

35
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

VALIDACION Y COMPARACION DEL METODO ANALITICO POTENCIOMETRICO PARA LA DETERMINACION DE ION FLUORURO EN ORINA UTILIZANDO DOS DIFERENTES SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.

T E S I S

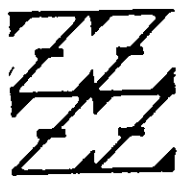
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA ISABEL CONCEPCION SANCHEZ BARRON

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO INDIAMO EN
DE INDIAR REFLEXION

ASESORES: M. en O. DOLORES DE LA CRUZ CARDOSO
M. en C. GLORIA VELAZQUEZ VAQUERO

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORICEN

277974



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

PRESIDENTE.

M en C. GLORIA VELÁZQUEZ VAQUERO.

VOCAL

M en O. DOLORES DE LA CRUZ CARDOSO.

SECRETARIO

Q. F. B. FELIPE A. PÉREZ VEGA.

SUPLENTE

Q. ANA PATRICIA SÁNCHEZ GARCÍAFIGUEROA

SUPLENTE

Q. F. B. IRMA ALEJANDRE RAZO.

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS:
POR EL DON DE LA VIDA.

A MIS ASESORES:
M en O. DOLORES DE LA CRUZ CARDOSO.
M en C. GLORIA VELÁZQUEZ VAQUERO.

POR SU APOYO, COMPRENSIÓN Y CONFIANZA QUE ME BRINDARON
DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

DEDICATORIAS:

**A MIS PADRES:
ISABEL Y JULIO.**

GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO APOYÁNDOME EN TODOS LOS MOMENTOS DE MI VIDA. JUNTOS HEMOS LOGRADO ESTA META GRACIAS.

**A MIS HIJAS:
ANA ISABEL Y LUISA VALERIA.**

PORQUE UNA SONRISA DE USTEDES SIEMPRE LEVANTO LOS ANIMOS PARA SEGUIR ADELANTE. POR USTEDES PEQUEÑAS.

A MI FAMILIA:

COMO MUESTRA DE CARIÑO POR SU RESPALDO EN LA REALIZACION DE UNA MAS DE MIS METAS.

ÍNDICE.

	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA	
1. Metabolismo de los fluoruros	3
2. Potenciometría	4
2.1 Teoría de la Operación	5
3. Validación de métodos analíticos	7
3.1 Linealidad	8
3.2 Exactitud	9
3.3 Precisión del Sistema	9
3.4 Límites de detección y cuantificación	10
3.5 Especificidad	11
3.6 Estabilidad de la muestra	11
3.7 Comparación de dos métodos analíticos	12
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
IV. OBJETIVOS	
1. Objetivo General	14
2. Objetivos Específicos	14
V. HIPÓTESIS	15
VI. MATERIAL Y MÉTODO	16
VII. DIAGRAMAS DE FLUJO	23
VIII. RESULTADOS	33
IX. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	42
X. CONCLUSIONES	46
XI. SUGERENCIAS	47
XII. ANEXOS	
1. ANEXO I	48
2. ANEXO II	57
XIII. BIBLIOGRAFÍA	61

I. INTRODUCCIÓN

La caries ha sido descrita en la literatura científica bajo distintos aspectos. Morfológicamente, la caries es una enfermedad que determina la destrucción de las estructuras del diente. Algunos autores la definen como una enfermedad de origen infeccioso, dependiente del azúcar. De acuerdo con criterios epidemiológicos, se dice que la caries es una de las enfermedades más prevalentes de entre las que padece el hombre moderno.

Dada la gran prevalencia de la caries a nivel mundial, su control ha sido y es un objetivo sanitario importante, que ha preocupado a los profesionales de la odontología y de la salud pública durante generaciones. Los estudios epidemiológicos realizados por Dean, Mackay, Black, McClure y Arnold fueron el antecedente para establecer las bases sólidas de la relación flúor-caries. Hasta el momento, el flúor ha sido el agente preventivo que ha demostrado ser el más potente y costo-efectivo, además de inocuo y fácil de utilizar.

Antes de proceder a implementar la administración del ion fluoruro como una medida de salud pública se requiere un programa de prevención de las lesiones de caries dentaria, determinar las concentraciones de fluoruro existentes en el agua de consumo humano y los alimentos, conocer el promedio de la ingesta o consumo de sal por persona por día y cuantificar las concentraciones de fluoruro en uno o más de los fluidos orgánicos. En la mayoría de los casos la orina es seleccionada como el fluido biológico para ser analizado, esto se debe a que su recolección es simple y no invasora, es decir, no demanda el entrar al organismo propiamente dicho, además las concentraciones de fluoruro en la orina son altas.

Los procedimientos actuales permiten la determinación precisa de niveles muy bajos de fluoruro; uno de los métodos es el potenciométrico, el cual está siendo utilizado en la Unidad Universitaria de Investigación en Cariología, FES-Zaragoza, UNAM.

Dada la situación económica actual por la que atraviesa el país, el sector salud se ha visto en la necesidad de optimizar sus trabajos de investigación para que el presupuesto permita con pocos recursos obtener los mejores resultados posibles.

Tal situación llevó a validar el método analítico potenciométrico para la determinación de ion fluoruro en orina, utilizando la solución amortiguadora preparada con CDTA (Ácido trans-1,2 Diaminociclohexano-N,N,N',N', Tetracético; conocido comercialmente con el nombre de FAD) y la solución amortiguadora preparada a partir de citratos, estableciéndose que de la comparación en los resultados se determine si existe una igualdad en cuanto a la efectividad de ambas soluciones amortiguadoras.

La comparación de ambas validaciones mostró resultados aceptables, en lo referente a la linealidad del método se evaluaron la pendiente y la ordenada al origen, las cuales reportaron los rangos de -1.8525×10^{-2} a 2.0525×10^{-2} y de -2.0456×10^{-2} a 4.5496×10^{-2} respectivamente, mientras que la exactitud presentó un intervalo de -1.1106 a 3.3722 , ambos

parámetros incluyen el valor de cero, en cambio la precisión reportó valores de 0.3018 a 5.9175 y por último la repetibilidad mostró un rango de 0.3314 a 5.3834, en ambos intervalos se incluyen el valor de uno, lo que llevó a establecer que los cuatro parámetros considerados cumplen con los criterios de aceptación. Concluyéndose que la efectividad es la misma, tanto para la solución amortiguadora preparada en el laboratorio con citrato de sodio como para la de marca comercial con CDTA, siendo éste el criterio contundente que llevó a la elección de la solución amortiguadora preparada a partir de citratos, dado las ventajas que representa en cuanto a su costo y disponibilidad inmediata.

II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

El flúor es un elemento muy común, se caracteriza por ser el más electronegativo de todos los elementos conocidos, lo que da lugar a su gran reactividad, por lo cual se encuentra siempre de manera combinada. En el ser humano, el esmalte maduro de los dientes permanentes contiene trazas de flúor, zinc, plomo, sodio, magnesio, estroncio y cobre además de estar constituido por materia inorgánica en un 95-96 %, materia orgánica en un 0.2-2%, y agua⁽¹⁾. Estudios epidemiológicos de autores como Dean, Mackay, Black, McClure, y Arnold⁽²⁾ fueron el antecedente para establecer las bases sólidas de la relación flúor-caries, que ha llevado a considerar la adición en cantidades óptimas de fluoruros (en agua, sal y pasta de dientes) como un medio económico, efectivo y seguro para llevar el beneficio cariostático del ion fluoruro a la población en general. Antes de proceder a implementar esta medida de salud pública se requieren cuatro elementos básicos de información^(1, 3):

1. Debe existir la necesidad de un programa de prevención de las lesiones de caries dentaria.
2. Se deben determinar las concentraciones de fluoruro existentes en el agua de consumo humano y los alimentos.
3. Es necesario cuantificar las concentraciones de fluoruro en uno o más de los fluidos orgánicos. En la mayoría de los casos la orina es seleccionada como el fluido biológico para ser analizado.
4. Se requiere conocer el promedio de la ingesta o consumo de sal por persona por día.

METABOLISMO DE LOS FLUORUROS

El metabolismo de los fluoruros se refiere a su absorción, distribución y excreción. El conocimiento detallado acerca de este asunto implica el grado de retención de fluoruro en todo el cuerpo, el cual está asociado con los efectos benéficos hasta ciertos niveles de ingesta. Los aspectos cuantitativos del metabolismo de los fluoruros pueden ser diferentes, tanto en distintas personas como en una misma en diversas épocas⁽⁴⁾.

La absorción de los fluoruros que se ingieren es usualmente rápida, toda vez que se trate de fluoruros solubles en agua y que los iones que pueden combinarse con los fluoruros estén en muy bajas concentraciones (calcio, magnesio, hierro, aluminio)⁽⁵⁾.

La mucosa gastrointestinal es la ruta principal de absorción, mediante la cual los fluoruros ganan acceso a los fluidos y tejidos del cuerpo humano⁽⁴⁾. Sin embargo también se absorbe en el estómago siendo la tasa de absorción mayor cuando la acidez de su contenido, alcanza el punto máximo. Se acepta que si se reúnen estas condiciones, la absorción es aproximadamente de 30 minutos (el tiempo que toma en absorberse el 50% del remanente de fluoruro no utilizado)⁽⁶⁾.

Después de la absorción los fluoruros pasan a la sangre para su distribución en todo el cuerpo y su excreción parcial. Las concentraciones de fluoruro en el plasma y otros

fluidos orgánicos no son regulados homeostáticamente a niveles fijos, sino que por el contrario, ellos reflejan el nivel de ingesta de fluoruros por el individuo⁽⁷⁾. Los niveles de fluoruro en el plasma, orina y tejidos, también son influenciados por los aspectos cuantitativos del metabolismo de los fluoruros en cada individuo^(8, 9).

La orina es el fluido orgánico más comúnmente analizado para estimar la ingesta de fluoruro. Esto se debe a que su recolección es simple y no demanda el entrar al organismo propiamente dicho. En resumen, las concentraciones de fluoruro en la orina son más altas que aquellas que se tienen en otros fluidos del organismo, un hecho que en general permite mayores análisis con gran seguridad y precisión.

También es importante tomar en cuenta que las concentraciones de fluoruro de la orina que entra en la vejiga, concuerda minuto a minuto con los niveles de fluoruro en el plasma. Las concentraciones de fluoruro en las muestras de orina son proporcionales al promedio de concentración en el plasma durante el tiempo en que la orina se está formando, por lo tanto, los niveles urinarios de fluoruro son buenos indicadores de la ingesta reciente de fluoruro⁽¹⁰⁾.

Cuando se selecciona la orina como el fluido biológico, que es analizado con el propósito de controlar la ingesta de fluoruro, los resultados pueden ser expresados en términos de concentración o de tasa de excreción^(11, 12). Los procedimientos actuales permiten la determinación precisa de niveles muy bajos de fluoruro; uno de los métodos es el potenciométrico, el cual está siendo utilizado en la Unidad Universitaria de Investigación en Cariología, FES Zaragoza, UNAM ya que este método además presenta las ventajas de ser sencillo, económico, la preparación de las muestras no es complicada, los tiempos de respuesta son rápidos y la sensibilidad del electrodo (10^{-6} M) es buena.

POTENCIOMETRÍA

La medición de fuerzas electromotrices de celdas para obtener información química se denomina potenciometría⁽¹³⁾. Se ha demostrado que el potencial de un electrodo está determinado por la concentración (o más exactamente por la actividad) de una o más especies en una solución. Dicho fenómeno se aplica al análisis cuantitativo de iones o moléculas⁽¹⁴⁾.

Una solución contiene una especie electroactiva cuya actividad (concentración) se desea determinar. Una especie electroactiva es aquella que puede aceptar o ceder electrones proporcionados por un electrodo. La solución de la especie problema puede transformarse en una semicelda si se sumerge en ella un electrodo con el fin de transferir electrones desde o hacia la especie de interés. Puesto que el electrodo responde directamente al analito, se denomina electrodo indicador. Esta semicelda se conecta a otra mediante un puente salino. La segunda semicelda debe tener una composición invariable y conocida, de manera que mantenga un potencial constante, denominándose electrodo de referencia. El potencial de

celda es la diferencia entre un potencial constante del electrodo de referencia y un potencial variable que refleja cambios en la actividad del analito₍₁₃₎.

El instrumental necesario para las medidas potenciométricas comprende un electrodo de referencia, un electrodo indicador y un dispositivo de medida del potencial₍₁₄₎. Los principales electrodos de referencia utilizados son el plata-cloruro de plata y el de calomel_(13, 15, 16). Los electrodos indicadores son de dos tipos fundamentales: metálicos y de membrana. Estos últimos se denominan también electrodos específicos o selectivos para iones₍₁₄₎. Como electrodo indicador se pueden utilizar los electrodos de hidrógeno, quinhidrona, antimonio, iridio recubierto de IrO₂, ZrO₂ y vidrio₍₁₅₎.

La medición de los iones fluoruro es muy importante en muchas áreas relacionadas con la salud. Los fluoruros se miden con un electrodo específico para iones de cristal simple de estado sólido₍₁₇₎.

TEORÍA DE OPERACIÓN

El electrodo de fluoruros consiste en una membrana cristalina sencilla de fluoruro de lantano y un electrodo de referencia interna unidos en un cuerpo epóxico. El cristal es un conductor iónico en el cual solamente los iones fluoruro son móviles. Cuando la membrana entra en contacto con una solución de fluoruro se desarrolla un potencial de electrodo a través de la membrana. Este potencial depende del nivel de iones fluoruro libres en solución y es medido contra un potencial de referencia externo constante con un medidor de ion específico. La medida del potencial correspondiente al nivel de iones fluoruro en solución esta representado por la ecuación de Nerst.

$$E = E_0 - S \log A.$$

Donde:

E = Medida del potencial de electrodo.

E₀ = Potencial de referencia (constante).

A = La concentración de fluoruros en solución.

S = Pendiente del electrodo.

La concentración de fluoruro A es la actividad o la concentración efectiva de los iones fluoruro libres en solución. La concentración de fluoruro total C_t puede incluir algunos iones enlazados o complejados así como iones libres. El electrodo responde solamente con los iones libres, cuya concentración es:

$$C_f = C_t - C_b.$$

Donde:

Cb = Concentración del ion fluoruro en todas sus formas complejadas o enlazadas.

Ct = Concentración de fluoruro total.

Cf = Concentración de fluoruro libre.

La actividad del fluoruro esta relacionada a la concentración de fluoruro libre_(18, 19, 20).

En el análisis con el electrodo de ion específico (fluoruros), existen algunos factores que interfieren con el mismo, tales como:

A) La fuerza iónica de la solución.

B) El pH de la solución.

C) La presencia de cationes que puedan ligarse con el fluoruro.

A) La fuerza iónica de la solución. El electrodo de fluoruro no mide realmente la concentración de fluoruro en la solución sino en lugar de ello, mide la actividad del ion. La actividad del fluoruro es percibida por el electrodo y disminuye a medida que aumenta la fuerza iónica de la solución. Por lo tanto es necesario que la fuerza iónica de todas las muestras y patrones sea ajustada al mismo valor.

B) El pH de la solución. Puede causar errores analíticos si es demasiado alto o bajo. La carga eléctrica y el radio del ion hidratado de hidroxilo son tales que el electrodo no puede distinguir entre él y el ion de fluoruro, es decir que los iones hidroxilos son percibidos como si fueran iones fluoruros. Esto requiere que el pH sea ajustado a un valor ácido que para propósitos prácticos elimina la interferencia de los iones hidroxilos. El pH sin embargo no puede ser muy ácido porque se forma el ácido fluorhídrico (HF) que es un ácido muy débil.

