



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



“Evaluación del Desempeño del método de ensayo de sulfatos en Matrices de aguas claras en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos “LACONAL” de la Universidad Técnica de Ambato”.

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad Experiencia Práctica de Investigación y/o Intervención, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Johanna Estefanía Cáceres Núñez

Tutor: Ingeniero Alex Fabián Valencia Silva

Ambato - Ecuador

Mayo - 2016

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ing. Mg. Alex Valencia

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Experiencia Práctica de Investigación y/o Intervención, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 28 de Enero de 2016



Ingeniero Alex Valencia

C.I: 1803121084

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Johanna Estefanía Cáceres Núñez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Srta. Johanna Estefanía Cáceres Núñez

C.I. 180487342-8

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Experiencia Práctica de Investigación y/o Intervención, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

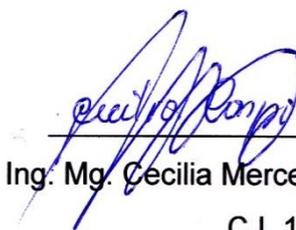
Para constancia firman:



PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ph.D.Nahir Yerely Dugarte Jiménez
C.I. 1753479193



Ing. Mg. Cecilia Mercedes Carpio
C.I. 1704627650

Ambato, 06 de Mayo de 2016

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Trabajo de Graduación o parte de él, como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Graduación, con fines de difusión pública, además apruebo su reproducción parcial o total dentro de las regulaciones de la Universidad Ecuatoriana, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Johanna Cáceres

C.I. 180487342-8

AUTORA

DEDICATORIA

Para mis padres;

mi guía, mi luz,

mi apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Control y Análisis de Alimentos “LACONAL” y a todo el personal de trabajo por permitirme ser parte de su equipo y colaborar con todas las actividades ofertadas al servicio del cliente, mediante el compartimiento de su experiencia y conocimientos. De manera especial a los Ingenieros Giovany Freire, Patrica Argüello y Gabriela Flores por todo el apoyo brindado y por su amistad.

Al Químico Lander Pérez y al Ingeniero Alex Valencia por guiarme durante el proceso.

A mis padres por ser el apoyo más grande que tengo en mi vida, sin ellos nada de esto sería posible y a mi hermano por ser mi ejemplo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema	3
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. General.....	4
1.3.2. Específicos	4

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos.....	5
2.2. Hipótesis	7
Hipótesis Nula	7
Hipótesis Alternativa.....	7
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis	7
Variable Independiente.....	7
Variable Dependiente	8

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.....	9
3.1.1. Materiales y Equipos	9
3.1.2. Reactivos.....	10
3.2 Método	10
3.2.1. Principio del método	10
3.2.2. Preparación de reactivos	11
3.2.3. Curva de calibración.....	11
3.2.4. Cuantificación de sulfatos.....	11
3.3 Diseño experimental.....	12
3.3.1 Parámetros de validación	12

3.3.1.1.	Linealidad.....	13
3.3.1.2.	Sensibilidad.....	16
3.3.1.3.	Límites	16
3.3.1.3.1.	Límite de detección (LoD)	16
3.3.1.3.2.	Límite de cuantificación (LoQ).....	17
3.3.1.4.	Exactitud	18
3.3.1.5.	Precisión	18
3.3.1.5.1.	Repetibilidad	18
3.3.1.5.2.	Reproducibilidad	19
3.3.1.6.	Aplicabilidad.....	20
3.3.2.	Tratamiento estadístico	21
3.3.3.	Incertidumbre.....	22
3.3.3.1.	Etapas para el cálculo de la incertidumbre	22

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Estimación lineal	26
4.2	Límites.....	31
4.3	Exactitud	32
4.4	Precisión	34
4.6	Tratamiento Estadístico.....	40
4.7	Incertidumbre	44
4.7.1.	Especificación.....	44
4.7.2.	Identificación de las fuentes de incertidumbre	44
4.7.3.	Cuantificación y Combinación	46
4.8	Corrida de muestras adicionales.....	56

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	Conclusiones.....	59
5.2.	Recomendaciones.....	60

MATERIAL DE REFERENCIA

BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Objetivos de validación	12
Tabla 2. Modelo para la estimación de la linealidad	13
Tabla 3. Modelo de estudio para el análisis de varianza aplicado a cada concentración (9 niveles)	20
Tabla 4. Datos de las curvas de calibración para la determinación de sulfatos	26
Tabla 5. Estimación Lineal de las curvas en forma integrada	28
Tabla 6. Límites de la recta de calibrado integrada (global)	30
Tabla 7. Lecturas para cuantificación de límites	31
Tabla 8. Porcentajes de Recuperación de los materiales de referencia certificados (200 y 25 mg SO ₄ ²⁻ /L)	33
Tabla 9. Datos experimentales de las corridas de cuantificación de sulfatos	35
Tabla 10. Resumen de concentraciones al evaluar el nivel 1 de (5mg/L)	37
Tabla 11. Desviaciones estándar y coeficientes de variación de los niveles de concentración.....	38
Tabla 12. Coeficientes de variación de Horwitz	39
Tabla 13. Resumen en orden ascendente de concentraciones al evaluar el nivel 1 de (5mg/L)	40
Tabla 14. Resumen Test de Grubbs	42
Tabla 15. Resumen ANOVA	43
Tabla 16. Fuentes de incertidumbre del método.....	45
Tabla 17. Concentraciones corregidas de los estándares (9 niveles).....	47
Tabla 18. Incertidumbre estándar del material volumétrico (μ_{MV})	48
Tabla 19. Incertidumbre típica combinada de las soluciones madre (μ_{SM}). 49	

Tabla 20. Incertidumbre típica combinada de la preparación de estándares (μ_{est}) (9 niveles).....	49
Tabla 21. Incertidumbre típica combinada de la curva de calibración (μ_{CC})	50
Tabla 22. Incertidumbre por resolución del equipo (μ_{resol})	51
Tabla 23. Incertidumbre por reproducibilidad (μ_R)	51
Tabla 24. Incertidumbre típica combinada del método (μ_{MET})	52
Tabla 25. Factor de cobertura (k).....	54
Tabla 26. Incertidumbre expandida del método (U_{EXP})	54
Tabla 27. Corrida de muestra de agua purificada envasada.....	56
Tabla 28. Corrida de muestras de agua potable	57
Tabla 29. Resultados de la validación	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas para el cálculo de la incertidumbre	23
Figura 2. Curvas de Calibración para la determinación de sulfatos	27
Figura 3. Curvas de calibración integradas para la determinación de sulfatos	28
Figura 4. Límites de la recta de calibrado integrada (global)	30
Figura 5. Resumen de los rangos de los porcentajes de recuperación	34
Figura 6. Esquema general para el cálculo de la incertidumbre combinada del método de determinación de sulfatos.....	46
Figura 7. Campana de Horwitz experimental (9 niveles)	55
Figura 8. Campana de Horwitz experimental (7 niveles)	56

ANEXO A: TERMINOLOGÍA

Terminología	67
--------------------	----

ANEXO B: MÉTODO DE REFERENCIA

Ilustración B- 1 Método turbidimétrico para la determinación de sulfatos	71
---	----

ANEXO C: CERTIFICADOS

Ilustración C- 1 Certificado de calibración Balanza OHAUS	74
Ilustración C- 2 Certificado de calidad de balón de aforo de 1000 mL (1) ...	76
Ilustración C- 3 Certificado de calidad de balón de aforo de 1000 mL (2) ...	77
Ilustración C- 4 Certificado de calidad de balón de aforo de 100 mL	78
Ilustración C- 5 Certificado de calidad de pipeta aforada de 5 mL	79
Ilustración C- 6 Certificado de calidad de pipeta aforada de 10 mL	80
Ilustración C- 7 Certificado de calibración de pipeta aforada de 25 mL	81
Ilustración C- 8 Certificado de análisis del reactivo (Estándares)	82
Ilustración C- 9 Certificado de análisis del reactivo (MRC)	83
Ilustración C- 10 Certificado del material de referencia (25 mg/L)	84
Ilustración C- 11 Certificado del material de referencia (200 mg/L)	85

ANEXO D: ANÁLISIS DE DATOS

Ilustración D- 1 Prueba t de Student para la correlación lineal de las curvas de calibración.....	87
Ilustración D- 2 Prueba t de Student para exactitud en la determinación de sulfatos.....	88
Ilustración D- 3 ANOVA de los 9 niveles de concentración mediante hoja de cálculo Excel.....	89
Ilustración D- 4 ANOVA del nivel 1 (5 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat.....	90
Ilustración D- 5 ANOVA del nivel 2 (10 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat.....	90

Ilustración D- 6 ANOVA del nivel 3 (20 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat	90
Ilustración D- 7 ANOVA del nivel 4 (25 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat	90
Ilustración D- 8 ANOVA del nivel 5 (30 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat	91
Ilustración D- 9 ANOVA del nivel 6 (40 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat (40 mg/L).....	91
Ilustración D- 10 ANOVA del nivel 7 (50 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat	91
Ilustración D- 11 ANOVA del nivel 8 (150 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat.....	91
Ilustración D- 12 ANOVA del nivel 9 (250 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat.....	92
Ilustración D- 13 ANOVA de la muestra de agua purificada envasada (Tesalia).....	92

ANEXO E: DECLARACIÓN DEL MÉTODO VALIDADO

Cuadro E- 1 Hoja de Validación del método	94
---	----

ANEXO F: INSTRUCTIVOS

Instructivo F- 1 Instructivo de ensayo del método de sulfatos.....	97
Instructivo F- 2 Uso del espectrofotómetro EVOLUTION 60S	104

ANEXO G: FOTOGRAFÍAS

Ilustración G- 1 Estándares para curva de calibración.....	109
Ilustración G- 2 Turbidez de los estándares.....	109
Ilustración G- 3 Estándares para corridas de muestras (sin dilución)	109

Ilustración G- 4 Estándares para corridas de muestras (con dilución).....	110
Ilustración G- 5 Materiales de Referencia Certificados	110
Ilustración G- 6 Muestra de agua purificada envasada “Tesalia”	110
Ilustración G- 7 Espectrofotómetro Evolution 60S	111
Ilustración G- 8 Recta de calibración 1 para la cuantificación de sulfatos..	111
Ilustración G- 9 Recta de calibración 2 para la cuantificación de sulfatos..	111
Ilustración G- 10 Recta de calibración 3 para la cuantificación de sulfatos	112
Ilustración G- 11 Recta de calibración 4 para la cuantificación de sulfatos	112
Ilustración G- 12 Recta de calibración 5 para la cuantificación de sulfatos	112

RESUMEN

La validación de métodos analíticos, es parte de un proceso de mejoramiento de la calidad de los laboratorios, cuyo objetivo es demostrar, con pruebas documentadas y fundamento estadístico que, tanto el método utilizado como el resultado obtenido de dicho análisis es certero y proporciona datos confiables dentro de un intervalo definido de trabajo, mediante un control minucioso de condiciones, materiales y equipos, con el fin de adaptar los procedimientos al entorno de trabajo rutinario. De tal modo que, esto conlleva a un reconocimiento formal de la competencia del laboratorio que es la acreditación. Por otro lado el control de la calidad del agua es de un interés creciente, debido a la utilización y consumo masivo de este recurso. Tomando en cuenta estos criterios, se validó el método analítico de determinación de sulfatos en base a la técnica turbidimétrica, en matrices de agua potable y agua purificada envasada, utilizando como referencia el procedimiento 4500-SO₄²⁻ E establecido en Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22nd ed. Se comprobó la fiabilidad del método para producir el resultado previsto, mediante la evaluación de la linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud y cálculo de la incertidumbre del mismo. El método desarrollado produce una respuesta lineal en el rango de 5 a 50 mg/L con r² de 0,9961 y un m de 0,0041, pero debido a que el TULAS establece como LMP: 250 mg SO₄²⁻/L que es un valor superior al rango lineal, se estableció un intervalo de trabajo de 4,9 (LoQ) a 250 mg de SO₄²⁻/L por dilución, con una incertidumbre expandida de 9,3% (p=95.45%), coeficientes de variación por repetibilidad de %CV_r= 3,9 y por reproducibilidad de %CV_R= 4,3%, aceptados de acuerdo a los criterios establecidos por el coeficiente de variación de Horwitz (%CV_h) y un porcentaje de recuperación de 100 ± 6% (MRC: 25 mg/L).

Palabras clave: validación, métodos analíticos, sulfatos, aguas claras, Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos (LACONAL).

ABSTRACT

The validation of analytical methods is part of a process of improving the quality of laboratories, which aims to demonstrate with substantiated evidence and statistical basis that both the method used and the result of this analysis is accurate and provides reliable data within a working range defined by careful control of conditions, materials and equipment, in order to adapt procedures to routine working environment. So this leads to a formal recognition of the competence of the laboratory, that is the accreditation. On the other hand, control of water quality is of increasing interest, because of the extended use and massive consumption of this resource. Based on these criteria, the analytical method for the determination of sulfates in drinking and bottled purified water matrices, based on the turbidimetric technique, was validated, using as reference the procedure established in 4500-SO₄²⁻ E Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22nd ed. The reliability of the method to produce the expected outcome was checked, by assessing linearity, sensitivity, precision, accuracy and by the calculation of its uncertainty. The developed method produces a linear response within the range of 5 to 50 mg/L with r^2 of 0,9961 and m of 0,0041, however, as the TULAS expose a maximum allowable limit of 250 mg SO₄²⁻/L, a working interval of 4,9 (LOQ) to 250 mg SO₄²⁻/L was established by dilution, with a percentage expanded uncertainty of 9,3% ($p= 95.45\%$) and coefficients of variation of $\%CV_r= 5,83$ and $\%CV_R= 5,85\%$, respectively, percentages accepted according to the criteria established by the coefficient of variation of Horwitz ($\%CV_h$), and with an average recovery percentage of $100 \pm 6\%$ (MRC: 25 mg/L).

INTRODUCCIÓN

Debido a la gran cantidad de laboratorios de ensayo que ofertan métodos analíticos, que producen resultados fiables, mediante acreditación y validación de los mismos, y debido a la necesidad, cada vez mayor, de los clientes por obtener reportes de análisis que permitan tomar decisiones basadas en dicha información, el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos “LACONAL” de la Universidad Técnica de Ambato pretende desarrollar metodologías que cumplan con las especificaciones de normativas tanto nacionales como internacionales en todas las áreas de análisis.

El control de la calidad del agua es muy importante por lo que las sustancias parcialmente tóxicas deben eliminarse o por lo menos estar por debajo de los límites máximos permisibles, establecidos en las normas técnicas, previo al consumo. En este sentido, se determinará sulfatos en matrices de aguas claras, específicamente; agua potable y agua purificada envasada, utilizando la técnica turbidimétrico. Para esto, se tomarán medidas pertinentes con la finalidad de demostrar que el método es capaz de producir y reproducir efectivamente datos dentro de un intervalo de trabajo.

