alcance de la validación para métodos normalizados modificados o no normalizados ⁽¹⁰⁾

Parámetros	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios **	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas**	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/ Especificidad	Si	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del sistema	No	Si	Si	+
Linealidad del método	No	Si	Si	+
Rango	No	Si	Si	+
Exactitud	No	Si	Si	+
Repetibilidad	No	Si	Si	Si
Precisión intermedia	No	Si	Si	Si
Reproducibilidad	No	++	++	++
Limite de detección	+	No	No	No
Limite de cuantificación	No	+	Si	+
Robustez	+	+	+	+

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis o de las modificaciones que se le hagan al método.

++: Dependerá de la disponibilidad del laboratorio.

*: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (ej.: disolución, liberación de analito, etc.) el método usado para la cuantificación (cuando aplique) se validará de acuerdo a columnas 2 ó 3.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0. DISEÑO METODOLOGICO

4.1. Tipo de estudio

-Bibliográfico: se realizó la búsqueda de información necesaria para lograr realizar la evaluación de los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín, a través de la búsqueda de libros y normativas.

-Experimental: se realizaron los ensayos necesarios para la evaluación de los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín, en el laboratorio de suelos del CENTA.

-Transversal: el estudio se realizó en el período correspondiente a los años 2014-2015.

-Prospectivo: este trabajo de graduación, servirá de base para investigaciones relacionadas con el tema.

4.2. Investigación bibliográfica

Se recopiló información bibliográfica de libros, tesis, trabajos de graduación a través de la visita a:

-Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

-Biblioteca de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

-Biblioteca del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA).

-Internet

4.3. Investigación de campo

4.3.1. Universo

Lo constituyen los suelos agrícolas de El Salvador destinados para la siembra de diferentes cultivos.

4.3.2. Muestras

Las muestras utilizadas para la parte experimental, fueron facilitadas a través del programa de Agroindustrias y División del Café, ambas del CENTA y fueron procesadas en el laboratorio de suelos de esta misma institución.

Para seleccionar las 2 muestras de suelo se tomó en cuenta el tipo de cultivo desarrollado en él, se utilizó un suelo de cultivo exigente en boro (cacao) y otro de cultivo muy exigente en boro (café); ver anexo N°2.

En el cuadro N°3 se hace una descripción de la procedencia de las muestras, cantidad, tipo de cultivo y otros datos:

Cuadro N° 3 Descripción de las muestras utilizadas en la parte experimental

Muestra	Muestra 1	Muestra 2
Fecha de toma de muestra	15/06/2014	12/06/2014
Lugar de toma de muestra	Cantón Miramar, Concepción Batres, Usulután	Finca la majada, cantón San Luis, municipio de Juayua, Sonsonate
Cultivo	Cacao	Café
Área de toma de muestra	1.5 Mz	0.5 Mz

Para la muestra 1 se hicieron 14 replicas de prueba para realizar los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia y para la muestra 2 se hicieron 21 replicas de prueba para los parámetros de exactitud y linealidad del método.

4.4. Descripción de toma de muestra de suelo ⁽⁶⁾

1. Muestrear cada lote en 15 a 20 puntos en forma de zig-zag utilizando el modelo triangular o rectangular (ver anexo N°7).
2. En cada punto a muestrear quitar las malezas, entre otros; de la superficie del terreno antes de tomar la muestra.
3. Para tomar la muestra utilizar un barreno o una pala. Cuando use la pala, hacer un hueco en forma de “u” y tomar una rodaja de media pulgada de suelo.
4. Mezclar bien el suelo, colar para eliminar piedras, raíces, basura, entre otros y depositar la muestra en un balde y homogenizar.
5. En una bolsa plástica limpia, depositar una muestra de aproximadamente de 1 libra de muestra de suelo y rotular correctamente la muestra para el análisis químico.

4.5. Parte experimental

4.5.1. Determinación de boro

Tratamiento previo de muestras de suelo ⁽⁷⁾

1. Secar la muestra de suelo a una temperatura de 60°C durante 10 a 24 horas, dependiendo del grado de humedad de la muestra.
2. Moler la muestra con ayuda de un mazo, si es necesario dependiendo de la textura de la muestra.
3. Pasar la muestra a través de un tamiz de 2 mm.

Procedimiento de extracción de boro con solución extractora de 500 ppm de fósforo ⁽⁷⁾

4. Pesar 10.0 g de suelo en tubo plástico de 50 mL en balanza analítica.
5. Agregar 25.0 mL de solución de 500 ppm de P.
6. Agitar mecánicamente durante 10 minutos a una velocidad de 260 rpm.

7. Filtrar usando papel whatman N° 40 o N°42 y recibir en un tubo plástico de 50 mL (este es el filtrado de extracción de boro de la muestra).

Reacción colorimétrica ⁽⁵⁾

8. Tomar una alícuota de 2.0 mL del filtrado de extracción de boro, usando una pipeta volumétrica de 2.0 mL.
9. Agregar 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado.
10. Añadir 10.0 mL de ácido sulfúrico concentrado y mezclar suavemente.
11. Añadir 10.0 mL de solución rojo carmín con pipeta volumétrica de 10.0 mL.
12. Dejar en reposo durante 45 minutos.
13. Leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 585 nm.

Preparación de curva de estándares de boro ⁽⁵⁾

1. Tomar 2.0 mL de cada una de las soluciones estándares de boro de 0, 1, 2, 3, 4, y 5 ppm (ver anexo N°5, preparación de estándares).
2. Realizar el mismo procedimiento que se realiza a las muestras, descrito anteriormente para reacción colorimétrica de los pasos de 9 a 13.

Calculo de concentración de boro ⁽⁵⁾

Interpolar la absorbancia obtenida del ensayo de boro de las muestras en la curva de estándares de boro en una hoja de Excel previamente diseñada.

4.5.2. Metodología de la evaluación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín ⁽¹⁰⁾

Según la guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA), se evaluaron siete parámetros de desempeño por ser método normalizado modificado.

4.5.3. Precisión del método

4.5.3.1. Repetibilidad y Precisión intermedia ⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

Se determinó la repetibilidad del método espectrofotométrico rojo carmín (ver apartado 4.5.1. determinación de boro) para ello en una misma muestra de suelo se determinó la cantidad de boro por sextuplicado, manteniendo las siguientes condiciones del análisis: mismo analista, mismo día, mismo equipo y mismos instrumentos; se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro (espectrofotómetro Genesys 20 Thermo científico), y luego se hizo el cálculo de coeficiente de variación.

Para la precisión intermedia se determinó la cantidad de boro por sextuplicado en una misma muestra de suelo, usando equipo diferente (espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys) en el que se realizó el ensayo de repetibilidad, se leyeron las absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro, y se realizó el cálculo de coeficiente de variación.