Esta molécula de HF no es determinada por el electrodo de fluoruro. Para el análisis correcto de fluoruro con el electrodo se recomienda un pH de la solución de 5.0 ± 0.5 . En este rango sólo cerca de uno por ciento de fluoruro en la solución es HF y la concentración de hidroxilos es menor.

C) Cationes que interfieren. A pH básico ciertos cationes bivalentes o trivalentes (Aluminio, Calcio, Magnesio, Silicio, Fierro) forman fuertes enlaces iónicos con el fluoruro no pudiendo ser determinado el ion fluoruro. Las formas iónicas de Calcio, Magnesio, Fierro o Aluminio pueden producir este efecto si se encuentran en altas concentraciones. Por lo tanto es necesario preparar las soluciones que van a ser analizadas para fluoruro agregándoles un agente quelante apropiado (CDTA= ácido trans-1,2 Diaminociclohexano-N,N,N',N', Tetracético o citrato de sodio) que permita remover o atrapar los cationes que interfieren_(18, 20).

Se ha observado que la presencia de ácidos débiles y sus sales, o de bases débiles y sus sales, en una solución, permiten la adición de ácidos o de bases sin que se produzca un cambio notable en la concentración de los iones hidrógeno. Esta propiedad recibe el nombre de acción reguladora, y a la solución que la manifiesta se le denomina solución reguladora o amortiguadora₍₂₁₎.

El ion fluoruro forma complejos con muchos cationes polivalentes, principalmente con el fierro y el aluminio. La formación de los complejos depende del pH de la solución, de los niveles relativos de ion fluoruro y de las especies catiónicas. No obstante, el CDTA

(ácido ciclohexilendiaminotetracético) es un componente importante de la solución amortiguadora que elimina la interferencia de los cationes y proporciona una fuerza iónica constante permitiendo la lectura de los iones fluoruro libres. La concentración de aluminio, que más comúnmente causa interferencia es de 3.0 mg/L. pudiendo ser fácilmente acomplejado por el ion fluoruro. En solución ácida, las formas de F⁻ son ionizadas a complejos HF-HF pero la disolución amortiguadora mantiene un pH cercano a 5, lo que minimiza la formación del complejo fluoruro de hidrógeno (ácido fluorhídrico). En solución alcalina, el ion hidróxido puede interferir con la respuesta del electrodo al ion fluoruro, sin embargo no se presenta interferencia si se mantiene el pH por medio de la solución amortiguadora^(20, 22).

De igual manera, que el CDTA actúa como solución amortiguadora y acomplejante de iones (aluminio y hierro), el citrato de sodio presenta estas mismas propiedades, pero con la diferencia de que éste último resulta más económico⁽¹⁷⁾.

La situación económica actual que se presenta en México es de índole grave, en cuanto a que ésta afecta a todos los niveles económicos de la sociedad. En lo que respecta al sector salud, éste se ha visto en la necesidad de reducir sus gastos destinados a programas como el de Seguimiento del Beneficio Cariostático a Nivel de la Población en General - este programa se está realizando y se desea continuar considerando otros niveles como la clasificación por grupos de la población -. De manera, que un trabajo de investigación debe optimizarse, para que el presupuesto permita con estos recursos obtener los mejores resultados posibles.

Tal situación ha llevado a validar el método analítico potenciométrico para la determinación de ion fluoruro en orina, utilizando la solución amortiguadora preparada con CDTA (Ácido trans 1,2 Diaminociclohexano-N,N,N', Tetracético; conocido comercialmente con el nombre de FAD) y la solución amortiguadora preparada a partir de citratos, para que de estas dos validaciones se establezca una comparación en los resultados de ambas soluciones amortiguadoras.

VALIDACIÓN

La validación de métodos analíticos es parte fundamental para evaluar sistemáticamente si el estudio cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas⁽²³⁾. Considerándose como una actividad debidamente documentada mediante protocolos, en los que se informa el procedimiento de obtención de la información, así como de reportes, en los que se describe el análisis de ésta y se concluya respecto del estudio en cuestión.

Estos estudios permiten establecer la confiabilidad, enfocados a la evaluación de ciertos parámetros analíticos reconocidos tanto a nivel nacional como internacional⁽²⁴⁾. Los métodos analíticos deberán cumplir con los siguientes parámetros analíticos⁽²³⁾:

- Linealidad (del sistema y del método).
- Exactitud.
- Precisión.
- Repetibilidad.
- Reproducibilidad.
- Especificidad.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Estabilidad de la muestra.

El propósito del método analítico debe ser establecido con claridad, ya que en función del propósito se establecen los estudios ha desarrollar para cada parámetro⁽²⁴⁾.

LINEALIDAD

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado⁽²³⁾.

1) LINEALIDAD DEL SISTEMA

La determinación del analito en una muestra, involucra el empleo de un sistema de medición. El sistema generalmente se basa en determinar la respuesta analítica ya sea física, química o biológica del analito. Este parámetro es caracterizado al estudiar la relación concentración vs. respuesta analítica en un intervalo apropiado de concentración.

En el diseño del estudio del parámetro se sugiere tomar en cuenta los siguientes lineamientos⁽²⁵⁾:

- Con base a los datos de concentración del ion fluoruro reportados, seleccionar 5 valores de concentración incluyendo el 100%, para determinar la linealidad del sistema.
- Preparar una solución patrón en el disolvente de elección, a partir de la cual se obtendrán por diluciones las concentraciones seleccionadas para generar la curva estándar, hacer la cuantificación diariamente y por duplicado a cada nivel de concentraciones, durante el desarrollo y validación del método analítico.

Considerando los lineamientos anteriores, el análisis del modelo estadístico para la linealidad debe sugerir que se cumplan los siguientes requisitos^(23, 25, 26):

- a) La variación de Y , es explicada por X , en el intervalo de concentraciones.

b) La relación entre X y Y en el intervalo de concentraciones, se describirá mediante un modelo lineal.

Para determinar la linealidad del sistema se efectúa el análisis estadístico, obteniendo:

- Parámetro de regresión lineal: Coeficiente de determinación.
- Coeficiente de variación

2) LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para el diseño del estudio del parámetro se realiza lo siguiente:

- Seleccionar 5 concentraciones, de preferencia iguales a los niveles ya estudiados para la linealidad del sistema. Realizar la cuantificación por duplicado por lo menos durante 3 días.
- Determinar la linealidad del método tratando cada muestra de acuerdo al procedimiento analítico propuesto. Interpolare los resultados en la curva estándar. Obtener las curvas promedio por día, tanto de la curva estándar como de los problemas.

Determinar la linealidad del método mediante un análisis estadístico que comprenda los siguientes puntos^(26, 27):

- Parámetros de regresión lineal: Ordenada al origen, pendiente, y coeficiente de determinación.
- Media aritmética.
- Por ciento recuperado (resultados absolutos).
- Coeficiente de variación.

EXACTITUD

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se determina considerando los resultados absolutos de cada uno de los puntos en las curvas de linealidad correspondientes al 100%^(23, 26, 28).

PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del sistema es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

La precisión del sistema se determina considerando los resultados absolutos de cada uno de los puntos correspondientes al 100% establecido en las curvas de linealidad del sistema₍₂₃₎.

A) REPETIBILIDAD

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de análisis, (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.), provenientes del muestreo de un material, en el cual el analito está distribuido de manera homogénea₍₂₉₎.

Se determina la repetibilidad del método en orina considerando los resultados absolutos de cada uno de los puntos en las curvas de linealidad correspondientes al 100% y determinando estadísticamente el porcentaje de recobro y el coeficiente de variación₍₂₃₎.

B) REPRODUCIBILIDAD

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

Se deberá determinar por dos analistas durante dos días a una concentración homogénea y por triplicado. Los analistas deberán preparar individualmente las curvas estándar, las cuales estarán formadas cuando menos por 5 concentraciones que serán iguales a los niveles ya considerados anteriormente.

Se determina la reproducibilidad del método mediante un análisis estadístico que comprende_(23, 26, 29):

- Tabla de análisis de varianza (ANDEVA)
- Coeficiente de variación.

LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas₍₂₃₎.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas. Siendo ésta, la cantidad mínima que cumpla con los siguientes criterios^(23, 26):

- La mínima cantidad que presente un coeficiente de variación menor o igual al 15%, siempre y cuando la determinación se lleve a cabo cuando menos por duplicado y por lo menos durante 3 días.
- La mínima cantidad que por su promedio de por ciento recuperado esté comprendida entre el valor real más menos dos veces la desviación estándar.

ESPECIFICIDAD

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra⁽²³⁾.

El primer paso es demostrar que los metabolitos naturales del fluido biológico de interés no interfieren con el análisis por lo que es necesario aplicar el método a una matriz de plasma, sangre, suero u orina y comprobar que no existen interferencias.

Si no es posible concluir que el método es específico, será necesario analizar la muestra utilizando otro sistema, otro método de detección u otra técnica analítica.

Sería conveniente probar el método de análisis, adicionando a las muestras conteniendo el compuesto de interés, fármacos utilizados comúnmente, como analgésicos, antibióticos, etc.⁽²⁶⁾.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación⁽²³⁾.

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.

La comparación de dos métodos analíticos validados se lleva a cabo para establecer la igualdad entre los métodos y poder en determinado momento sustituir uno por el otro dado las ventajas que presenten. Los parámetros mínimos a comparar son:

- 1) Repetibilidad. Se determina el intervalo de confianza para la razón de varianzas calculada a partir del porcentaje recuperado de exactitud al 100 %, del porcentaje recuperado de linealidad del método y de la varianza del método del estudio de precisión. Para considerarse que ambos métodos tienen la misma repetibilidad debe localizarse el valor de uno en el intervalo de confianza
- 2) Exactitud. Se considera que ambos métodos tienen la misma exactitud cuando se incluye el valor de cero en el intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado.
- 3) Precisión. El criterio de aceptación considerado es localizar el valor de uno en el intervalo de confianza para la razón de varianzas, calculadas a partir del porcentaje recuperado al 100 %.
- 4) Linealidad del método. En el intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen y de la pendiente de cantidad adicionada-cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la situación económica actual por la que atraviesa el país, la Secretaría de Salud se ha visto en la necesidad de implementar planes que reduzcan sus gastos en programas ya establecidos.

La utilización del método potenciométrico con electrodo de ion selectivo para la determinación del ion fluoruro en orina, importante para el seguimiento del beneficio cariostático que éste reporta, involucra el empleo de una solución amortiguadora en cuya formulación se utiliza CDTA (ácido trans-1,2 Diaminociclohexano-N,N',N', Tetracético) cuyo costo la hace inaccesible; el empleo de una solución amortiguadora realizada a nivel laboratorio permitirá continuar con el desarrollo del programa.

La validación representa el medio adecuado a través del cual el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación de manera individual del método potenciométrico con electrodo de ion selectivo para la determinación del ion fluoruro en orina, con cada una de las soluciones amortiguadoras (la que utiliza CDTA y la preparada a partir de citratos) facilitará la comparación de los resultados obtenidos, para establecer criterios contundentes que lleven a la elección de cualquiera de las dos diferentes soluciones amortiguadoras, de acuerdo a las posibilidades de la institución interesada, así mismo, permitirá el reconocimiento de su efectividad para la determinación rutinaria del ion fluoruro a nivel farmacopeico y/o sector salud.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Realizar la validación del método analítico potenciométrico con electrodo de ion selectivo para la determinación del ion fluoruro en orina utilizando dos diferentes soluciones amortiguadoras.

ESPECÍFICOS

1. Realizar la validación del método analítico potenciométrico con electrodo de ion selectivo para la determinación de ion fluoruro en orina utilizando solución amortiguadora preparada con CDTA.
2. Realizar la validación del método analítico potenciométrico con electrodo de ion selectivo para la determinación de ion fluoruro en orina utilizando solución amortiguadora preparada a partir de citratos.
3. Realizar la comparación de los dos métodos analíticos potenciométricos con electrodo de ion selectivo, ya antes validados de manera individual, con cada una de las diferentes soluciones amortiguadoras.

V. HIPÓTESIS

La solución amortiguadora preparada en el laboratorio con citrato de sodio, será igual en cuanto a efectividad en la determinación de ion fluoruro que la solución amortiguadora de marca comercial con CDTA.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

EQUIPO

- Potenciómetro con electrodo de ion selectivo de fluoruros Corning Ion Analyzer 255.
- pH-metro Corning, pH meter 120.
- Placa de agitación magnética Thermolyne Cimarec 2.
- Dosificador Schott Duran.
- Balanza analítica OHAUS Analytical Standard.

MATERIAL

MATERIAL DIVERSO

- Micropipeta de 50-200 μ L Finnpiptette Helsinki.
- Puntas para micropipeta Finnpiptette Helsinki.
- Agitadores magnéticos.
- Envases URIN-TEK Bayer.
- Viales con capacidad de 20 mL con tapa hermética.
- Piceta de 500 mL.
- Perilla de seguridad.
- Soporte universal.

MATERIAL DE VIDRIO

- 1 vaso de precipitados de 1000 mL Pyrex.
- 1 matraz volumétrico de 1000 mL Pyrex.
- 10 matraces volumétricos de 100 mL Pyrex.
- 11 matraces volumétricos de 10 mL Pyrex.
- 1 bureta de 25 mL Pyrex.
- 11 pipetas volumétricas de 5 mL Pyrex.

REACTIVOS

- Solución Patrón de Fluoruro de Sodio 100 ppm. 500 mL. Corning.
- Agua desionizada.
- Soluciones amortiguadoras pH 4,7 y 10, para calibración de potenciómetro, grado reactivo Baker Analyzed.
- Solución amortiguadora preparada con CDTA Corning (FAD) 3.785 L.
- Cloruro de sodio 500 g, grado reactivo Baker Analyzed.
- Citrato de sodio dihidratado 500 g, grado reactivo Baker Analyzed.
- Hidróxido de sodio 500 g, grado reactivo Baker Analyzed.
- Ácido acético glacial 3.5 L, grado reactivo Baker Analyzed.
- Orina sintética CHEK-STIX de Bayer.

MÉTODO

La metodología comprendió en primer término, la preparación del material a utilizar (lavado y calibración), asimismo la elaboración de la solución amortiguadora a partir de citratos_(3, 30), en un volumen de 3.785 L. la cual se utilizó durante el desarrollo de toda la parte experimental.

La presente investigación se llevó a cabo con orina sintética, ésta se utilizó en la determinación de los parámetros de especificidad, linealidad del método, repetibilidad, exactitud, reproducibilidad y estabilidad de la muestra analítica con cada una de las diferentes soluciones amortiguadoras (CDTA y citratos). Siendo la técnica para la preparación de la orina sintética la siguiente:

PREPARACIÓN DE ORINA SINTÉTICA (CHEK-STIX)

1. Se ponen 12 mL. de agua desionizada en un tubo URIN-TEK.
2. Se toma una tira reactiva CHEK-STIX del frasco, teniendo precaución en tapar el frasco de inmediato ajustando la tapa herméticamente.
3. Se coloca la tira en el tubo con agua y se tapa herméticamente.
4. Se agita suavemente el tubo por inversión por 2 minutos.
5. Se deja reposar el tubo verticalmente por 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Se invierte una vez más el tubo.
7. Se remueve y deshecha la tira reactiva CHEK-STIX.

