

Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*

Validation of an analytical method for the determination of boron in leaf samples of *Citrus reticulata*

Rodríguez, S. C.¹; Pellerano, R. G.; Romero, C. H.;
Acevedo, H. A. y Vázquez, F. A.

Resumen. Se desarrolló un método espectrofotométrico rápido y económico para la cuantificación de boro en tejido vegetal, usando quinalizarina como reactivo cromogénico. En el trabajo, se presenta la validación, evaluándose los parámetros de selectividad, especificidad, sensibilidad, linealidad, límite de detección y de cuantificación, exactitud, precisión y robustez. Los resultados demostraron que el método es selectivo y específico para boro, tiene sensibilidad, presenta buena linealidad y robustez en cuanto a las pequeñas variaciones de masa y tiempo, pero no con las variaciones de pH, las que sí inciden en los resultados obtenidos, comprometiendo la precisión del método.

Palabras clave: espectrofotometría, fase sólida, cítricos, micronutrientes, quinalizarina.

Abstract. A rapid and inexpensive spectrophotometric method for quantification of B in plant tissue using quinalizarina as chromogenic reagent was developed. In the validation work, the parameters evaluated were selectivity, specificity, sensitivity, linearity, limit of detection and quantification, accuracy, precision and robustness. The results showed that the method is selective and specific for Bn, is sensitive, has good linearity and robustness in terms of small variations in mass and time. However, we found that variations in pH affect the results obtained and this compromises the accuracy of the method.

I Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura Av. Libertad 5450-3400 Corrientes, Argentina.
Correo electrónico: rodrisil@agr.unne.edu.ar, silvicarlo@yahoo.com.ar

Keywords: spectrophotometry, solid phase, chromogenic reagent, quinalizarin citrus, micronutrients.

1. INTRODUCCIÓN

El boro (B) es un micronutriente esencial requerido por las plantas para su normal desarrollo y crecimiento. Sin embargo, a lo largo del tiempo se pudo comprobar que los rangos de concentración de este elemento en el suelo que causan síntomas de deficiencia o toxicidad en las plantas son más estrechos que para cualquier otro elemento, dependiendo de la especie botánica; por lo tanto, esta situación ha tenido una profunda influencia en la búsqueda del conocimiento del comportamiento del boro en la biósfera o el ambiente (Malavé Acuña, 2005).

Recientemente, se ha aceptado que el boro está implicado en el mantenimiento de la estructura de la pared celular, estabilizando la compleja red péptica y ayudando a regular el tamaño de los poros de la pared celular (O'Neill et al., 2004).

Todas las funciones que se le atribuyen al boro hacen que tenga una importancia fundamental en la formación de nuevos tejidos en los meristemas de crecimiento, en el proceso de polinización, crecimiento del tubo polínico, fecundación del óvulo y cuajado. La época de floración en cuajado en cítricos es la más crítica en cuanto a los requerimientos de boro. La concentración de boro en las flores es relativamente alta. Este boro proviene de las reservas del árbol. Para asegurar niveles adecuados en esta época se llevan fertilizaciones foliares. Las aplicaciones de boro tienen un efecto positivo en el cuaje, incluso cuando se encuentran niveles adecuados en los análisis foliares (Bar, 2010).

El boro puede ser tóxico para todos los organismos. La sensibilidad varía según la especie. Los cítricos son bastante sensibles a excesos de boro. La diferencia entre la concentración necesaria y la concentración potencialmente tóxica en el suelo en cítricos es muy estrecha. Para su desarrollo normal son suficientes 0,5-0,8 meq L⁻¹ de boro (0,5-0,8 mg L⁻¹). Árboles injertados sobre patrones sensibles pueden sufrir excesos de boro con concentraciones superiores a 1,0 meq L⁻¹. Por este estrecho margen, su aplicación debe ser hecha con sumo cuidado (Bar, 2010).

Cuando se pretende llevar a cabo planes nutricionales en cítricos, es necesario determinar la concentración de boro en la planta, sobre todo por la importancia que este tiene en la calidad de la fruta.

Para conocer el estado nutricional del cultivo, una técnica de diagnóstico es el análisis foliar. La concentración óptima de cada nutriente depende del papel que este desempeña en el metabolismo y es determinada experimentalmente. Así, la evaluación nutricional rutinaria de tejidos foliares consiste en la comparación de los resultados de laboratorio obtenidos para un cultivo de interés y los niveles propuestos como óptimos para dicho cultivo (Alvarado et al., 2004).