Los criterios de aceptación para cumplimiento de la precisión son:

$CV \leq 3 \%$ para método espectrofotométrico

Formulas matemáticas a utilizar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$ S= desviación estándar

CV= coeficiente de variación

\bar{y} = media aritmética de y

n= 6 (tanto para repetibilidad como para precisión intermedia)

4.5.4. Exactitud ⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

Se determinó la exactitud del método espectrofotométrico rojo carmín (ver apartado 4.2.1. determinación de boro), para ello se analizó una muestra de suelo por sextuplicado, se cuantificó primero la cantidad de boro, luego a cada una de las muestras se agregó 2.0 mL de una concentración conocida de estándar de boro de 5 ppm (ver anexo N°5), se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro, posteriormente se realizaron los cálculos del porcentaje de recobro y con estos los cálculos correspondientes para determinar la exactitud del método.

$$\% R = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} \times 100$$

Los criterios de aceptación para cumplimiento de la exactitud son:

CV \leq 3 % para método espectrofotométrico

El IC (μ) para método espectrofotométrico es (97 -103)%

Formulas matemáticas a utilizar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

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

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

S= desviación estándar

CV= coeficiente de variación

IC(μ) = intervalo de confianza para la media poblacional

4.5.5. Linealidad del método ⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

Para realizar esta prueba se realizó lo siguiente:

- Se determinó la concentración de boro en una muestra de suelo (ver apartado 4.5.1. determinación de boro).
- Se realizaron cinco niveles de concentración de estándar de boro de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm (ver anexo N°5).
- Se agregó a diferentes sub muestras de suelo una cantidad de 2.0 mL de estándar de boro de la siguiente manera y se realizó por triplicado:
 - Sub muestra 1 más estándar 1 ppm de boro
 - Sub muestra 1 más estándar 2 ppm de boro
 - Sub muestra 1 más estándar 3 ppm de boro
 - Sub muestra 1 más estándar 4 ppm de boro
 - Sub muestra 1 más estándar 5 ppm de boro
- Se realizó el procedimiento de cuantificación de boro según el procedimiento del método espectrofotométrico rojo carmín y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro.
- Posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes de linealidad del método en una hoja de Excel diseñada para ese fin.

Los criterios de aceptación para cumplimiento de la linealidad del método son:

$$r^2 \geq 0.95$$

El IC (β_1) debe incluir la unidad

El IC (β_0) debe incluir el cero

El CV y/x del porcentaje de recobro, no debe ser mayor del 3% por ser método espectrofotométrico

Formulas matemáticas a utilizar:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_o \sum y}{n - 2}}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}}$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_o} = \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$IC(\beta_o) = b_o \pm t_{0.975, n-2} S_{b_o}$$

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

$S_{\frac{y}{x}}$ = desviación estándar de regresión

S_{b_1} = desviación estándar de la pendiente

$IC(\beta_1)$ = intervalo de confianza de la pendiente poblacional

S_{b_o} = desviación estándar de la ordenada al origen

$IC(\beta_o)$ = intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional

$CV_{y/x}$ = coeficiente de variación de regresión

r^2 = Coeficiente de regresión lineal

4.5.6. Limite de cuantificación (3)(5)(7)(10)

Para la realización del límite de cuantificación, se leyeron las absorbancias de los estándares de boro de concentración: 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de boro (ver anexo N°5) en un espectrofotómetro, así mismo se leyeron las absorbancias de 5 blancos y se hicieron los cálculos correspondientes.

Fórmula matemática a utilizar:

$$C_L = \frac{K S_{blanco}}{b}$$

C_L = Limite de cuantificación

K = constante de limite de cuantificación cuyo valor es 10

S_{blanco} = desviación estándar de los blancos

b =pendiente

4.5.7. Rango o intervalo de cuantificación de boro ⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

Se determinaron las absorbancias, de tres concentraciones de estándares las cuales fueron de 0 ,3 y 5 ppm de boro para determinar el rango donde es posible cuantificar boro con una exactitud, precisión y linealidad adecuada para así ver si existe un rango de cuantificación de boro dentro de los niveles de interpretación de boro en suelo (ver anexo N°1).

4.5.8. Linealidad del sistema ⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

Para realizar esta prueba, se leyeron por triplicado las absorbancias de los estándares de boro cuya concentración son: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de boro (ver anexo N°5), en un espectrofotómetro, posteriormente se hicieron los cálculos correspondientes.

Los criterios de aceptación para cumplimiento de la linealidad del sistema son:

$$r^2 \geq 0.98$$

El IC (β_1) no debe incluir el cero

Formulas matemáticas a utilizar:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$Sb_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}}$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$S_{\frac{y}{x}}$ = desviación estándar de regresión

S_{b_1} = desviación estándar de la pendiente

$IC(\beta_1)$ = intervalo de confianza de la pendiente poblacional

r^2 = Coeficiente de regresión lineal

Después de desarrollar los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín se realizó la interpretación de los resultados obtenidos los cuales son descritos en la sección de resultados y discusión de resultados.

Al final de la sección de resultados y discusión de resultados se hizo un cuadro resumen de los resultados obtenidos de la evaluación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín de la siguiente manera:

Cuadro N°4 Formato de cuadro de interpretación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín

Parámetro	Criterios	Resultado	Interpretación
Repetibilidad			
Precisión intermedia			
Exactitud			
Linealidad del método			
Limite de cuantificación			
Rango o intervalo de cuantificación de boro			
Linealidad del sistema			

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los datos y los cálculos de los parámetros de desempeño fueron calculados mediante hojas de Excel diseñadas para ese fin.

Para realizar los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia se ocupó la muestra N°1 de cultivo de cacao la cual es exigente en boro y para los parámetros de exactitud y linealidad del método se ocupó la muestra N°2 de café la cual es muy exigente en boro.

A continuación se presentan en la tabla N° 1 los valores de las absorbancias de los estándares de boro utilizadas para hacer los cálculos de los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín, cabe mencionar que solo estos datos de estándares de boro se ocuparon para hacer todos los cálculos correspondientes.

Tabla N° 1 Valores de absorbancias de estándares de boro utilizados, longitud de onda de 585 nm.

ppm B	Abs B
0	0.000
1	0.110
2	0.208
4	0.573

5.1. Repetibilidad (1)(3)(5)(7)(10)

Se determinó la repetibilidad del método espectrofotométrico rojo carmín (ver apartado 4.5.1. determinación de boro) para de una misma muestra de suelo se analizó boro por sextuplicado, manteniendo las mismas condiciones del análisis: mismo analista, mismo día, mismo equipo y mismos instrumentos; se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro (espectrofotómetro Genesys 20 Thermo científico), y luego se hizo el cálculo de coeficiente de variación.

Tabla N°2 Datos obtenidos de repetibilidad del método espectrofotométrico rojo carmín.