Para llevar a cabo la validación del método analítico potenciométrico para la determinación del ion fluoruro en orina, se requirió siempre de la calibración del potenciómetro, previo a la determinación de las lecturas de cada uno de los parámetros. Las calibraciones se realizaron con una curva estándar de concentraciones similares a las de linealidad del sistema.

La validación comprendió los parámetros de especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad del sistema, linealidad del método, precisión, repetibilidad, exactitud, reproducibilidad y estabilidad de la muestra analítica. Los anteriores parámetros se determinaron para cada una de las dos diferentes soluciones amortiguadoras (la preparada con CDTA y la realizada a partir de citratos) de acuerdo a la metodología que se describe a continuación (ver diagramas de flujo).

ESPECIFICIDAD

Determinar que los elementos normales de la orina no interfieren con el análisis. Aplicar el método a una matriz de orina sintética, (ver preparación de orina sintética CHEK-STIX), la cual se lee potenciométricamente por medio de un electrodo de ion selectivo para fluoruro; comprobándose que no existen interferencias, al no presentarse lectura alguna. Realizar la determinación por duplicado durante un periodo de tres días.

CRITERIO: Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Preparar seis soluciones de manera independiente cuya concentración sea de 0.05 y 0.1 ppm, a partir de una solución patrón de 100 ppm de fluoruro de sodio.

Tomar de la solución patrón de 100 ppm, seis alícuotas de 0.1 mL y seis de 0.2 mL, depositarlas en matraces volumétricos de 100 mL. Aforar con agua desionizada y mezclar por inversión dos veces. Estas soluciones presentan una concentración de 0.1 y 0.2 ppm respectivamente.

Tomar de estas soluciones alícuotas de 5 mL colocarlas en matraces volumétricos de 10 mL. Adicionar solución amortiguadora (de la que utiliza CDTA o de la preparada a partir de citratos) hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces. De esta forma se obtienen las concentraciones de 0.05 y 0.1 ppm.

Vertir las soluciones finales en viales de plástico de 20 mL. Agitar las muestras por medio de una placa de agitación durante un minuto y leer potenciométricamente por medio de un electrodo de ion selectivo para fluoruro.

Realizar el análisis por duplicado y por el mismo analista durante un período de tres días.

Determinar el porcentaje de recobro y el coeficiente de variación.

CRITERIO: La mínima cantidad que presente un coeficiente de variación menor o igual al 15%; $CV \leq 15\%$.

La mínima cantidad que por su promedio de porcentaje de recobro, esté comprendida entre el valor real \pm dos veces la desviación estándar. Promedio de recobro: 95-105%.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Preparar soluciones cuya concentración sea de 0.1, 0.5, 1, 2, y 3 ppm a partir de una solución patrón de 100 ppm de fluoruro de sodio.

De la solución patrón de 100 ppm tomar alícuotas de 0.2, 1, 2, 4 y 6 mL y colocarlas en matraces volumétricos de 100 mL. Adicionar agua desionizada hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces. Estas soluciones presentan las concentraciones de 0.2, 1, 2, 4 y 6 ppm respectivamente.

Tomar de estas soluciones alícuotas de 5 mL colocarlas en matraces volumétricos de 10 mL. Adicionar solución amortiguadora (de la que utiliza CDTA o de la preparada a partir de citratos) hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces. De esta manera se obtienen las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 ppm.

Verter las soluciones finales en frascos viales de plástico de 20 mL. Agitar las muestras por medio de una placa de agitación durante un minuto y leer potenciométricamente por medio de un electrodo de ion selectivo para fluoruro.

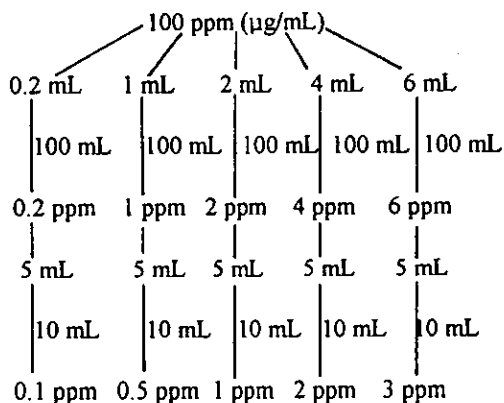
Preparar blanco, colocando 5 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 10 mL aforar con solución amortiguadora (de la que utiliza CDTA o de la preparada a partir

de citratos) mezclar por inversión dos veces y vertir el contenido en un frasco vial de 20 mL. Agitar el blanco por medio de una placa de agitación durante un minuto y leer potenciométricamente.

Determinar la linealidad del sistema obteniendo la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación.

Llevar a cabo las determinaciones por duplicado durante un periodo de tres días.

CURVA ESTÁNDAR



CRITERIO: $CV \leq 1.5\%$ y $r \geq 0.98$.

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Preparar soluciones cuya concentración sea de 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 ppm a partir de una solución patrón de 100 ppm de fluoruro de sodio.

De la solución patrón de 100 ppm tomar alicuotas de 0.2, 1, 2, 4 y 6 mL colocarlas en matraces volumétricos de 100 mL. Adicionar agua desionizada hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces. Estas soluciones presentan las concentraciones de 0.2, 1, 2, 4 y 6 ppm respectivamente.

Tomar de estas soluciones alicuotas de 12 mL, depositar cada una de ellas en un tubo URIN-TEK y reconstituir una tira de orina sintética por cada concentración (ver preparación de orina sintética CHEK-STIX). Del anterior reconstituido tomar alicuotas de 5 mL, colocarlas en matraces volumétricos de 10 mL. Adicionar solución amortiguadora (de la que utiliza CDTA o de la preparada a partir de citratos) hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces. De esta manera se obtienen las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 ppm.

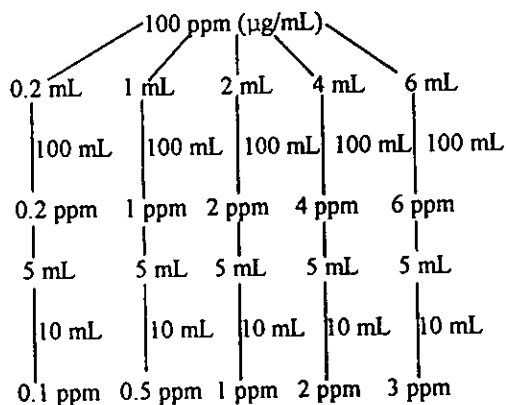
Vertir las soluciones finales en frascos viales de plástico de 20 mL. Agitar las muestras por medio de una placa de agitación durante un minuto y leer potenciométricamente por medio de un electrodo de ion selectivo para fluoruro.

Preparar blanco, colocar 5 mL de orina sintética (previamente reconstituida; ver preparación de orina sintética CHEK-STIX) en un matraz volumétrico de 10 mL aforar con solución amortiguadora (de la que utiliza CDTA o de la preparada a partir de citratos) mezclar por inversión dos veces y vertir el contenido en un frasco vial de 20 mL. Agitar el blanco de orina sintética por medio de una placa de agitación durante un minuto y leer potenciométricamente.

Determinar la linealidad del método obteniendo la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación.

Llevar a cabo las determinaciones por duplicado durante un periodo de tres días.

CURVA ESTÁNDAR



CRITERIO: Cantidad adicionada vs. cantidad recuperada: $m = 1$, $b = 0$, $r^2 \geq 0.98$.
Promedio de recobro: 95-105%. CV \leq 5%.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Determinar la precisión tomando de la curva de linealidad del sistema, la solución cuya concentración teórica sea de 1 ppm (correspondiente al 100%).

Realizar el análisis sextuplicado de esa misma solución, dos veces por un periodo de tres días y determinar el coeficiente de variación.

CRITERIO: CV \leq 3%.

1) REPETIBILIDAD Y EXACTITUD

Preparar seis soluciones de manera independiente, cuya concentración sea de 1 ppm, a partir de una solución patrón de 100 ppm de fluoruro de sodio.

De la solución patrón de 100 ppm tomar seis alícuotas de 2 mL, colocarlas en matraces volumétricos de 100 mL. Adicionar agua desionizada hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces. De esta manera se obtienen seis soluciones con una concentración de 2 ppm.

Tomar de estas soluciones alícuotas de 12 mL, depositar cada una de ellas en un tubo URIN-TEK y reconstituir una tira de orina sintética por cada solución (ver preparación de orina sintética CHEK-STIX). Del anterior reconstituido tomar alícuotas de 5 mL, colocarlas en matraces volumétricos de 10 mL. Adicionar solución amortiguadora (de la que utiliza CDTA o de la preparada a partir de citratos) hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces. De esta manera se obtienen seis soluciones con una concentración de 1 ppm.

Vertir las soluciones finales en frascos viales de plástico de 20 mL. Agitar las muestras por medio de una placa de agitación durante un minuto y leer potenciométricamente por medio de un electrodo de ion selectivo para fluoruro.

Realizar el análisis por duplicado y por el mismo analista durante un período de tres días. Determinar el porcentaje de recobro y el coeficiente de variación.

CRITERIO: Promedio de recobro: 95-105%; CV \leq 5%.

2) REPRODUCIBILIDAD

Determinarla por dos analistas durante dos días a una concentración homogénea de la matriz cercana al 100% de la concentración teórica, para lo cual a partir de una solución patrón de 100 ppm de fluoruro de sodio se toma una alícuota de 2 mL y se coloca en un matraz aforado de 100 mL se adiciona agua desionizada hasta el aforo y se mezcla por inversión dos veces.

De la anterior solución tomar una alícuota de 12 mL y colocarla en un tubo URIN-TEK y reconstituir la orina sintética (ver preparación de orina sintética CHEK-STIX). Del anterior reconstituido tomar una alícuota de 5 mL, colocarla en un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar solución amortiguadora (de la que utiliza CDTA o de la preparada a partir de citratos) hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces.

Esta última solución, verterla en un frasco vial de plástico de 20 mL. Se agita la muestra por medio de una placa de agitación durante un minuto y leer potenciométricamente por medio de un electrodo de ion selectivo para fluoruro.

La muestra es realizada y analizada por triplicado por un mismo analista, durante dos días. Determinar el coeficiente de variación.

CRITERIO: CV \leq 5%.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

Preparar nueve soluciones cuya concentración sea de 1 ppm, a partir de una solución patrón de 100 ppm de fluoruro de sodio.

Tomar de la solución patrón de 100 ppm, nueve alícuotas de 2 mL, depositarlas en matraces volumétricos de 100 mL. Aforar con agua desionizada y mezclar por inversión dos veces.

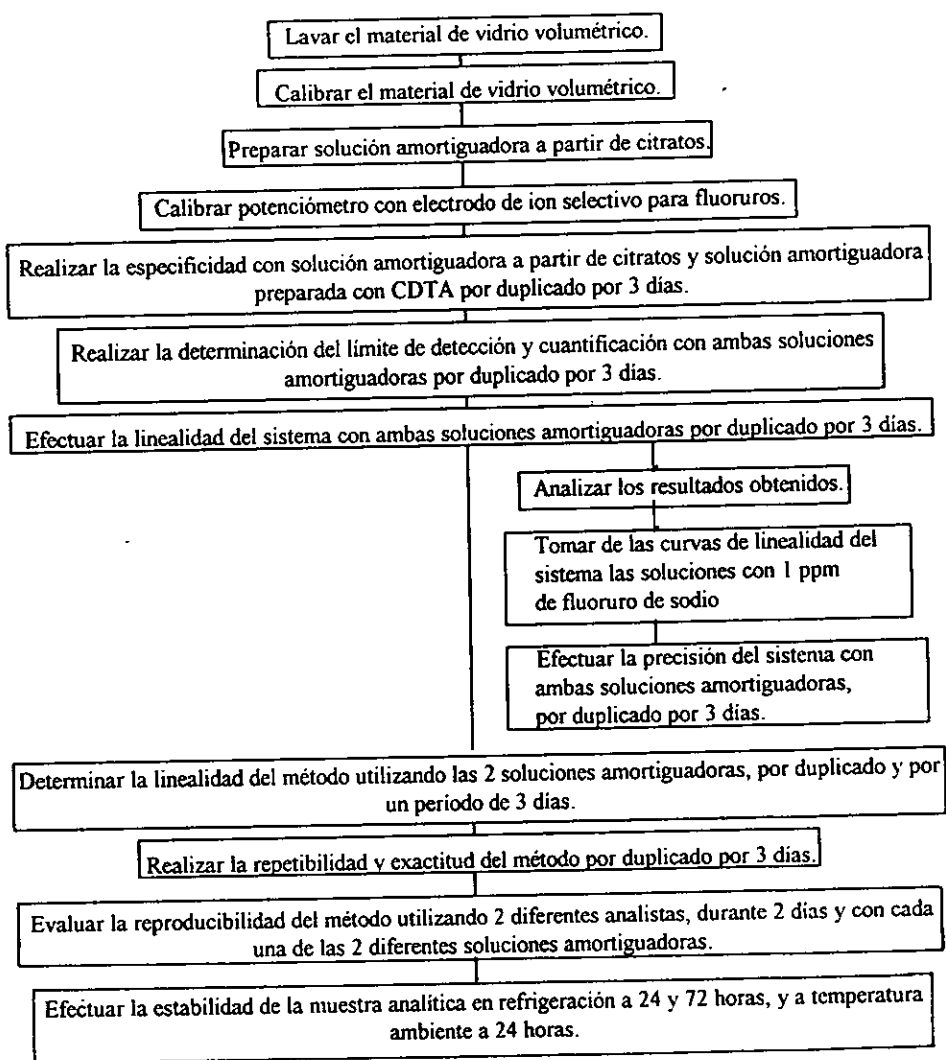
Tomar de estas soluciones alicuotas de 12 mL, depositar cada una de ellas en un tubo URIN-TEK y reconstituir una tira de orina sintética por cada concentración (ver preparación de orina sintética CHEK-STIX). Del anterior reconstituido tomar alicuotas de 5 mL, colocarlas en matraces volumétricos de 10 mL. Adicionar solución amortiguadora (de la que utiliza CDTA o de la preparada a partir de citratos) hasta el aforo y mezclar por inversión dos veces. Se obtienen soluciones con una concentración de 1 ppm.

Vertir las soluciones en frascos viales de plástico de 20 mL. Almacenar tres soluciones en refrigeración durante 24 horas, tres soluciones en refrigeración durante 72 horas y tres soluciones a temperatura ambiente durante 24 horas.

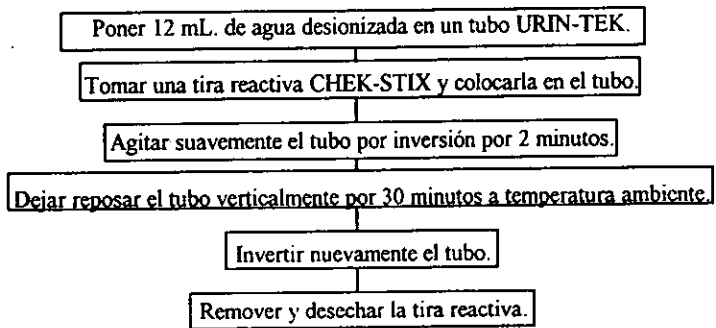
Determinar la estabilidad de la muestra de análisis de ion fluoruro en orina por un método potenciométrico de ion selectivo para fluoruro, reanalizando las muestras almacenadas en refrigeración/24 horas, refrigeración/72 horas y temperatura ambiente/24 horas utilizando una solución de referencia recientemente preparada a cada tiempo de reanálisis; efectuar las determinaciones por un mismo analista.