Se requiere entonces, con miras a la acreditación del método y con la finalidad de validar el mismo, del uso de materiales calibrados o certificados, métodos de referencia documentados, reactivos con certificados, materiales de referencia confiables y un buen desempeño del analista, con lo cual se verificará que los resultados reportados mediante el método proporcionan un alto grado de confianza y seguridad.

Así los objetivos del presente trabajo son evaluar el desempeño del método de ensayo de sulfatos en matrices de aguas claras por espectroscopía UV-VIS, determinar los parámetros de validación y dar el mejor tratamiento estadístico a los datos que se obtienen durante la validación, así como también identificar las fuentes de incertidumbre que se asocian a todo el proceso de medición y cuantificarlas.

Luego del desarrollo del proceso se identificó que se cumplieron con los objetivos de validación especificados inicialmente, se pudo establecer el rango de trabajo y la incertidumbre ligada a cada nivel de ensayo. Por lo cual se declara que el método aplicado para la determinación de sulfatos es apto para ser sometido al proceso de acreditación conforme lo establece la norma ISO/IEC 17025.

De tal modo, "LACONAL" cumplirá con las exigencias de calidad y productividad, dando a los clientes certeza de que el laboratorio es técnicamente competente en una amplia gama de métodos y matrices.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema

Evaluación del desempeño del método de ensayo de sulfatos en matrices de aguas claras en el laboratorio de control y análisis de alimentos “LACONAL” de la Universidad Técnica de Ambato.

1.2. Justificación

La acreditación, es la herramienta establecida a escala internacional para generar confianza ya que permite: dar certidumbre a las mediciones de los laboratorios, asegurar la veracidad de los resultados e incrementar la calidad, considerando las interrelaciones con la producción y con las condiciones de vida de los ciudadanos.

Así mismo, la validación de métodos analíticos, es parte de un proceso de mejoramiento de la calidad de los laboratorios, por lo que desarrollar un tema de investigación en este campo es de gran importancia no solo científica sino también ambiental y de interés para las instituciones ya que el proceso de acreditación de laboratorios conlleva la validación de métodos. La validación es un proceso esencial que un laboratorio debe implementar con la finalidad de demostrar que, tanto el método utilizado como el resultado obtenido de dicho análisis es certero y proporciona datos confiables mediante un control minucioso de las condiciones, materiales y equipos utilizados.

El laboratorio de control y análisis de alimentos “LACONAL” es un laboratorio acreditado en cuanto a análisis fisicoquímicos y microbiológicos para la matriz alimentos, sin embargo, carece de acreditación de parámetros en

aguas. Según las necesidades del laboratorio, con la finalidad de satisfacer la demanda del cliente, el método a validarse cumplirá con los requisitos de la norma internacional ISO/IEC 17025:2005 y estará basado en Standard Methods. 22nd Edition. Específicamente, la detección y cuantificación de sulfatos en aguas claras es de vital importancia debido a que concentraciones elevadas pueden causar trastornos gastrointestinales, intoxicaciones y un sabor amargo al consumirse, es así que el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria (TULAS) establece un límite máximo permisible de 250 mg SO₄²⁻/L, como criterio de calidad, para aguas de consumo humano y uso doméstico.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Evaluar el desempeño del método de ensayo de sulfatos en matrices de aguas claras en el laboratorio de control y análisis de alimentos “LACONAL” de la Universidad Técnica de Ambato.

1.3.2. Específicos

Establecer y aplicar los parámetros de validación para la determinación de sulfatos por el método turbidimétrico.

Determinar si el método turbidimétrico cumple con las especificaciones del método de referencia establecido en el procedimiento 4500 E de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Edition.

Elaborar el análisis estadístico y el informe de los objetivos de validación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

Se ha registrado, con el tiempo, un compromiso creciente de la sociedad por cuidar el medio ambiente debido, en gran parte, a la implementación de normas ambientales y legislativas cada vez más exigentes, lo que conlleva a un incremento en la demanda de análisis ya sea de agua, suelo o aire tanto en organismos públicos como privados. Es indispensable que los laboratorios que ofertan dichos servicios demuestren que proporcionan resultados confiables. En este sentido, el uso de un método analítico se justifica sólo después de haber descubierto que es válido **(Gennaro, 2003)**.

En la actualidad, existe una amplia disponibilidad de métodos de ensayo, reconocidos tanto nacional como internacionalmente, utilizados como métodos de referencia **(UNODC, 2010)**. Sin embargo, ello no garantiza que el funcionamiento sea satisfactorio en el laboratorio, por lo que debe ser evaluado bajo sus condiciones ya que cualquier cambio introducido puede afectar sus características, es decir, debe ser validado **(Báez, 2009)**. Así la validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son certeros **(Duffau et al., 2010)**, de tal modo que esto conlleva a un reconocimiento formal de la competencia del laboratorio que es la acreditación; para un laboratorio acreditado la responsabilidad en el reporte de resultados es predominante **(Gennaro, 2003)**.

La norma ISO 17025 establece los requisitos generales que un laboratorio debe cumplir para que su competencia en la realización de ensayos, incluyendo muestreo, métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el laboratorio sea reconocida. La Acreditación concedida por un organismo acreditado reconocido como es el Servicio de

Accreditación Ecuatoriano (SAE), con base en prácticas internacionales, es la forma más efectiva de demostrar la competencia técnica del laboratorio, mostrando evidencias de la credibilidad de los servicios que brinda y eliminando la necesidad de múltiples evaluaciones realizadas por sus clientes **(López & Jibaja, 2007)**.

Por otro lado, el control de la calidad del agua es muy importante, ya que es el medio de transporte de todas las sustancias y compuestos tanto biológicos como fisicoquímicos **(Severiche & González, 2012)**. Un agua de buena calidad ya sea para consumo humano o para las diferentes actividades económicas es aquella en la cual las sustancias potencialmente tóxicas para la salud humana se eliminan totalmente en el tratamiento previo o se lleva a la máxima concentración permitida por las normas que rigen estos parámetros **(Aponte, 2010)**.

Estudios han revelado que los sulfatos le otorgan al agua un gusto amargo, estando el umbral de gusto en función del catión concreto que sea mayoritario en el agua **(Severiche & González, 2012)** y un efecto laxante, el cual es mayor para el caso del sulfato de sodio y de magnesio por lo que no es deseable un exceso de los mismos en las aguas de consumo **(Vidaurreta, s.f.)**

Los sulfatos, sales solubles en agua a excepción de los de plomo (Pb), bario (Ba) y estroncio (Sr), se hallan profusamente repartidos en todo tipo de aguas, en concentraciones variables **(Marín, 2005)**. La forma más común de sulfatos presentes en el agua son las sales de calcio, hierro, magnesio y sodio **(Vidaurreta, s.f.)**.

El ion procede fundamentalmente de los procesos de disolución de yesos (CaSO_4), a partir de residuos industriales liberados al agua y mediante precipitación desde la atmósfera, sin olvidar las cantidades procedentes de la oxidación bacteriana de sulfuros; no obstante, las concentraciones más altas suelen encontrarse en aguas subterráneas y provienen de fuentes naturales **(OMS, 2005; Vidaurreta, s.f.)**.

En consecuencia a los efectos perjudiciales que ejercen cantidades excesivas de sulfatos en agua, cada país cuenta con cuerpos normativos que agrupan las normas reglamentarias más importantes en materia ambiental, por lo que un documento vinculante con la norma internacional ISO/IEC 17025:2005 es el TULAS, que proporciona un valor máximo permisible de 250 mg SO_4^{2-} /L en agua para consumo humano y uso doméstico, de modo que no represente un riesgo para la salud.

Existen varios métodos para la cuantificación de los sulfatos, siendo el más exacto el gravimétrico con calcinación del residuo. Sin embargo, el método turbidimétrico es el más rápido y puede ser tan exacto como el gravimétrico, pero depende de varios factores que incluyen las condiciones de trabajo y la habilidad del operador, lo que podría minimizarse, tomando en cuenta parámetros de exactitud, reproducibilidad y repetibilidad al desarrollar la validación del método (INEN, 1984).

2.2. Hipótesis

Hipótesis Nula

El método de determinación de sulfatos desarrollado internamente cumple con los objetivos de validación como indicativo de calidad del método.

Hipótesis Alternativa

El método de determinación de sulfatos desarrollado internamente no cumple con los objetivos de validación como indicativo de calidad del método.

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

Variable Independiente

Método turbidimétrico para determinación de sulfatos.

Variable Dependiente

Cuantificación de sulfatos en matrices de agua potable y envasada en función de los parámetros de validación.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

El objetivo de la validación es demostrar, con fundamento estadístico, que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la cual se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones realizadas no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado.

En este sentido, el tipo de método que se desarrolló es normalizado modificado puesto que se basa en el procedimiento de determinación de sulfatos por turbidimetría establecido en Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (4500 E) (ver ANEXO B), razón por la cual se realizó una validación.

Además, se llevó a cabo una validación prospectiva en la cual los datos se generaron a través del análisis, de donde se establecieron: parámetros a evaluar y criterios de aceptabilidad, conjuntamente, se desarrollaron las pruebas experimentales pertinentes y se evaluaron los resultados.

3.1 Materiales

3.1.1. Materiales y Equipos

- Pipetas volumétricas de 5, 10 y 25 mL
- 8 Matraz Erlenmeyer de 125 mL
- 7 Balones aforados de 100 mL
- 2 Balones aforados de 1000 mL
- 1 Probeta de 100 mL
- 1 Espátula
- 1 Varilla de agitación
- 1 Piceta
- 1 Pipeteador
- 2 Celdas espectrofotométricas de cuarzo

- Espectrofotómetro Evolution 60S
- Balanza OHAUS con precisión de $\pm 0,0001$ g

3.1.2. Reactivos

- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)
- Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- Nitrato de potasio (KNO_3)
- Ácido acético glacial 99% (CH_3COOH)
- Cloruro de Bario (BaCl_2)

3.2 Método

3.2.1. Principio del método

La espectrofotometría mide la disminución de la cantidad de luz transmitida a través de una suspensión de partículas utilizando para ello un espectrofotómetro. Este método está basado en la técnica turbidimétrica, que consiste en la medida de la turbidez producida por la reacción de precipitación del ión sulfato en medio acético con cloruro de bario con el cual forma coloides de sulfato de bario de tamaño uniforme.



Estos deben mantenerse en suspensión homogénea durante un periodo de tiempo suficientemente largo como para medir la luz transmitida en unidades de absorbancia, la cual es proporcional a la concentración de sulfatos presentes en el medio.

El contenido de sulfatos (SO_4^{2-}) en una muestra problema se obtiene a partir de la curva de calibración, previamente obtenida con disoluciones patrón. Así, el grado de turbidez se mide espectrofotométricamente a 420 nm. Este método permite determinar de 5 a 40 mg/L de sulfatos (**Castillo et al., 2013**). Es importante mencionar que es posible utilizar estándares de mayor concentración sin embargo, sobrepasar la concentración de 40 mg/L podría

decrecer la exactitud y bajar la estabilidad de la suspensión de sulfato de bario (Aponte, 2010).

3.2.2. Preparación de reactivos

- Solución Buffer: Se disolvió en 500 mL de agua destilada; 30 g de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 5 g de acetato de sodio ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$), 1 g nitrato de potasio (KNO_3) y 20 mL de ácido acético glacial 99% (CH_3COOH), una vez homogenizado el contenido, la solución se aforó a 1000 mL.
- Estándar de sulfato de sodio (Na_2SO_4): Se preparó una solución estándar de 100 mg/L para lo cual se disolvió 0.1479 g del reactivo en agua destilada y se llevó el volumen a 1000 mL en un matraz aforado.

3.2.3. Curva de calibración

Se realizó la curva de calibración mediante la preparación de disoluciones de 5, 10, 20, 25, 30, 40 y 50 mg/L a partir de la solución estándar de sulfato de sodio (Na_2SO_4).

3.2.4. Cuantificación de sulfatos

Se tomó 100 mL de muestra (o del estándar, en caso de realizar la curva de calibración), previamente homogenizada, se colocó en un matraz erlenmeyer de 125 mL, se agregó 20 mL de la solución buffer y se agitó por un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 segundos con la finalidad de estabilizar de manera uniforme el contenido.

Se agregó una punta de espátula de cristales de cloruro de bario ($BaCl_2$) con una cantidad de entre 0,3 a 0,5 g (cantidad suficiente, no necesita ser exacta) y se agitó de manera constante por aproximadamente 60 segundos.

Después de finalizada la agitación se colocó la solución en la celda y se midió la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro. No es aconsejable sobrepasar 5 ± 0.5 minutos para leer la turbidez de la muestra.

La concentración se obtuvo directamente, mediante interpolación de la absorbancia, en la curva de calibración (Para mayor información del método ver ANEXO F, Instructivo F- 1 Instructivo de Ensayo del método de sulfatos).

3.3 Diseño experimental

3.3.1 Parámetros de validación

De acuerdo al tipo de método los parámetros de validación que se evaluaron son: linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, exactitud, precisión, aplicabilidad y adicionalmente se calculó la incertidumbre del método.

Por otro lado, para cada parámetro se establecieron los objetivos de validación.

Tabla 1. Objetivos de validación

Parámetro	Objetivo
Matriz	Aplicable a agua potable y agua purificada envasada
Linealidad/Función respuesta	Regresión Lineal. Grado de Ajuste $r^2 \geq 0,99$ $Abs = m Conc + b$
Límite de detección	2 mg/L
Límite de cuantificación	5 mg/L
Precisión	
Repetibilidad	$\%CV_r < 6,3\%$ en todos los niveles
Reproducibilidad	$\%CV_R < 8,4\%$ en todos los niveles
Exactitud	% Recuperación entre 90% y 110 %
Incertidumbre	$U (p=95,45\%) \leq 20\%$, en todos los niveles
Intervalo de trabajo	5 - 250 mg/L

Elaborado por: Johanna Cáceres

3.3.1.1. Linealidad

Se definió la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito, para lo cual se desarrollaron rectas de calibrado que se ajustan a una serie de puntos experimentales, los mismos que están definidos por una variable independiente y por una variable dependiente, rigiéndose a la ecuación:

$$y = m x + b$$

Ec. 1

Para ello, se prepararon 7 soluciones patrón (5, 10, 20, 25, 30, 40 y 50 mg/L) del analito (sulfato de sodio) y se leyeron en un espectrofotómetro a 420 nm, como función respuesta se obtuvieron los valores de absorbancia, datos con los cuales se graficó la curva de calibración, este proceso se repitió durante 5 días, como consecuencia se tuvieron 5 rectas de calibrado.