En esta ocasión, se desarrolló una metodología específica para la determinación de boro en el tejido foliar de mandarina (*Citrus reticulata*, Blanco) mediante espectrofotometría de absorción molecular en fase sólida (EFS). La técnica presenta como principales ventajas su sencillez, sensibilidad, versatilidad y facilidad de aplicación. La reacción utilizada con esta metodología es la de formación del quelato del éster de ácido bórico con un derivado de la antraquinona: la quinalizarina (1,2,5,8,-*tetra hidroxí antraquinona*).

El método podrá ser aplicado una vez validado. La validación de un método analítico es primordial en sistemas de calidad, provoca mayor fiabilidad y aceptación de los datos generados, estando estas en proporción con la calidad del proceso de obtención de estos (Shap, 2000).

La validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001).

La validación de un método de análisis consiste en “Confirmación mediante examen y provisión de evidencias objetivas que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico determinado” (ISO 8402).

Se trabajó para demostrar la viabilidad del método analítico desarrollado para la determinación de boro; para ello, se comprobaron parámetros, que servirían como pautas para la aplicación del método de espectrofotometría en fase sólida para la determinación de boro en muestras foliares de mandarina.

2. FASE EXPERIMENTAL

Reactivos

Solución estándar de boro para AAS (Trace CERT); ácido bórico (material puro) diluido en agua *Trace SELECT™ Ultra* (18.2 MΩ cm, 0,22 μm filtrado). Densidad a 20 °C: $\rho = 1000 \text{ kg m}^{-3}$; $u_c(\rho) = 0,5 \text{ kg m}^{-3}$.

Solución de 1, 2, 5, 8 – *tetrahidroxiantraquinona* (quinalizarina).

Solución de boro de diferentes concentraciones fueron preparadas a partir de una solución stock de 1000 ppm (Fluka).

Solución de tritón X-100 5% v/v éter octilfenol poli(etilenglicol): se utilizó solución al 5% a partir del reactivo comercial.

Solución de H₂SO₄ 0,9 M.

Solución de HCl 0,10 M.

Solución de NaOH 0,10 M.

La resina de adsorción seleccionada como soporte sólido fue Silica Gel, o gel de sílice. Para el análisis, la Silica Gel se activó secándose en horno mufla durante 2 h a 550 °C.

Todos los reactivos fueron preparados con agua de elevada pureza.

Materiales y equipos

Materiales de uso común en laboratorio: de plástico libre de boro.

pH-metro digital, electrodo combinado de vidrio, marca Altronix Tpx

Centrífuga marca Cavour VT-32165-DC 0-3500 rpm

Agitador mecánico rotativo 0-200 rpm

Medidas espectrofotométricas

Para las medidas absorciométricas y trazado de curvas espectrales en UV-VIS se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS haz simple (200-1100 nm), marca Metrolab 1700, controlado desde un PC, utilizando el programa Metrolab SF170, en cubetas de 1 mm de paso óptico y volumen útil de 0,240 ml con adaptador para portacubetas.

Tratamiento de las muestras botánicas

Se trabajó con muestras foliares de Mandarina (*Citrus reticulata*, Blanco) de las que

se tomó una pequeña masa (0,5 g) en un crisol de porcelana y se la mineralizó por vía seca mediante una calcinación a una temperatura de 550 °C en horno mufla. Se enfría y se extrae el boro con 10 ml de H₂SO₄ 5N, se calienta hasta ebullición, se deja reposar durante 1 h y se filtra (papel filtro Whatman 40)

Procedimiento

Del filtrado se toman alícuotas, se agrega el reactivo de quinalizarina en presencia del tensioactivo (Tritón X-100). La formación del complejo coloreado se completa en fase acuosa, en 15 min, para luego extraer con Silica Gel activada agitando durante 20 min. La fase sólida se separa por centrifugación (un minuto), se extrae el sobrenadante y se coloca la resina con el complejo coloreado en la cubeta de 1 mm de paso óptico y se lee en el espectrofotómetro UV-VIS a 466 nm. La cuantificación se realiza por comparación con respecto a una curva de calibración obtenida con soluciones patrones en el ámbito de 0-100 µg L⁻¹.

Proceso de validación

Para la determinación del desempeño del método propuesto se realizó el siguiente protocolo de validación.

Selectividad. En el análisis de la selectividad de un método, se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en porciones de prueba a las cuales deliberadamente se han introducido interferencias específicas (aquellas que se cree probablemente estén presentes en las muestras). Si no se está seguro de que las interferencias están presentes, la selectividad de un método se puede investigar estudiando su capacidad de medir el analito comparado con otros métodos o técnicas independientes (Eurachem, 2005).