CRITERIO: La muestra es estable si el I.C. (Intervalo de confianza) para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda el porcentaje de $\pm 5\%$.

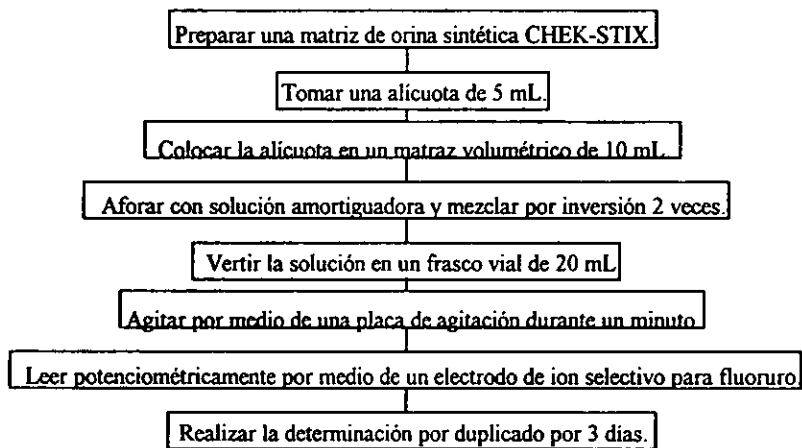
VII. DIAGRAMAS DE FLUJO EXPERIMENTAL



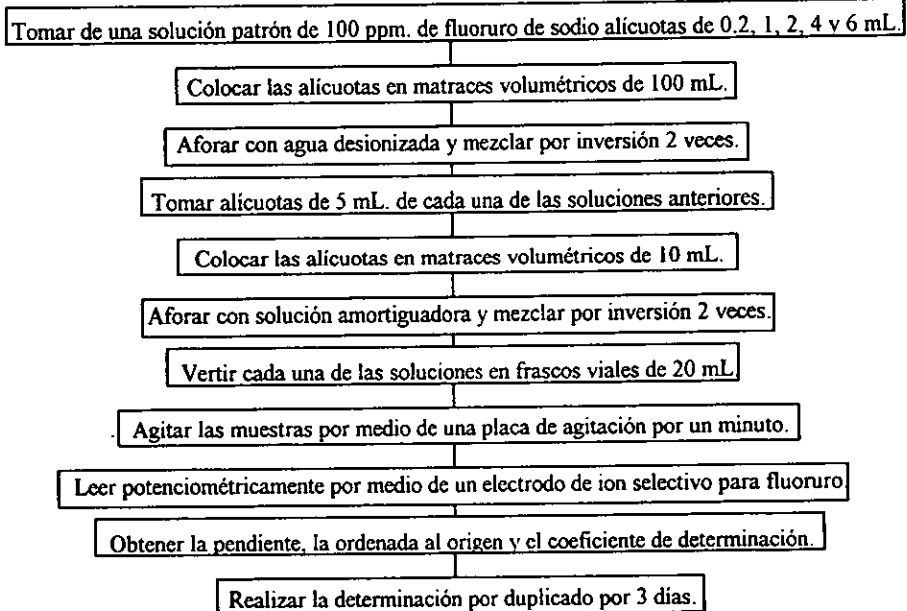
PREPARACIÓN DE ORINA SINTÉTICA



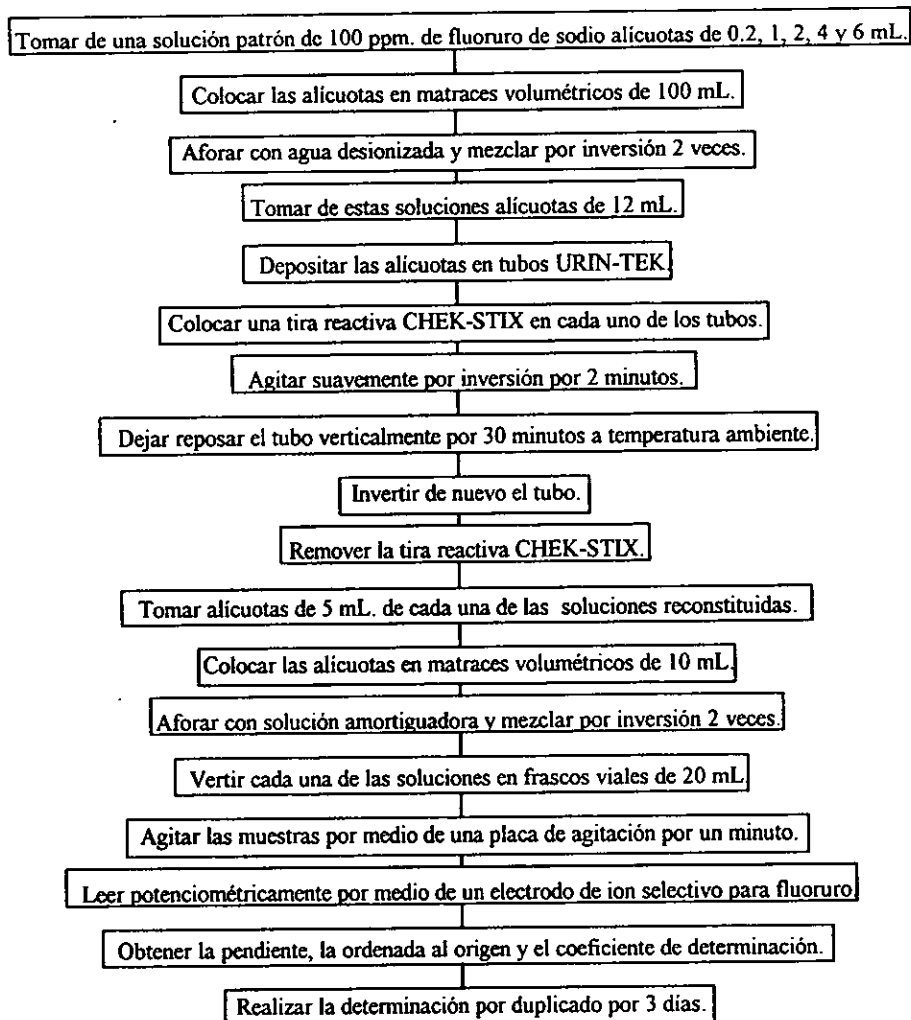
ESPECIFICIDAD



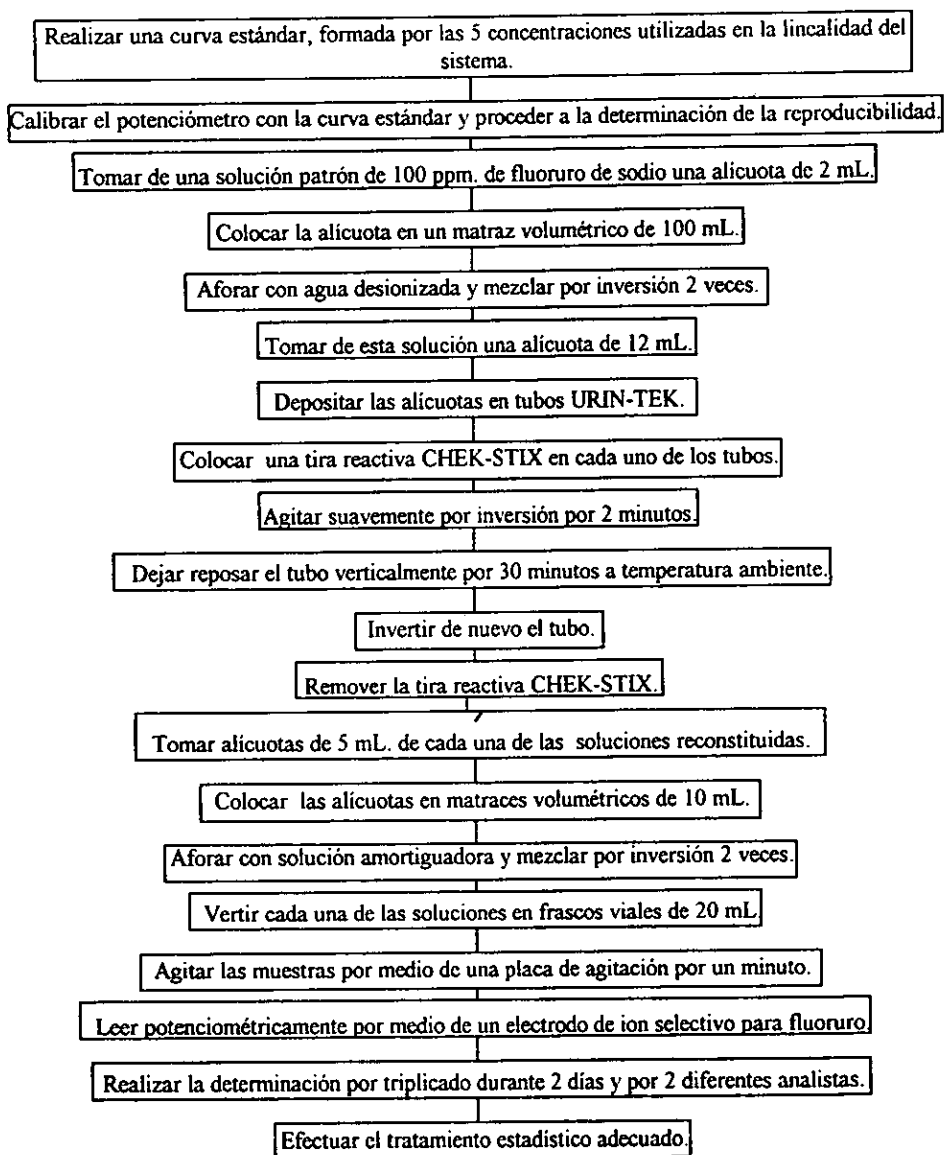
LINEALIDAD DEL SISTEMA



LINEALIDAD DEL MÉTODO



REPRODUCIBILIDAD



LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Tomar de una solución patrón de 100 ppm. de fluoruro de sodio, 6 alícuotas de 0.1 mL. y 6 de 0.2 mL.

Colocar las alícuotas en matraces volumétricos de 100 mL.

Aforar con agua desionizada y mezclar por inversión 2 veces.

Tomar alícuotas de 5 mL. de cada una de las soluciones anteriores.

Colocar las alícuotas en matraces volumétricos de 10 mL.

Aforar con solución amortiguadora y mezclar por inversión 2 veces.

Vertir cada una de las soluciones en frascos viales de 20 mL.

Agitar las muestras por medio de una placa de agitación por un minuto.

Determinar el porcentaje de recobro y el coeficiente de variación.

Realizar el análisis por duplicado y por el mismo analista durante un período de 3 días.

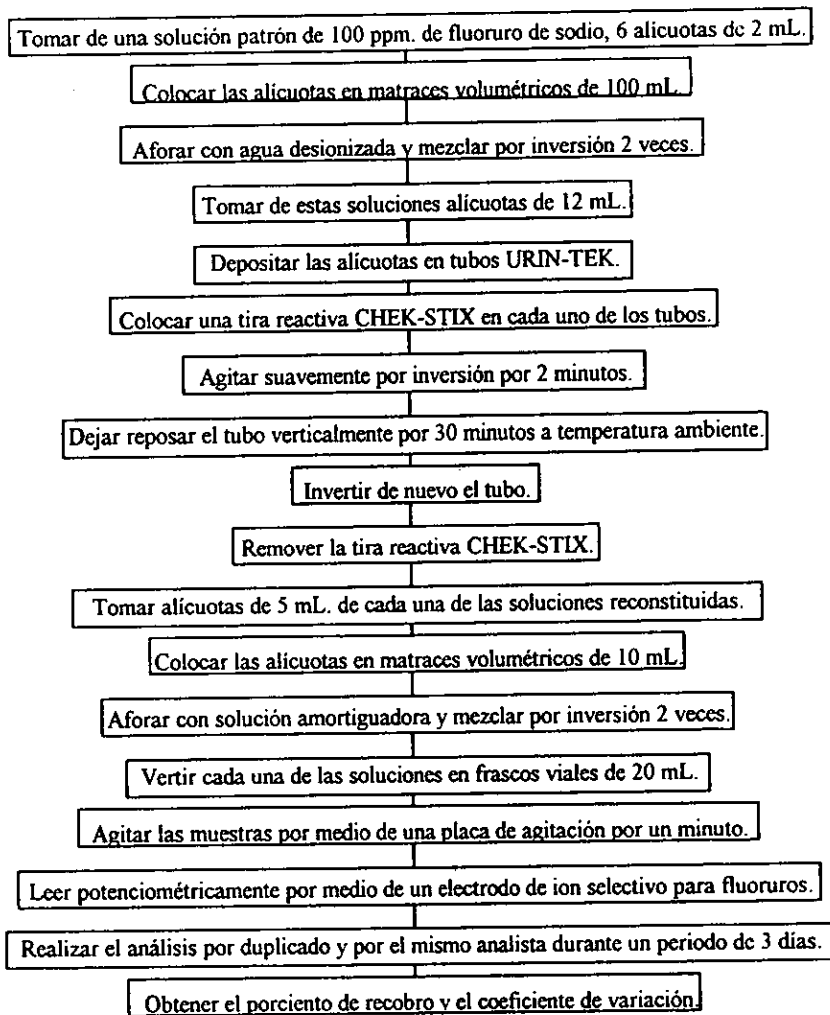
PRECISIÓN DEL SISTEMA

Tomar de la curva de linealidad del sistema, la solución cuya concentración corresponde a 1 ppm.

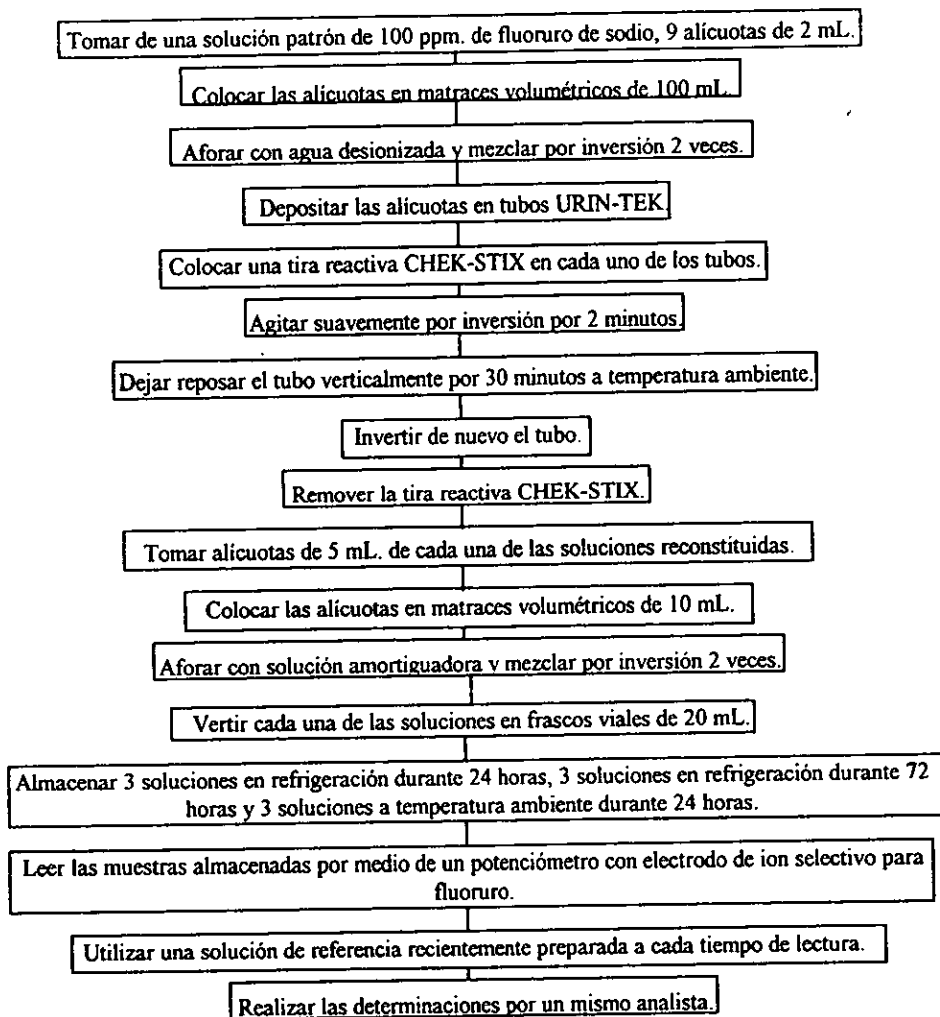
Analizar 6 veces esa misma solución, por duplicado y por un período de 3 días.