Tabla 2. Modelo para la estimación de la linealidad

	X Concentración (mg/L)	Y Lectura (abs)
Día 1	D1-X1	D1-Y1
	D1-X2	D1-Y2
	D1-X3	D1-Y3
	D1-X4	D1-Y4
	D1-X5	D1-Y5
	D1-X6	D1-Y6
	D1-X7	D1-Y7
Día 2	D2-X1	D2-Y1
	D2-X2	D2-Y2
	D2-X3	D2-Y3
	D2-X4	D2-Y4
	D2-X5	D2-Y5
	D2-X6	D2-Y6
	D2-X7	D2-Y7
Día 3	D3-X1	D3-Y1
	D3-X2	D3-Y2
	D3-X3	D3-Y3
	D3-X4	D3-Y4

	X Concentración (mg/L)	Y Lectura (abs)
	D3-X5	D3-Y5
	D3-X6	D3-Y6
	D3-X7	D3-Y7
Día 4	D4-X1	D4-Y1
	D4-X2	D4-Y2
	D4-X3	D4-Y3
	D4-X4	D4-Y4
	D4-X5	D4-Y5
	D4-X6	D4-Y6
	D4-X7	D4-Y7
Día 5	D5-X1	D5-Y1
	D5-X2	D5-Y2
	D5-X3	D5-Y3
	D5-X4	D5-Y4
	D5-X5	D5-Y5
	D5-X6	D5-Y6
	D5-X7	D5-Y7

Elaborado por: Johanna Cáceres

A partir de las curvas y a fin de asegurar que las rectas encontradas con los puntos experimentales se ajustan correctamente al modelo matemático de la ecuación de la recta [Ec. 1], se calcularon los valores de la ordenada al origen (b), la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación, que tuvo un valor superior a $r^2=0.99$.

Adicionalmente se utilizó el método de mínimos cuadrados, este busca la recta de calibrado que haga que la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto experimental y la recta de calibrado sea mínima o tienda a cero (**Miller, 2008**), así se aseguró una buena exactitud y confiabilidad estadística. Este método proporciona valores de: pendiente [Ec.2], intercepto [Ec.3], coeficiente de correlación [Ec.4], coeficiente de determinación [Ec.5], desviación estándar de la pendiente [Ec.6], desviación estándar del intercepto [Ec.7] y error tipo [Ec.8].

$$m = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Ec.2

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

Ec.3

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})(yi - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (yi - \bar{y})^2}}$$

Ec.4

$$r^2 = (r)^2$$

Ec.5

$$S_m = \frac{\sqrt{\frac{\sum (yi - \bar{y})^2 - [m^2 \sum (xi - \bar{x})^2]}{n - 2}}}{\sqrt{\sum (xi - \bar{x})^2}}$$

Ec.6

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum (yi - \bar{y})^2 - [m^2 \sum (xi - \bar{x})^2]}{n - 2}} * \sqrt{\frac{1}{n - \frac{(\sum xi)^2}{\sum xi^2}}}$$

Ec.7

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum (yi - \bar{y})^2 - [m^2 \sum (xi - \bar{x})^2]}{n - 2}}$$

Ec.8

Dónde:

x= datos de concentración

y= datos de absorbancia

\bar{x} = media de datos de concentración

\bar{y} = media de datos de absorbancia

m= pendiente

n= número de datos

3.3.1.2. Sensibilidad

Se observó la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito (**Duffau et al., 2010**). En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración, por lo que se obtuvo como consecuencia de un buen desarrollo de la linealidad.

3.3.1.3. Límites

3.3.1.3.1. Límite de detección (LoD)

Se identificó la concentración más baja del analito que puede ser detectada de forma confiable por el método (**Duffau et al., 2010**).

MILLER (2008), presenta una proyección estadística para su cálculo a partir de los estadísticos obtenidos por mínimos cuadrados (estimación lineal).

$$LoD = b + t * S_b$$

Ec.9

Dónde:

b = intercepto

S_b = desviación estándar del intercepto

t = valor crítico de t

Sin embargo, según **EURACHEM (2005)**, para este propósito la aproximación “blanco o concentración más baja + 3 desviaciones estándar” será suficiente. En el primer caso [Ec.10] se utiliza el valor promedio de las lecturas de los blancos así como su desviación estándar, mientras que, en el segundo caso [Ec.11] se toma la desviación de las lecturas del estándar de menor concentración.

$$LoD = \bar{X}_{blanco} + 3s$$

Ec.10

$$LoD = 0 + 3s$$

Ec.11

Dónde:

\bar{X} = valor medio muestral

s = desviación estándar de las lecturas

Para su cálculo se eligió la Ec.11 y por fines de validación se realizaron 10 mediciones del estándar de menor concentración (5 mg/L), establecido en el método de referencia.

3.3.1.3.2. Límite de cuantificación (LoQ)

Con este parámetro se estableció la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión y exactitud (**Duffau et al., 2010**).

Así mismo **MILLER (2008)**, establece una proyección estadística

$$LoQ = b + t * S_{yx}$$

Ec.12

Dónde:

b = intercepto

S_{yx} = error tipo

t = valor crítico de t

Por otro lado **EURACHEM (2005)**, presenta dos opciones para obtener el valor de este límite:

$$LoQ = \bar{X}_{blanco} + 10s$$

Ec.13

$$LoQ = 0 + 10s$$

Ec.14

Dónde:

\bar{X} = valor medio muestral

s = desviación estándar de las lecturas

Experimentalmente se realizaron 10 mediciones del estándar de menor concentración (5 mg/L) de modo que el límite de cuantificación se obtuvo aplicando la Ec.14.

3.3.1.4. Exactitud

Se indicó la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posibles a un valor verdadero, para lo cual, se utilizaron materiales de referencia certificados.

Se determinó además la veracidad, que indica el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de las soluciones patrón y un valor de referencia aceptado (**Miller, 2008**). Se utilizó el método de análisis repetido de una muestra de concentración única conocida y se calculó el porcentaje de recuperación (%R) [Ec. 15], el mismo que debió encontrarse entre el 90% y el 110%, en todos los niveles, como indicativo de una buena exactitud, ya que la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero resulta pequeña. Para ello se utilizaron dos materiales de referencia de diferentes concentraciones: uno de 25mg SO₄²⁻/L y otro de 200 mg SO₄²⁻/L con la finalidad de evaluar el desempeño del método incluyendo la dilución.

$$\%R = \frac{X_{estimada}}{X_{verdadera}} * 100$$

Ec.15

3.3.1.5. Precisión

Es una medida de que tan cercanos se encuentran unos resultados en comparación de otros y se expresa por lo general como desviación estándar la cual describe la dispersión de los datos (**Duffau et al., 2010**). Se determinó la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad en 9 niveles.

La precisión se evaluó a través del análisis simple de varianza (ANOVA) para cada uno de los niveles de ensayo.

3.3.1.5.1. Repetibilidad

Se realizaron cinco mediciones, de cada una de las concentraciones (niveles), en las mismas condiciones. Adicionalmente se calculó la desviación estándar (S_r) [Ec.16] y el coeficiente de variación (CV_r %) [Ec.17].

$$S_r = \sqrt{CME}$$

Ec.16

$$\% CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}_{nT}}$$

Ec.17

Dónde:

CME= cuadrados medios dentro de los grupos (error)

\bar{X}_{nT} = valor medio global

3.3.1.5.2. Reproducibilidad

Se realizaron las mediciones, en cinco días distintos; evaluando así determinaciones independientes en diferentes condiciones. Así mismo, se calculó la desviación estándar (S_R) [Ec.18] y el coeficiente de variación (CV_R %) [Ec.19].

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + \frac{CMT_r - CME}{n_{rep}}}$$

Ec.18

$$\% CV_R = \frac{S_R}{\bar{X}_{nT}}$$

Ec.19

Dónde:

CME= cuadrados medios dentro de los grupos (error)

CMT_r= cuadrados medios entre grupos (tratamientos)

n_{rep} = número de repeticiones por día

\bar{X}_{nT} = valor medio global

El criterio de aceptabilidad para la precisión se evaluó en base al coeficiente de variación de Horwitz [Ec.20], el cual expresa que este, aumenta conforme disminuye la concentración del analito, en la determinación de cualquier tipo

de muestra (**Harris, 2001**). Los criterios de aceptabilidad tanto para repetibilidad como para reproducibilidad son $\%CV_h/2$ y $2/3 \%CV_h$, respectivamente.

$$\% CV_h = 2^{(1-0.5 \log c)}$$

Ec.20

Dónde:

C= Fracción del analito en la muestra (C=g analito/g de muestra)

Además, se eligió el diseño de un factor completamente al azar (D.C.A.) con la finalidad de realizar el análisis simple de varianza, también conocido como ANOVA. Se obtuvieron 25 lecturas por cada nivel de concentración.

Tabla 3. Modelo de estudio para el análisis de varianza aplicado a cada concentración (9 niveles)

MUESTRA DE CONCENTRACIÓN X (mg/L)					
REPETICIONES	DÍAS				
	D1	D2	D3	D4	D5
R1	R1-1	R1-2	R1-3	R1-4	R1-5
R2	R2-1	R2-2	R2-3	R2-4	R2-5
R3	R3-1	R3-2	R3-3	R3-4	R3-5
R4	R4-1	R4-2	R4-3	R4-4	R4-5
R5	R5-1	R5-2	R5-3	R5-4	R5-5

Elaborado por: Johanna Cáceres

3.3.1.6. Aplicabilidad

Permitió exponer, como consecuencia del trabajo realizado, las especificaciones del rendimiento del método evaluado como son: la identidad de la sustancia analizada, el intervalo de concentraciones cubierto por la validación y la especificación de las matrices (**Duffau et al., 2010**).

Así, el desempeño del método debe cumplir con todos los parámetros de validación y se estimó la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza del 95,45 %.

3.3.2. Tratamiento estadístico

Para los fines de una validación, se utilizan normalmente ciertas mediciones estadísticas, que permiten establecer si el método se encuentra dentro de un parámetro aceptable, para este fin se utilizó la hoja de cálculo Excel y el paquete estadístico Infostat.

Es frecuente utilizar pruebas de significancia estadísticas durante el proceso de validación de los métodos analíticos, con las cuales se comprueba la veracidad de una hipótesis experimental, en este sentido, se aplicaron las siguientes:

1. Prueba t- student para identificar errores sistemáticos (veracidad).
2. Prueba F-Fisher para identificar errores aleatorios (precisiones).

Además, como se mencionó en la sección 3.3.1.5. (Precisión), se realizó el análisis de varianza, ANOVA, que es un análisis estadístico muy robusto, en el cual se compararon las diferencias entre cada grupo, es decir, las observaciones realizadas durante los cinco días y las diferencias dentro de los grupos. Es recomendable previo a la realización del análisis de varianza, que se realice el test de Grubbs con la finalidad de detectar la presencia de datos atípicos dentro de un grupo, haciendo que este pierda uniformidad. Sin embargo según **Murphy & Lau (2008)**, esta prueba estadística se utiliza para identificar valores atípicos, no para eliminarlos, a menos que una investigación halle una causa probable para justificar esta acción. La prueba de Grubbs utiliza una estadística de prueba t de Student.

$$t_{min} = \frac{|X_{min} - \bar{X}|}{S_g}$$

Ec.21

$$t_{max} = \frac{|X_{max} - \bar{X}|}{S_g}$$

Ec.22

Dónde:

X_{min} = valor mínimo dentro de la muestra

X_{max} = valor máximo dentro de la muestra

s_g = desviación estándar del grupo de datos o de la muestra.

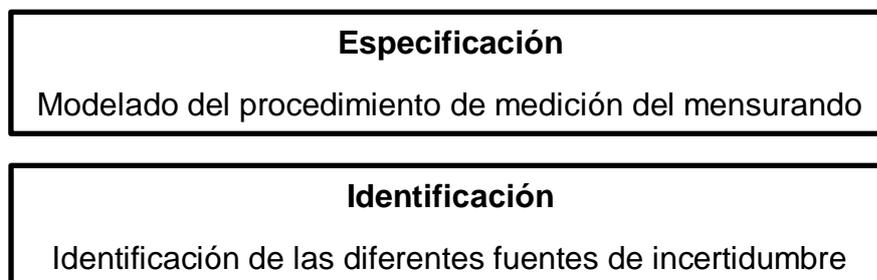
3.3.3. Incertidumbre

Tal como establece la norma **ISO/IEC 17025 (2005)**, hoy en día es cada vez más relevante que los resultados analíticos vayan acompañados de su incertidumbre. La guía **ISO 3534-1 (2006)** define incertidumbre como “una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el intervalo de valores que puede ser razonablemente atribuido al mensurando”. En este sentido el mensurando debe analizarse correctamente para considerar todas las fuentes de incertidumbre.

La incertidumbre proporciona una idea de la calidad del resultado ya que indica cuanto puede alejarse un resultado del valor considerado como verdadero (**Duffau et al., 2010**). Es necesario mencionar que este es un requisito técnico indispensable como forma de búsqueda de posibles fuentes de error y para aquellos laboratorios que pretenden acreditarse según la norma internacional ISO/IEC 17025.

3.3.3.1. Etapas para el cálculo de la incertidumbre

Sánchez (2002) menciona que generalmente la incertidumbre puede estimarse en 4 etapas a pesar de que no es un proceso simple.



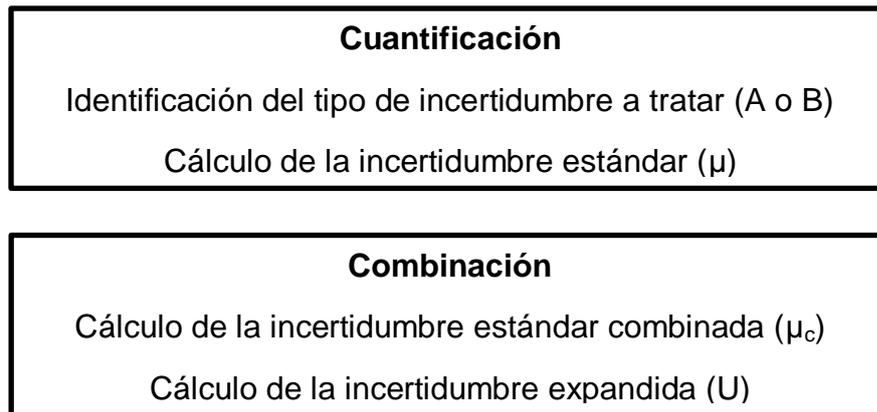


Figura 1. Etapas para el cálculo de la incertidumbre

Elaborado por: Johanna Cáceres

En forma general, una vez conocido el procedimiento de medición se establecieron todas las fuentes de incertidumbre y se identificó el tipo de evaluador (Evaluación tipo A o B) con el que se trabajó. En el caso de incertidumbres tipo A [Ec.23-24], la desviación estándar dividida para la raíz cuadrada del número de datos muestrales equivale a la incertidumbre estándar.