N° repetición	Absorbancia	ppm de boro obtenidas (y)	Y ²
1	0.235	4.58	21.00
2	0.191	3.83	14.70
3	0.133	2.85	8.12
4	0.212	4.19	17.57
5	0.085	2.03	4.14
6	0.044	1.34	1.79
Sumatoria	-----	18.82	67.32

Con los datos de ppm de boro de repetibilidad de la tabla N°2 se hizo el cálculo de coeficiente de variación.

$$n = 6$$

$$Y \text{ (promedio)} = 3.14 \text{ ppm}$$

$$S = 1.2819$$

$$CV = 40.85 \%$$

5.2. Precisión intermedia (1)(3)(5)(7)(10)

Para la precisión intermedia se analizó boro por sextuplicado de una misma muestra de suelo, utilizando un equipo diferente (Spectronic 20 Genesys) que el utilizado en el ensayo de repetibilidad. Se obtuvieron las absorbancias y posteriormente se realizaron los cálculos estadísticos para obtener el coeficiente de variación.

Tabla N°3 Datos obtenidos de precisión intermedia del método espectrofotométrico rojo carmín

N° repetición	Absorbancia	ppm de boro obtenidas (y)	Y ²
1	0.200	3.99	15.9201
2	0.180	3.65	13.3225
3	0.134	2.87	8.2369
4	0.200	3.99	15.9201
5	0.082	1.98	3.9204
6	0.047	1.39	1.9321
Sumatoria	-----	17.87	59.2521

Con los datos de ppm de boro de precisión intermedia de la tabla N°3 se hizo el cálculo de coeficiente de variación.

$$n = 6$$

$$Y \text{ (promedio)} = 2.98 \text{ ppm}$$

$$S = 1.0971$$

$$CV = 36.86 \%$$

El valor del coeficiente de variación de repetibilidad y precisión intermedia reflejan que la media aritmética carece de representatividad en los datos obtenidos de ppm de boro (ver anexo N°6) y por lo tanto no cumplen con el criterio de aceptación de menor o igual a 3% de coeficiente de variación para método espectrofotométrico especificado en la guía de validación de métodos fisicoquímico de la OSA.

5.3. Exactitud (1)(3)(5)(7)(10)

Se determinó la exactitud del método espectrofotométrico rojo carmín (ver procedimiento del método espectrofotométrico rojo carmín), para ello se analizó

una muestra de suelo por sextuplicado, se cuantificó primero la cantidad de boro, luego a cada una de las muestras se agregó 2.0 mL de una concentración conocida de estándar de boro de 5 ppm (ver anexo N°5, preparación de estándares), se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro, posteriormente se realizó los cálculos del porcentaje de recobro y luego se hicieron los cálculos correspondientes para determinar la exactitud del método utilizando los datos de porcentaje de recobro.

Tabla N°4 Datos obtenidos de exactitud del método espectrofotométrico rojo carmín

N° repetición	ppm de boro adicionada (teórico)	Absorbancia	ppm de boro recuperada	Porcentaje de recobro %	χ^2
1	7.27	0.042	1.30	17.88	319.69
2	7.27	0.142	3.00	41.27	1703.21
3	7.27	0.117	2.58	35.49	1259.54
4	7.27	0.059	1.59	21.87	478.30
5	7.27	0.151	3.16	43.47	1889.64
6	7.27	0.168	3.44	47.32	2239.18
Sumatoria	---	--	--	207.30	7889.56

Con los datos de la tabla N° 4 de porcentaje de recobro se hicieron los cálculos correspondientes de exactitud.

La concentración de boro obtenidas en muestra de suelo = 2.27 ppm (teórico)

ppm de boro adicionadas $2.27 + 5 = 7.27$ ppm

$Y(\text{promedio}) = 34.55 \%$

$n = 6$

$S = 12.06$

$$CV = 34.91\%$$

$$t_{0.975,n-1} = 2.571 \text{ (ver anexo N°8)}$$

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$IC(\mu) = (34.55) \pm (2.571) \frac{(12.06)}{\sqrt{6}}$$

$$IC(\mu) = 21.89 - 47.21$$

Los datos de exactitud indican que el método espectrofotométrico rojo carmín no cuenta con una buena exactitud debido a que el coeficiente de variación tiene una representatividad dudosa en su media aritmética (ver anexo N°6) y no cumple con el criterio de aceptación de que el $IC(\mu)$ tenga un intervalo de (97-103) % especificado en la guía de validación de métodos fisicoquímicos de la OSA.

5.4. Linealidad del método (1)(3)(5)(7)(10)

Para realizar la linealidad del método del método espectrofotométrico rojo carmín se siguió la metodología descrita anteriormente en el apartado 4.5.5.

Los datos obtenidos de ppm de B recuperadas se presentan en la tabla N° 5

Tabla N°5 Datos obtenidos de ppm de boro recuperadas del ensayo de linealidad del método

ppm B añadido (teórico)	Abs 1	ppm B recuperada 1	Abs 2	ppm B recuperada 2	Abs 3	ppm B recuperada 3
1.27	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00
2.27	0.134	2.97	0.140	2.97	0.140	2.97
3.27	0.130	3.10	0.148	3.10	0.139	2.95
4.27	0.093	2.10	0.089	2.10	0.092	2.15
5.27	0.273	5.13	0.267	5.13	0.28	5.35

En anexo N°9 se encuentra la grafica de linealidad del método.

En la tabla N° 6 se presentan los datos numéricos de los ensayos de linealidad del método, con los cuales se hicieron los cálculos de linealidad del método.

Tabla N°6 Datos de las diferentes curvas de linealidad del método del método espectrofotométrico rojo carmín

Dato	Curva 1	Curva 2	Curva 3
r^2	0.681	0.639	0.661
Pendiente (b_1)	0.975	0.938	0.987
Ordenada (b_0)	-0.576	-0.407	-0.544
$\sum X$	16.3500	16.3500	16.3500
$\sum X^2$	63.4645	63.4645	63.4645
$\sum Y$	13.0660	13.2998	13.4178
$\sum Y^2$	48.1044	49.1391	50.7384
$\sum XY$	52.4809	52.8717	53.7491
$S_{y/x}$	1.2195	1.2856	1.2894
S_{b_1}	0.3856	0.4065	0.4077
S_{B_0}	1.1266	1.1266	1.1266

$$t_{0.975, n-2} = 3.182 \text{ (ver anexo N°8)}$$

$$b_1 \text{ (Promedio)} = 0.967$$

$$b_0 \text{ (Promedio)} = -0.509$$

$$S_{\frac{y}{x}} \text{ (Promedio)} = 1.2648$$

$$S_{b_1} \text{ (Promedio)} = 0.4000$$

$$S_{B_0} \text{ (Promedio)} = 1.1266$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$IC(\beta_1) = -0.3060 - 2.2394$$

$$IC(\beta_o) = b_o \pm t_{0.975, n-2} S_{b_o}$$

$$IC(\beta_o) = -4.0939 - 3.0759$$

$$CV_{y/x} = 47.69 \%$$

La linealidad del método no cumple con el criterio de r^2 de ser igual o mayor a 0.95 pues los r^2 obtenidos son debajo de 0.95, y el $CV_{y/x}$ carece de representatividad en su media aritmética (ver anexo N°6) pues no se cumple con el criterio de $CV_{y/x}$ menor o igual a 3%, por lo tanto la linealidad de método del método espectrofotométrico rojo carmín no cumple con la guía de validación de métodos fisicoquímicos de la OSA.