Determinar el coeficiente de variación.

REPETIBILIDAD Y EXACTITUD



ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA



VIII. RESULTADOS

El tratamiento estadístico que se aplicó a los resultados experimentales de los diferentes parámetros, fue de acuerdo a lo establecido en las Guías Generales de Validación del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

Los resultados obtenidos se presentaron primeramente, en una tabla general que muestra los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros de la validación y los resultados obtenidos estadísticamente, tanto con la solución amortiguadora preparada con CDTA como la preparada a partir de citratos.

Posteriormente, se colocaron las tablas de los resultados experimentales de linealidad del sistema y del método con sus respectivas gráficas, asimismo se colocaron las tablas de reproducibilidad y sus análisis estadísticos (tablas de ANDEVA).

Los resultados experimentales de los parámetros de precisión, exactitud, repetibilidad, límite de detección y cuantificación, especificidad y estabilidad de la muestra analítica se podrán observar en el anexo I con su respectiva determinación de coeficientes de variación, promedios de recobro, factores e intervalos de confianza.

Tabla 1. Tabla General de Resultados.

PARÁMETRO.	CRITERIO DE ACEPTACIÓN.	VALORES REPORTADOS CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA CON CDTA (FAD).	VALORES REPORTADOS CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA A PARTIR DE CITRATOS.
Linealidad del Sistema.	C.V. \leq 3%. $r \geq 0.99$. $r^2 \geq 0.98$.	C.V. = 2.2910%. $r = 0.9999$. $r^2 = 0.9998$.	C.V. = 1.9771%. $r = 0.9999$. $r^2 = 0.9998$.
Precisión del Sistema.*	C.V. \leq 1.5%.	C.V. = 1.4391%.	C.V. = 0.7725%.
Linealidad del método.	$m \approx 1$. $b \approx 0$. $r^2 \geq 0.98$. $\bar{R} = 97 - 103\%$. C.V. \leq 3%.	$m = 0.9959$. $b = -0.00238$. $r^2 = 0.9995$. $\bar{R} = 98.5584\%$. C.V. = 2.5888%.	$m = 0.9949$. $b = -0.0149$. $r^2 = 0.9998$. $\bar{R} = 97.4276\%$. C.V. = 2.2658%.
Exactitud y repetibilidad al 100% *	$\bar{R} = 97 - 103\%$. C.V. \leq 3%.	$R = 97.3875\%$. C.V. = 1.1289%.	$R = 97.8308\%$. C.V. = 0.7338%.
Reproducibilidad.	C.V. \leq 3%.	C.V. = 2.3752%.	C.V. = 2.2295%.
Límite de detección y cuantificación al 0.05 *	C.V. \leq 15%. $\bar{R} = 80.5394 - 119.4606\%$.	C.V. = 4.5957%. $\bar{R} = 86.6\%$.	C.V. = 8.4567%. $\bar{R} = 91.05\%$.
Límite de detección y cuantificación al 0.10 *	C.V. \leq 15%. $\bar{R} = 84.2878 - 115.7122\%$.	C.V. = 6.1478%. $\bar{R} = 84.6833\%$.	C.V. = 5.2780%. $\bar{R} = 94.6916\%$.
Especificidad *	No debe presentarse lectura	No se presentó lectura.	No se presentó lectura.
Estabilidad de la muestra analítica *	$I = 97 - 103\%$. I.C. = debe incluir el valor de cero.	T.A./24 horas. I.C. = -3.2457 a 2.5791. $I = 99.6803\%$. Refrig./24 horas. I.C. = 0.7985 a 5.2015. $I = 103.0582\%$. Refrig./72 horas. I.C. = 1.7985 a 6.2015. $I = 104.0719\%$.	T.A./24 horas. I.C. = -2.7947 a 2.1281. $I = 99.6632\%$. Refrig./24 horas. I.C. = 3.1100 a 6.2234. $I = 104.7037\%$. Refrig./72 horas. I.C. = 3.2326 a 5.4340. $I = 104.3670\%$.

C.V. - Coeficiente de variación.

r - Coeficiente de correlación.

r^2 - Coeficiente de determinación.

m - Pendiente.

b - Ordenada al origen.

\bar{R} - Promedio de recobro.

I - Factor I.

I.C. - Intervalo de confianza.

* Ver anexo I.

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA CON CDTA (FAD)

Las siguientes tablas muestra sólo el promedio de los resultados experimentales, para más detalle ver anexo I.

Tabla 2.1. Linealidad del sistema.

CONCENTRACIÓN EN PPM A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN (X).	PROPIEDAD MEDIDA (Y) PPM.	
$x_1 = 0.1.$	$y_{11} = 0.1000.$	$y_{12} = 0.0933.$
$x_2 = 0.5.$	$y_{21} = 0.4733.$	$y_{22} = 0.4766.$
$x_3 = 1.0.$	$y_{31} = 0.9766.$	$y_{32} = 0.9800.$
$x_4 = 2.0.$	$y_{41} = 1.9500.$	$y_{42} = 1.9800.$
$x_5 = 3.0.$	$y_{51} = 2.9833.$	$y_{52} = 2.9700.$

$$\Sigma x = 13.2.$$

$$\Sigma x^2 = 28.52.$$

$$\Sigma y = 12.9831.$$

$$\Sigma y^2 = 27.8278.$$

$$\Sigma xy = 28.1707.$$

$$r = 0.9999.$$

$$r^2 = 0.9998.$$

$$D.E. = 2.2310 \times 10^{-2}.$$

$$C.V. = 2.2910\%.$$

FIG. 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA CON CDTA (FAD).

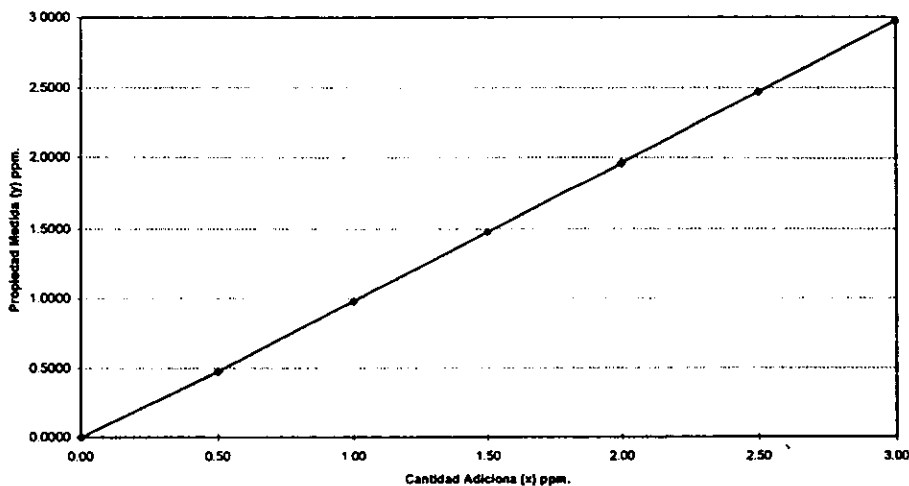


Tabla 2.2. Linealidad del método.

CANTIDAD ADICIONADA (X) PPM.	CANTIDAD RECUPERADA (Y) PPM.	
$x_1 = 0.1$.	$y_{11} = 0.0933$.	$y_{12} = 0.0966$.
$x_2 = 0.5$.	$y_{21} = 0.4966$.	$y_{22} = 0.5066$.
$x_3 = 1.0$.	$y_{31} = 0.9900$.	$y_{32} = 0.9633$.
$x_4 = 2.0$.	$y_{41} = 2.0366$.	$y_{42} = 1.9933$.
$x_5 = 3.0$.	$y_{51} = 2.9966$.	$y_{52} = 2.9500$.

$$\Sigma x = 13.2.$$

$$\Sigma x^2 = 28.52.$$

$$\Sigma y = 13.1229.$$

$$\Sigma y^2 = 28.2324.$$

$$\Sigma xy = 28.3734.$$

$$r = 0.9997.$$

$$r^2 = 0.9995.$$

$$D.E. = 2.5515.$$

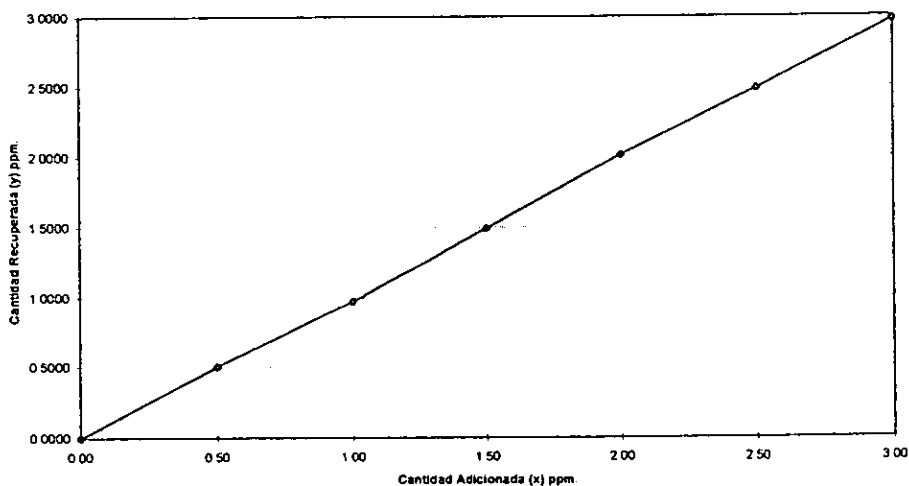
$$C.V. = 2.5888\%.$$

$$\bar{R} = 98.5584\%.$$

$$m = 0.9959.$$

$$b = -0.00238.$$

FIG. 2. LINEALIDAD DEL METODO CON SOLUCION AMORTIGUADORA PREPARADA CON CDTA (FAD).



Los resultados obtenidos para la pendiente y la ordenada al origen, no cumplen con los criterios establecidos por la Guía General de Validaciones, por lo que se aplicó un tratamiento estadístico adicional (t-student), con el cual se determinó si los valores se podían considerar como uno y cero respectivamente. Ver anexo II.

Tabla 2.3. Porcentajes de Recobro para la Reproducibilidad.

DÍA. \ ANALISTA	I.	II.
	I.	99.0 % 97.0 % 93.0 %
II.	98.0 % 96.0 % 99.0 %	100 % 100 % 100 %

$$\Sigma y = 1170.$$

$$D.E. = 2.3159.$$

$$\Sigma y^2 = 114134.$$

$$C.V. = 2.3752\%.$$

$$\bar{y} = 97.5.$$

Tabla 2.3.1. Tabla de análisis de varianza (ANDEVA).

FUENTE DE VARIACIÓN.	GRADOS DE LIBERTAD.	SUMA DE CUADRADOS.	MEDIA DE CUADRADOS	F _{CAL.}	F _{0.05.}
Analista.	g _{la} = 1.	SC _a = 3.0000.	MC _a = 3.0000.	F _a = 0.2250.	F _{1/2(0.05)} = 38.51
Día.	g _{ld} = 2.	SC _d = 26.6667.	MC _d = 13.3333.	F _d = 3.6364.	F _{2/8(0.05)} = 6.06.
Error.	g _{le} = 8.	SC _e = 29.3333.	MC _e = 3.6666	-----	-----

Al comparar los resultados de las F calculadas con las F experimentales se encontró que:

$F_a < F_{1/2(0.05)}$ Por lo tanto el método analítico es reproducible por los analistas, además

$F_d < F_{2/8(0.05)}$ Por lo tanto el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA A PARTIR DE CITRATOS

Las siguientes tablas muestra sólo el promedio de los resultados experimentales, para más detalle ver anexo I.

Tabla 3.1. Linealidad del sistema.

CONCENTRACIÓN EN PPM A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN (X).	PROPIEDAD MEDIDA (Y) PPM.	
$x_1 = 0.1.$	$y_{11} = 0.0933.$	$y_{12} = 0.0966.$
$x_2 = 0.5.$	$y_{21} = 0.4966.$	$y_{22} = 0.4900.$
$x_3 = 1.0.$	$y_{31} = 0.9666.$	$y_{32} = 0.9600.$
$x_4 = 2.0.$	$y_{41} = 1.9900.$	$y_{42} = 1.9800.$
$x_5 = 3.0.$	$y_{51} = 2.9633.$	$y_{52} = 2.9600.$

$$\Sigma x = 13.2.$$

$$\Sigma x^2 = 28.52.$$

$$\Sigma y = 12.9964.$$

$$\Sigma y^2 = 27.7839.$$

$$\Sigma xy = 28.1487.$$

$$r = 0.9999.$$

$$r^2 = 0.9998.$$

$$D.E. = 1.9293 \times 10^{-2}.$$

$$C.V. = 1.9771\%.$$

FIG. 3. LINEALIDAD DEL SISTEMA CON SOLUCION AMORTIGUADORA PREPARADA A PARTIR DE CITRATOS.

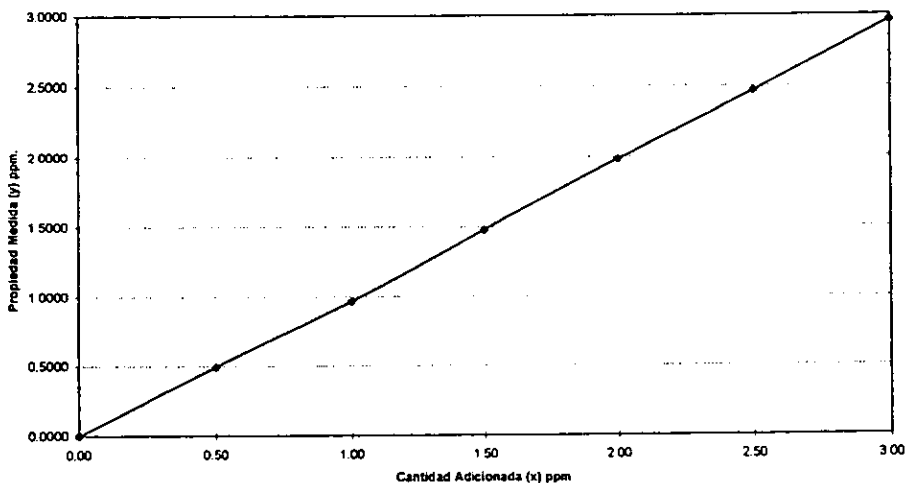


Tabla 3.2. Linealidad del método.