Incertidumbre estándar por repetibilidad

$$\mu_r = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$$

Ec.23

Incertidumbre estándar por reproducibilidad

$$\mu_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$$

Ec.24

Dónde:

S_r = desviación estándar de repetibilidad

S_R = desviación estándar de reproducibilidad

n = número de datos

En cambio, las incertidumbres tipo B suelen estar expresadas como intervalos de confianza, por lo que para convertirlas en incertidumbre

estándar es necesario conocer la distribución en que se basan, así como el nivel de confianza [Ec.25-27] (**Sánchez, 2002**).

Incertidumbre estándar a partir de certificados de calibración

$$\mu = \frac{U}{k}$$

Ec.25

Dónde:

U = incertidumbre expandida

k = factor de cobertura

Incertidumbre estándar a partir de tolerancia del material volumétrico (considerando una distribución triangular)

$$U_{m\acute{a}x} = \frac{EMP}{3}$$

Ec.26

$$\mu_{MV} = \frac{U_{m\acute{a}x}}{\sqrt{6}}$$

Ec.27

Dónde:

$U_{m\acute{a}x}$ = incertidumbre máxima del material

EMP = error máximo permitido

Además se calculó la incertidumbre estándar combinada (μ_c) utilizando la metodología de números relativos.

$$\mu_c = \sqrt{\sum \mu_i^2}$$

Ec.28

Dónde:

μ_i = incertidumbre estándar de cada componente involucrado

Finalmente es posible calcular la incertidumbre expandida multiplicando la anterior (μ_c) por un factor de cobertura k [Ec.29] (**Sánchez, 2002**). Generalmente se utiliza el valor $k=2$, que asume una distribución normal y una probabilidad del 95,45% de contener el valor verdadero.

$$U = k * \mu_c$$

Ec.29

Dónde:

μ_c = incertidumbre combinada

k = factor de cobertura

Sin embargo, según la Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida **GUM (2008)**, es conveniente calcular el factor de cobertura por medio de una distribución t con un número efectivo de grados de libertad, obtenido con la fórmula de Welch-Satterthwaite [Ec.30], luego de lo cual se obtiene la incertidumbre expandida como en la Ec.29. De este modo se eliminaron asunciones respecto a la distribución y a cambio se trabajó con un enfoque real.

$$v_{eff} = \frac{\mu_y^4}{\sum_{i=1}^N \frac{\mu_{i(y)}^4}{v_i}}$$

Ec.30

Dónde:

$\mu_y = \mu_c$ = incertidumbre combinada del método

$\mu_{i(y)}$ = incertidumbre estándar de cada componente

v_i = grados de libertad de cada componente

Es importante mencionar que para obtener el valor de los grados de libertad para cada componente (v_i) se debe tomar en cuenta lo siguiente:

- Para incertidumbre tipo B $v \rightarrow \infty$
- Para incertidumbre tipo A $v \approx n - 1, n - 2$ ó $n - 3$ (de acuerdo al número de variables involucradas y n corresponde al número de datos)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estimación lineal

Con la finalidad de abarcar tanto errores sistemáticos como aleatorios durante el proceso de preparación y lectura de estándares, se realizaron 5 curvas de calibración en 5 días, lo que permitió tener resultados comparables en condiciones de reproducibilidad y evaluar la diferencia, en unidades de absorbancia, entre las rectas de calibrado obtenidas.

Tabla 4. Datos de las curvas de calibración para la determinación de sulfatos

# Estándar	Concentración (mg/L)	Absorbancia (420 nm)				
		Día 1 (9/11/2015)	Día 2 (11/11/2015)	Día 3 (13/11/2015)	Día 4 (16/11/2015)	Día 5 (18/11/2015)
1	5	0,012	0,005	0,010	0,008	0,008
2	10	0,028	0,025	0,028	0,031	0,028
3	20	0,062	0,068	0,068	0,065	0,064
4	25	0,084	0,082	0,087	0,086	0,086
5	30	0,102	0,100	0,113	0,107	0,113
6	40	0,150	0,146	0,150	0,147	0,153
7	50	0,196	0,190	0,197	0,196	0,194

Elaborado por: Johanna Cáceres

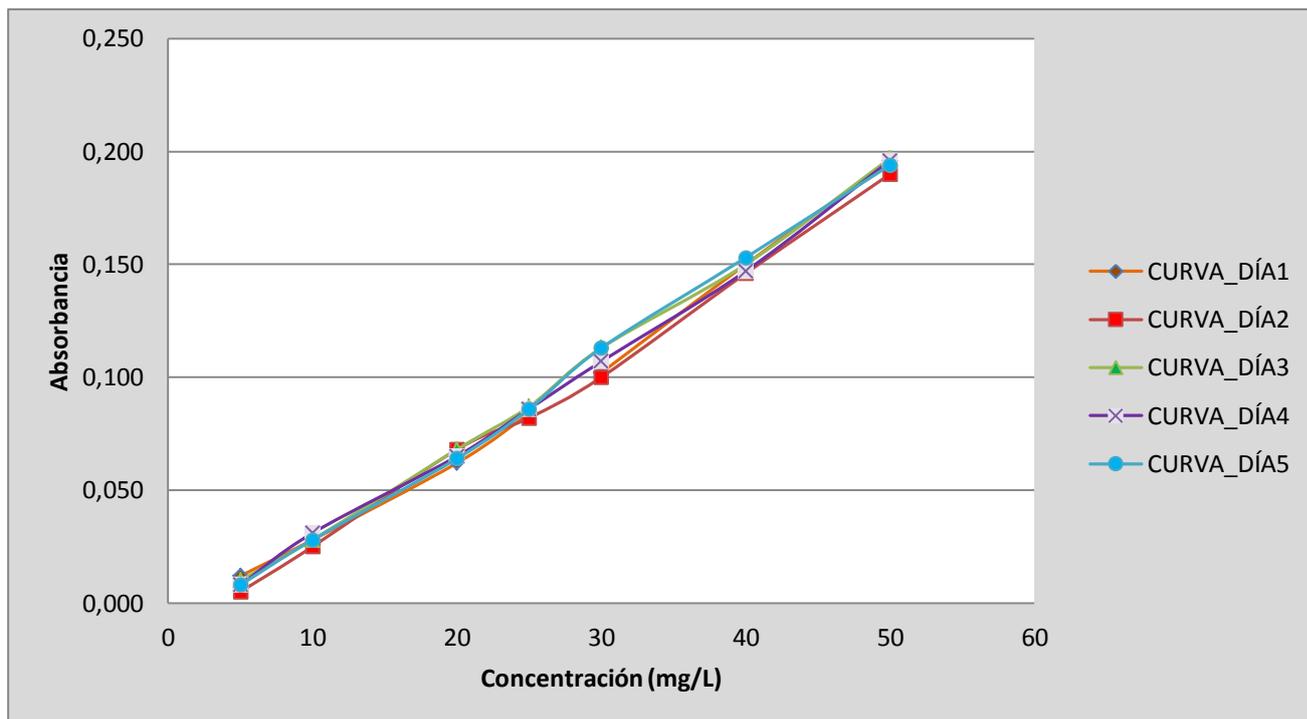


Figura 2. Curvas de Calibración para la determinación de sulfatos

Elaborado por: Johanna Cáceres

Pese a que el método de referencia (4500 E de Standard methods) menciona que sobrepasar la concentración de 40 mg/L de sulfatos, decrece la exactitud y baja la estabilidad de la suspensión de sulfato de bario, se realizaron las curvas de calibración en 7 niveles incluyendo un estándar de concentración de 50 mg/L, en donde se obtuvieron coeficientes de determinación superiores al límite establecido en los objetivos de validación (ver Tabla 1), de forma que el estándar de mayor concentración se ajusta al modelo lineal.

Sin embargo, es necesario ratificar estadísticamente si la correlación lineal es significativa, para lo cual se aplicó una prueba t de Student, como un mejor indicativo del modelo lineal, en donde el t calculado (35,874) es mayor que el crítico (2,571) por lo que se acepta que existe una correlación significativa entre la concentración y la turbidez generada por la misma con un nivel de confianza del 95% (ver ANEXO D, Figura D- 1. Prueba t de Student para la correlación lineal de las curvas de calibración).

Adicionalmente se realizó un análisis global; integrando todas las rectas, con el método de los mínimos cuadrados.

Tabla 5. Estimación Lineal de las curvas en forma integrada

Estadísticos	Global
m	0,004117
b	-0,014746
S_{yx}	0,003896
r	0,998063
r^2	0,996130
S_m	0,000045
S_b	0,001324

Elaborado por: Johanna Cáceres

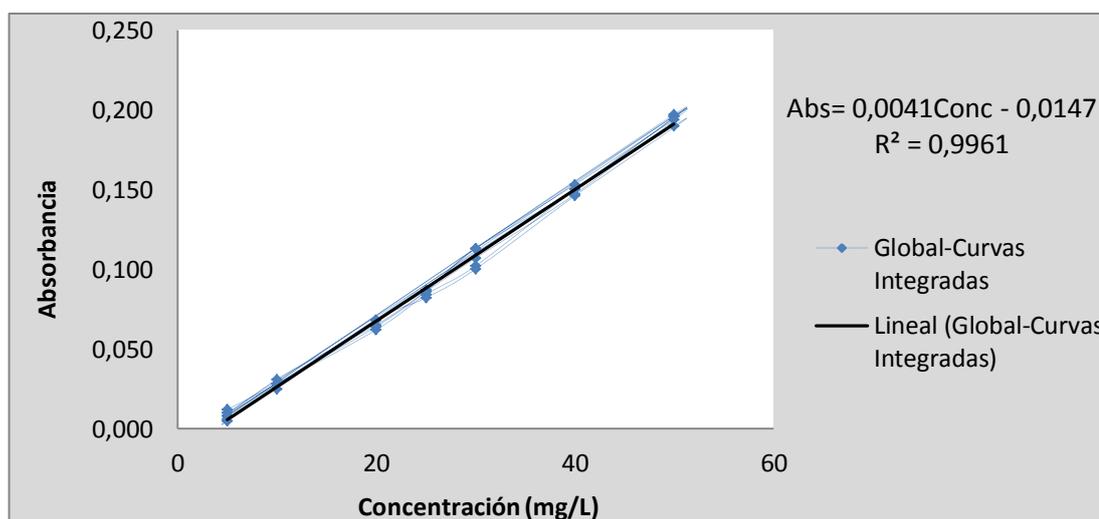


Figura 3. Curvas de calibración integradas para la determinación de sulfatos

Elaborado por: Johanna Cáceres

En base a la estimación lineal global (ver Tabla 5), se calcularon los límites superiores e inferiores (ver Tabla 6 y Figura 4), de las curvas de calibrado (Figura 3) que determinan la zona de confianza de medición, la cual permite verificar que las curvas posteriores se encuentren dentro de estos límites y así asegurar su validez, caso contrario se deberá descartar y corregir.

Dichos límites se han calculado empleando las Ec. 31, Ec 32 y adicionalmente la ecuación global de las rectas (ver ecuación Figura 3) como se detalla:

$$t_{crit} = t(1 - \alpha; v)$$

$$t_{crit} = t(0,05; 33)$$

$$t_{crit} = 2,035$$

Límite superior

$$LS = b + t_{crit} * s$$

Ec.31

$$LS = -1,475E - 2 + (2,035 * 3,896E - 3)$$

$$LS = -6,820E - 3$$

Límite inferior

$$LI = b - t_{crit} * S_{xy}$$

Ec.32

$$LI = -1,475E - 2 - (2,035 * 3,896E - 3)$$

$$LI = -2,267E - 2$$

Límites aplicados a cada concentración

Cálculo demostrativo: nivel 1 (5mg/L)

$$\text{Abs} = 0,0041 \text{ Conc} + \text{LS}$$

$$\text{Abs} = 0,0041 (5) - 6,820E-3$$

$$\text{Abs} = 0,0138$$

$$\text{Abs} = 0,0041 \text{ Conc} + \text{LI}$$

$$\text{Abs} = 0,0041 (5) - 2,267E-2$$

$$\text{Abs} = -0,0021$$

Tabla 6. Límites de la recta de calibrado integrada (global)

Concentración (mg/L)	Límite superior	Límite inferior
5	0,0138	-0,0021
10	0,0343	0,0185
20	0,0755	0,0597
25	0,0961	0,0802
30	0,1167	0,1008
40	0,1579	0,1420
50	0,1990	0,1832

Elaborado por: Johanna Cáceres

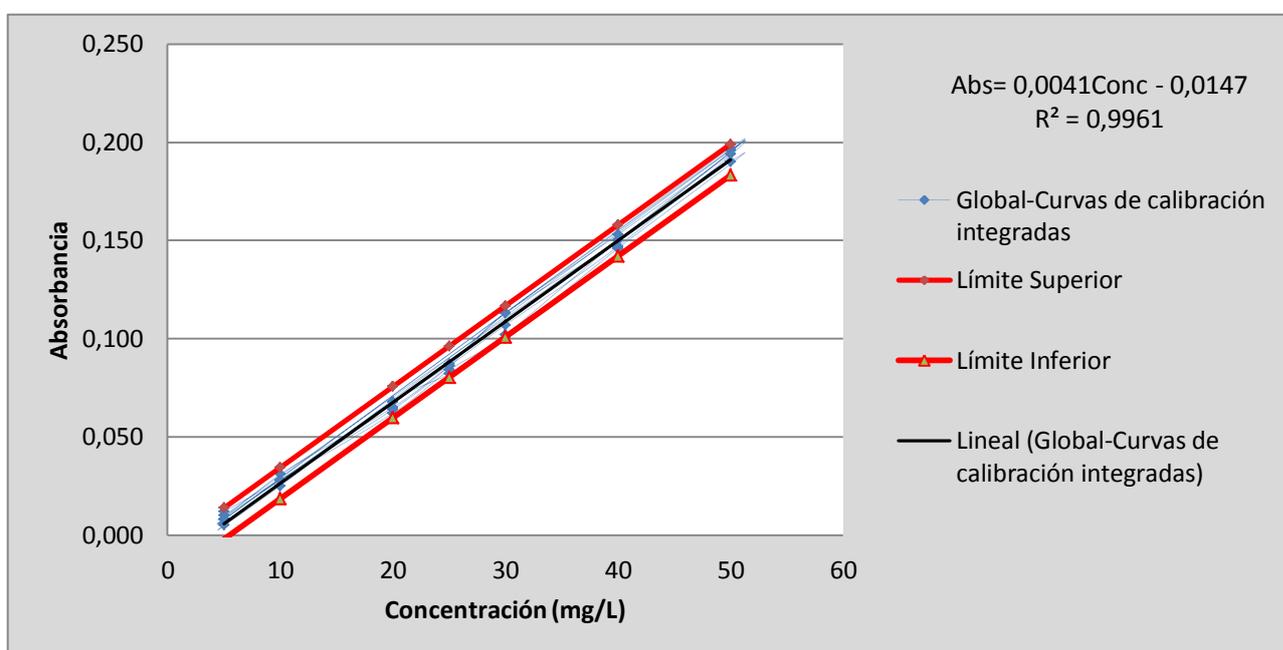


Figura 4. Límites de la recta de calibrado integrada (global)

Elaborado por: Johanna Cáceres

Por otro lado, no existe mayor variabilidad en la función respuesta al comparar la medición de un mismo estándar durante los diferentes días, a pesar de haber sido preparados simultáneamente, además se ha realizado el análisis global incluyendo las 5 curvas obtenidas por lo cual, al analizar una muestra, se puede utilizar cualquiera de ellas.