5.5. Límite de cuantificación (3)(5)(7)(10)

Por lo datos obtenidos de repetibilidad (CV =86.38%), precisión intermedia (CV= 67.00 %) y exactitud (CV =34.91 % y IC(μ) de 21.89-47.21 %) del método espectrofotométrico rojo carmín y adicionalmente los datos de coeficientes de regresión de las curvas de estándares de boro son menores a 0.98 lo cual es un requisito para cumplir limite de cuantificación, se puede decir que no es posible determinar el límite de cuantificación debido a que no se cuenta con la certeza de que el dato numérico de limite de cuantificación sea verdadero.

5.6. Rango o Intervalo de cuantificación de boro (3)(5)(7)(10)

Se determinaron las absorbancias, de tres concentraciones de estándares las cuales fueron de 0 ,3 y 5 ppm de boro para determinar el rango donde es posible cuantificar boro con una exactitud, precisión y linealidad adecuada para así ver si existe un rango de cuantificación de boro dentro de los niveles de interpretación de boro en suelo (ver anexo N°1).

La tabla N°7 presenta los valores de absorbancia de los estándares de 0, 3 y ppm de boro.

Tabla N°7 Datos de absorbancias de estándares del parámetro rango o intervalo de cuantificación de boro

Estándar	Absorbancia
0 ppm	0.000
3 ppm	0.164
5 ppm	0.229

Se logra determinar absorbancia con los estándares de 0, 3 y 5 ppm de boro, no obstante tomado en cuenta los datos obtenidos de linealidad del método y linealidad del sistema (ver apartado 5.7. linealidad del sistema) los cuales no se cumplieron en sus criterios de aceptación; se puede decir que es muy difícil establecer un rango o intervalo de cuantificación de boro.

5.7. Linealidad del sistema ⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

Para realizar esta prueba, se leyeron por triplicado las absorbancias de los estándares de boro cuya concentración son: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de boro (ver anexo N°5), en un espectrofotómetro, posteriormente se hicieron los cálculos correspondientes para linealidad del sistema.

Tabla N° 8 Absorbancias obtenidas de los estándares de boro de la linealidad del sistema

Estándar	x2	Abs 1	Abs 2	Abs 3
1 ppm	1	0.157	0.110	0.175
2 ppm	4	0.343	0.208	-0.039
3 ppm	9	0.164	0.163	0.224
4 ppm	16	0.221	0.573	0.575
5 ppm	25	0.229	0.299	0.576

En la tabla N° 9 se presenta los datos numéricos de los cálculos de linealidad del sistema.

Tablas N°9 Datos obtenidos de los resultados de la linealidad del sistema

Dato	Curva 1	Curva 2	Curva 3	promedios
r^2	0.822	0.939	0.840	0.867
Pendiente	0.018	0.047	0.100	0.055
Ordenada	0.129	0.048	0.024	0.067
$\frac{S_y}{\bar{x}}$	0.0273	0.0469	0.1284	0.0675
Sb_1	0.0096	0.0166	0.0454	0.0238

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$Sb_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}}$$


$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$IC(\beta_1) = -0.2482 - 0.3582$$

Los datos de coeficiente de regresión indican que la curva de calibración de estándares de boro no cumplen con el criterio de aceptación de r^2 igual o mayor a 0.98 y el $IC(\beta_1)$ incluye el cero por lo cual no se cuenta con una linealidad de sistema adecuada para los análisis de cuantificación de boro en suelos agrícolas.

5.8. Protocolo de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín.


A continuación se escribe el protocolo de validación del método espectrofotométrico rojo carmín para la determinación de boro en suelos agrícola:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
	PAGINAS 1 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	DE	FECHA DE APROBACION REVISION 0
Índice <ol style="list-style-type: none"> 1. Objetivo 2. Alcance 3. Responsable 4. Parámetros a estudiar 5. Muestras 6. Equipos involucrados 7. Descripción del método <ol style="list-style-type: none"> 7.1. reactivos 7.2. estándares 7.3. materiales 7.4. preparación de estándar 7.5. preparación de reactivos 7.6. preparación de muestras 7.7. procedimiento 7.8. cálculos 8. Procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar 9. Criterios de aceptación 10. Anexos 			
ELABORADO POR:		REVISADO POR:	APROBADO POR:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
	PAGINAS 2 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>1. Objetivo</p> <p>Determinación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín para la determinación de boro en suelos agrícolas para el laboratorio de suelos del Centro Nacional de Tecnología agropecuaria y forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA).</p> <p>2. Alcance</p> <p>Este protocolo de parámetros de desempeño solo es para la cuantificación de boro en suelo.</p> <p>3. Responsable</p> <p>Los técnicos químicos analistas que realicen análisis de boro en suelos son los responsables de la aplicación del protocolo de parámetros de desempeño.</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL “ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA”		CODIGO
	PAGINAS 3 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>4. Parámetros a Determinar</p> <ul style="list-style-type: none"> -Repetibilidad -Precisión intermedia -Exactitud -Linealidad del método -Limite de cuantificación -Rango o intervalo de cuantificación de boro -Linealidad del sistema <p>5. Muestras</p> <p>Utilizar muestras de suelos seleccionadas con el propósito de realizar la evaluación de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín.</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	DE FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>6. Equipos involucrados</p> <ul style="list-style-type: none"> -Agitador mecánico orbital -Espectrofotómetro Genesys 20 Thermo científico -Espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys <p>7. Descripción del método</p> <p>7.1. Reactivos (ver apartado 7.5. preparación de reactivos)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Solución extractora de fosfato de calcio (500 ppm de P) -Acido Clorhídrico concentrado 37% p/p -Acido Sulfúrico concentrado 95-97% p/p -Solución indicadora de rojo carmín <p>7.2. Estándares (ver apartado 7.4. preparación de estándar)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Soluciones estándares de boro de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de Boro 			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
	PAGINAS 5 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>7.3. Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> -Tubos de centrifugación plásticos de 50 mL -Embudos de filtración plásticos -Probeta de 50 mL -Pipetas volumétricas de 2.0 mL -Pipetas volumétricas de 10. 0 mL -Vasos de precipitado de de 50 mL y 250 mL -Gotero <p>7.4. Preparación de estándar</p> <p>Pesar y colocar 2.860 g de acido bórico en un balón aforado de 1 litro; disolver y llevar a volumen de 1 litro con la solución extractora de fosfato de calcio (500 ppm de fosforo), esta solución contiene 500 ppm de boro</p> <p>Para preparar una solución de 50 ppm de boro, tomar 50.0 mL de la solución de 500 ppm de boro y diluir a 1 litro con la solución extractora de fosfato de calcio.</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO																							
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO																					
	PAGINAS 6 de 18																							
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS																					
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0																					
<p>Medir los siguientes volúmenes de la solución estándar de 50 ppm y llevar a volumen 250.0 mL con la solución extractora de fosfato de calcio, para preparar los estándares de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de boro.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">Cantidad a preparar</th> <th style="width: 33%;">Alícuota a tomar de la solución de 50 ppm de boro</th> <th style="width: 33%;">ppm de boro obtenido</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">250.0 mL</td> <td style="text-align: center;">0.0 mL</td> <td style="text-align: center;">0 ppm</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">250.0 mL</td> <td style="text-align: center;">5.0 mL</td> <td style="text-align: center;">1 ppm</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">250.0 mL</td> <td style="text-align: center;">10. mL</td> <td style="text-align: center;">2 ppm</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">250.0 mL</td> <td style="text-align: center;">15.0 mL</td> <td style="text-align: center;">3 ppm</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">250.0 mL</td> <td style="text-align: center;">20.0 mL</td> <td style="text-align: center;">4 ppm</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">250.0 mL</td> <td style="text-align: center;">25.0 mL</td> <td style="text-align: center;">5 ppm</td> </tr> </tbody> </table>				Cantidad a preparar	Alícuota a tomar de la solución de 50 ppm de boro	ppm de boro obtenido	250.0 mL	0.0 mL	0 ppm	250.0 mL	5.0 mL	1 ppm	250.0 mL	10. mL	2 ppm	250.0 mL	15.0 mL	3 ppm	250.0 mL	20.0 mL	4 ppm	250.0 mL	25.0 mL	5 ppm
Cantidad a preparar	Alícuota a tomar de la solución de 50 ppm de boro	ppm de boro obtenido																						
250.0 mL	0.0 mL	0 ppm																						
250.0 mL	5.0 mL	1 ppm																						
250.0 mL	10. mL	2 ppm																						
250.0 mL	15.0 mL	3 ppm																						
250.0 mL	20.0 mL	4 ppm																						
250.0 mL	25.0 mL	5 ppm																						
<p>7.5. Preparación de reactivos</p> <p>Solución extractora de fosfato de calcio. 500 ppm de P</p> <p>Disolver 20.3 g de fosfato de calcio en aproximadamente 2 litros de agua agregando 10 mL de HCl concentrado. Agregar 0.5 g de superfloc 127 (agente floculante) disuelto previamente en agua y llevar a un volumen final de 10 litros.</p>																								
ELABORADO POR	REVISADO POR:	APROBADO POR:																						

				PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO				
				CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"			CODIGO	
				PAGINAS 7 de 18				
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.					LABORATORIO DE SUELOS			
FECHA DE EMISION		FECHA DE REVISION	DE	FECHA DE APROBACION	DE	REVISION 0		
<p>Solución indicadora de rojo carmín</p> <p>Disolver 920 mg de rojo carmín en 1000 mL de ácido sulfúrico concentrado.</p> <p>7.7. Preparación de muestras</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Secar la muestra de suelo a una temperatura de 60°C y tiempo de 10 a 24 horas dependiendo del grado de humedad de la muestra. 2. Moler la muestra con ayuda de un mazo, si es necesario dependiendo de la textura de la muestra. 3. Pasar la muestra a través de un tamiz de 2 mm. <p>7.8. Procedimiento</p> <p style="text-align: center;">Procedimiento de extracción de boro con solución extractora de 500 ppm de fosforo</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. Pesar 10.0 g de suelo en tubo plástico de 50 mL. 5. Agregar 25.0 mL de solución de 500 ppm de P. 6. Agitar con agitador mecánico durante 10 minutos a una velocidad de 260 rpm. 7. Filtrar usando papel Whatman N° 40 o N°42 y recibir en un tubo plástico de 50 mL. 								
ELABORADO POR			REVISADO POR:		APROBADO POR:			