CANTIDAD ADICIONADA (X) PPM	CANTIDAD RECUPERADA (Y) PPM.	
$x_1 = 0.1.$	$y_{11} = 0.0933.$	$y_{12} = 0.1000.$
$x_2 = 0.5.$	$y_{21} = 0.4733.$	$y_{22} = 0.4833.$
$x_3 = 1.0.$	$y_{31} = 0.9600.$	$y_{32} = 0.9866.$
$x_4 = 2.0.$	$y_{41} = 1.9666.$	$y_{42} = 1.9600.$
$x_5 = 3.0.$	$y_{51} = 2.9800.$	$y_{52} = 2.9800.$

$$\Sigma x = 13.2.$$

$$\Sigma x^2 = 28.52.$$

$$\Sigma y = 12.9831.$$

$$\Sigma y^2 = 27.8411.$$

$$\Sigma xy = 28.1774.$$

$$r = 0.9999.$$

$$r^2 = 0.9998.$$

$$D.E. = 2.2076.$$

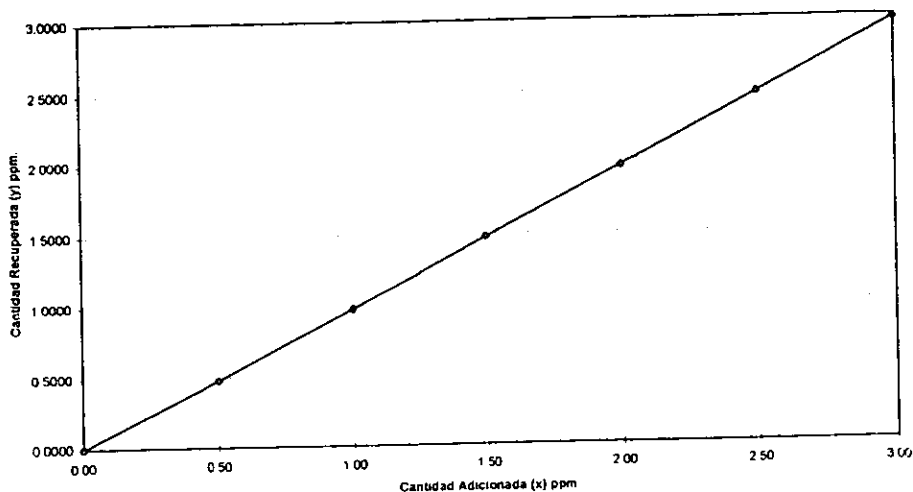
$$C.V. = 2.2658\%.$$

$$R = 97.4276\%.$$

$$m = 0.9949.$$

$$b = -0.0149.$$

FIG. 4. LINEALIDAD DEL METODO CON SOLUCION AMORTIGUADORA PREPARADA A PARTIR DE CITRATOS.



Los resultados obtenidos para la pendiente y la ordenada al origen, no cumplen con los criterios establecidos por la Guía General de Validaciones, por lo que se aplicó un tratamiento estadístico adicional (t-student), con el cual se determinó si los valores se podían considerar como uno y cero respectivamente. Ver anexo II.

Tabla 3.3. Porcentajes de Recobro para la Reproducibilidad.

DÍA. \ ANALISTA	I.	II.
	I.	97.0 % 98.0 % 97.0 %
II.	100 % 101 % 101 %	98.0 % 98.0 % 98.0 %

$$\Sigma y = 1173.$$

$$\Sigma y^2 = 114713.$$

$$\bar{y} = 97.75.$$

$$D.E. = 2.1794.$$

$$C.V. = 2.2295 \%$$

Tabla 3.3.1. Tabla de análisis de varianza (ANDEVA).

FUENTE DE VARIACIÓN.	GRADOS DE LIBERTAD.	SUMA DE CUADRADOS.	MEDIA DE CUADRADOS.	F _{CAL.}	F _{0.05.}
Analista.	gla = 1.	SCa = 18.7500.	MCa = 18.7500.	Fa = 1.2430	$F_{1/2(0.05)} = 38.51.$
Día.	gld = 2.	SCd = 30.1667.	M Cd = 15.0833	Fd = 36.2057	$F_{2/8(0.05)} = 6.06.$
Error.	gle = 8.	SCe = 3.3333.	M Ce = 0.4166	-----	-----

Al comparar los resultados de las F calculadas con las F experimentales se encontró que:

$F_a < F_{1/2(0.05)}$ Por lo tanto el método analítico es reproducible por los analistas, además

$F_d > F_{2/8(0.05)}$ Por lo tanto el método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Debido a que no resultó reproducible en distintos días por un mismo analista se determinó la variación que presentaba, siendo:

Variación interdías para analista = ± 1.1055 .

Esta variación es mínima, por lo que el método se considera reproducible en distintos días por un mismo analista.

COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Con los resultados de los parámetros de repetibilidad, precisión, exactitud y linealidad del método se llevó a cabo la comparación de las dos validaciones. La tabla 4 muestra los resultados obtenidos:

Tabla 4. Comparación estadística de los dos métodos analíticos.

PARÁMETRO.	INTERVALO DE CONFIANZA.	CRITERIO.
Repetibilidad.	0.3314 a 5.3834.	Tienen la misma repetibilidad, ya que se encuentra el valor de uno dentro del intervalo.
Precisión.	0.3018 a 5.9175.	Tienen la misma precisión, ya que se encuentra el valor de uno dentro del intervalo.
Exactitud al 100%	-1.1106 a 3.3722.	Tienen la misma exactitud al 100% ya que se encuentra el valor de cero dentro del intervalo.
Linealidad del método.	Para m: -1.8525×10^{-2} a 2.0525×10^{-2} . Para b: -2.0456×10^{-2} a 4.5496×10^{-2} .	Tienen una pendiente y una ordenada al origen equivalente, ya que dentro de los intervalos de confianza se localiza el valor de cero.

IX. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POTENCIOMÉTRICO UTILIZANDO SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA CON CDTA

Los resultados en el presente estudio para la validación del método analítico potenciométrico en orina utilizando la solución amortiguadora preparada con CDTA (ver tabla 1), demuestran que el sistema es lineal ya que se obtuvo un coeficiente de correlación (r) de 0.9999 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9998 con un coeficiente de variación de 2.2910%, dichos resultados cumplen con el criterio de aceptación establecido para un método potenciométrico.

La precisión del método potenciométrico reportó un coeficiente de variación de 1.4391% encontrándose por debajo del criterio de aceptación por lo que se considera que el método cumple con este parámetro.

En la tabla 1 se puede observar que la linealidad del método presentó un coeficiente de determinación aceptable, al igual que el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro; sin embargo, los valores de la pendiente y la ordenada al origen, no cumplieron con el criterio de aceptación establecido, por lo que se sometieron a una prueba de hipótesis aplicando una distribución t-student, evaluándose que la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero y la pendiente a uno. En la figura 2 se puede observar la linealidad que presenta el método potenciométrico.

Los parámetros de exactitud y repetibilidad al 100% presentan resultados aceptables tanto para el porcentaje de recobro como para el coeficiente de variación.

La reproducibilidad fue realizada por dos analistas en dos diferentes días, aplicándoseles posteriormente a los resultados un tratamiento estadístico por análisis de varianza (ANDEVA). Los valores de la distribución F para cada una de las fuentes de variación, son menores a los valores de tablas por lo que se considera que el método potenciométrico es reproducible (ver tabla 2.3.1). El coeficiente de variación obtenido fue de 2.3752%, valor por debajo del criterio de aceptación, lo cual confirma que el método es reproducible.

En cuanto al límite de detección y cuantificación, éste se realizó con dos mínimas concentraciones, una de 0.05 ppm y la otra de 0.10 ppm., se encontró que con ambas concentraciones los valores de coeficiente de variación y de porcentaje de recobro están dentro de los límites de aceptación, por lo que la sensibilidad del aparato se considera óptima.

En lo referente a la especificidad, ésta se realizó en muestras de orina sintética, la cual presenta la misma composición química de una orina normal pero sin estar presente el ion fluoruro, se leyeron en el potenciómetro y se determinaron lecturas del orden de 2.0×10^{-7} es decir, valores que estadísticamente se consideran como cero.

Se prepararon muestras de orina sintética, las cuales fueron cargadas con fluoruro a una concentración al 100%, se leyeron en el potenciómetro y reportaron los resultados que se muestran en la tabla 1, posteriormente se les dejó a temperatura ambiente durante 24 horas para ser leídas nuevamente, encontrándose que los valores habían mostrado una tendencia casi similar a la inicial, comprobándose al determinar su intervalo de confianza y su factor I que se encontraban dentro de los límites considerados como aceptables.

También se prepararon muestras de orina sintética, que se sometieron a refrigeración durante 24 y 72 horas, dichas muestras presentaron resultados superiores al valor inicial; se les determinó su intervalo de confianza y su factor I, los cuales se encontraron fuera de los límites establecidos, teniendo como única explicación una contaminación con fluoruro durante el proceso de refrigerado.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POTENCIOMÉTRICO UTILIZANDO SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA CON CITRATOS

La validación del método analítico potenciométrico utilizando solución amortiguadora preparada a partir de citratos comprende los mismos parámetros anteriores. Primeramente se evaluó la linealidad del sistema, que reportó un coeficiente de correlación de 0.9999, un coeficiente de determinación de 0.9998 y un coeficiente de variación de 1.9771% por lo que se consideró que el sistema cumplió con los criterios establecidos para un método potenciométrico (ver tabla 1).

En la precisión del sistema se evaluó sólo el coeficiente de variación, el cual se localizó en los límites de aceptación ya que presentó un valor de 0.7725%.

En la linealidad del método se trabajaron 5 niveles de concentraciones, que al ser graficados mostraron una relación lineal de los mg. adicionados contra los mg. recuperados (ver figura 4). La ordenada al origen y la pendiente se evaluaron estadísticamente con la distribución t-student debido a que no cumplían con el criterio de aceptación, el resultado fue que estadísticamente los valores absolutos de ambos parámetros de regresión lineal se consideran igual a cero y uno respectivamente.

El porcentaje de recobro y el coeficiente de variación para los parámetros de exactitud y repetibilidad al 100% reportaron valores aceptables.

La reproducibilidad tratada estadísticamente por un análisis de varianza (ANDEVA) mostró valores de la distribución F para cada una de las fuentes de variación. Los resultados reportaron que el método analítico es reproducible por diferentes analistas pero no así por uno mismo en distintos días; por lo que se procedió a determinar la variación interdías para analista encontrándose un valor de ± 1.1055 , considerándose mínima la variación, por lo que se puede establecer que el método potenciométrico es reproducible (ver tabla 3.3.1), ello se

corroborar con el valor de coeficiente de variación, el cual está dentro del criterio de aceptación establecido.

Los límites de detección y de cuantificación, se realizaron con dos concentraciones una de 0.05 ppm y otra de 0.10 ppm., reportándose como aceptables los valores de coeficiente de variación y de porcentaje de recobro, ya que cumplen con el criterio establecido.

El método potenciométrico se evaluó como específico debido a que no se presentó lectura del ion fluoruro en las muestras.

Las muestras de orina sintética cargadas con ion fluoruro al 100% de la concentración fueron sometidas a temperatura ambiente durante 24 horas, al cabo del tiempo, fueron leídas en el potenciómetro, encontrándose que los valores de intervalo de confianza y de su factor I se encontraban dentro del criterio de aceptación, en cambio para las muestras que fueron sometidas a refrigeración durante 24 y 72 horas, los resultados no fueron óptimos debido a que los valores de intervalo de confianza y del factor I no se localizaron dentro de los límites de aceptación establecidos (ver tabla 1).

COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE AMBOS MÉTODOS

Los parámetros estadísticos considerados para la comparación de los métodos analíticos validados comprenden: Repetibilidad, precisión, exactitud y linealidad del método.

La comparación de la repetibilidad de ambos métodos establece el calcular un intervalo a partir de la relación de las desviaciones estándar de la linealidad del método, reportándose los valores de 0.3314 a 5.3834, intervalo que incluye el valor de uno, por lo que se considera que los métodos tienen la misma repetibilidad.

Teniendo en consideración el hecho de que los métodos presentan la misma repetibilidad, se aplicó el tratamiento estadístico adecuado para estos casos, reportándose un intervalo de confianza que incluye el valor de cero, por lo que se evaluó que los métodos presentan una exactitud equivalente, es decir, el método analítico con ambas soluciones amortiguadoras no presenta error sistemático⁽²⁸⁾.

El parámetro de precisión se evaluó a partir de la razón de las varianzas, que estableció un intervalo de 0.3018 a 5.9175; dicho intervalo comprende el valor de uno, deduciéndose que los métodos presentan la misma precisión.

Para evaluar la linealidad del método, se determinaron dos intervalos. La relación de la diferencia de las pendientes de la cantidad adicionada vs. cantidad recuperada, presenta un intervalo de -1.8525×10^{-2} a 2.0525×10^{-2} , mientras que para la relación de la diferencia de las ordenadas al origen, el intervalo fue de -2.0456×10^{-2} a 4.5496×10^{-2} . Como ambos intervalos incluyen el valor de cero, se considera que la linealidad de los métodos es equivalente. Las ventajas que esto representa es la disminución de los costos y el ahorro de

tiempo, ya que la solución amortiguadora comercial preparada con CDTA tiene un precio por galón de \$860.00 (precio sujeto al cambio del dólar) y con un tiempo de entrega de 30 días a partir de la fecha de solicitud, mientras que la solución amortiguadora preparada a partir de citratos tiene un costo de \$100.00, y se puede preparar al momento de ser necesitada.

X. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados anteriores se llegó a las siguientes conclusiones:

- El método analítico potenciométrico para la determinación de ion fluoruro en orina utilizando solución amortiguadora comercial preparada con CDTA, es lineal en el intervalo de concentraciones utilizado, es exacto, preciso y reproducible. Se considera específico dado que no presentó respuesta la matriz de orina sintética, concluyéndose que no existen interferencias.
- Los resultados de la validación del método analítico potenciométrico para la determinación de ion fluoruro en orina utilizando solución amortiguadora preparada a partir de citratos, indican que el método es lineal, exacto, preciso, reproducible y específico.
- Se encontró que las muestras analizadas, tanto con la solución amortiguadora comercial preparada con CDTA como con citratos, son estables sólo a temperatura ambiente durante 24 horas.
- Por lo anterior, se determina que ambos métodos están validados, ya que cumplen con las especificaciones establecidas por el Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA.⁽²³⁾
- La comparación estadística entre ambos métodos, establece una relación semejante que permite la sustitución de la solución amortiguadora comercial preparada con CDTA, por la solución amortiguadora preparada a partir de citratos.