4.2 Límites

Como se menciona en 3.3.1.3 (Límites) para la determinación del límite de detección y límite de cuantificación se midieron 10 muestras del estándar de menor concentración (ver Tabla 7) dentro del rango de la curva de calibración (5-50 mg SO₄²⁻/L) a partir de donde se asegurará que el valor atribuido a la absorbancia corresponde a la presencia de sulfatos, mas no a posibles interferencias.

Para su cálculo se han utilizado Ec.11 y Ec.14.

Tabla 7. Lecturas para cuantificación de límites

#	Concentración (mg/L)	Concentración observada (mg/L)
1	5	4,439
2	5	5,885
3	5	4,680
4	5	5,162
5	5	5,664
6	5	5,403
7	5	5,403
8	5	5,885
9	5	5,664
10	5	5,162
	Promedio (\bar{X})	5,335
	Desviación estándar (s)	0,486

Elaborado por: Johanna Cáceres

Límite de Detección

$$LoD = 0 + 3s$$

$$LoD = 0 + 3(0,486)$$

$$LoD = 1,457$$

Límite de Cuantificación

$$LoQ = 0 + 10s$$

$$LoQ = 0 + 10(0,486)$$

$$LoQ = 4,856$$

El límite de detección es de 1,5 mg SO₄²⁻/L y el límite de cuantificación es de 4,9 mg SO₄²⁻/L.

Se eligió calcular los límites a partir de lecturas del estándar de menor concentración ($5\text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L}$), en lugar de utilizar lecturas del blanco o la aproximación estadística mencionada en 3.3.1.3 (Límites), que proporcionan un valor de límite de detección y cuantificación próximo a la mitad de los mencionados ($1,5\text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L}$ y $4,9\text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L}$ respectivamente), debido a que al tratarse de concentraciones muy pequeñas se prefiere asegurar el reporte a partir de los $4,9\text{ mg/L}$ y no a concentraciones menores, además que es un valor cercano al estándar con el que se ha trabajado (5 mg/L).

4.3 Exactitud

Los porcentajes de recuperación de los dos materiales de referencia certificados; uno de $200 \pm 5,61\text{ mg/L}$ de SO_4^{2-} y otro de $25 \pm 0,79\text{ mg/L}$ de SO_4^{2-} , permitieron por un lado evaluar la recuperación mediante dilución y por el otro evaluar la veracidad por lectura directa en la curva de calibración.

Tabla 8. Porcentajes de Recuperación de los materiales de referencia certificados (200 y 25 mg SO₄²⁻/L)

Concentración (mg/L)	Dilución	Concentración observada (mg/L)					%R					Rango %R
25	-	24,4	26,0	25,6	25,4	24,7	97,4	103,8	102,6	101,5	98,7	96,4 - 105,8
	-	24,6	26,2	25,9	24,4	25,2	98,4	104,8	103,5	97,6	100,7	
	-	24,1	25,2	24,7	25,6	25,2	96,4	100,9	98,7	102,4	100,7	
	-	25,6	25,7	25,2	25,4	25,2	102,3	102,9	100,7	101,5	100,7	
	-	24,1	26,5	24,2	24,1	24,7	96,4	105,8	96,8	96,6	98,7	
200	5	203,5	201,1	193,3	195,2	198,9	101,7	100,6	96,6	97,6	99,5	96,6 - 103,0
	5	201,1	206,1	199,3	195,2	196,5	100,5	103,0	99,7	97,6	98,3	
	5	193,7	198,7	198,1	200,1	202,5	96,9	99,3	99,1	100,0	101,3	
	5	201,1	195,0	198,1	200,1	196,5	100,5	97,5	99,1	100,0	98,3	
	5	202,3	203,6	196,9	204,9	196,5	101,1	101,8	98,5	102,5	98,3	

Elaborado por: Johanna Cáceres

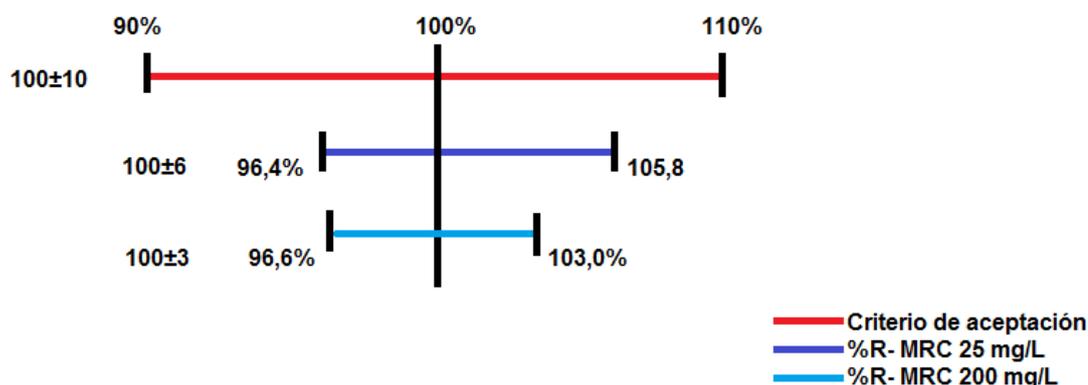


Figura 5. Resumen de los rangos de los porcentajes de recuperación

Elaborado por: Johanna Cáceres

Los porcentajes de recuperación de los dos materiales de referencia cumplen con el criterio de aceptación establecido en los objetivos de validación (ver Tabla 1). Además en base a esto, se aprecia que la dilución no altera significativamente la lectura, de forma que la utilización de diluciones es adecuada en el método.

Sin embargo, al ser obtenidas por lectura directa las concentraciones del material de referencia de menor concentración y por abarcar un rango más amplio se establece que la recuperación del método es de $100 \pm 6\%$.

Así mismo, se ratificó estadísticamente, mediante una prueba t de Student, que no existe diferencia significativa entre el valor obtenido de la experiencia analítica y el valor de referencia, por lo cual la veracidad es aceptable, al ser el t calculado (200 mg/L: 1,243; 25 mg/L: 0,769) menor que el t crítico (2,064) (ver ANEXO D, Ilustración D- 2. Prueba t de Student para exactitud).

4.4 Precisión

Al no contar con muestras de diferentes concentraciones en un amplio rango de trabajo, se utilizaron para las corridas estándares de concentración conocida, preparados simultáneamente en el laboratorio a partir de un reactivo con una pureza del 99,99%, según se especifica en el certificado adjunto (ver ANEXO C, Ilustración C- 8).

Para evaluar la precisión en términos de repetibilidad (5 veces en las mismas condiciones) y reproducibilidad (5 días) se trabajó con 9 niveles.

El TULAS establece como límite máximo permisible 250 mg SO₄²⁻/L en aguas de consumo humano y uso doméstico, de tal modo se requiere cuantificar concentraciones superiores al rango lineal, por lo que se estableció el intervalo de concentraciones del analito, sobre el cual el método es aplicable. En este sentido, se realizó la validación por dilución, así el rango de concentración en que se efectuaron las corridas fue desde 5 mg/L hasta 250 mg/L de SO₄²⁻ (intervalo de trabajo).

Tabla 9. Datos experimentales de las corridas de cuantificación de sulfatos

	Día 1 (19/11/2015)	Día 2 (21/11/2015)	Día 3 (23/11/2015)	Día 4 (25/11/2015)	Día 5 (27/11/2015)
Concentración Esperada (mg/L)	Concentración observada (mg/L)				
5,0	5,3	5,8	5,4	5,6	5,8
	5,1	4,6	5,6	5,3	5,3
	5,3	5,8	5,4	5,8	5,5
	5,6	5,8	5,4	5,3	5,0
	5,6	5,5	5,4	5,1	5,3
10,0	10,2	10,0	10,9	10,7	10,5
	10,7	11,0	10,2	10,2	10,8
	10,5	10,0	10,0	10,0	10,5
	10,7	9,7	10,2	10,7	10,1
	10,5	10,7	10,5	9,7	9,8
20,0	19,2	20,3	19,9	20,2	20,1
	20,2	21,0	20,1	20,0	19,9
	20,2	19,6	19,6	19,8	19,9
	20,9	20,8	19,9	19,0	20,6
	20,2	20,1	20,3	20,7	19,7
25,0	24,6	24,2	24,4	24,6	24,7
	25,8	25,2	25,6	24,4	24,4
	24,1	24,7	25,2	24,9	24,2
	24,6	24,5	24,2	24,4	24,7
	25,3	25,0	24,4	24,9	24,4
30,0	29,0	30,1	29,0	29,3	30,0
	30,2	29,4	29,7	29,8	30,0
	29,2	28,7	29,3	30,7	29,5
	30,0	30,9	29,5	29,0	30,0

	Día 1 (19/11/2015)	Día 2 (21/11/2015)	Día 3 (23/11/2015)	Día 4 (25/11/2015)	Día 5 (27/11/2015)
Concentración Esperada (mg/L)	Concentración observada (mg/L)				
	30,2	30,4	30,0	28,8	29,5
40,0	39,7	40,5	40,1	39,5	40,5
	40,2	39,7	39,6	40,0	40,5
	39,7	40,7	40,8	40,3	40,3
	40,2	40,0	40,1	40,0	39,8
	40,5	39,7	39,1	39,8	40,3
50,0	50,5	50,6	50,2	50,5	50,8
	50,2	50,8	50,0	49,3	50,8
	50,5	50,1	49,7	49,8	50,3
	50,2	50,3	50,5	50,3	49,9
	49,5	50,6	50,0	51,0	49,9
150,0 (Dilución 5)	152,3	148,3	149,9	148,8	148,6
	149,8	149,5	148,7	148,8	149,8
	149,8	150,7	151,1	150,0	148,6
	151,0	151,9	152,3	147,6	149,8
	149,8	149,5	151,1	150,0	149,8
250,0 (Dilución 10)	250,9	250,3	251,1	250,1	251,6
	248,4	251,6	248,7	250,1	251,6
	246,0	252,8	249,9	247,7	249,3
	252,3	251,6	247,5	248,9	250,5
	249,8	250,3	248,7	248,9	248,1

Elaborado por: Johanna Cáceres

Esta concentración máxima de 250 mg/L se estableció tomando en cuenta el límite máximo permisible (LMP) establecido en el TULAS y debido a que no se dispone en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos "LACONAL" de un historial de muestras.

Por otro lado los coeficientes de variación por repetibilidad (%CVR) y por reproducibilidad (%CVR), que se obtuvieron utilizando los resultados del análisis de ANOVA detallado en la sección 4.6 (Tratamiento Estadístico) y utilizando las Ec.16 - Ec. 19, son aceptados de acuerdo a lo establecido en los objetivos de validación especificados en la Tabla 1 (Objetivos de Validación).

Cálculo demostrativo: nivel 1 (5 mg/L)

Tabla 10. Resumen de concentraciones al evaluar el nivel 1 de (5mg/L)

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	5,329	5,789	5,403	5,594	5,755
2	5,085		5,644	5,350	5,276
3	5,329	5,789	5,403	5,838	5,515
4	5,573	5,789	5,403	5,350	5,036
5	5,573	5,543	5,403	5,105	5,276
\bar{x}	5,465				
ANOVA-CME	0,046				
ANOVA-CMTr	0,090				

*Nota: El casillero marcado con color rojo representa el descarte de un dato que no corresponde a la distribución, detectado al realizar el test de Grubbs. Dirigirse a 4.6 (Tratamiento estadístico) y ver Tabla 14.

Elaborado por: Johanna Cáceres

Repetibilidad

Desviación estándar

$$S_r = \sqrt{CME}$$

$$S_r = \sqrt{0,046}$$

$$S_r = 0,214$$

Coefficiente de variación

$$\% CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}_{nT}}$$

$$\% CV_r = \frac{0,214}{5,465}$$

$$\% CV_r = 3,909$$

Reproducibilidad

Desviación estándar

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + \frac{CMTr - CME}{n}}$$

$$S_R = \sqrt{0,214^2 + \frac{0,090 - 0,046}{5}}$$

$$S_R = \sqrt{0,214^2 + 0,0089}$$

Si por efectos aleatorios el segundo término de la raíz es menor a 0 debe asumirse 0

$$S_R = 0,234$$

Coefficiente de variación

$$\% CV_R = \frac{S_R}{\bar{X}_{nT}}$$

$$\% CV_R = \frac{0,234}{5,465}$$

$$\% CV_R = 4,274$$

Tabla 11. Desviaciones estándar y coeficientes de variación de los niveles de concentración

Concentración (mg/L)	S _r	% CV _r	S _R	% CV _R
5	0,214	3,909	0,234	4,274
10	0,401	3,876	0,401	3,876
20	0,471	2,337	0,471	2,337
25	0,356	1,448	0,356	1,448
30	0,615	2,073	0,615	2,073
40	0,371	0,926	0,371	0,926
50	0,443	0,881	0,443	0,881
150	1,142	0,762	1,248	0,833
250	1,293	0,517	1,471	0,588

Elaborado por: Johanna Cáceres

Adicionalmente se evaluó la validez de los coeficientes de variación del método, calculados anteriormente, en base a la ecuación de Horwitz. Los criterios de aceptabilidad tanto para la repetibilidad como para reproducibilidad son $\%CV_h/2$ y $2/3 \%CV_h$, respectivamente. Para lo cual se calcularon los coeficientes de variación de Horwitz utilizando la Ec.20 para todos los 9 niveles de concentración.

