

CONSIDERACIONES TEORICO-PRACTICAS ACERCA DE LOS LIMITES DE DETECCION EN ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION

I.Q. TOMAS BENSE, ISABEL DOL *

I. Generalidades

Junto a los criterios de exactitud, precisión y sensibilidad, el de "límite de detección" desempeña un rol de fundamental importancia en la caracterización de un método analítico. Sobre este concepto se ha escrito mucho en la literatura especializada, existiendo considerable confusión en la terminología empleada así como en los procedimientos de cálculo adoptados para expresarlo cuantitativamente.

Siguiendo los criterios más aceptables [3, 4, 6, 7, 8, 9, 10] definiremos el límite de detección de una sustancia según un dado procedimiento analítico completo, como la menor concentración (o cantidad) de dicha sustancia que puede ser cualitativamente detectada con un nivel de confianza especificado. Conviene destacar varios aspectos de esta definición.

En primer lugar, se hace referencia a un procedimiento analítico completo [4]. Obedece esto al hecho de que, a lo largo de las diversas operaciones que componen dicho procedimiento, y que pueden culminar por ejemplo en una medida instrumental, actúan diferentes factores que introducen perturbaciones aleatorias determinantes de cierta dispersión de los valores obtenidos cuando se efectúan réplicas de un dado análisis. Estos factores son muy variados, pudiendo ser de naturaleza operatoria, instrumental, etc. Parece razonable englobar estas perturbaciones bajo la designación general de "ruido analítico" [4]. No debe olvidarse que todo experimento que se diseñe con la

*Cátedra de Análisis Instrumental, Facultad de Química.

finalidad de evaluar el límite de detección de un método analítico debe ser realista, en el sentido de permitir la intervención de tales factores aleatorios en condiciones similares a las dadas en la práctica usual de dicho método analítico. Téngase en cuenta, por ejemplo, que el límite de detección puede depender de la composición de las soluciones de las muestras y el blanco: la presencia de interferencias puede hacer que se obtenga límites de detección muy diferentes cuando se trabaja con soluciones puras del analito que cuando se aplica el método a problemas reales. Por otra parte, esta dependencia del límite de detección con las condiciones experimentales debe ser manejada con prudencia. En efecto, no debe incurrirse en el error de aceptar un límite de detección accidental impuesto por la incapacidad de un instrumento para detectar fluctuaciones de la señal analítica.

Volviendo a la definición de límite de detección señalemos que hace referencia a la mínima concentración o cantidad de sustancia "cualitativamente" detectable. Esto es comprensible pues a los niveles de concentración próximos al límite de detección la desviación standard relativa (coeficiente de variación) de una señal analítica, absorbancia por ejemplo, suele ser mayor de 0.25, y pretender mejorar su precisión constituye una contradicción al concepto mismo de límite de detección.

Por último, la definición de límite de detección, al referirse a un "nivel de confianza especificado" destaca el carácter estadístico de este concepto, lo cual se comprende dada la naturaleza aleatoria de las perturbaciones que enmarcan la señal analítica a medida que la concentración del analito se aproxima al límite de detección.

2. Límite de detección y sensibilidad

El valor numérico del límite de detección es, como lo señaláramos al principio, un valioso criterio para caracterizar un método analítico y compararlo con otros métodos. Cuanto menor es el valor de dicho límite más eficiente es el método en cuestión para detectar la presencia del analito. En tal sentido debe evitarse el error, bastante frecuente incluso en textos de química analítica, de considerar sinónimos "límite de detección" y "sensibilidad". Nos referiremos brevemente a este último concepto.

En todo método analítico instrumental vamos a tener una señal analítica S que estará relacionada con la concentración c

(o la masa) de la sustancia investigada a través de cierta función matemática de manera que, en general, podremos escribir:

$$S = f(c) \quad (1)$$

La representación gráfica de S en función de c constituye la "curva de calibración" o "curva de trabajo" y usualmente se determina experimentalmente mediante soluciones patrón. En el caso particular de la espectrofotometría de absorción, la señal analítica es la absorbancia A y, si se cumple la ley de Bouguer-Beer, la forma de la (1) es la de una recta con ordenada en el origen nula.