Sensibilidad y Linealidad. La linealidad del método define la habilidad de este para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito (Eurachem, 2005). La sensibilidad se pone en evidencia por medio de la pendiente de la curva de calibrado (Skoog et al., 2005), cuanto mayor es la pendiente el método es más sensible.

Límite de detección y de cuantificación. El límite de detección se define como el menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable (Asociación de químicos analíticos oficiales, 2003). Se determina mediante el análisis de muestras con cantidades o concentraciones conocidas de analito (Molina, 2010).

El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad. También se define por diversas convenciones, como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 o 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Algunas veces también se conoce como “límite de determinación”. LOQ es un valor indicativo y no deberá usarse en la toma de decisiones (Eurachem, 2005).

Exactitud. La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero (ISO 3534-1). La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. La evaluación práctica de este parámetro se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, se determina contra un valor de referencia (o sea, un valor verdadero o un valor verdadero convencional) (Eurachem, 2005).

Precisión. La precisión es medida mediante la repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad. Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un tiempo corto.

Precisión intermedia. Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio (Eurachem, 2005).

Robustez. Es una medida de la capacidad que tiene el método analítico de permanecer inalterado por pequeñas variaciones en el procedimiento del método. Con ello, se puede inferir que las variables son más significativas a la hora de realizar las medidas y, por lo tanto, deben ser controladas (Jurado, 2008).

Prueba de robustez. Estudio dentro del laboratorio para evaluar el comportamiento de un proceso analítico cuando se efectúan pequeños cambios en las condiciones ambientales o de operación, semejantes a aquellos que pudieran surgir en los diferentes ambientes de prueba. La prueba de robustez permite obtener información de los efectos de cambios menores de una forma rápida y sistemática (Eurachem, 2005).

Análisis estadístico Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Infostat (2007).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selectividad. Estudios de interferencias

Por la complejidad de las matrices vegetales es necesario asegurarse de la eliminación de interferencias. La IUPAC (2001) en sus últimas recomendaciones ha definido la selectividad como “la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar”.

Al máximo de selectividad se denomina *especificidad*, es decir, un método será específico cuando la señal medida solo proviene del analito de interés (Compañó y Ríos, 2002).

Efectos de relaciones exteriores de iones

Con anterioridad, el equipo de trabajo (Rodríguez et al., 2011) realizó un estudio de las posibles interferencias en la determinación de boro con los iones que comúnmente se encuentran en la matriz vegetal, en cantidades que oscilan hasta 10,0 mg L⁻¹ con 20 mg de boro. Un error relativo inferior al 5% fue considerado dentro del rango del error experimental, por lo que se considera que estos iones estudiados no interfirieron en la determinación de boro al producirse un error relativo inferior a ± 5%. Los límites de tolerancia para los iones estudiados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Límite tolerado (desviación mayor del 5% de la señal esperada) para iones extraños de aparición frecuente en la matriz estudiada (ICH, 1995)

Especie química	Límite tolerado (mg L ⁻¹)
Na(I), K(I), Cl(I), NO ₃ (I)	10,0
Ca(II), PO ₄ (III)	5,0
Al(III), Ba(II), Mg(II)	1,0
As(III), Cr(III)	0,9
Cu(II), Co(III), Zn(II)	0,7
Cd(II), Ge(IV), Mo(VI)	0,5
Fe(III)	0,2

Nota: Concentración de boro: 20 mg L⁻¹

Fuente: ICH (1995).

Sensibilidad

Con el fin de determinar el intervalo de concentración en el que se cumple la ley de Beer, se construyó la curva de Ringbom (Suárez et al., 2009) para la cual se preparó una serie de soluciones patrones de distintas concentración de boro leyéndose por triplicado (ver figura 1).

La parte lineal de esta gráfica permite obtener el intervalo de concentraciones óptimo o el intervalo que presentará una relación lineal entre absorbancia y concentración. La linealidad debe ser establecida mediante una inspección visual y debe observarse que el comportamiento de la respuesta analítica está en función de la concentración del analito (Australian Pesticides, and Veterinary Medicines Authority [APVMA], 2004). Por lo tanto, al evaluar la curva se observa que el comportamiento lineal se limita hasta una concentración aproximadamente de 100 mg L⁻¹ de boro.