Cálculo demostrativo: nivel 1 (5 mg/L)

$$\rho = \frac{m}{V}$$

$$\rho = \frac{199,8294 \text{ g} - 76,1891 \text{ g}}{121,5 \text{ mL}}$$

$$\rho = 1,0176 \text{ g/mL}$$

Ec.33

$$\% CV_h = 2^{(1-0.5 \log c)}$$

$$5 \frac{mg}{L} * \frac{1 g}{1000 mg} * \frac{1 L}{1000 mL} * \frac{1 mL}{1,0176 g} = 4,91E - 6 \frac{g}{g}$$

$$\% CV_h = 2^{(1-0.5 \log c)}$$

$$\% CV_h = 2^{(1-0.5 \log 4,91E-6)}$$

$$\% CV_h = 2^{(1-(-2,654))}$$

$$\% CV_h = 2^{(3,654)}$$

$$\% CV_h = 12,59$$

Tabla 12. Coeficientes de variación de Horwitz

Concentración (mg/L)	%CV _h	Repetibilidad %CV _h /2	Reproducibilidad (2/3)%CV _h
5	12,59	6,30	8,39
10	11,34	5,67	7,56
20	10,22	5,11	6,81
25	9,88	4,94	6,59
30	9,61	4,81	6,41
40	9,21	4,60	6,14
50	8,90	4,45	5,94
150	7,55	3,77	5,03
250	6,99	3,49	4,66

Elaborado por: Johanna Cáceres

Debido a que las soluciones estándar se prepararon a diario, y las repeticiones se realizaron en el mismo momento, se observa que, no existe una variación superior al criterio de aceptabilidad de Horwitz (ver Tabla 11 y Tabla 12), por lo que la precisión se considera aceptable ya que los valores que se obtienen al aplicar la Ec.20 son límites razonables de variabilidad que permiten calificar la precisión intra e interlaboratorio de cualquier método analítico.

4.5 Aplicabilidad

“El método de determinación de sulfatos por turbidimetría es aplicable para el análisis del analito SO_4^{2-} en las matrices de agua potable y agua purificada envasada en el rango de 4,9 a 250 unidades de concentración”.

4.6 Tratamiento Estadístico

Previo al tratamiento estadístico de los datos mediante análisis de varianza simple se procedió a verificar si existen valores atípicos o aberrantes aplicando el test de Grubbs. Para su cálculo se han aplicado la Ec. 21 y la Ec.22.

Cálculo demostrativo nivel 1 (5 mg/L)

Tabla 13. Resumen en orden ascendente de concentraciones al evaluar el nivel 1 de (5mg/L)

n	Concentración (mg/L)
1	4,559
2	5,036
3	5,085
4	5,105
5	5,276
6	5,276
7	5,329
8	5,329
9	5,350
10	5,350
11	5,403
12	5,403
13	5,403
14	5,403
15	5,515
16	5,543
17	5,573
18	5,573
19	5,594
20	5,644
21	5,755
22	5,789
23	5,789

n	Concentración (mg/L)
24	5,789
25	5,838
\bar{x}	5,428
s_g	0,290

Elaborado por: Johanna Cáceres

$$t_{min} = \frac{|X_{min} - \bar{X}|}{s_g}$$

$$t_{min} = \frac{|4,559 - 5,428|}{0,290}$$

$$t_{min} = 2,999$$

$$t_{m\acute{a}x} = \frac{|X_{max} - \bar{X}|}{s_g}$$

$$t_{m\acute{a}x} = \frac{|5,838 - 5,428|}{0,290}$$

$$t_{m\acute{a}x} = 1,413$$

$$t_{crit} = t(1 - \alpha; v)$$

$$t_{crit} = t(0,05; 24)$$

$$t_{crit} = 2,064$$

Al comparar t crítico con t mínimo ($t_{min} > t_{crit}$) se concluye que 4,559 es un datos aberrante. Entonces, se procedió a evaluar de la misma forma el siguiente dato (5,036), ya que al ser Grubbs un análisis iterativo se requiere que los dos extremos sean aceptados, es decir, que presenten valores menores en comparación al t crítico.

$$t_{min} = \frac{|X_{min} - \bar{X}|}{s_g}$$

$$t_{min} = \frac{|5,036 - 5,428|}{0,290}$$

$$t_{min} = 1,352$$

En el cálculo se observó que $t_{\min} < t_{\text{crit}}$ por lo cual en el nivel de 5 mg/L se reportó un único valor aberrante (4,559). En la Tabla 14 se reporta la cantidad de datos aberrantes en cada nivel.

Tabla 14. Resumen Test de Grubbs

Concentración (mg/L)	# de Datos aberrantes	Datos aberrante	t_{\min}	t_{\max}	t_{crit}	Conclusión
5	1	4,559	2,999	1,413	2,064	Existe 1 dato atípico respecto al menor valor
10	0		1,672	1,598	2,064	No existen datos atípicos
20	1	19,019	2,171	1,923	2,064	Existe 1 dato atípico respecto al menor valor
25	2	25,819 25,645	1,336	2,502 2,136	2,064	Existen 2 datos atípicos respecto a los valores mayores
30	0		1,740	2,059	2,064	No existen datos atípicos
40	1	39,14	2,312	1,899	2,064	Existe 1 dato atípico respecto al menor valor
50	0		2,020	1,768	2,064	No existen datos atípicos
150	0		1,892	1,965	2,064	No existen datos atípicos
250	0		1,749	1,913	2,064	No existen datos atípicos

Elaborado por: Johanna Cáceres

Grubbs rebeló la presencia de datos atípicos en los nivel de 5, 20, 25 y 40 mg/L, los mismos que son un indicativo de no uniformidad dentro de la muestra, atribuyendo la presencia de estos valores aberrantes a posibles errores experimentales, sin embargo, no se eliminaron debido a que no se tiene la certeza absoluta de su origen pero sí fueron descartados para el análisis de varianza simple ya que estadísticamente no pertenece a la distribución de datos.

Así, se realizó el análisis simple de varianza para cada uno de los niveles de ensayo mediante la aplicación del paquete estadístico Infostat y la hoja de cálculo Excel (ver ANEXO D, Ilustración D-3 a D- 12). Se determinó que no existieron diferencias significativas en las varianzas de los grupos muestrales tras los distintos días de análisis de los estándares, pues se obtuvieron valores de F calculado menores a los valores críticos.

Tabla 15. Resumen ANOVA

Concentración (mg/L)	n	SCTr	CMTr	SCE	CME	F calculado	F crítico	Conclusión
5	24	0,361	0,090	0,867	0,046	1,977	2,895	No existe diferencia significativa
10	25	0,173	0,043	3,221	0,161	0,269	2,866	No existe diferencia significativa
20	24	0,449	0,112	4,207	0,221	0,506	2,895	No existe diferencia significativa
25	23	0,159	0,040	2,286	0,127	0,314	2,928	No existe diferencia significativa
30	25	0,576	0,144	7,574	0,379	0,381	2,866	No existe diferencia significativa
40	24	0,335	0,084	2,622	0,138	0,607	2,895	No existe diferencia significativa

Concentración (mg/L)	n	SCTr	CMTr	SCE	CME	F calculado	F crítico	Conclusión
50	25	0,468	0,117	3,918	0,196	0,597	2,866	No existe diferencia significativa
150	25	10,311	2,578	26,069	1,303	1,978	2,866	No existe diferencia significativa
250	25	16,504	4,126	33,454	1,673	2,467	2,866	No existe diferencia significativa

Elaborado por: Johanna Cáceres

4.7 Incertidumbre

A la hora de expresar el resultado de una medición, representa una obligación dar alguna indicación cuantitativa de la calidad del resultado, de otro modo los valores no pueden compararse entre sí, ni con valores de referencia especificados en normativas. Tomando en cuenta dicha necesidad se estableció un procedimiento comprensible y aceptado universalmente para evaluar y expresar la incertidumbre, como indicativo de calidad del resultado. Como se menciona en 3.3.3.1 (Etapas para el cálculo de la incertidumbre) se siguieron 4 etapas para la estimación de la incertidumbre expandida del método.

4.7.1. Especificación

Determinación de sulfatos en aguas claras expresada en mg/L, en base a la ecuación $Abs = 0,0041 Conc - 0,0147$.

4.7.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre

Se analizó todo el proceso que involucra el tratamiento de una muestra de modo que se identificaron todas las contribuciones a la incertidumbre del método.

Tabla 16. Fuentes de incertidumbre del método

#	Fuente de incertidumbre	Criterio	Sustento	Conclusión
1	Muestreo y toma de muestra	Se desestima	Existen instructivos internos y técnicas que controlan las fuentes de error.	La fuente está bajo control
2	Recepción e ingreso de muestra	Se desestima	Se lleva a cabo por personal capacitado. Las muestras tienen un código único e irrepetible.	La fuente está bajo control
3	Almacenamiento, manejo y preparación de la muestra	Se desestima	Existen instructivos y un control minucioso por parte del director técnico.	La fuente está bajo control
4	Ensayo o análisis de la muestra -Preparación de la curva de calibración -Lectura de la muestra	Obligatoriamente se estima	Se deben tomar en cuenta todos los errores que involucran el proceso	La fuente no está bajo control
5	Cálculos	Se desestima	Existen hojas de cálculo validadas y controladas. El director técnico se encarga de la verificación del correcto desarrollo de estos.	La fuente está bajo control
6	Informe de resultados	Se desestima	El director de calidad supervisa el reporte de resultados y autoriza la salida del informe.	La fuente está bajo control

Elaborado por: Johanna Cáceres

4.7.3. Cuantificación y Combinación

No se desestimó el ensayo de la muestra, por lo que se diseñó un esquema que resume a breves rasgos el procedimiento que se siguió para obtener la incertidumbre combinada del método.

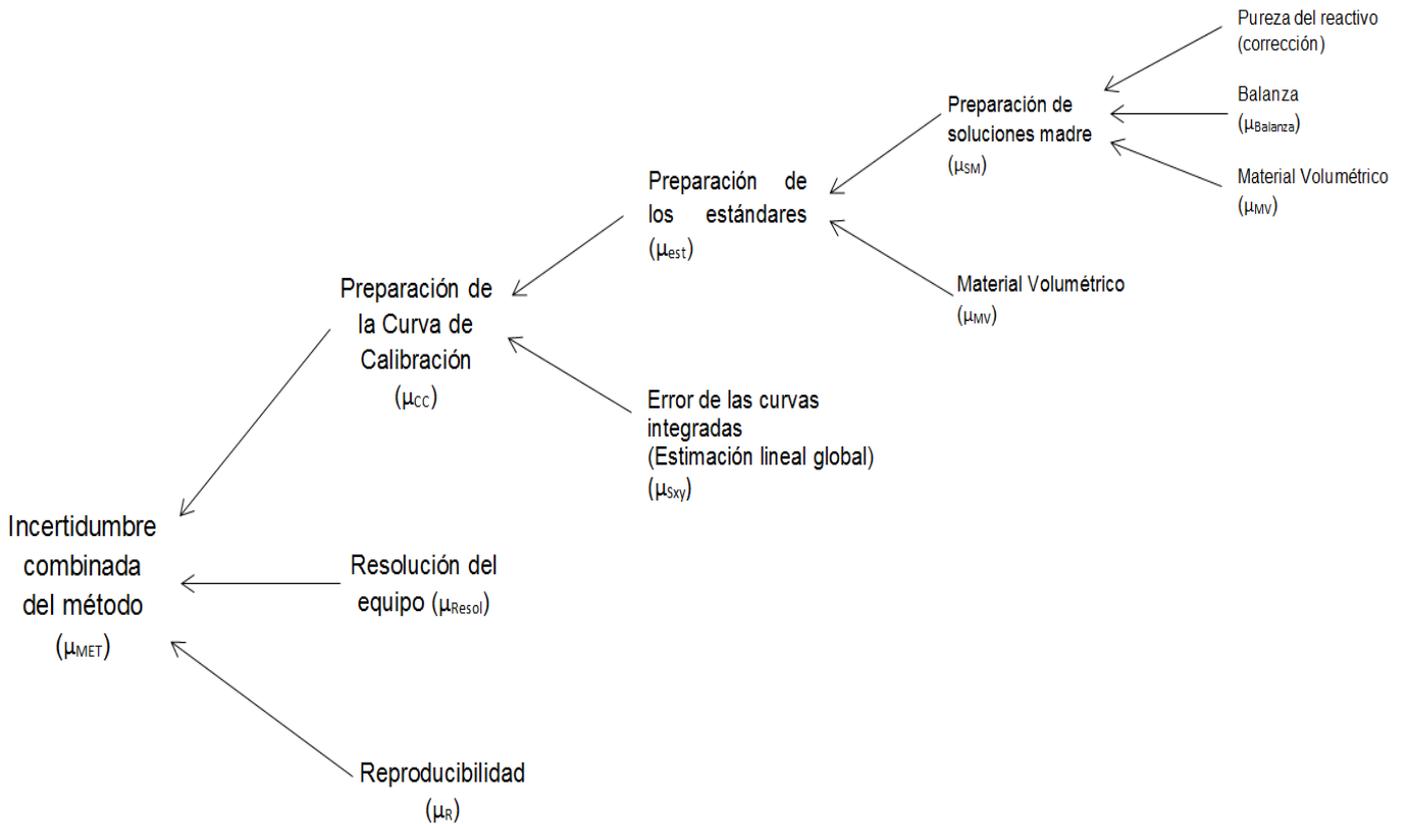


Figura 6. Esquema general para el cálculo de la incertidumbre combinada del método de determinación de sulfatos

Elaborado por: Johanna Cáceres

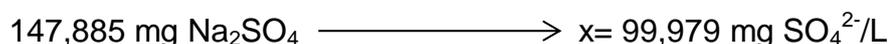
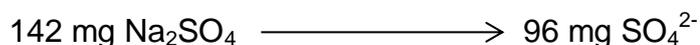
Pureza del reactivo

Al no contar, en el certificado del reactivo adjunto (ver ANEXO C, Ilustración C- 8), con la incertidumbre por pureza, sino únicamente con el porcentaje de pureza (99,99%), se realizó una corrección en la concentración de las soluciones preparadas.

Peso de $\text{Na}_2\text{SO}_4 = 0,1479$ g al 100% de pureza

Peso de $\text{Na}_2\text{SO}_4 = 0,147885$ g al 99,99% de pureza

Por lo tanto las soluciones madre ya no corresponden a 100 y 1000 mg SO₄²⁻/L sino a 99,979 y 999,787 mg SO₄²⁻/L respectivamente, según lo propuesto.



Criterio que se aplicó, además, a cada concentración de los estándares, en base a la concentración de la solución madre.