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL “ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA”		CODIGO
	PAGINAS 8 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>Reacción colorimétrica</p> <ol style="list-style-type: none"> 8. Tomar una alícuota de 2.0 mL de filtrado de extracción de boro, usado una pipeta volumétrica de 2.0 mL. 9. Agregar 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado. 10. Añadir 10.0 mL de ácido sulfúrico concentrado y mezclar suavemente. 11. Añadir 10.0 mL de solución rojo carmín con pipeta volumétrica de 10.0 mL. 12. Dejar en reposo durante 45 minutos. 13. Leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 585 nm. <p>7.9. Cálculos</p> <p>Interpolar la absorbancia obtenida del ensayo de boro de las muestras en la curva de estándares de boro en una hoja de Excel previamente diseñada.</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>8. Procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar</p> <p>Repetibilidad</p> <p>En una misma muestra de suelo se cuantifica boro por sextuplicado, manteniendo las mismas condiciones del análisis: mismo analista, el mismo día, el mismo equipo y los mismos instrumentos, se leer las absorbancias en el espectrofotómetro, para posteriormente hacer el cálculo de coeficiente de variación,</p> <p>Precisión intermedia</p> <p>Se analizará una misma muestra de suelo, se cuantificará boro por sextuplicado, se realizará con espectrofotómetro diferente al utilizado en el ensayo de repetibilidad, pero manteniendo las demás condiciones iguales; se leerán las absorbancias en el espectrofotómetro, para posteriormente hacer el cálculo de coeficiente de variación.</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
	PAGINAS 10 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>Formulas para repetibilidad y precisión intermedia</p> $S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$ $CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$ <p>Exactitud</p> <p>Se cuantifica por sextuplicado la cantidad de boro en una misma muestra de suelo, luego a cada de las muestras (6 muestras) se le agregar 2.0 mL de una concentración conocida de estándar de boro de 1 ppm, se leen la absorbancias en un espectrofotómetro, posteriormente se hacen los cálculos de porcentaje de recobro y luego se hacen los cálculos correspondientes para determinar la exactitud del método utilizado los datos de porcentaje de recobro.</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
	PAGINAS 11 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>Formulas matemáticas para determinar la exactitud:</p> $S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$ $CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$ $IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$ <p>Linealidad del método</p> <p>A. Se determina la concentración de boro en una muestra de suelo</p> <p>B. Se realizar cinco niveles de concentración de estándar de boro de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ppm.</p> <p>C. Se agregar a diferentes muestras de suelo una cantidad de 2.0 mL de estándar de boro de la siguiente manera y se realiza por triplicado:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Muestra 1 más estándar 1 ppm de boro -Muestra 1 más estándar 2 ppm de boro -Muestra 1 más estándar 3 ppm de boro -Muestra 1 más estándar 4 ppm de boro -Muestra 1 más estándar 5 ppm de boro 			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL “ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA”		CODIGO
	PAGINAS 12 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>D. Se realiza el procedimiento de cuantificación boro según el procedimiento del método espectrofotométrico rojo carmín y se leen las absorbancias en un espectrofotómetro.</p> <p>E. Posteriormente se hacen los cálculos correspondientes a linealidad del método.</p> <p>Formulas matemáticas a utilizar para linealidad del método:</p> $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$ $S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}}$ $IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S_{b_1}$ $S_{b_0} = \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ $IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975,n-2} S_{b_0}$ $CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL “ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA”		CODIGO
	PAGINAS 13 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>Limite de cuantificación</p> <p>Se leen las absorbancias de los estándares de boro de concentración de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de boro en un espectrofotómetro; así mismo se leen las absorbancias de 5 blancos, para posteriormente hacer los cálculos correspondientes.</p> <p>Fórmula matemática a utilizar:</p> $C_L = \frac{K S_{blanco}}{b}$			
<p>Linealidad del sistema</p> <p>Se leen por triplicado las absorbancias de los estándares de boro cuya concentración son 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de boro, en un espectrofotómetro, para posteriormente hacer los cálculos correspondientes de linealidad de sistema.</p> <p>Formulas matemáticas para linealidad del método:</p> $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	DE APROBACION	DE REVISION 0
$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}}$ $IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$			
9. Criterios de aceptación de parámetros de desempeño			
Repetibilidad			
Los criterios de aceptación para cumplimiento de la repetibilidad son:			
CV ≤ 3 % para método espectrofotométrico			
Precisión intermedia			
Los criterios de aceptación para cumplimiento de la precisión intermedia son:			
CV ≤ 3 % para método espectrofotométrico			
Exactitud			
Los criterios de aceptación para cumplimiento de la exactitud son:			
CV ≤ 3 % para método espectrofotométrico			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
	PAGINAS 15 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>El IC (μ) para método espectrofotométrico es (97 -103)%</p> <p>Linealidad del método</p> <p>Los criterios de aceptación para cumplimiento de la linealidad del método son:</p> <p>$r^2 \geq 0.95$</p> <p>El IC (β_1) debe incluir la unidad</p> <p>El IC (β_0) debe incluir el cero</p> <p>El CV y/x del porcentaje de recobro, no debe ser mayor del 3% por ser método espectrofotométrico</p> <p>Limite de cuantificación</p> <p>Según dato obtenido en el proceso estadístico</p> <p>Rango o intervalo de cuantificación de boro</p> <p>Dependiendo de los resultados de los demás parámetros de desempeño.</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL "ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA"		CODIGO
	PAGINAS 16 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>Linealidad del sistema</p> <p>Los criterios de aceptación para cumplimiento de la linealidad del sistema son:</p> <p>$r^2 \geq 0.98$</p> <p>El IC (β_1) no debe incluir el cero</p> <p>10. Anexo</p> <p>Significado de símbolos matemáticos:</p> <p>S = desviación estándar</p> <p>CV = coeficiente de variación</p> <p>$CV_{y/x}$ = coeficiente de variación de regresión</p> <p>L_C = límite de cuantificación</p> <p>IC (μ) = intervalo de confianza para la media poblacional</p> <p>IC (β_1) = intervalo de confianza de la pendiente poblacional</p> <p>El IC (β_0) = intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL “ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA”		CODIGO
	PAGINAS 17 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA DE REVISION	FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>K = constante para límite de cuantificación</p> <p>S blanco = desviación estándar de la respuesta de los blancos</p> <p>b = pendiente de la recta de calibración</p> <p>b₁ = pendiente</p> <p>b₀ = ordenada al origen</p> <p>n = numero de ensayos realizados</p> <p>t_{0.975,n-2} = Valor de la distribución t de Student y asociada a una confianza del 95 % y grados de libertad establecidos</p> <p>∑y = Sumatoria de componente y</p> <p>\bar{y} = media aritmética de y</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO		
	CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL “ENRIQUE ALVAREZ CORDOVA”		CODIGO
	PAGINAS 18 de 18		
PROTOCOLO DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO ROJO CARMIN PARA DETERMINACION DE BORO EN SUELOS AGRICOLAS.			LABORATORIO DE SUELOS
FECHA DE EMISION	FECHA REVISION	DE FECHA DE APROBACION	REVISION 0
<p>$\sum x$ = Sumatoria de componente x</p> <p>\bar{x} = media aritmética de x</p> <p>r^2 = Coeficiente de regresión lineal</p> <p>Sb_1 = Desviación estándar de la pendiente</p> <p>$\% R$ = Porcentaje de recobro</p> <p>Sy/x = Desviación estándar de regresión</p> <p>S_{b_0} = Desviación estándar de la ordenada al origen</p>			
ELABORADO POR		REVISADO POR:	APROBADO POR:

5.9. Interpretación de los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín.

Cuadro N°5 Interpretaciones de parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

Parámetro	Criterios	Resultado	Interpretación
Repetibilidad	CV \leq 3 % para método espectrofotométrico	CV= 40.85 %	La repetibilidad carece de total representatividad en su coeficiente de variación
Precisión intermedia	CV \leq 3 % para método espectrofotométrico	CV= 36.86 %	La precisión intermedia no tiene representatividad en su coeficiente de variación
Exactitud	CV \leq 3 % para método espectrofotométrico El IC (μ) para método espectrofotométrico es (97 -103)%	CV = 34.91% IC(μ) = 21.89 – 47.21	No se cumple ningún criterio de aceptación para la exactitud por lo tanto el método no presenta exactitud.
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.95$ El IC (β_1) debe incluir la unidad El IC (β_0) debe incluir el cero El CV y/x del porcentaje de recobro, no debe ser mayor del 3% por ser método espectrofotométrico	$r^2 = 0.681$ $r^2 = 0.639$ $r^2 = 0.661$ IC(β_1)= - 0.3060-2.2.394 IC(β_0)= - 4.0939-3.0759 CV y/x = 47.69 %	La linealidad del método no cumple con la mayoría de los criterios de aceptación por lo tanto no hay correlación entre la cantidad añadida y la cantidad recuperada de ppm de boro.

Limite de cuantificación	Valor calculado con base a una buena precisión y exactitud del método espectrofotométrico rojo carmín.	No se calculo el dato de limite de cuantificación debido a que no se cuenta con precisión y exactitud adecuado	Como no se cuenta con precisión y exactitud adecuada el límite de cuantificación no es confiable.
Rango o intervalo de cuantificación de boro	Valores de absorbancias de los estándares de 0.3 y 5 ppm de boro.	0 ppm = 0.000 3 ppm = 0.164 5 ppm = 0.229	Se logró determinar un intervalo pero, tomando en cuenta los datos obtenidos de linealidad del método y sistema no se puede decir que el intervalo sea confiable.
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$ El IC (β_1) no debe incluir el cero	$r^2 = 0.822$ $r^2 = 0.939$ $r^2 = 0.840$ IC (β_1) = - 0.2482- 0.3582	No existe una adecuada linealidad del sistema por lo tanto no se puede hacer uso de curva de estándares de boro para el método en estudio

6.0. Parámetros de desempeño del método espectrofotométrico

Azometina-H (método alternativo).