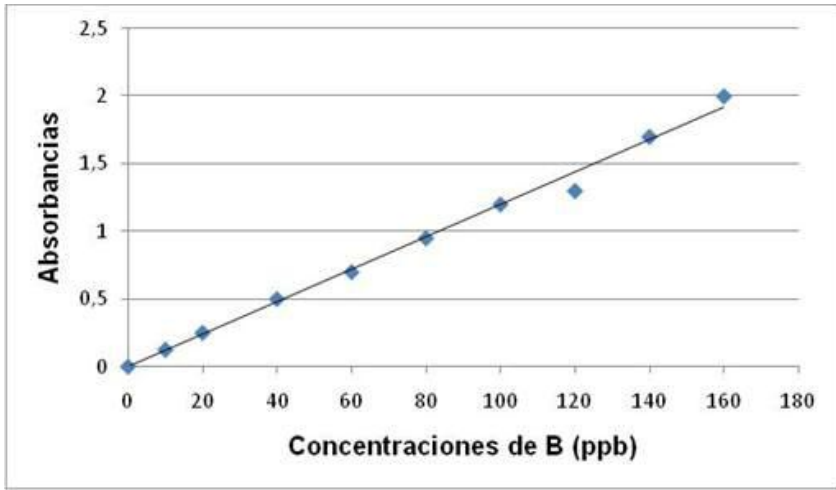


Figura 1. Curva de Ringbom para determinaciones de boro

La sensibilidad se pone en evidencia por medio de la pendiente de la curva de calibrado (ver figura 2), cuanto mayor es la pendiente el método es más sensible (Skoog et al., 2005).

La linealidad determina la región de la curva respuesta o de cuantificación en la que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado (Leite, 2001), el cual es un método lineal (International Conference Harmonization [ICH], 1995) cuando presenta una $r > 0,99$. Cumpliendo en este caso con este requisito, podemos afirmar que el método es lineal.

En la figura 2, se puede apreciar que la pendiente de la recta de la curva patrón fue de 0,012, lo que indica también una buena sensibilidad del método, la cual es entendida como la capacidad de este de distinguir, con determinado nivel de confianza, dos concentraciones próximas (ICH, 1995; Leite, 2002).

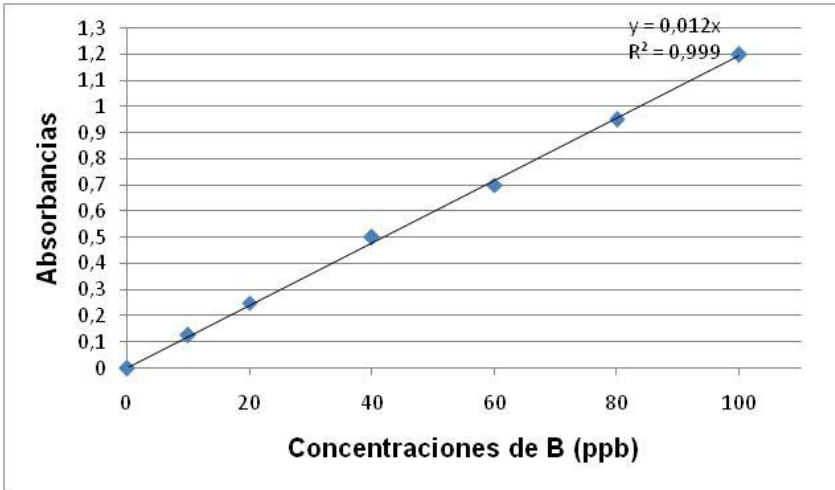


Figura. 2. Curva de calibración. (Fuente: Skoog *et al.*, 2005).

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

El LD es la concentración más pequeña que se puede detectar en un cierto nivel de confianza.

En los casos donde se emplea una curva de calibrado, se define al LD como la concentración del analito que produce una respuesta con un factor de confianza k mayor que la desviación estándar del blanco (s_b) (Skoog *et al.*, 2005). La ecuación correspondiente para determinar el LD es:

$$LD = k s_b m^{-1}$$

Donde:

m = es la sensibilidad (pendiente de la curva de calibración).

La IUPAC ha sugerido que el criterio para el valor de la constante k sea 3 (Suárez *et al.*, 2009).

El LQ es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con un aceptable nivel de incertidumbre. La ecuación correspondiente para determinar el LQ es

$$LOQ = k s_b m^{-1}$$

Donde:

k es igual a 10.