Cálculo demostrativo: Nivel 1

$$Conc_{est} = \frac{Conc_{SM} * V_{SM}}{V_{est}}$$

Ec.34

$$Conc_{est} = \frac{99,979 \frac{\text{mg SO}_4}{\text{L}} * 5 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$$

$$Conc_{est} = 4,9989 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L}$$

Tabla 17. Concentraciones corregidas de los estándares (9 niveles)

Concentración (mg/L)	Concentración corregida(mg/L)
5	4,9989
10	9,9979
20	19,9957
25	24,9947
30	29,9936
40	39,9915
50	49,9894
150	149,9681
250	249,9468

Elaborado por: Johanna Cáceres

Balanza

La incertidumbre combinada de la balanza OHAUS se especifica directamente en el certificado de calibración adjunto (ver ANEXO C, Ilustración C- 1).

$$\mu_{Balanza} = 0,00023 \text{ g}$$

Material Volumétrico

Se utilizaron las Ec.25 - Ec.27 de acuerdo al tipo de certificado de cada uno de los materiales (ver ANEXO C, Ilustración C-2 a C-7)

Cálculo demostrativo: balón de aforo de 1000 ml

$$U_{m\acute{a}x} = \frac{0,6}{3}$$

$$U_{m\acute{a}x} = 0,2$$

$$\mu_{MV} = \frac{0,2}{\sqrt{6}}$$

$$\mu_{MV} = 0,0816$$

Tabla 18. Incertidumbre estándar del material volumétrico (μ_{MV})

Descripción	Certificado	Uso	Volumen (mL)	Vol Real (mL)	Tolerancia (mL)	U (mL)	Desviación Estándar (mL)	μ_{MV} (mL)
Balón de Aforo	Calidad	Solución madre	1000	1000,0700	0,6000	0,2000		0,0816
Balón de Aforo	Calidad	Solución madre	100	100,0048	0,1000		0,0118	0,0136
Balón de Aforo	Calidad	Dilución	100	100,0048	0,1000		0,0118	0,0136
Pipeta Aforada	Calibración	Alícuota	25	25,0300	0,0300	0,0080	0,0300	0,0040
Pipeta Aforada	Calidad	Alícuota	10	9,9994	0,0200		0,0040	0,0027
Pipeta Aforada	Calidad	Alícuota	5	5,0011	0,0150		0,0030	0,0020

Elaborado por: Johanna Cáceres

Incertidumbre típica combinada de las soluciones madre (μ_{SM})

Cálculo demostrativo: solución madre de 100 mg/L

$$\mu_{SM} = Conc * \sqrt{\left(\frac{\mu_{Balón}}{Vol\ aforo}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Balanza}}{Peso}\right)^2}$$

Ec.38

$$\mu_{SM} = 99,979 \text{ mg/L} * \sqrt{\left(\frac{0,0816 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,00023 \text{ g}}{0,1479 \text{ g}}\right)^2}$$

$$\mu_{SM} = 0,1557 \text{ mg/L}$$

Tabla 19. Incertidumbre típica combinada de las soluciones madre (μ_{SM})

Concentración (mg/L)	99,97873	999,78734
$\mu_{Balón}$ (mL)	0,08165	0,01361
Volumen de aforo (mL)	1000	100
$\mu_{Balanza}$ (g)	0,00023	0,00023
Pesado (g)	0,14790	0,14790
μ Solución madre (mg/L) (μ_{SM})	0,15569	1,56072

Elaborado por: Johanna Cáceres

Incertidumbre típica combinada de la preparación de estándares (μ_{est})

Cálculo demostrativo: Nivel 1 (4,9989 mg/L)

$$\mu_{est} = Conc * \sqrt{\left(\frac{\mu_{SM}}{Conc}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Balón}}{Vol \text{ aforo}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Pipeta}}{Alicuota}\right)^2}$$

Ec.36

$$\mu_{est} = 4,9989 \text{ mg/L} * \sqrt{\left(\frac{0,1557 \text{ mg/L}}{99,9787 \text{ mg/L}}\right)^2 + \left(\frac{0,0136 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,0020 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}\right)^2}$$

$$\mu_{est} = 0,0081 \text{ mg/L}$$

Tabla 20. Incertidumbre típica combinada de la preparación de estándares (μ_{est}) (9 niveles)

Concentración (mg/L)	4,9989	9,9979	19,9957	24,9947	29,9936	39,9915	49,9894	149,9681	249,9468
μ_{SM} (mg/L)	0,1557	0,1557	0,1557	0,1557	0,1557	0,1557	0,1557	1,5607	1,5607
Conc. solución madre (mg/L)	99,9787	99,9787	99,9787	99,9787	99,9787	99,9787	99,9787	999,7873	999,7873
$\mu_{Balón}$ (mL)	0,0136	0,0136	0,0136	0,0136	0,0136	0,0136	0,0136	0,0136	0,0136
Volumen Aforo (mL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Concentración (mg/L)	4,9989	9,9979	19,9957	24,9947	29,9936	39,9915	49,9894	149,9681	249,9468
$\mu_{\text{Pipeta 5 mL}}$ (mL)	0,0020				0,0020	0,0020		0,0020	
Volumen Aforo (mL)	5				5	5		5	
$\mu_{\text{Pipeta 10 mL}}$ (mL)		0,0027	0,0027			0,0027		0,0027	
Volumen Aforo (mL)		10	10			10		10	
$\mu_{\text{Pipeta 25 mL}}$ (mL)				0,0040	0,0040	0,0040	0,0040		0,0040
Volumen Aforo (mL)				25	25	25	25		25
μ_{est} (mg/L)	0,0081	0,0159	0,0317	0,0393	0,0487	0,0658	0,0786	0,2462	0,3937

Elaborado por: Johanna Cáceres

Incertidumbre típica combinada de la curva de calibración (μ_{CC})

Para realizar la curva de calibración se prepararon las soluciones madre, los estándares y adicionalmente se consideró el error tipo.

Cálculo demostrativo: Nivel 1 (4,9989 mg/L)

$$\mu_{CC} = \sqrt{(\mu_{est})^2 + (\mu_{Sxy})^2}$$

Ec.37

$$\mu_{CC} = \sqrt{(\mu_{est})^2 + \left(\frac{\text{Error tipo}}{\sqrt{n}}\right)^2}$$

$$\mu_{CC} = \sqrt{(0,0081 \text{ mg/L})^2 + \left(\frac{0,9464 \text{ (mg/L)}}{\sqrt{35}}\right)^2}$$

$$\mu_{CC} = 0,1602 \text{ mg/L}$$

Tabla 21. Incertidumbre típica combinada de la curva de calibración (μ_{CC})

Concentración (mg/L)	4,9989	9,9979	19,9957	24,9947	29,9936	39,9915	49,9894	149,9681	249,9468
μ_{est} (mg/L)	0,0081	0,0159	0,0317	0,0393	0,0487	0,0658	0,0786	0,2462	0,3937
μ_{Sxy} (mg/L)	0,1600	0,1600	0,1600	0,1600	0,1600	0,1600	0,1600	0,1600	0,1600

Concentración (mg/L)	4,9989	9,9979	19,9957	24,9947	29,9936	39,9915	49,9894	149,9681	249,9468
Sxy (mg/L)	0,9464	0,9464	0,9464	0,9464	0,9464	0,9464	0,9464	0,9464	0,9464
n	35	35	35	35	35	35	35	35	35
μ_{CC} (mg/L)	0,1602	0,1607	0,1631	0,1647	0,1672	0,1730	0,1782	0,2936	0,4250

Elaborado por: Johanna Cáceres

Incertidumbre por resolución del equipo (μ_{resol})

$$\mu_{resol} = \frac{\text{resolución del equipo}}{2\sqrt{3}}$$

Ec.38

$$\mu_{resol} = \frac{0,001 \text{ abs}}{2\sqrt{3}}$$

$$\mu_{resol} = 0,0003 \text{ abs}$$

Tabla 22. Incertidumbre por resolución del equipo (μ_{resol})

Resolución (abs)	0,0010
μ_{Resol} (abs)	0,0003

Elaborado por: Johanna Cáceres

Incertidumbre por reproducibilidad (μ_R)

La desviación estándar de reproducibilidad se calculó previamente en 4.4 (Precisión), (ver tabla 11).

Cálculo demostrativo: Nivel 1 (4,9989 mg/L)

$$\mu_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$$

$$\mu_R = \frac{0,2336}{\sqrt{24}}$$

$$\mu_R = 0,0477 \text{ mg/L}$$

Tabla 23. Incertidumbre por reproducibilidad (μ_R)

Concentración (mg/L)	n	S_R	μ_R (mg/L)
5	24	0,2336	0,0477
10	25	0,4013	0,0803
20	24	0,4706	0,0961
25	23	0,3563	0,0743
30	25	0,6154	0,1231

Concentración (mg/L)	n	S _R	μ _R (mg/L)
40	24	0,3715	0,0758
50	25	0,4426	0,0885
150	25	1,2483	0,2497
250	25	1,4708	0,2942

*Nota: n representa el número de observaciones totales por nivel, valor reducido mediante el test de Grubbs.

Elaborado por: Johanna Cáceres

Incertidumbre típica combinada del método (μ_{MET})

Cálculo demostrativo: Nivel 1 (4,9989 mg/L)

$$\mu_{met} = Conc * \sqrt{\left(\frac{\mu_{cc}}{Conc_{est}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Resol}}{Lectura\ media}\right)^2 + \left(\frac{\mu_R}{\bar{X}}\right)^2}$$

Ec.39

$$\mu_{met} = 4,9989 * \sqrt{\left(\frac{0,1602\ mg/L}{4,9989\ mg/L}\right)^2 + \left(\frac{0,0003\ abs}{0,008\ abs}\right)^2 + \left(\frac{0,0477\ mg/L}{5,4646\ mg/L}\right)^2}$$

$$\mu_{met} = 0,2522\ mg/L$$

Tabla 24. Incertidumbre típica combinada del método (μ_{MET})

Concentración (mg/L)	4,9989	9,9979	19,9957	24,9947	29,9936	39,9915	49,9894	149,9681	249,9468
μ _R (mg/L)	0,0477	0,0803	0,0961	0,0743	0,1231	0,0758	0,0885	0,2497	0,2942
̄X (mg/L)	5,4646	10,3541	20,1355	24,6165	29,6804	40,1048	50,2400	149,9059	250,0351
μ _{Resol} (abs)	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003
Ȳ (abs)	0,0080	0,0280	0,0680	0,0870	0,1070	0,1500	0,1920	0,1090	0,0880
μ _{CC} (mg/L)	0,1602	0,1607	0,1631	0,1647	0,1672	0,1730	0,1782	0,2936	0,4250
μ _{MET} (mg/L)	0,2522	0,2063	0,2071	0,1993	0,2234	0,2038	0,2125	0,5543	0,9683

Elaborado por: Johanna Cáceres

Aunque según la **GUM (2008)**, la incertidumbre típica combinada puede ser utilizada universalmente para expresar la incertidumbre de un resultado de medida, se consideró necesario, a partir de la misma, dar una incertidumbre que defina, alrededor del resultado de medida, un intervalo dentro del cual se encuentran gran parte de la distribución de valores, por tal motivo se

calculó la incertidumbre expandida, para lo cual se definió un factor de cobertura.

Cálculo del factor de cobertura k

Pese a que generalmente se acostumbra a utilizar valores constantes de k es base a la asunción de una determinada distribución, no es correcto. Por lo que como se menciona en 3.3.3.1 (Etapas para el cálculo de la incertidumbre) se calculó un factor de cobertura k para cada nivel de concentración, mediante la Ec.30 que engloba todas las incertidumbres involucradas en dicho nivel, trabajando con un enfoque real a un nivel de confianza del 95,45%.

Cálculo demostrativo: Nivel 1 (4,9989 mg/L)

$$v_{eff} = \frac{\mu_y^4}{\sum_{i=1}^N \frac{\mu_i(y)^4}{v_i}}$$

$$v_{eff} = \frac{\mu_{met}^4}{\frac{\mu_{Balanza}^4}{\infty} + \frac{\mu_{Bálon}^4}{\infty} + \frac{\mu_{pipeta}^4}{\infty} + \frac{\mu_R^4}{n-1} + \frac{\mu_{CC}^4}{n-2}}$$

$$v_{eff} = \frac{0,2522^4 \text{ mg/L}}{\frac{0,0477^4 \text{ mg/L}}{24} + \frac{0,1602^4 \text{ mg/L}}{33}}$$

$$v_{eff} = 200,7208 \approx 200$$

La **GUM (2008)** menciona que, si el valor de grados efectivos de libertad (v_{eff}) no es un número entero, debe tomarse el número entero inferior más próximo.

$$k = t(1 - \alpha; v)$$

$$k = t(0,0455; 200)$$

$$k = 2,0126$$

Tabla 25. Factor de cobertura (k)

Concentración (mg/L)	4,9989	9,9979	19,9957	24,9947	29,9936	39,9915	49,9894	149,9681	249,9468
μ_{MET} (mg/L)	0,2522	0,2063	0,2071	0,1993	0,2234	0,2038	0,2125	0,5543	0,9683
μ_{CC} (mg/L)	0,1602	0,1607	0,1631	0,1647	0,1672	0,1730	0,1782	0,2936	0,4250
v_{CC}	33	33	33	33	33	33	33	33	33
μ_R (mg/L)	0,0477	0,0803	0,0961	0,0743	0,1231	0,0758	0,0885	0,2497	0,2942
$v_{\mu R}$	24	24	24	24	24	24	24	24	24
v_k	200,7208	82,4862	73,7016	66,8762	74,9583	60,5484	61,5750	243,8764	676,0355
v_k	200	82	73	66	74	60	61	243	676
k	2,0126	2,0310	2,0348	2,0386	2,0344	2,0425	2,0418	2,0103	2,0037

Elaborado por: Johanna Cáceres

Incertidumbre expandida del método (U_{EXP})

Para su cálculo se utilizó la Ec.29.

Tabla 26. Incertidumbre expandida del método (U_{EXP})

Concentración promedio (mg/L)	μ_{MET} (mg/L)	k	U_{EXP} (mg/L)	% U_{EXP}
5,465	0,25	2,0126	0,51	9,3
10,354	0,21	2,0310	0,42	4,0
20,136	0,21	2,0348	0,42	2,1
24,617	0,20	2,0386	0,41	1,7
29,680	0,22	2,0344	0,45	1,5
40,105	0,20	2,0425	0,42	1,0
50,240	0,21	2,0418	0,43	0,86
149,906	0,55	2,0103	1,1	0,74
250,035	0,97	2,0037	1,9	0,78

*Nota: Según la GUM (2008), la U_{EXP} no debe darse con un número excesivo de cifras. Basta con reportar el resultado con 2 cifras significativas.

Elaborado por: Johanna Cáceres

Con el porcentaje de incertidumbre expandida y la concentración promedio se graficó la campana de Horwitz (Figura 7), en donde se obtuvo la ecuación

de incertidumbre del método [Ec.40], que permite obtener, por reemplazo, al analizar cualquier muestra, el correspondiente porcentaje de incertidumbre expandida. Por lo que cada muestra de concentración conocida se reportará, exactamente, con su respectiva incertidumbre.

$$\%U_{EXP} = 15,971 \text{ Conc}^{-0,639}$$

Ec.40

Por otro lado, lo óptimo sería tener un coeficiente de determinación $\geq 0,99$, sin embargo se obtuvo un $r^2 = 0,8264$ debido a que por efectos de dilución existe un desfase en las concentraciones de 149,9 y 250 (ver Tabla 26) ya que el $\%U_{EXP}$ de 250 mg/L no sigue la tendencia del resto de valores.