A partir de la (1) podremos definir la "sensibilidad de calibración", m [6, 10, 11].

$$m = \left(\frac{dS}{dc} \right)_c \quad (2)$$

y la "sensibilidad analítica", γ ,

$$\gamma = \frac{m}{s} \quad (3)$$

donde s es la desviación standard en las medidas de S . Evidentemente, la sensibilidad analítica aporta más información que la sensibilidad de calibración, ya que depende de la pendiente de la curva de calibración y de la precisión del método. Además, debe señalarse que las unidades en que se expresa m dependen de las unidades de la medida instrumental, mientras que las de γ serán siempre conc. (o masa⁻¹). Puede también demostrarse [11] que la sensibilidad analítica es independiente de la escala de medida utilizada.

3. Objeto de este trabajo

El presente trabajo no pretende ser una revisión de los diferentes criterios propuestos para evaluar el límite de detección de un método analítico: en las citas bibliográficas que damos al final se puede encontrar abundante información en tal sentido. En nuestro caso simplemente hemos seleccionado y desarrollado los criterios que creemos más adecuados y prácticos, ilustrándo-

los con ejemplos de cálculo a partir de medidas experimentales efectuadas en nuestro laboratorio, concretándonos al caso de la espectrofotometría de absorción.

En particular discutimos dos procedimientos: el primero se basa en medidas en blanco contra blanco recurriendo luego a la curva de calibración, mientras el segundo aprovecha la información aportada por la curva de calibración y su corredor de confianza. Según las circunstancias, los resultados de ambos métodos pueden ser equivalentes o diferir, siendo el segundo de ellos el más confiable y general, aunque exija mayor volumen de cálculos.

4. Cálculo de límites de detección a partir de medidas de blanco contra blanco y de la curva de calibración

El "ruido analítico" asociado a todo procedimiento espectrofotométrico determina cierta dispersión de los valores obtenidos cuando se mide repetidamente la absorbancia de una dada **solución contra un blanco. Incluso cuando la concentración del analito es nula esta variación persiste, y una repetición de medidas de absorbancia de un blanco contra otro conducirá a un conjunto de valores que en general diferirán entre sí. Es usual adoptar la media \bar{A} de las N medidas realizadas como el mejor estimador de la verdadera media, μ , de la población de la cual se extrajo la muestra de N medidas.**

En el caso de las medidas de un blanco contra otro, si el procedimiento analítico está bien diseñado y las condiciones operativas son correctas, la media verdadera será $\mu_0 = 0$, y las medias experimentales \bar{A}_0 obtenidas de muestras de N medidas se distribuirán en torno a dicha media. Supondremos que tal distribución es normal. Esta suposición es a veces admitida sin reparos [1, 3] y otras veces cuestionada en sus aplicaciones a los resultados en química analítica [2, 5]. Por otra parte, de acuerdo al Teorema del Límite Central [15] cualquiera que sea la forma de la distribución de frecuencias de la población original, la distribución de las medias de muestras aleatorias de tamaño N **tiende a hacerse normal al crecer N. En consecuencia, nuestra suposición de normalidad será tanto menos objetable cuanto mayor sea el número de medidas realizadas.**

La varianza σ^2 de la población la desconocemos, pero su estimador s^2 podrá obtenerse a partir de una investigación experimental previa. Los grados de libertad de s^2 dependerán del

número n de medidas a partir de las cuales se estimó. En el caso de que s^2 se evalúe con los mismos datos experimentales con que se obtiene \bar{A}_0 , evidentemente resultará $n = N$. En problemas asociados al establecimiento de límites de detección se consideran en general concentraciones relativamente débiles del analito, siendo también bajas las correspondientes absorbancias. Bajo tales condiciones es usual considerar aproximadamente constante la varianza de las medidas de absorbancia realizadas sobre blancos ($c = 0$) y sobre soluciones del analito próximas al límite de detección [1, 3] lo cual tiene una aceptable confirmación experimental.