Para la determinación de estos límites se prepararon 10 muestras blanco según el procedimiento ya descrito y se efectuaron las lecturas de absorbancias. Estas se realizaron en distintos tiempos del ensayo, y se obtuvo los siguientes resultados:

DE: 0,007; m: 0,0107

LD = 1,96 $\mu\text{g L}^{-1}$

LQ = 6,54 $\mu\text{g L}^{-1}$

Exactitud

Da cuenta de la proximidad entre el resultado obtenido por un método y el valor “real”. Es un parámetro que expresa la proximidad de la media de una serie de resultados obtenidos con el método al valor real. Generalmente, se expresa respecto del error, definido como la diferencia entre el resultado de medida y el valor real (Compañó y Ríos, 2002). Este parámetro se evaluó por medio de ensayos de recuperación.

Los criterios de aceptación para este parámetro son (ICH, 1995):

- Los porcentajes de recuperación obtenidos deben encontrarse dentro del 100% +/- 4S donde S es la mayor desviación estándar obtenida.
- Al graficar la respuesta del ensayo (cantidad total encontrada) contra la cantidad de analito adicionada, la pendiente debe ser mayor o igual a 0,95 y el intercepto debe ser igual a la concentración inicial.

Recuperación

Se prepararon por triplicado soluciones de boro en diferentes concentraciones (0, 20, 30, 60, 80 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$), se determinó la recuperación media y la desviación estándar relativa (DER).

El porcentaje de analito recuperado se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = (X/X_a) \times 100 \text{ (The United States Pharmacopeia - USP XXVI, 2003)}$$

Donde:

%R: porcentaje de recuperación

X: cantidad de analito hallado

Xa: cantidad de analito añadido

El porcentaje de recuperación entre el 98 y el 102%, que según los criterios antes descrito estaría dentro del rango aceptable (ICH, 1995).

Tabla 2. Exactitud del método por ensayo de recuperación

Muestras	Muestras incorporadas 20 µg L ⁻¹	Muestras incorporadas 30 µg L ⁻¹	Muestras incorporadas 60 µg L ⁻¹	Muestras incorporadas 80 µg L ⁻¹	Muestras incorporadas 100 µg L ⁻¹
Absorbancias	0,064 0,067 0,065	0,173 0,172 0,177	0,203 0,202 0,205	0,279 0,258 0,280	0,309 0,405 0,380
Absorbancias medias	0,0653	0,174	0,2033	0,2752	0,3645
DER	0,0534	0,0218	0,0102	0,0351	0,1038
Porcentaje de recuperación	100,04%	99,87%	100,01%	98,96%	100,04%

Fuente: USP XXVI (2003)

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante una figura de relación entre la cantidad de boro de la muestra y la cantidad de boro sobreagregada. Se observó una escasa dispersión de los datos obtenidos del ensayo de recuperación (ver figura 3).

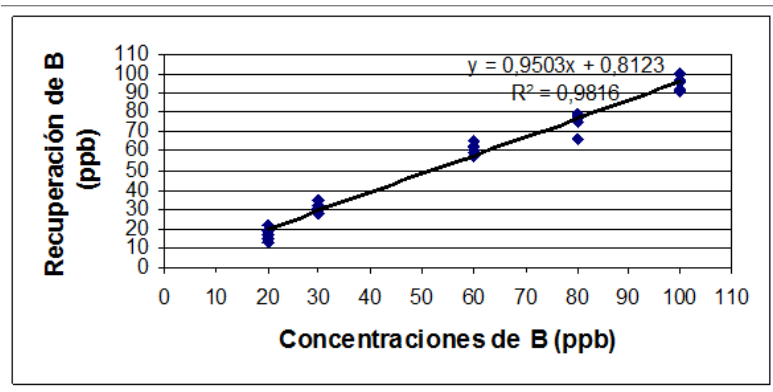


Figura 3. Relación unitaria entre la cantidad de boro en la muestra y la cantidad de boro recuperada. (Fuente: ICH, 1995).

Al graficar la respuesta de ensayo de la cantidad total encontrada contra la cantidad de analito adicionada, la pendiente que obtuvimos fue de 0,95, estando este valor dentro de los criterios de aceptación para este parámetro.

Precisión

Refleja la reproducibilidad de las medidas, es decir, la cercanía entre los resultados obtenidos entre sí (Skoog *et al.*, 2005). Es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas ISO 3534-1:19932 (Suárez *et al.*, 2009). Esta fue verificada evaluándose las condiciones de repetibilidad (ensayo hecho en el mismo día), como se puede observar en la tabla 3, y precisión intermedia, para lo cual se prepararon soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Las determinaciones fueron realizadas tres veces en el mismo día ($n = 3$) y en dos días diferentes ($n = 6$), determinándose con los resultados obtenidos la desviación estándar relativa (DER), como se observa en la tabla 4.