Como parte adicional a la parte experimental se realizó la evaluación de parámetros de desempeño de un método alternativo llamado método espectrofotométrico Azometina-H, esto debido a que los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín no cumplieron con sus criterios de aceptación; los datos del método Azometina-H se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N°10 Datos de los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico Azometina-H para la determinación de boro en suelos agrícolas. ⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

Parámetro	Resultado
Repetibilidad	Coeficiente de variación de 8.60 %
Precisión intermedia	Coeficiente de variación de 8.38 %
Exactitud	Coeficiente de variación de 2.23 % Intervalo de confianza de (89.96 - 94.27)%
Linealidad del método	Coeficientes de regresión lineal de 0.999, 0.999 y 0.995 Intervalo de confianza de la pendiente de 1.5007-1.6846 Intervalo de confianza de la ordenada al origen de - 4.9389 - 2.2369 Coeficiente de variación de regresión de 1.25 %
Limite de cuantificación	0.14 ppm de boro
Rango o intervalo de cuantificación de boro	0 a 5 ppm de boro
Linealidad del sistema	Coeficientes de regresión lineal de 0.998, 0.999 y 0.999 Intervalo de confianza de la pendiente de 0.3453 - 0.3887

Según los resultados obtenidos, el método espectrofotométrico Azometina-H, presenta una buena exactitud y linealidad del método y del sistema, según estos resultados este método Azometina-H, presenta mejores condiciones para la cuantificación de boro en suelo, comparado con el método rojo carmín, por lo tanto, se puede realizar un estudio de validación de mismo, teniendo el cuidado de verificar los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0. CONCLUSIONES

1. El protocolo de parámetros de desempeño es importante porque sirve de guía para demostrar que un método analítico cumple con las especificaciones deseadas.
2. La linealidad del método y del sistema del método espectrofotométrico rojo carmín no cumple con el criterio de aceptación con respecto al coeficiente de regresión igual o mayor a 0.98, lo cual indica que la respuesta analítica (absorbancia) no es representativa con respecto a la concentración del boro en estudio.
3. La determinación del límite de cuantificación de acuerdo a los resultados de precisión, exactitud y coeficiente de regresión del método rojo carmín no tiene representatividad.
4. Con el método espectrofotométrico rojo carmín no es posible establecer un rango o intervalo de cuantificación de boro debido a que no se cumple los parámetros de repetibilidad, precisión intermedia y exactitud.
5. El método espectrofotométrico rojo carmín no cumple con los criterios de aceptación de los parámetros de desempeño realizados por lo cual, no es conveniente la validación del mismo.
6. Los resultados de los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico rojo carmín indican que este método no es adecuado para la determinación de boro en suelo.
7. El método estudiado rojo carmín es susceptible, a diferentes interferencias ya sea de equipo, reactivos, cristalería, ambientales,

interferencias propias de la muestra de suelo, entre otras, lo cual afecta los resultados.

8. Los parámetros de desempeño del método Azometina-H presentaron mejores resultados comparados con el método rojo carmín, por lo cual sería necesario un estudio de validación de método Azometina-H.
9. El método alternativo de Azometina-H presentó buena exactitud y una excelente linealidad del método y sistema, según los datos obtenidos de los parámetros de desempeño, aunque no se cumple con la precisión en la investigación realizada.
10. Con el método espectrofotométrico Azometina-H es posible establecer límite de cuantificación y rango de cuantificación de boro.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0. RECOMENDACIONES

1. Utilizar material de polipropileno (PP), este material minimiza el riesgo de contaminación con boro durante el proceso de cuantificación en muestras de suelo.
2. Realizar calibración y mantenimiento del espectrofotómetro ultravioleta – visible en forma programada para asegura la confiabilidad de los datos de absorbancia.
3. Realizar la validación del método espectrofotométrico Azometina-H porque demostró buenos resultados en los parámetros de exactitud y linealidad del método y sistema, pues el método rojo carmín demostró no se apto para su utilización para cuantificar boro en suelos.
4. Cumplir con la Guía de Validación de Métodos Físicoquímicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA) y demás normativas internacionales de validación de métodos analíticos.
5. Aplicar los nuevos criterios del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA) que dice que para realizar los parámetros de precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad) y exactitud se deben hacer 10 replicas de ensayo del método en estudio.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Bonilla, G. (1993). *Estadística I, elementos de estadística descriptiva y probabilidad*. (1 ed). San Salvador, El Salvador: UCA editores.
2. Bru sarda, J y de Torres Ribas, M. (1992). *Boro micronutriente agrícola* (1 ed.). Barcelona. España.
3. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos México, A.C. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. México: Autor.
4. Cocharane, T.T y Barber, R.G. (1993). *Análisis de suelos y plantas tropicales*. Santa Cruz, Bolivia: Centro de Investigación Agrícola Tropical/Misión Británica en Agricultura Tropical.
5. Dewis, J; y Freitas, F. (1970). *Physical and Chemical methods of soil and wáter analysis*. Rome: Food and Agriculture organization of the United Nations.
6. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHA). (1994). *Manual de muestro de suelos y propiedades físicas*. La Lima, Cortez, Honduras: Autor.
7. Laboratorio de suelo, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA). (1993). *Manual de laboratorio del laboratorio de suelos, CENTA*. San Andres, La Libertad: Autor.

8. López L, M. (2009). *Determinación de parámetros de desempeño en métodos analíticos espectrofotométricos específicos para cuantificar fósforo y potasio utilizados para cultivos de café*. San Salvador: Universidad de El Salvador.
9. Mortvedt, J, J; Giordano, P, M y Lindsay, W, L. (1983). *Micronutrientes en agricultura* (1 ed.). México: Editor, S.A.
10. Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA). (2010). *Validación de métodos analíticos fisicoquímicos* (1 ed.): Autor.
11. Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica. (OSARTEC). (2013). Reglamento técnico Centroamericano 11.03.39:06. Reglamento de productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de productos farmacéuticos. Centro América: Autor.
12. Segura, M; Castillo. A y Alvarado, A. (2010). Métodos de extracción de boro y respuesta del jaúl a su adición en andisoles de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 34(2), 165-176.
13. United States Pharmacopeial Convention, In. (2007). The United States Pharmacopeia thirty revisión USP 30. U.S.A: Autor.

ANEXOS

Anexo N° 1

Interpretación de los niveles de boro en suelo manejados por el laboratorio de suelos del CENTA ⁽⁷⁾

Cuadro N°6 Niveles de interpretación de boro en suelo

ppm de boro en suelo	Grado de disponibilidad del mineral
0-0.03	Muy bajo
0.04-0.2	Bajo
0.3-0.5	Alto
0.6-8	Muy alto

Anexo N° 2

Exigencias de boro para diferentes cultivos agrícolas ⁽²⁾

Tabla N°11 Exigencias de boro para diferentes cultivos agrícolas

Exigencias de elemento Boro		
Cultivo muy exigente	Cultivo exigente	Cultivo tolerante
Aguacate	Amapola	Arroz
Alfalfa	Cacao	Avena
Algodón	Cítricos	Caña de azúcar
Apio	Coco	Árbol del caucho
Brócoli	Col	Cebada
Cacahuete	Col china	Centeno
Café	Col de Bruselas	Fresa
Clavel	Lino	Guisante
Colza	Lúpulo	Frijoles
Crisantemo	Maíz	Pastos
Eucalipto	Papaya	Piña tropical
Girasol	Patata	Soya
Manzano	Plátano	Trigo
Nabos	Pera	
Olivo	Tabaco	
Aceite de palma	Te	
Pino	Tomate	
Remolacha azucarera	Tréboles	
Remolacha forrajera		
Remolacha roja		
Vid		
Zanahoria		

Anexo N°3

Suelos bajos en boro total ⁽⁹⁾

Suelos bajos en boro total

Aluviales

Podsoles

Orgánicos

Regosoles

Gleys bajos en sustancias húmicas

Areas de precipitación pluvial moderada o fuerte

Suelos casi neutros o alcalinos

Clima seco

Alta intensidad lumínica

Anexo N°4

Materiales, equipo y reactivos para la determinación de boro en suelos agrícolas ^{(5) (7)}

Materiales

- Tubos de centrifugación plásticos de 50 mL
- Probeta de 50 mL
- Pipetas volumétricas de 2.0 mL
- Pipeta volumétrica de 10.0 mL
- Vasos de precipitados de 50 mL y 250 mL
- Gotero

Nota: de preferencia el material a utilizar para hacer el análisis de boro en suelos debe ser de plástico o de vidrio libre de borosilicato.