Puesto que aun en ausencia del analito la media muestral de absorbancias, \bar{A} , puede ser un número diferente de cero, será conveniente establecer un valor crítico de absorbancia, llamémoslo $A_{0,L}$, tal que para todo valor $\bar{A} \leq \bar{A}_{0,L}$ podamos afirmar, con razonable probabilidad de no equivocarnos, que \bar{A} pertenece a la población de media $\mu_0 = 0$. En términos estadísticos, dada una muestra de media \bar{A} , extraída de una población de media desconocida μ , formularemos la hipótesis de que $\mu = \mu_0 (= 0)$. Para contrastar la verdad o falsedad de esta hipótesis recurriremos a una prueba estadística que consistirá en determinar qué valores de algún estadístico ("región crítica") nos harán rechazar la hipótesis y cuáles aceptarla.

Puesto que en nuestro caso no se conoce σ , el más adecuado será el estadístico "t" de Student:

$$t = \frac{A_0 - \mu_0}{s\sqrt{N}} = \frac{\bar{A}_0}{s} \sqrt{N} \quad (4)$$

o sea,

$$\bar{A}_0 = t \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (5)$$

La distribución de t se asemeja mucho a la normal, y para valores muy grandes de n, caso en que resulta $s \approx \sigma$, la distribución muestral de t será casi idéntica a la del estadístico $z = (\bar{A}_0 - \mu_0)\sqrt{N}/\sigma$, es decir a la distribución normal.

Debemos fijar ahora un valor crítico para t tal que el correspondiente valor de \bar{A}_0 de la (5) sea el valor $\bar{A}_{0,L}$ que buscamos.

La fig. 1 representa la distribución muestral de \bar{A}_O . La probabilidad de que la variable tome valores comprendidos entre dos puntos cualesquiera de la abscisa es el área bajo la curva comprendida entre dichos puntos.

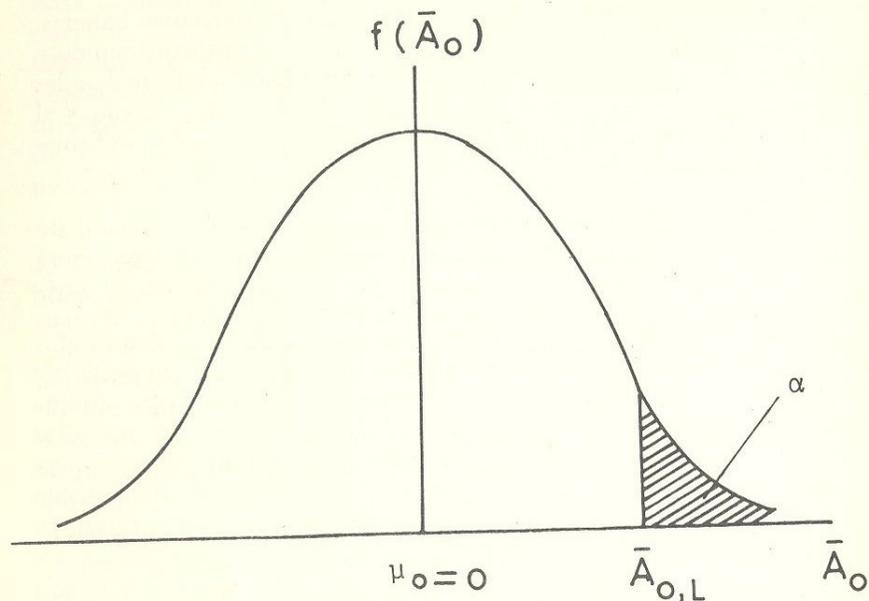


FIG. 1

La naturaleza física del problema que estamos considerando nos hará rechazar la hipótesis inicial sólo si el valor de \bar{A} está muy alejado de la media en una sola dirección, la de los valores mayores de cero: será pues una prueba estadística unilateral o de "una cola". Podríamos por ejemplo tomar como valor crítico $\bar{A}_{O,L}$ un valor de \bar{A}_O tal que el área α bajo la curva por encima de este valor, área que representa la probabilidad de rechazar la hipótesis cuando es verdadera (error de tipo I) sea razonablemente pequeña, por ejemplo, $\alpha = 0.05$. Esta probabilidad es el nivel de significación de la prueba. El correspondiente valor de t , que simbolizaremos por $t_{\alpha, (n-1)}$, donde $(n-1)$ hace referencia a los grados de libertad de s^2 , se obtendrá de las tablas de percentiles de la distribución t . Téngase en cuenta que si se utiliza una tabla de dos colas deberá tomarse el valor

de t correspondiente a un nivel de significación de 2α y $(n-1)$ grados de libertad. Podemos calcular ahora $\bar{A}_{O,L}$:

$$\bar{A}_{O,L} = t_{\alpha, (n-1)} \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (6)$$