Tabla 3. Valores de repetibilidad

Soluciones patrones					
Boro [$\mu\text{g L}^{-1}$]	20	40	60	80	100
A ₁	0,068	0,177	0,210	0,242	0,279
A ₂	0,068	0,175	0,208	0,243	0,277
A ₃	0,069	0,178	0,208	0,241	0,276
A media	0,068	0,177	0,209	0,242	0,277
DER	0,0084	0,0086	0,0055	0,00413	0,0055
CV	0,84	0,86	0,55	0,41	0,55

Fuente: Suárez *et al.* (2009)

Tabla 4. Valores de precisión intermedia

Soluciones patrones						
$\mu\text{g L}^{-1}$		20	40	60	80	100
Día 1	A ₁	0,064	0,175	0,207	0,239	0,275
	A ₂	0,064	0,176	0,208	0,241	0,277
	A ₃	0,065	0,172	0,204	0,239	0,275
Día 2	A ₁	0,066	0,175	0,198	0,239	0,278
	A ₂	0,066	0,177	0,208	0,235	0,278
	A ₃	0,065	0,175	0,207	0,240	0,274
A media		0,065	0,175	0,205	0,239	0,277
DER		0,01376	0,0096	0,0189	0,00854	0,00624
CV		1,38	0,96	1,89	0,85	0,62

Fuente: Suárez *et al.*, (2009)

Los valores de DER por debajo del 1% en análisis de repetibilidad y por debajo del 2% en análisis de precisión intermediaria son considerados aceptables.

Evaluación de la robustez

Es una medida de la capacidad que tiene el método analítico de permanecer inalterado por pequeñas variaciones en el procedimiento del método. Con ello, se puede inferir que las variables son más significativas a la hora de realizar las medidas y, por lo tanto, deben ser controladas (Jurado, 2008).

El objetivo de la robustez es describir bajo qué condiciones establecidas (incluidas sus tolerancias) se pueden obtener resultados confiables, de manera que el procedimiento funcione, si se utiliza en otros laboratorios o después de intervalos de tiempo largo (Organismo Argentino de Acreditación [OAA], 2003) o con pequeños cambios en la rutina. Un método es más robusto cuanto menos dependa de una rutina estricta. Los valores de los coeficientes de variación (CV) encontrados y puestos en evidencia en las tablas anteriores permiten aseverar condiciones de robustez.

La robustez se evaluó, además, considerando la influencia del pH, el tiempo mínimo de contacto a partir del cual se alcanza la señal máxima y de la masa de resina. Para evaluar la influencia del pH, se prepararon soluciones de boro de 1 mg L^{-1} con diferentes pH 0,75, 1,25, 1,75, 2,61, 3, 3,45 y 4. La influencia de la masa de resina se determinó agregando diferentes cantidades de masa de resina (50 mg a 100 mg) a soluciones que contenían la misma concentración de boro y, finalmente, para determinar el tiempo mínimo de contacto a partir del cual se alcanza la señal máxima, se repitió la metodología en 7 muestras de igual concentración del analito pero sometidas a diferentes tiempos de agitación entre 10 y 40 min. En todos los casos, las lecturas se efectuaron a 466 nm.

Al evaluarse la capacidad del resultado de no sufrir alteraciones por pequeñas modificaciones en los parámetros del análisis, se comprobó que los distintos tiempos de contactos (entre 15 y 20 min) y las pequeñas modificaciones de la cantidad de masa de resina no interfieren en los resultados obtenidos (ver figuras 4 y 5); sin embargo, los cambios en los valores de pH pueden interferir en la cuantificación del analito (ver figura 6).