XI. SUGERENCIAS

- Considerando que el método analítico potenciométrico quedó validado con ambas soluciones amortiguadoras, llevar a cabo en la Unidad Universitaria de Investigación en Cariología, la sustitución de la solución amortiguadora comercial preparada con CDTA por la solución amortiguadora preparada a partir de citratos.
- Trascender los resultados obtenidos a otras instituciones que lleven a cabo la determinación potenciométrica del ion fluoruro en orina, resaltando las ventajas que representa en ahorro de tiempo y dinero.
- Preparar sólo la solución amortiguadora que se va a utilizar, para que ésta se mantenga en óptimas condiciones.
- Se recomienda crear un manual de limpieza en donde se citen todos los lineamientos importantes como ejemplo, preparación de reactivos de limpiezas, técnicas de lavado, etc.
- Se recomienda llevar a cabo la lectura de las muestras de orina, el mismo día de su preparación.
- Se sugiere no añadir la solución amortiguadora a las muestras y mantenerlas en refrigeración, cuidando no excederse de 24 horas.
- Realizar un análisis adicional de estabilidad, que determine las posibles interacciones existentes que no permiten mantener en refrigeración las muestras de orina con solución amortiguadora durante un tiempo prolongado.

ANEXOS

ANEXO I

Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos experimentalmente a través de la lectura directa al aparato, promedios de los días y duplicaciones realizadas, así como los resultados estadísticos obtenidos de acuerdo a la aplicación del manual del Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud. Estos últimos resultados se muestran de manera concreta en la tabla general de resultados (ver tabla 1).

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA CON CDTA (FAD)

Tabla 1.1 Resultados y Promedio de la Linealidad del Sistema.

CONCENTRACIÓN EN PPM A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN (X).	PROPIEDAD MEDIDA (Y) PPM.			PROMEDIO DE PROPIEDAD MEDIDA (Y) PPM.
	DÍA 1.	DÍA 2.	DÍA 3.	
$x_1 = 0.1$	$y_{11} = 0.10$	$y_{11} = 0.11$	$y_{11} = 0.09$	$y_{11} = 0.1000$
	$y_{12} = 0.09$	$y_{12} = 0.10$	$y_{12} = 0.09$	$y_{12} = 0.0933$
$x_2 = 0.5$	$y_{21} = 0.46$	$y_{21} = 0.48$	$y_{21} = 0.48$	$y_{21} = 0.4733$
	$y_{22} = 0.47$	$y_{22} = 0.48$	$y_{22} = 0.48$	$y_{22} = 0.4766$
$x_3 = 1.0$	$y_{31} = 0.97$	$y_{31} = 0.99$	$y_{31} = 0.97$	$y_{31} = 0.9766$
	$y_{32} = 0.97$	$y_{32} = 0.98$	$y_{32} = 0.99$	$y_{32} = 0.9800$
$x_4 = 2.0$	$y_{41} = 1.92$	$y_{41} = 1.95$	$y_{41} = 1.98$	$y_{41} = 1.9500$
	$y_{42} = 1.92$	$y_{42} = 1.99$	$y_{42} = 2.03$	$y_{42} = 1.9800$
$x_5 = 3.0$	$y_{51} = 2.99$	$y_{51} = 2.95$	$y_{51} = 3.01$	$y_{51} = 2.9833$
	$y_{52} = 2.97$	$y_{52} = 2.97$	$y_{52} = 2.97$	$y_{52} = 2.9700$

Tabla 1.2 Resultados y Promedio de la Linealidad del Método.

CANTIDAD ADICIONADA (X) PPM	CANTIDAD RECUPERADA (Y) PPM.			PROMEDIO DE CANTIDAD RECUPERADA (Y) PPM.
	DÍA 1	DÍA 2.	DÍA 3.	
$x_1 = 0.1$	$y_{11} = 0.10$	$y_{11} = 0.10$	$y_{11} = 0.08$	$y_{11} = 0.0933$
	$y_{12} = 0.10$	$y_{12} = 0.09$	$y_{12} = 0.10$	$y_{12} = 0.0966$
$x_2 = 0.5$	$y_{21} = 0.49$	$y_{21} = 0.49$	$y_{21} = 0.51$	$y_{21} = 0.4966$
	$y_{22} = 0.52$	$y_{22} = 0.51$	$y_{22} = 0.49$	$y_{22} = 0.5066$
$x_3 = 1.0$	$y_{31} = 0.95$	$y_{31} = 1.01$	$y_{31} = 1.01$	$y_{31} = 0.9900$
	$y_{32} = 0.96$	$y_{32} = 0.99$	$y_{32} = 0.94$	$y_{32} = 0.9633$
$x_4 = 2.0$	$y_{41} = 1.99$	$y_{41} = 2.02$	$y_{41} = 2.10$	$y_{41} = 2.0366$
	$y_{42} = 1.99$	$y_{42} = 1.99$	$y_{42} = 2.00$	$y_{42} = 1.9933$
$x_5 = 3.0$	$y_{51} = 3.01$	$y_{51} = 3.00$	$y_{51} = 2.98$	$y_{51} = 2.9966$
	$y_{52} = 2.98$	$y_{52} = 2.96$	$y_{52} = 2.91$	$y_{52} = 2.9500$

Tabla 1.3. Resultados y Promedio de la Precisión del Sistema.

CANTIDAD ADICIONADA PPM.	DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3		CANTIDAD RECUPERADA PPM.
	1	2	1	2	1	2	
	1.0	0.91	0.97	0.96	0.94	0.95	
1.0	1.01	1.00	1.00	0.99	0.97	0.97	0.9900
1.0	0.98	0.99	0.96	0.97	0.98	1.00	0.9800
1.0	0.98	0.95	0.97	0.96	0.99	0.96	0.9683
1.0	0.96	1.01	0.98	0.98	0.98	1.00	0.9850
1.0	0.96	0.97	0.99	0.98	0.96	0.98	0.9733

$$\bar{y} = 0.9744.$$

$$\Sigma y = 5.8466.$$

$$\Sigma y^2 = 5.6981.$$

$$D.E. = 1.4023 \times 10^{-2}.$$

$$C.V. = 1.4391\%.$$

Tabla 1.4 Resultados y Promedio de la Repetibilidad y exactitud al 100%.

CANTIDAD ADICIONADA PPM.	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	CANTIDAD RECUPERADA PPM	% RECOBRO (Y).
1.0	1.00	0.95	0.99	0.9800	98.00
1.0	0.99	0.97	0.95	0.9700	97.00
1.0	0.97	0.97	0.96	0.9666	96.66
1.0	0.96	0.96	1.00	0.9733	97.33
1.0	1.01	0.99	0.97	0.9900	99.00
1.0	0.97	1.02	0.98	0.9900	99.00
1.0	0.96	0.96	0.96	0.9600	96.00
1.0	0.97	0.96	0.95	0.9600	96.00
1.0	0.96	0.95	0.97	0.9600	96.00
1.0	0.96	1.01	0.98	0.9833	98.33
1.0	0.97	0.98	0.97	0.9733	97.33
1.0	0.96	1.00	0.98	0.9800	98.00

$$\Sigma R = 1168.65.$$

$$D.E. = 1.0995.$$

$$\Sigma R^2 = 113825.2023.$$

$$C.V. = 1.1289\%.$$

$$\bar{R} = 97.3875\%.$$

Tabla 1.5 Resultados de la Reproducibilidad.

DÍA.	ANALISTA	
	I.	II.
I.	0.99	0.95
	0.97	0.98
	0.93	0.95
II.	0.98	1.00
	0.96	1.00
	0.99	1.00

Tabla 1.6 Resultados y Promedio del Límite de detección y cuantificación de 0.05 ppm.

CANTIDAD ADICIONADA PPM.	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	CANTIDAD RECUPERA DA PPM	% RECOBRO (Y).
0.05	0.05	0.04	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.04	0.05	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.04	0.04	0.05	0.0433	86.6
0.05	0.04	0.05	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.04	0.04	0.04	0.0400	80.0
0.05	0.05	0.04	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.04	0.04	0.04	0.0400	80.0
0.05	0.05	0.05	0.04	0.0466	93.2
0.05	0.05	0.04	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.05	0.04	0.05	0.0466	93.2
0.05	0.04	0.04	0.05	0.0433	86.6
0.05	0.04	0.04	0.05	0.0433	86.6

$$\bar{R} = 86.6000\%$$

$$D.E. = 3.9799.$$

$$C.V. = 4.5957\%.$$

Tabla 1.7 Resultados y Promedio del Límite de detección y cuantificación de 0.10 ppm.

CANTIDAD ADICIONADA PPM.	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	CANTIDAD RECUPERA DA PPM	% RECOBRO (Y).
0.10	0.09	0.11	0.09	0.0966	96.6
0.10	0.09	0.09	0.08	0.0866	86.6
0.10	0.08	0.08	0.09	0.0833	83.3
0.10	0.09	0.08	0.09	0.0866	86.6
0.10	0.10	0.07	0.09	0.0866	86.6
0.10	0.08	0.07	0.08	0.0766	76.6
0.10	0.08	0.08	0.09	0.0833	83.3
0.10	0.09	0.10	0.08	0.0900	90.0
0.10	0.08	0.09	0.08	0.0833	83.3
0.10	0.08	0.09	0.08	0.0833	83.3
0.10	0.08	0.08	0.08	0.0800	80.0
0.10	0.08	0.08	0.08	0.0800	80.0

$$\bar{R} = 84.6833\%$$

$$D.E. = 5.2062.$$

$$C.V. = 6.1478\%.$$

Tabla 1.8 Estabilidad de la muestra analítica.

% INICIAL.	% T.A./24 HORAS.	% REFRIG./24 HORAS.	% REFRIG./72 HORAS.
100.0	97.0	102.0	103.0
99.0	100.0	101.0	102.0
97.0	98.0	102.0	103.0
$y_0=98.6666$	$y_1=98.3333$	$y_2=101.6666$	$y_3=102.6666$
$s^2_0=2.3333$	$s^2_1=2.3333$	$s^2_2=0.3333$	$s^2_3=0.3333$
-----	I.C.= -3.2457 a 2.5791.	I.C.= 0.7985 a 5.2015.	I.C.= 1.7985 a 6.2015.
-----	I = 99.6803%.	I = 103.0582%.	I = 104.0719%.

T.A. Temperatura ambiente.

Refrig. Refrigeración.

\bar{y} Media.

s^2 Varianza.

I.C. Intervalo de confianza.

I. Factor I.

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA A PARTIR DE CITRATOS

Tabla 2.1 Resultados y Promedio de la Linealidad del Sistema.

CONCENTRACIÓN EN PPM A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN (X).	PROPIEDAD MEDIDA (Y) PPM.			PROMEDIO DE PROPIEDAD MEDIDA (Y) PPM.
	DÍA 1.	DÍA 2.	DÍA 3.	
$x_1 = 0.1$	$y_{11} = 0.09$	$y_{11} = 0.10$	$y_{11} = 0.09$	$y_{11} = 0.0933$
	$y_{12} = 0.09$	$y_{12} = 0.10$	$y_{12} = 0.10$	$y_{12} = 0.0966$
$x_2 = 0.5$	$y_{21} = 0.47$	$y_{21} = 0.51$	$y_{21} = 0.51$	$y_{21} = 0.4966$
	$y_{22} = 0.49$	$y_{22} = 0.49$	$y_{22} = 0.49$	$y_{22} = 0.4900$
$x_3 = 1.0$	$y_{31} = 0.96$	$y_{31} = 0.99$	$y_{31} = 0.95$	$y_{31} = 0.9666$
	$y_{32} = 0.97$	$y_{32} = 0.96$	$y_{32} = 0.95$	$y_{32} = 0.9600$
$x_4 = 2.0$	$y_{41} = 1.95$	$y_{41} = 2.04$	$y_{41} = 1.98$	$y_{41} = 1.9900$
	$y_{42} = 2.00$	$y_{42} = 1.96$	$y_{42} = 1.98$	$y_{42} = 1.9800$
$x_5 = 3.0$	$y_{51} = 2.97$	$y_{51} = 3.01$	$y_{51} = 2.91$	$y_{51} = 2.9633$
	$y_{52} = 2.98$	$y_{52} = 2.94$	$y_{52} = 2.96$	$y_{52} = 2.9600$

Tabla 2.2 Resultados y Promedio de la Linealidad del Método.

CANTIDAD ADICIONADA (X) PPM	CANTIDAD RECUPERADA (Y) PPM.			PROMEDIO DE CANTIDAD RECUPERADA (Y) PPM.
	DÍA 1.	DÍA 2.	DÍA 3.	
$x_1 = 0.1$	$y_{11} = 0.09$	$y_{11} = 0.10$	$y_{11} = 0.09$	$y_{11} = 0.0933$
	$y_{12} = 0.10$	$y_{12} = 0.10$	$y_{12} = 0.11$	$y_{12} = 0.1000$
$x_2 = 0.5$	$y_{21} = 0.51$	$y_{21} = 0.50$	$y_{21} = 0.44$	$y_{21} = 0.4733$
	$y_{22} = 0.49$	$y_{22} = 0.49$	$y_{22} = 0.48$	$y_{22} = 0.4833$
$x_3 = 1.0$	$y_{31} = 0.95$	$y_{31} = 0.95$	$y_{31} = 0.97$	$y_{31} = 0.9600$
	$y_{32} = 0.95$	$y_{32} = 0.96$	$y_{32} = 1.02$	$y_{32} = 0.9866$
$x_4 = 2.0$	$y_{41} = 1.98$	$y_{41} = 1.97$	$y_{41} = 1.98$	$y_{41} = 1.9666$
	$y_{42} = 1.98$	$y_{42} = 1.95$	$y_{42} = 1.96$	$y_{42} = 1.9600$
$x_5 = 3.0$	$y_{51} = 2.91$	$y_{51} = 2.96$	$y_{51} = 2.99$	$y_{51} = 2.9800$
	$y_{52} = 2.96$	$y_{52} = 2.96$	$y_{52} = 3.00$	$y_{52} = 2.9800$

Tabla 2.3 Resultados y Promedio de la Precisión del Sistema.

CANTIDAD ADICIONADA PPM.	DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3		CANTIDAD RECUPERADA PPM.
	1	2	1	2	1	2	
	1.0	0.99	0.91	0.99	0.98	0.93	
1.0	1.00	0.94	0.98	1.01	0.96	0.95	0.9733
1.0	0.98	0.96	0.97	1.01	0.97	0.97	0.9766
1.0	0.96	0.93	1.02	0.99	0.97	0.98	0.9750
1.0	0.98	0.97	0.97	0.99	0.99	0.95	0.9750
1.0	1.02	0.98	0.99	0.98	0.98	0.96	0.9850

$$y = 0.9744.$$

$$\Sigma y = 5.8465.$$

$$\Sigma y^2 = 5.6972.$$

$$D.E. = 7.5276 \times 10^{-3}.$$

$$C.V. = 0.7725\%.$$

Tabla 2.4 Resultados y Promedio de la Repetibilidad y exactitud al 100%.

CANTIDAD ADICIONA DA PPM.	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	CANTIDAD RECUPERA DA PPM	% RECOBRO (Y).
1.0	1.00	0.98	0.95	0.9766	97.66
1.0	0.98	0.98	0.97	0.9766	97.66
1.0	0.97	0.98	0.97	0.9733	97.33
1.0	0.98	0.98	0.98	0.9800	98.00
1.0	0.98	0.99	0.97	0.9800	98.00
1.0	0.98	1.00	0.99	0.9900	99.00
1.0	1.00	0.98	1.00	0.9933	99.33
1.0	0.97	0.96	0.98	0.9700	97.00
1.0	0.98	0.96	0.98	0.9733	97.33
1.0	0.98	0.98	0.98	0.9800	98.00
1.0	0.97	0.97	0.97	0.9700	97.00
1.0	0.98	0.96	0.99	0.9766	97.66

$$\Sigma R = 1173.97.$$

$$\Sigma R^2 = 114856.1335.$$

$$\bar{R} = 97.8308\%.$$

$$D.E. = 0.7179.$$

$$C.V. = 0.7338\%.$$

Tabla 2.5 Resultados de la Reproducibilidad.