Equipo

- Espectrofotómetro Genesys 20 Thermo scientific
- Agitador mecánico

Reactivos

- Solución extractora de fosfato de calcio (500 ppm de P)
- Acido clorhídrico concentrado 37 % p/p
- Acido sulfúrico concentrado 95-97 % p/p
- Solución indicadora de rojo carmín

Anexo N°5

**Preparación de los reactivos para la determinación de boro en suelos
agrícolas ^{(5) (7)}**

Solución extractora de fosfato de calcio. 500 ppm de P

Disolver 20.3 g de fosfato de calcio en aproximadamente 2 litros de agua agregando 10 mL de HCl concentrado. Agregar 0.5 g de superfloc 127 disuelto previamente en agua y llevar a un volumen final de 10 litros.

Solución indicadora de rojo carmín

Disolver 920 mg de rojo carmín en 1000 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Estándares de boro

Pesar y colocar 2.860 g de ácido bórico en un balón aforado de 1 litro; disolver y llevar a volumen de 1 litro con la solución extractora de fosfato de calcio (500 ppm de fósforo), esta solución contiene 500 ppm de boro

Para preparar una solución de 50 ppm de boro, tomar 50.0 mL de la solución de 500 ppm de boro y diluir a 1 litro con la solución extractora de fosfato de calcio.

Medir los siguientes volúmenes de la solución estándar de 50 ppm y llevar a volumen 250.0 mL con la solución extractora de fosfato de calcio, para preparar los estándares de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de boro.

Cuadro N°7 Patrones de trabajo de boro a partir de la solución estándar de 50 ppm de boro

Cantidad a preparar	Alícuota a tomar de la solución de 50 ppm de boro	ppm de boro en la solución
250.0 mL	0.0 mL	0 ppm
250.0 mL	5.0 mL	1 ppm
250.0 mL	10.0 mL	2 ppm
250.0 mL	15.0 mL	3 ppm
250.0 mL	20.0 mL	4 ppm
250.0 mL	25.0 mL	5 ppm

Anexo N°6

Cuadro N°8 Grado de representatividad de la media aritmética, para distintos coeficientes de variación. ⁽¹⁾

Valor del coeficiente de variación (CV)	Grado en que la media representa a la serie
De 0 a menos de 10 %	Media altamente representativa
De 10 a menos de 20 %	Media bastante representativa
De 20 a menos de 30 %	Media tiene representatividad
De 30 a menos de 40 %	Media cuya representación es dudosa
De 40 % o más	Media carente de representatividad

Anexo N°7

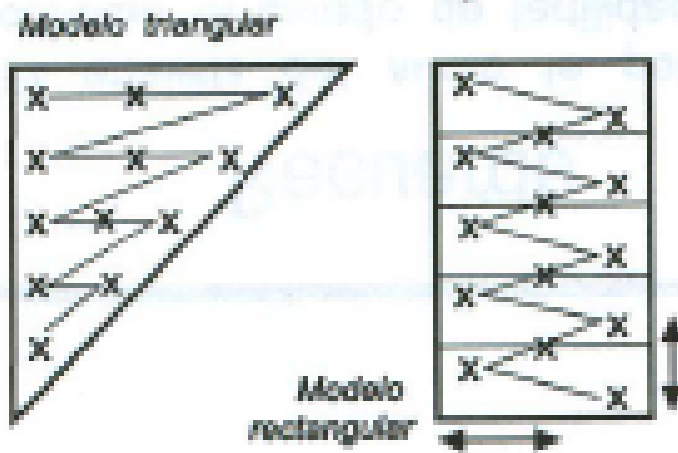


Figura N°1 Modelos triangular y rectangular para toma de muestra de suelo en un lote de terreno ⁽⁶⁾

Anexo N°8

Tabla N° 12 Tabla estadística de la distribución t de Student ⁽³⁾

GRADOS DE LIBERTAD	t 0.975	GRADOS DE LIBERTAD	t 0.975	GRADOS DE LIBERTAD	t 0.975
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992

Anexo N°9

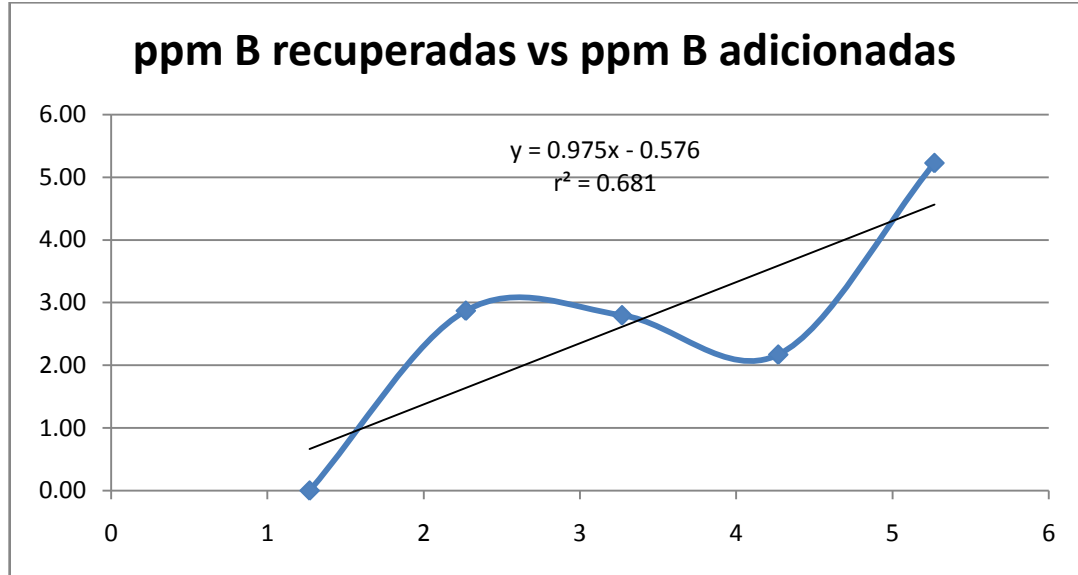


Figura N°2 Grafico de linealidad del método rojo carmín