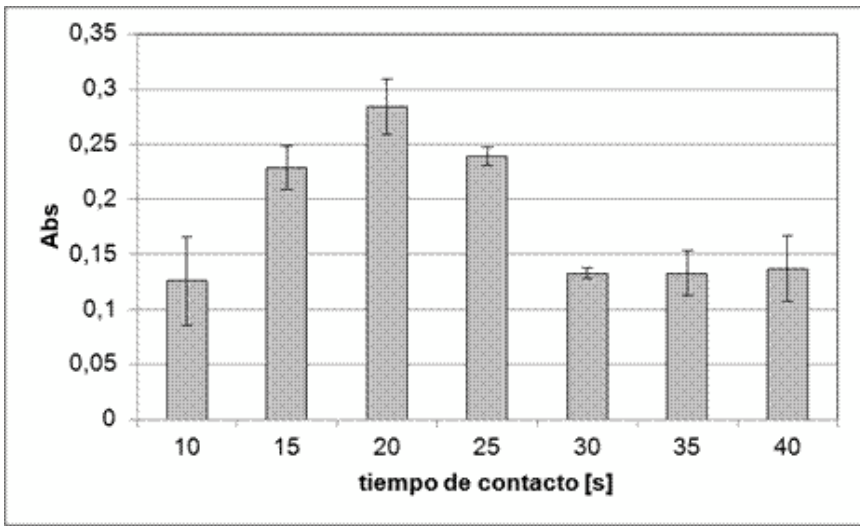


Figura 4. Variación de la absorbancia neta medida en función de diferentes tiempos de contacto (50 ml de muestra, 10 mg L⁻¹ boro). (Fuente: Eurachem, 2005).

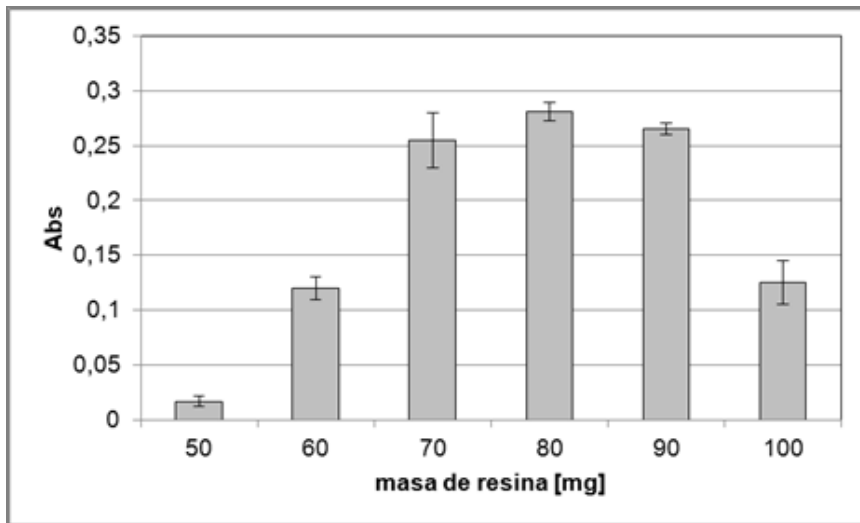


Figura 5. Variación de la absorbancia neta medida utilizando diferentes cantidades de resina (50 ml de muestra, 10 mg L⁻¹ boro). (Fuente: Eurachem, 2005).

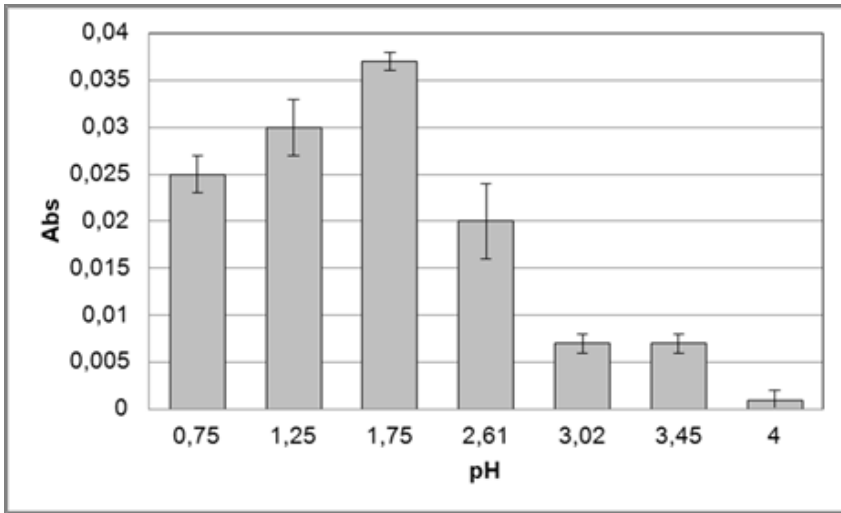


Figura 6. Influencia del pH (50 ml de muestra, 10 mg L⁻¹ boro). (Fuente: Eurachem, 2005).