DÍA. \ ANALISTA	I.	II.
	I.	0.97 0.98 0.97
II.	1.00 1.01 1.01	0.98 0.98 0.98

Tabla 2.6 Resultados y Promedio del Limite de detección y cuantificación de 0.05 ppm.

CANTIDAD ADICIONADA PPM.	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	CANTIDAD RECUPERA DA PPM	% RECOBRO (Y).
0.05	0.07	0.05	0.04	0.0533	106.6
0.05	0.04	0.05	0.05	0.0466	93.2
0.05	0.04	0.04	0.04	0.0400	80.0
0.05	0.03	0.05	0.05	0.0433	86.6
0.05	0.05	0.04	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.04	0.05	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.07	0.04	0.04	0.0500	100.0
0.05	0.06	0.04	0.04	0.0466	93.2
0.05	0.05	0.04	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.05	0.04	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.05	0.04	0.04	0.0433	86.6
0.05	0.05	0.05	0.05	0.0500	100.0

$$\bar{R} = 91.0500\%$$

$$D.E. = 7.6998.$$

$$C.V. = 8.4567\%.$$

Tabla 2.7 Resultados y Promedio del Limite de detección y cuantificación de 0.10 ppm.

CANTIDAD ADICIONADA PPM.	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	CANTIDAD RECUPERA DA PPM	% RECOBRO (Y).
0.10	0.12	0.11	0.09	0.1066	106.6
0.10	0.12	0.08	0.09	0.0966	96.6
0.10	0.12	0.09	0.09	0.1000	100.0
0.10	0.11	0.09	0.09	0.0966	96.6
0.10	0.11	0.08	0.08	0.0900	90.0
0.10	0.11	0.08	0.08	0.0900	90.0
0.10	0.12	0.08	0.08	0.0933	93.3
0.10	0.11	0.09	0.08	0.0933	93.3
0.10	0.11	0.09	0.08	0.0933	93.3
0.10	0.11	0.08	0.08	0.0900	90.0
0.10	0.11	0.09	0.07	0.0900	90.0
0.10	0.11	0.10	0.08	0.0966	96.6

$$\bar{R} = 94.6916\%$$

$$D.E. = 4.9979.$$

$$C.V. = 5.2780\%.$$

Tabla 2.8 Estabilidad de la muestra analítica.

% INICIAL.	% T.A./24 HORAS.	% REFRIG./24 HORAS.	% REFRIG./72 HORAS.
100.0	100.0	103.0	103.0
99.0	97.0	104.0	104.0
99.0	100.0	105.0	104.0
$y_0=99.3333$	$y_1=99.0000$	$y_2=104.0000$	$y_3=103.6666$
$s_0^2=0.3333$	$s_1^2=3.000$	$s_2^2=1.000$	$s_3^2=0.3333$
-----	I.C.= -2.7947 a	I.C.= 3.1100 a	I.C.= 3.2326 a
-----	2.1281.	6.2234.	5.4340.
-----	I = 99.6632%.	I = 104.7037%.	I = 104.3670%.

T.A. Temperatura ambiente.

Refrig. Refrigeración.

\bar{y} Media.

s^2 Varianza.

I.C. Intervalo de confianza.

I. Factor I.

ANEXO II

PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA DETERMINAR SI LA PENDIENTE Y LA ORDENADA AL ORIGEN SON ESTADÍSTICAMENTE IGUAL A UNO Y CERO RESPECTIVAMENTE

**LINEALIDAD DEL MÉTODO CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PREPARADA CON CDTA.
PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA LA PENDIENTE.**

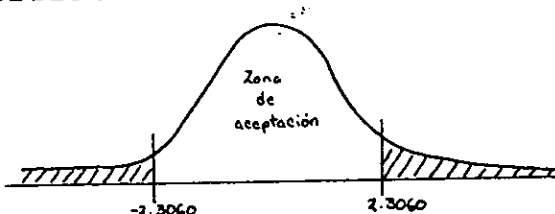
1. PLANTEAMIENTO.

$$H_0: m = 1.$$

$$H_a: m \neq 1.$$

2. MODELO ESTADÍSTICO. t-STUDENT.

3. REGLA DE DECISIÓN.



$$\alpha = 0.05$$

$$1 - \alpha/2 = 0.025$$

$$t_{0.975}(8) = 2.3060$$

$$g.l. = n-2.$$

4. CÁLCULOS.

$$S_x^2 = 1.2328$$

$$m = 0.9959$$

$$S_y^2 = 1.2234$$

$$n = 10$$

$$S_{y/x} = \sqrt{(n-1/n-2)(S_y^2 - m^2 S_x^2)}.$$

$$S_{y/x} = 2.8062 \times 10^{-2}$$

$$S_x = 1.1103$$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{m - \mu_0}{\frac{S_{y/x}}{\sqrt{n-1}(S_x)}}$$

$$t_{\text{calc.}} = -0.4866$$

5. DECISIÓN ESTADÍSTICA.

H_0 no se rechaza, por lo tanto la pendiente es estadísticamente igual a uno.

PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA LA ORDENADA AL ORIGEN.

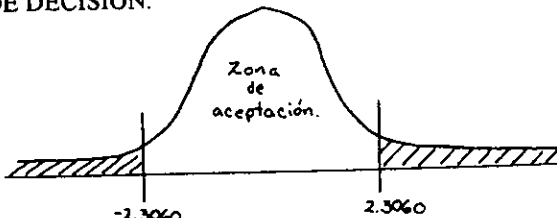
1. PLANTEAMIENTO.

$$H_0: b = 0.$$

$$H_a: b \neq 0.$$

2. MODELO ESTADÍSTICO. t-STUDENT.

3. REGLA DE DECISIÓN.



$$\alpha = 0.05$$

$$1 - \alpha/2 = 0.025$$

$$t_{0.975(8)} = 2.3060$$

$$g.l. = n-2.$$

4. CÁLCULOS.

$$S_x^2 = 1.2328$$

$$S_y^2 = 1.2234$$

$$m = 0.9959$$

$$n = 10$$

$$S_{yx} = \sqrt{(n-1/n-2)(S_y^2 - m^2 S_x^2)}.$$

$$S_{yx} = 2.8062 \times 10^{-2}$$

$$S_x^2 = 1.2328$$

$$\bar{x} = 1.32$$

$$n = 10$$

$$b = -0.00238$$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - B_0}{\frac{S_{yx}}{\sqrt{n}} + \frac{1}{(n-1)S_x^2}}$$

$$t_{\text{calc.}} = -0.1673$$

5. DECISIÓN ESTADÍSTICA.

H_0 no se rechaza, por lo tanto la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero.

**LINEALIDAD DEL MÉTODO CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA
PREPARADA A PARTIR DE CITRATOS.
PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA LA PENDIENTE.**

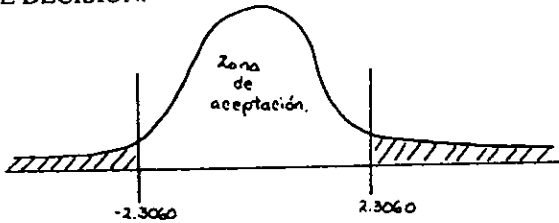
1. PLANTEAMIENTO.

$H_0: m = 1.$

$H_a: m \neq 1.$

2. MODELO ESTADÍSTICO. t-STUDENT.

3. REGLA DE DECISIÓN.



$\alpha = 0.05$

$1 - \alpha/2 = 0.025 \quad \text{g.l.} = n-2.$

$t_{0.975(8)} = 2.3060$

4. CÁLCULOS.

$S_x^2 = 1.2328$

$m = 0.9949$

$S_y^2 = 1.2205$

$n = 10$

$$S_{y/x} = \sqrt{(n-1/n-2)(S_y^2 - m^2 S_x^2)}$$

$S_{y/x} = 1.6516 \times 10^{-2}$

$S_x = 1.1103$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{m - \mu_0}{\frac{S_{y/x}}{\sqrt{n-1}(S_x)}}$$

$t_{\text{calc.}} = -1.0285$

5. DECISIÓN ESTADÍSTICA.

H_0 se acepta, por lo tanto la pendiente es estadísticamente igual a uno.

**ESTA TESTE NO DEBE
SALIR DE LA INDUSTRIA**

PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA LA ORDENADA AL ORIGEN.

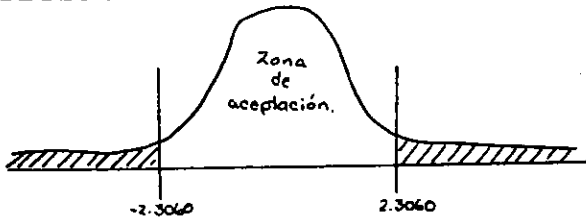
1. PLANTEAMIENTO.

$$H_0: b = 0.$$

$$H_a: b \neq 0.$$

2. MODELO ESTADÍSTICO. t-STUDENT.

3. REGLA DE DECISIÓN.



$$\alpha = 0.05$$

$$1 - \alpha/2 = 0.025 \quad \text{g.l.} = n-2.$$

$$t_{0.975(8)} = 2.3060$$

4. CÁLCULOS.

$$S_x^2 = 1.2328$$

$$m = 0.9949$$

$$S_y^2 = 1.2205$$

$$n = 10$$

$$S_{y/x} = \sqrt{(n-1/n-2)(S_y^2 - m^2 S_x^2)}.$$

$$S_{y/x} = 1.6516 \times 10^{-2}$$

$$\bar{x} = 1.32$$

$$b = -0.0149$$

$$S_x^2 = 1.2328$$

$$n = 10$$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - B_0}{\frac{S_{y/x}}{\sqrt{n}} + \frac{\bar{x}^2}{(n-1)S_x^2}}$$

$$t_{\text{calc.}} = -1.7797$$

5. DECISIÓN ESTADÍSTICA.

H_0 no se rechaza, por lo tanto la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Cuenca, E, Manau, C. y Serra, L.I. *Manual de Odontología Preventiva y Comunitaria*. España, Ed. Masson, 1991. Págs 13, 68, 69, 89, 90, 93.
2. Dean H.T. et al. "Studies on mass control of dental caries through fluoridation of the public water supply". *Publ. Health Rep.* 65(1): 403-408. 1950.
3. Organización Panamericana de la Salud. *Informe final sobre fluoruración y yodación de la sal de consumo humano*. Antigua Guatemala, Guatemala. 17-21 Noviembre, 1986. Págs 133-177.
4. Whitford, G.M., Callan, R.S. and Wang, H.S. "Fluoride absorption through the hamster cheek pouch: a pH dependent event". *J. Appl. Toxicol.* 2: 303-306. 1982.
5. Cremer, H.D. and Buttner, W. *Absorption of fluorides*. In: *Fluorides and human health*. Geneva. World Health Organization. Chapter 3: 75-91. 1970.
6. Whitford, G.M. and Pashley, D.H. "Fluoride absorption: the influence of gastric acidity". *Calcif. Tissue Int.* 36: 302-307. 1984.
7. Taves, D.R. and Guy, W.S. *Distribution of fluoride among body compartments*. In *Johansen, E., Taves, D.R. and Olson, T.O., edits. Continuing evaluation of the use of fluorides*. Boulder Co., Am. A. for the Advancement of Science. Selected Symposium 11. Westview Press. Chapter 7: 159-185. 1979.
8. Whitford, G.M. "Physiologic determinants of plasma fluoride concentrations. In: Shupe, J.L. et al., edits. *Fluorides: effects on vegetation, animals and humans*". Salt Lake City, Utah. Paragon Press. Págs 167-182. 1983.
9. Waterhouse, C, Taves, D.R. and Munzer, A. "Serum inorganic fluoride: changes related to previous fluoride intake, renal function and bone resorption". *Clin. Sci.* 58: 145-150. 1980.
10. Largent, E.J. "Rates of elimination of fluoride stored in the tissues of man". *Arch. Industr. Hyg.* 6: 37-42. 1952.
11. Vandeputte, M. et al. "A contribution to the study of fluoride excretion". *Clin. Chim. Acta.* 75: 205-212. 1977.
12. Martin, A. "Fluorid im 24-Stunden-Urin. Tagesprofile und beziehungen zum kreatinin bei trinkwasserfluoridierung und salzfluoridierung. Inaugural dissertation". *Juris Druck and Verlag*. Zurich, 1982.

13. Harris, C.D. *Análisis Químico Cuantitativo*. 3a ed. México, Ed. Grupo Editorial Iberoamérica, 1992.
14. Skoog, D.A. and West, D.M. *Análisis Instrumental*. 2a ed. México, Ed. Interamericana, 1985. Págs 562-577.
15. Velásquez V. G. y Pérez V. F. *Manual de Química Analítica. Determinación del pH*. México, FES-Zaragoza, UNAM, 1996. Págs 7-11.
16. Organización Panamericana de la Salud. *Uso del Equipo HACH Modelos 12320 y 12330 para determinaciones de pH/fluoruro*. Documento FDH/56. Sección dental. División de Salud de la Familia. Washinton, D.C. E.U.A., 1976. Págs 1-5.
17. Schenk, G.H. et al. *Química Analítica Cuantitativa*. México, Ed. CECSA, 1984. Págs 427-428.
18. Laboratorio Estatal de Salud Pública. *Curso Nacional de Técnicas de Análisis para el Monitoreo de Yodo y Fluoruro*. Toluca, Estado de México, 1993.
19. Orion Research. *Instruction manual fluoride electrode*. Massachusetts, 1982. Págs 7-10.
20. Corning. *Instruction Manual Corning Ion Selective Electrode*. E.U.A., 1997. Págs 9-15.
21. Orozco, F.D. *Análisis Químico Cuantitativo*. 16a ed. México, Ed. Porrúa, 1985.
22. *Standard Methods for the Examination of Water an Wastewater*. 16a ed. E.U.A., 1985. Págs 352-364.
23. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaria de Salud. México. *Guías Generales de Validación*. 1991. Págs 1-63.
24. LUAL. "Componentes para un programa de validación de métodos analíticos". *Pharma News*. 4(5): 39-40. 1993.
25. LUAL. "Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. El sistema de medición". 1ª parte. *Pharma News*. 4(7): 32-44. 1993.
26. *APHA Working Group's Bioequivalence Guidelines*. Scrip No. 1487, February 9 th, 1990. Págs 1-25.
27. LUAL. "Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. La exactitud del método analítico, el error sistemático proporcional o linealidad del método". 3ª parte. *Pharma News*. 4(10): 16-19. 1993.

28. LUAL. "Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. La exactitud del método analítico. El error sistemático constante". 2ª parte. **Pharma News**. 4(9): 24-25. 1993.
29. LUAL. "Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Precisión del método". 4ª parte. **Pharma News**. 4(11): 26-28. 1993.
30. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. *Norma Oficial Mexicana. Nom-Y-272-1985. Productos para uso Agropecuario-Fertilizantes-Ácido Fosfórico-Fluor-Método del Electrodo Selectivo*. Dirección General de Normas. 1985.