Si el valor \bar{A} obtenido para una solución desconocida resulta mayor que $\bar{A}_{O,L}$ descartaremos la hipótesis de que $\mu = \mu_0 (= 0)$.

El valor $\bar{A}_{O,L}$ se halla asociado a través de una curva de calibración $\bar{A} = \phi(c)$ a cierta concentración del analito. Podría pensarse que dicha concentración es el límite de detección buscado: éste constituye un error bastante frecuente. Es fácil comprender las razones por las cuales $\bar{A}_{O,L}$ no es la absorbancia a partir de la cual puede hallarse dicho límite.

En efecto, $\bar{A}_{O,L}$ determina cierto límite crítico por encima del cual la probabilidad de cometer un error tipo I, es decir, rechazar la hipótesis cuando es verdadera, se hace menor que cierto valor prefijado. En tal sentido $\bar{A}_{O,L}$, o la concentración correspondiente, pueden ser llamados "límite de decisión" [2, 4, 5].

Sin embargo, no debemos olvidar que simultáneamente existe la posibilidad de cometer otro tipo de error: aceptar la hipótesis cuando es falsa (error de tipo II), es decir declarar ausente al analito cuando realmente está presente.

Supongamos por ejemplo que la absorbancia \bar{A} de una solución problema pertenece a una población de media $\mu > \mu_0$. En la fig. 2 se representan las distribuciones muestrales correspondientes a las poblaciones de media μ_0 y μ . Nótese que si adoptamos el límite crítico $\bar{A}_{O,L}$ el riesgo que corremos de aceptar la hipótesis $\mu = \mu_0$ cuando es falsa, y que viene dada por el área β , puede ser considerable. Del concepto mismo de límite de detección se desprende que éste debe corresponder a un valor μ_D tal que el riesgo sea pequeño, no superando un valor prefijado que puede ser, por ejemplo, del mismo orden que α . La situación descrita se representa en la fig. 3 para el caso $\alpha = \beta$. Es evidente que

$$\mu_D = \bar{A}_{O,L} + t_{\beta, (n-1)} \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (7)$$

$$\mu_D = t_{\alpha, (n-1)} \frac{s}{\sqrt{N}} + t_{\beta, (n-1)} \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (8)$$

y, si $\alpha = \beta$,

$$\mu_D = 2t_{\alpha, (n-1)} \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (9)$$

La concentración correspondiente a μ_D , es decir, el valor del límite de detección, se obtendrá a partir de la curva de calibración. Si la ecuación de dicha curva es de la forma $\bar{A} = kc$ la concentración correspondiente al límite de detección resultará

$$C_D = \frac{\mu_D}{k} = \frac{2}{k} t_{\alpha, (n-1)} \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (10)$$

Además el límite de detección es importante, desde el punto de vista del análisis cuantitativo, el llamado "límite de determinación" [2, 5] que es aquella concentración por encima de la cual la determinación cuantitativa comienza a ser razonablemente precisa. Podemos adoptar, por ejemplo, aquel nivel de concentración para el cual la desviación standard de las medidas de absorbancia es una fracción pequeña del valor verdadero (μ_a) eligiéndose usualmente el valor 0.1 para dicha fracción.