4. CONCLUSIONES

La técnica propuesta para determinar boro utilizando la espectrofotometría de absorción molecular en fase sólida es selectiva y específica, presenta buena linealidad en el rango de concentraciones estudiada y los porcentajes de recuperación de la prueba adición/recuperación están dentro de los criterios de aceptación. En los ensayos de repetibilidad el coeficiente de variación fue menor del 1% y el de precisión intermedia menor del 2%, exhibiendo la precisión del método. Se comprobó la robustez en cuanto a las pequeñas variaciones de masa y tiempo de contacto, pero no con las variaciones de pH, las que sí inciden en los resultados obtenidos, comprometiendo la reproducibilidad del método, que es explicable por el cambio en las condiciones de complejación.

Se puede expresar, entonces, que se desarrolló un método de fácil manejo y aplicación, rápido, de bajo costo, realizable en laboratorios de baja y mediana complejidad con confiabilidad aceptable.

REFERENCIAS

Alvarado, A. L.; Yglesias, J. M. y Güell, O. (2005). Análisis multielemental de material foliar por medio de ICP-MS. *Agronomía Costarricense*. 29(1), 17-27.

- Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (2003). *Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures*, Arlington, Va. (Estados Unidos): Ed. Association of Official Analytical Chemists.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) (2001). *Validación de métodos analíticos*. Barcelona: Edición Hewlett Packard.
- Australian Pesticides, and Veterinary Medicines Authority (APVMA) (2004). *Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products*. Kingston
- Bar, Y. (2010). El boro en los cítricos. En *VII Seminario Internacional de Cítricos* (pp. 20-25). Lima: Citrinotas-Procitrus-Boletín Informativo Trimestral, 44..
- Compañó, R. y Ríos, A. (2002). *Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos*. Madrid: Síntesis.
- International Conference Harmonization (ICH). (1995, 29 de noviembre). Note for guidance on validation of analytical methods: methodology. International Conference on Harmonization. Yokohama, Japón.
- Infostat/Profesional. (2007). Universidad Nacional de Córdoba. Estadística y Diseño. FCA. Versión 1.1.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (2001). Selectivity in analytical chemistry. *Pure & Applied Chemistry*, 73(8). 1381-1386.
- Jurado, J. M. (2008). Aplicación de Microsoft Excel a la química analítica: validación de métodos analíticos. Sevilla: Universidad de Sevilla-Departamento de Química Analítica.
- Leite, F. (2002). *Validação em análise química* (4.ª ed.). Campinas (SP): Átomo.
- Malavé Acuña, A. (2005). Los suelos como fuente de boro para las plantas. *Revista Científica UDO Agrícola*, 5(1), 10-26.
- “Métodos analíticos adecuados a su propósito” (2005). *Guía de laboratorio para la validación de método y temas relacionados* (2.ª ed.). México: Eurachem-Publicación técnica CNM-MRD-PT-030, CENAM-Los Cués, Qro.
- Molina, G. (2010). *Validación de métodos analíticos físico-químicos. Guía Técnica*. (pp. 1-38). México: CONACYT.
- Norma ISO 8402-1994. Gestión y garantía de la calidad.
- Norma ISO 3534-1:1993. Statistics-Vocabulary and symbols - Part 1. Probability and general statistical terms.
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA) (2003, septiembre). Guía para validación de

métodos de ensayo. Versión 1.

O'Neill, M. A. et al. (2004). Rhamnogalacturosam II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annal Review Biology* 55(1), 109-139.

Rodríguez, S. C.; Romero, C. H.; Pellerano, R. G.; Acevedo H. A. y Vázquez, F. A. (2011). Simple and sensitive determination of boron in botanical samples. Batch solid phase spectrophotometry. *The Environmental Science: An Indian Journal. Trade Science INC India*.

Shap J. (2000). *Quality in manufacture of medicines and other healthcare products*. Part 5: Quality control (pp. 283-358). Londres: Pharmaceutical Press.

Skoog, D.; West, D.; Holler, J. y Crouch, S. (2005). *Fundamentos de química analítica* (8.ª ed.). Barcelona: Editorial Reverté.

Suárez, R. et al. (2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en Química*, 4(2), 53-62.

The United States Pharmacopeia. USP XXVI. (2003). Rockville: United States Pharmaceutical Convention. Formulary XXVI



Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Rodríguez, Silvia C*, Pellerano, Roberto G., Romero, César H., Acevedo, Hugo A., Vázquez, Francisco A. Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de <i>Citrus reticulata</i> Revista Tumbaga (2012), 7, 55-71	Día/mes/año 15/10/11	Día/mes/año 27/03/12