Tendremos pues:

$$\frac{s/\sqrt{N}}{\mu_a} \leq 0.1 \quad (11)$$

La correspondiente concentración, c_a , será el límite de determinación, y suponiendo el caso en que $\bar{A} = kc$,

$$c_a = \frac{\mu_a}{k} = \frac{10s}{k\sqrt{N}} \quad (12)$$

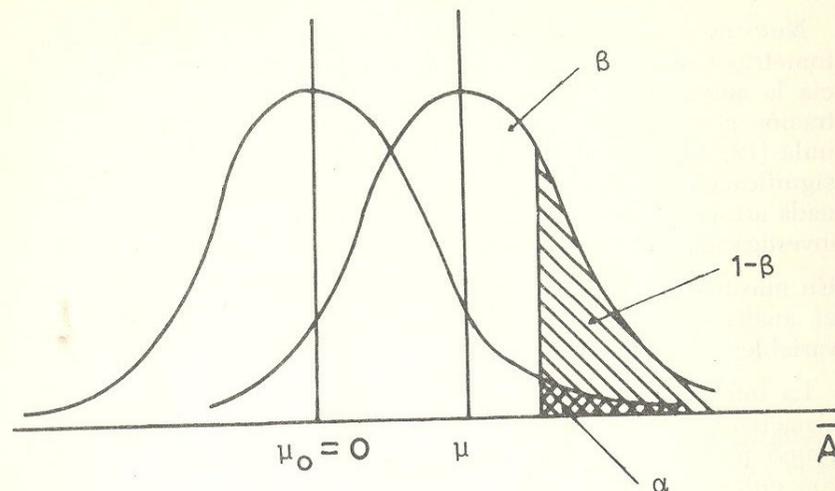


FIG. 2

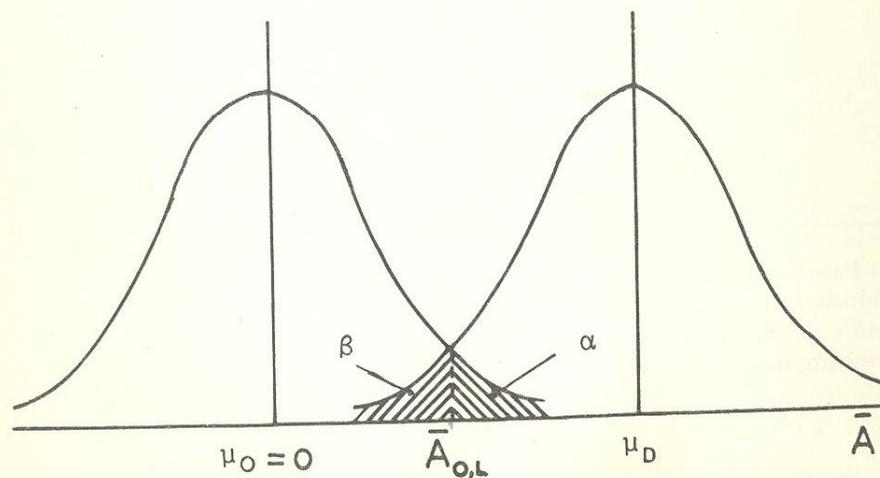


FIG. 3

5. Cálculo del límite de detección a partir de la curva de calibración y su corredor de confianza

Nuestra discusión se limitará a aquellos sistemas espectrofotométricos que cumplen la ley de Bouguer-Beer. En consecuencia la curva de regresión de la absorbancia A sobre la concentración c se ajustará al modelo lineal con ordenada en el origen nula [12, 13]. Por supuesto, en cada caso deberá investigarse la significación de cualquier eventual valor que para dicha ordenada arroje el cálculo de regresión. El método a seguir para esta investigación podrá consultarse en la literatura especializada [14, 17].

En nuestros desarrollos aceptaremos las suposiciones usuales en el análisis de regresión acerca de la relación entre las dos variables involucradas [15, 16].

La información experimental a partir de la cual se calcula la ecuación para la línea de regresión se resume en el Cuadro I. Como puede apreciarse en éste, se trabaja con m niveles de concentración cuya absorbancia se determina a través de n_i réplicas para cada nivel i .

CUADRO I

Niveles de Concentración	Valores de la propiedad medida						Promedios
c_1	A_{11}	A_{12}	...	A_{1j}	...	A_{1n_1}	A_1
c_2	A_{21}	A_{22}	...	A_{2j}	...	A_{2n_2}	A_2
...
c_i	A_{i1}	A_{i2}	...	A_{ij}	...	A_{in_i}	A_i
...
c_m	A_{m1}	A_{m2}	...	A_{mj}	...	A_{mn_m}	A_m

Para un dado nivel de concentración, la media de los correspondientes valores de absorbancia, estimada mediante la ecuación de la línea de regresión, la simbolizaremos mediante \hat{A} y vendrá dada por

$$\hat{A} = kc \quad (13)$$

Mediante la información del Cuadro I podrán estimarse también las varianzas de reproductibilidad, s_{rep}^2 y de regresión, s_{R}^2 :

$$s_{\text{rep}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} A_{ij}^2 - \sum_{i=1}^m A_i^2/n_i}{\sum_{i=1}^m n_i - m} \quad (14)$$

$$s_{\text{R}}^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m n_i (A_i - \hat{A}_i)^2 \quad (15)$$

En el caso de que ambas varianzas no difieran significativamente, podrán combinarse en la siguiente expresión para estimar la varianza general s_{Ac}^2 :

$$s_{\text{Ac}}^2 = \frac{\left(\sum_i n_i - m \right) s_{\text{rep}}^2 + (m-1) s_{\text{R}}^2}{\sum_i n_i - 1} \quad (16)$$

Cabe señalar que para el modelo lineal con ordenada en el origen, el denominador de la (15), que corresponde a los grados de libertad, será $(m-2)$. Asimismo en la (16) aparecerá $(m-2)$ como factor de s_{R}^2 y $\sum n_i - 2$ como denominador.

Una de las aplicaciones más importantes del análisis de regresión es la predicción del valor individual de la variable independiente. En nuestro caso concreto, se trataría de predecir el valor de A de la absorbancia para un nuevo valor c de la concentración. Los límites de confianza para dicha absorbancia vienen dados, para un nivel de significación α , por la siguiente expresión [17]:

$$\hat{A} - t_{\alpha, f} s_A \leq A \leq \hat{A} + t_{\alpha, f} s_A \quad (17)$$

siendo

$$s_A = s_{Ac} \sqrt{\frac{m}{\sum_i n_i} \left(1 + \frac{c^2}{\sum_i c_i^2} \right)} \quad (18)$$

y siendo $f = \sum_i n_i - 1$ los grados de libertad de s_{Ac} .

Cuando las varianzas s_{rep}^2 y s_R^2 difieren significativamente (resultando por supuesto $s_R^2 > s_{rep}^2$) se deberá tomar $s_{Ac}^2 = s_R^2$.

En la fig. 4 se representa la línea de regresión de A sobre c y su corredor de confianza para un nuevo valor de c . Dicho corredor puede ser calculado mediante las ecuaciones (17) y (18) para diferentes valores de c , fijado α . En espectrofotometría analítica la aplicación más usual de la línea de regresión (curva de calibración) es el pronóstico de la concentración partiendo de la medida experimental de la absorbancia.

Así, si en una solución problema se obtiene un valor A_x de la absorbancia determinada siguiendo la misma técnica analítica que para los patrones mediante los cuales se preparó la curva de calibración, ésta permitirá obtener la predicción de c_x y sus límites de confianza inferior y superior (c_{inf} y c_{sup} en la fig. 4).

Es corriente que la nueva determinación no consista de una sola medida de absorbancia sino del promedio de N réplicas. En tal caso, el valor de s_A vendrá dado por la ec. (19):

$$s_A = s_{Ac} \sqrt{\frac{m}{\sum_i n_i} \left(\frac{1}{N} + \frac{C^2}{\sum_i C_i^2} \right)} \quad (19)$$

con la cual se podrá estimar el correspondiente corredor de confianza y representarlo gráficamente tal como se hizo en la fig. 4 para $N = 1$. En esta nueva representación nos interesa particularmente, desde el punto de vista de la estimación de límites de detección, el valor de la absorbancia para el cual la

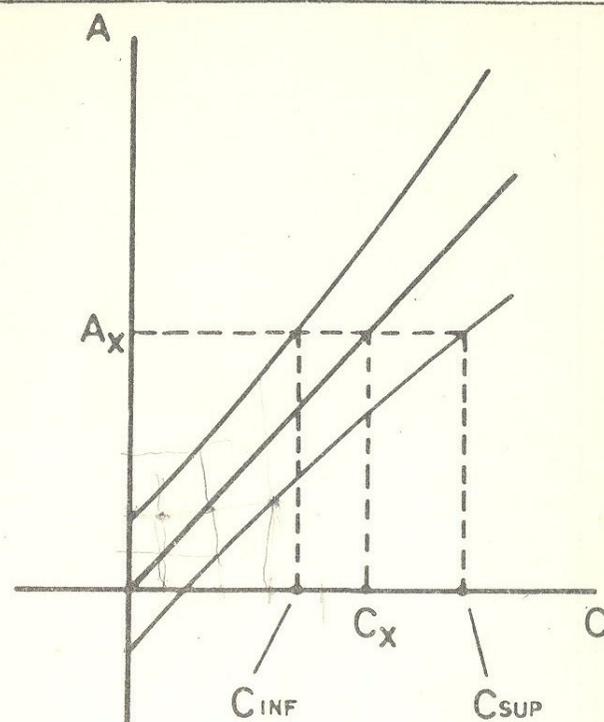


FIG. 4

rama superior del corredor de confianza intercepta el eje de ordenadas. Este valor lo hemos designado A_0 en la gráfica de la fig. 5, en la que también hemos representado distribuciones muestrales. El valor de A_0 es análogo al límite de decisión $A_{0,L}$ a que nos referimos en la sec. 3, y por consideraciones similares a las efectuadas en dicha oportunidad se comprende que C_D será el correspondiente límite de detección.

6. Ejemplo de aplicación

Como ejemplo de aplicación de los conceptos y métodos de cálculo descritos se realizó el estudio espectrofotométrico de soluciones de sulfato de cobre. Se utilizaron dos modelos de espectrofotómetros, Beckman B y Beckman DU, y los límites de detección se calcularon por los métodos de las medidas de blanco contra blanco y del corredor de confianza.

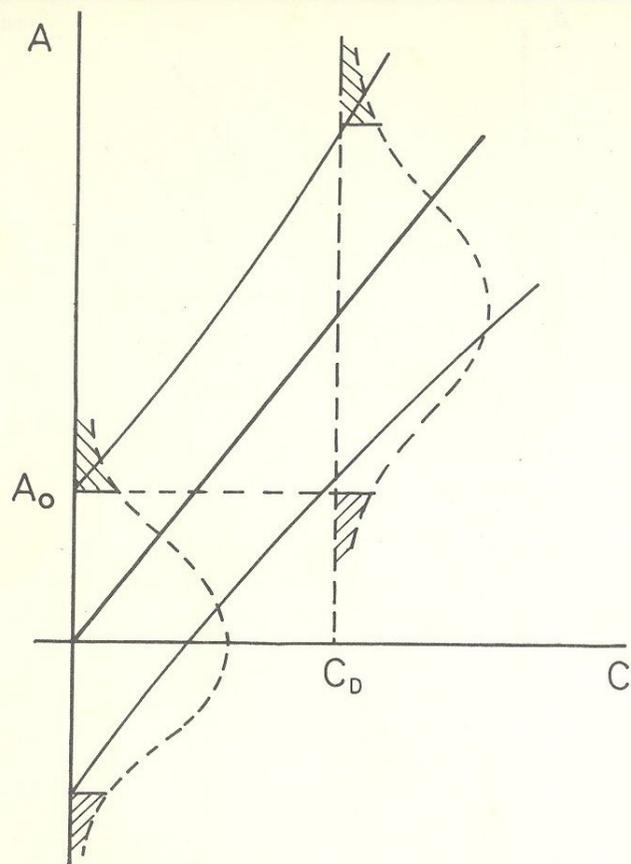


FIG. 5

Los resultados de las experiencias se tabulan en el Cuadro II.

7. Discusión de los resultados

A través de los resultados resumidos en el Cuadro II puede apreciarse cómo las condiciones experimentales, en este caso el empleo de dos diferentes modelos de espectrofotómetros, determinan límites de detección diferentes.

Además, tal como era de preverse, los resultados obtenidos por los dos métodos ensayados se aproximan entre sí al aproxi-

CUADRO II

Soluciones acuosas de $\text{Cu SO}_4 - \lambda 750 \text{ nm}$

Espectrofotómetro Beckman B	s^2_{rep}	s^2_R	$F = \frac{s^2_R}{s^2_{\text{rep}}}$	$C_D (\text{g/l})$	
				N=1	N=5
Método: medidas de blanco contra blanco	2.84×10^{-6} (n = 15)	-	-	0.2	0.07
Método: corredor de confianza	2.12×10^{-6} (n = 15, m = 6)	1.05×10^{-4}	$49.5 > F_{\text{crit}}$	0.3	0.1
Espectrofotómetro Beckman DU	s^2_{rep}	s^2_R	$F = \frac{s^2_R}{s^2_{\text{rep}}}$	$C_D (\text{g/l})$	
Método: medidas de blanco contra blanco	1.87×10^{-6}	-	-	N=1	N=5
Método: corredor de confianza	1.22×10^{-6}	1.26×10^{-5}	$10.3 > F_{\text{crit}}$	0.1	0.05
				0.1	0.05

marse los valores de s_{rep}^2 y s_R^2 . Evidentemente, el método del corredor de confianza es de aplicabilidad más general, y conduce a resultados más acordes con la realidad. Esto obedece al hecho de que tiene en cuenta la varianza respecto a la regresión que, en general, suele ser mayor que la varianza de reproductibilidad. Sólo en el caso de que ambas varianzas sean similares parece aconsejable aceptar el método de las medidas de blanco contra blanco, pese a la ventaja del menor volumen de cálculos exigido por éste.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Ing. Quím. R. Tappin su colaboración en la discusión de los tratamientos matemáticos para el método del corredor de confianza y en la preparación de los programas de computación para la realización de los cálculos correspondientes.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- *St. John, P.A., Mc Carthy, W.J. y Winefordner, J.D.* (1967). *Analytical Chemistry*, Vol. 39, No. 12, 1495-1497.
- 2.- *Curry, Lloyd A.* (1968). *Analytical Chemistry*. Vol. 40. No. 3, 586.
- 3.- *Parsons, M.L.* (1969). *Journal of Chemical Education*, Vol. 46, No. 5, 290-292.
- 4.- *Kaiser, H.* (1970). *Analytical Chemistry*, Vol. 42 No. 4, 26A-59A.
- 5.- *Hubaux, A. y Vos, G.* (1970). *Analytical Chemistry*, Vol. 42, No. 8, 849-855.
- 6.- *Ingle, J.D., Jr.* (1974) *Journal of Chemical Education*, Vol. 51, No. 2, 100-105.
- 7.- *Winefordner, J.D. (Ed.)* (1971). *Spectrochemical Methods of Analysis*. Wiley-Interscience.
- 8.- *Eckshlager, M.* (1972). *Errors, Measurement and Results in Chemical Analysis*. London. Van Nostrand Reinhold Co.
- 9.- *Herrmann, R. y Alkemade, C.T.J.* (1963). *Chemical Analysis by Flame Photometry*. Interscience Publishers.
- 10.- *Winefordner, J.D. (Editor)* (1976). *Trace Analysis*. John Wiley & Sons.
- 11.- *Mandel, J. y Stiehler, R.D.* (1954). *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, Vol. 53. No. 53, 155-159.
- 12.- *Maurice, M.J.* (1964). *Zeitschrift für analytische Chemie*, 204. Band, 6. Heft 401.
- 13.- *Bense, T. y Tappin, R.* (1978) *Anales de la Facultad de Química. Universidad de la República Oriental del Uruguay.* (En prensa).
- 14.- *Mandel, J. y Linning, F.J.* (1957). *Analytical Chemistry*, Vol. 29, No. 5, 743-749.
- 15.- *Snedecor, G.W. y Cochran, W.G.* (1971). *Métodos Estadísticos*. México. Compañía Editorial Continental, S.A.
- 16.- *Spiridonov, V.P. y Lopatkin, A.A.* (1973). *Tratamiento matemático de datos físico-químicos*. Moscú. Editorial Mir.
- 17.- *Tappin, R.* (1979). *Jornadas Químicas. Facultad de Química. Montevideo. Uruguay.*