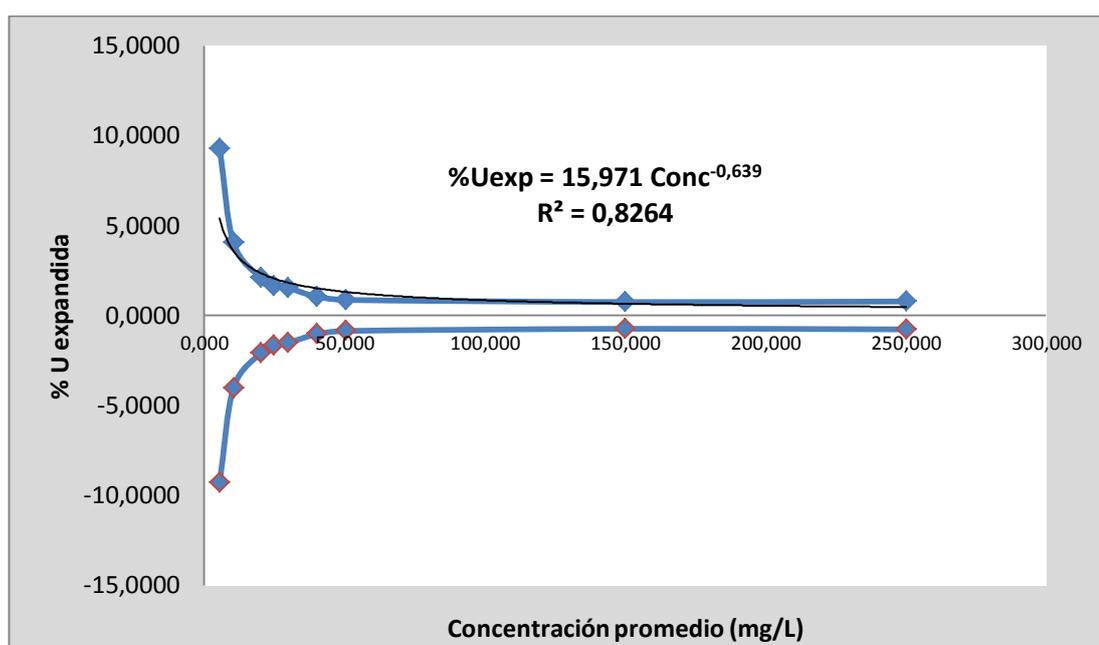


Figura 7. Campana de Horwitz experimental (9 niveles)

Elaborado por: Johanna Cáceres

Sin embargo se observó que al retirar los niveles (8 y 9) que requirieron dilución y graficar los 7 niveles restantes, que entran dentro de la curva, el coeficiente de determinación asciende, de esta forma se observó el efecto de la dilución.

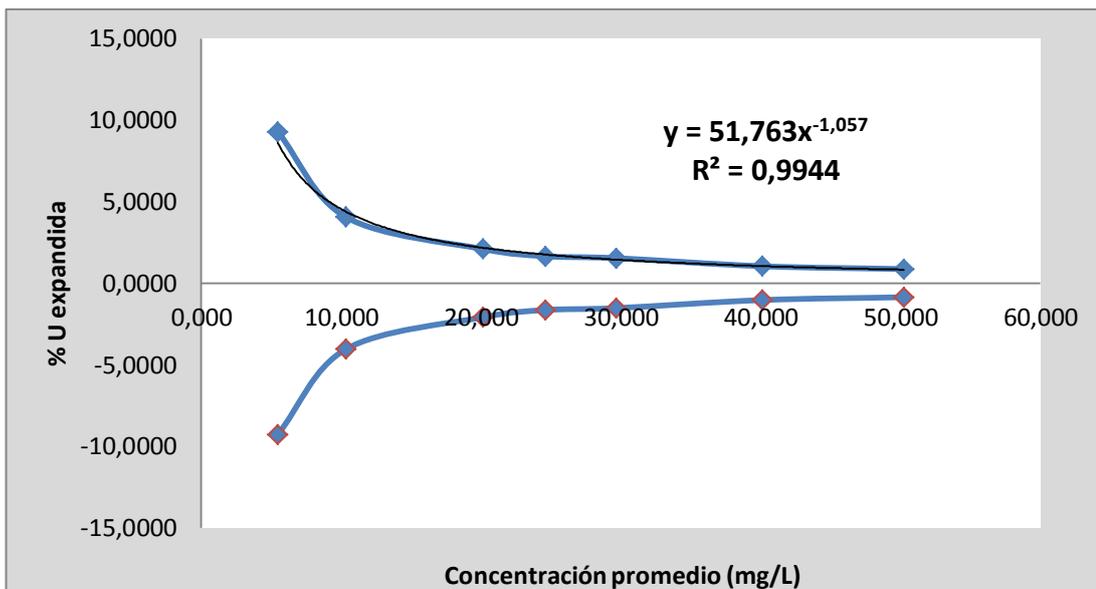


Figura 8. Campana de Horwitz experimental (7 niveles)

Elaborado por: Johanna Cáceres

4.8 Corrida de muestras adicionales

Con el objetivo de evaluar la utilidad del método en las matrices propuestas se han corrido muestras de agua potable y agua purificada envasada.

Se evaluaron muestras de agua purificada “Tesalia” de un mismo lote, esta tiene especificada una cantidad de sulfatos de 27 mg/L en la etiqueta, lo que se puede tomar como un valor de referencia a pesar de que no se cuenta con la certeza de la veracidad del dato reportado.

Tabla 27. Corrida de muestra de agua purificada envasada

Concentración (mg/L)	Concentración observada (mg/L)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
27	27,3	27,2	26,4	26,6	26,6
	27,0	27,4	26,9	27,1	26,6
	26,8	26,9	27,1	26,8	27,1
	27,0	27,4	26,9	27,1	27,1
	26,8	27,2	26,9	27,3	26,6

Elaborado por: Johanna Cáceres

Las lecturas se realizaron en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, de donde se obtuvo una concentración media de 27 mg de SO_4^{2-} /L. Como se observa en la Tabla 25 y se corrobora estadísticamente (ver ANEXO D, Ilustración D- 13), no existe diferencia significativa en el conjunto de concentraciones observadas. De esta manera, se ratifica que la precisión que ofrece el método es aceptable.

Adicionalmente se corrieron muestras de agua potable (ver Tabla 28) de diversas fuentes obteniéndose datos variables pero considerablemente menores al límite máximo permisible por lo que el método es funcional para el análisis de este tipo de agua.

Tabla 28. Corrida de muestras de agua potable

Muestra	Concentración observada (mg/L)
1	< LoQ
2	9,3
3	9,9
4	10,7
5	9,3
6	11,0
7	< LoQ
8	< LoQ
9	9,5
10	10,2

Elaborado por: Johanna Cáceres

Tabla 29. Resultados de la validación

Parámetro	Resultado
Matriz	Aplicable a agua potable y agua purificada envasada
Linealidad/Función respuesta	$r^2 = 0,9961$ $m=0,0041$
Límite de detección	1,5 mg/L
Límite de cuantificación	4,9 mg/L
Precisión Repetibilidad Reproducibilidad	$\%CV_r = 3,9\%$ $\%CV_R = 4,3\%$
Exactitud	$100 \pm 6\%$
Incertidumbre del método	9,3% ($p=95,45\%$)
Intervalo de trabajo	4,9 - 250 mg/L

Elaborado por: Johanna Cáceres

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se evaluó el desempeño del método de cuantificación de sulfatos por turbidimetría, en el laboratorio de control y análisis de alimentos “LACONAL” de la Universidad Técnica de Ambato, el cual demostró; linealidad, precisión y exactitud al ser aplicado en matrices de agua potable y agua purificada envasada en un rango de concentraciones de 4,9 a 250 mg/L que cubre el límite máximo permisible establecido por el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria (TULAS).
- Se establecieron y aplicaron los parámetros de validación en base al tipo de método a validar, como son; linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud e incertidumbre, obteniéndose como resultados de los mismos un coeficiente de determinación (r^2) de 0,9961, pendiente (m) de 0,0041, límites de 1,5 (LoD) y 4,9 mg/L (LoQ), coeficiente de variación por repetibilidad de 3,9%, coeficiente de variación por reproducibilidad de 4,3%, un porcentaje de recuperación de $100 \pm 6\%$ y una incertidumbre expandida porcentual del método de 9,3% ($p=95,45\%$).
- Se determinó que, el método desarrollado cumple con las especificaciones del método de referencia establecido en el procedimiento 4500 E de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater ya que a pesar de tener modificaciones, estas fueron evaluadas y adaptadas a las condiciones rutinarias de trabajo mediante la validación por lo que el método es funcional.

- Se elaboró el análisis estadístico utilizando pruebas *t* de Student que evidenciaron una correlación lineal significativa al evaluar la linealidad y en cuanto a exactitud, demostraron que no existe diferencia entre el valor obtenido de la experiencia analítica y el valor del MRC por lo que el porcentaje de recuperación (%R) es bueno. Además se aplicó el análisis simple de varianza (ANOVA), que demostró que el método de ensayo cumple con los parámetros tanto de repetibilidad como de reproducibilidad en las condiciones de trabajo y en el intervalo de concentraciones de 5 a 250 mg/L, con un nivel de confianza del 95% debido a que no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y dentro de estos.
- Se realizó el informe de declaración del método validado en donde se identificó que el estudio cumple con todos los objetivos de validación planteados inicialmente por lo que se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta que el método de determinación de sulfatos desarrollado internamente cumple con los objetivos de validación como indicativo de calidad del mismo y queda validado en el rango de 4,9 a 250 mg/L de sulfatos en matrices de agua; potable y purificada envasada, por lo que el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos “LACONAL” podrá contar con este dentro de los alcances de acreditación posteriores, asegurando la validez técnica de sus resultados.

5.2. Recomendaciones

- Cuando se realicen curvas de calibración, seguir minuciosamente el procedimiento de preparación y lectura de estándares en los puntos de concentración más bajos (5 y 10 mg/L) ya que son los más críticos.
- Con la finalidad de evaluar la exactitud en las mediciones, utilizar un estándar de control interno donde la concentración observada debe estar dentro del $\pm 6\%$ del valor real; caso contrario rechazar la medida y repetir la lectura y/o preparación del estándar de control.

- Para evaluar la precisión, leer duplicados de muestras aleatoriamente y verificar que el valor entre ambas lecturas deberá estar entre el $\pm 3,9\%$, caso contrario rechazar las mediciones y repetir el proceso.
- Para verificar el pesaje de cantidades pequeñas como 0,1479 g, necesario para la preparación de las soluciones madre, se recomienda adquirir pesas patrón de 0,1 g aproximadamente.
- Utilizar para el cálculo de la incertidumbre expandida ($\%U_{EXP}$) de la concentración de cada muestra, exclusivamente, la ecuación de incertidumbre del método $\%U_{EXP} = 15,971 Conc^{-0,639}$.
- Utilizar los factores de dilución empleados en la validación. De concentraciones entre 50 y 150 aplicar dilución 5 y de concentraciones entre 151 y 250 aplica dilución 10.
- Realizar anualmente programas de mantenimiento de equipos y calibración del material volumétrico para la obtención de resultados satisfactorios.
- Desarrollar ensayos de intercomparación para verificar el desempeño del método.

BIBLIOGRAFÍA

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Edition. Washington, APHA. pp 4-179.

Aponte, M. (2010). *Validación y documentación de la determinación de sulfatos y cloro residual libre en aguas en el laboratorio ALISCCA Ltda.* Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira.

Báez, M. (2009). *Validación de métodos de ensayo para el análisis de Parámetros físico-químicos en aguas limpias y residuales en el laboratorio de medio ambiente.* Universidad Politécnica del Ejercito, Quito.

Castillo, M. E., Acevedo, L. & Severiche, C. A. (2013). *Manual de métodos analíticos para la determinación de parámetros fisicoquímicos básicos en aguas.* Recuperado de <http://www.eumed.net/libros-gratis/2013a/1326/1326.pdf>

Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M. & Sandoval, S. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos.* Chile: Instituto de Salud Pública de Chile.

EURACHEM. (2005). *Métodos analíticos adecuados a su proposito: Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados.* México: Centro Nacional de Metrología.

Gennaro, A. R. (2003). *Remington Farmacia.* Recuperado de <https://books.google.com.ec>

GUM. (2008). Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (1995 with minor corrections): published by ISO in the name of BIPM. IEC, IFCC, IUPAC, IUPAP and OIML.

Harris, D. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*. Recuperado de <https://books.google.com.ec>

International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission. (2005). *ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Ginebra: Secretaría General ISO.

International Organization for Standardization. (2006). *ISO 3534-1 Términos estadísticos generales y términos empleados en el cálculo de probabilidades (IDT)*. Ginebra: Secretaría General ISO.

Servicio Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (1984). *Agua potable. Determinación de sulfatos*. Recuperado de: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0978.1984.pdf>

López, N. A. & Jibaja, J. S. (2007). *Implantación de la norma ISO:17025 en el laboratorio de medio ambiente del departamento de ciencias de la tierra y de la construcción*. Recuperado de repositorio digital ESPE (018595).

Marín, R. M. (2005). *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas*. Recuperado de <https://books.google.com.ec>

Miller, J. (2008). *Estadística para Química Analítica*. Inglaterra: Addison-Wesley Iberoamerica.

Murphy, T. & Lau, A. (2008). Manejo de valores atípicos. Recuperado de: http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPND08/datapoints_spnd08.html

Oficina de las naciones unidas contra la droga y el delito [UNODC]. (2010).

Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas. Recuperado de: https://www.unodc.org/.../Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf

OMS (2005). Sulfate in drinking-water. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/03.04/114).

Sánchez, A. M. (2002). *Incertidumbre en métodos analíticos de rutina* (Tesis doctoral). Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.

Severiche, C. A. & González, H. (2012, diciembre). Evaluación analítica para la determinación de sulfatos en aguas por método turbidimétrico modificado. Ing. USBMed, 3 (2): 6-11. Recuperado de usbmed.edu.co

Texto Unificado de Legislación Secundaria [TULAS]. (2015). Registro Oficial. Edición 270.

Vidaurreta, I. (s.f.). Calidad y disponibilidad de agua para los bovinos en producción. Recuperado de <http://www.vetifarma.com.ar/novedades/22.pdf>

ANEXOS

ANEXO A

TERMINOLOGÍA

Analito

Sustancia (química, física o biológica) buscada o determinada en una muestra, que debe ser recuperada, detectada o cuantificada por el método.

Datos aberrantes

También llamados valores atípicos y corresponden a observaciones que son numéricamente distantes del resto de los datos, haciendo que el conjunto pierda uniformidad.

Evaluación tipo A de la incertidumbre

Está basada en un análisis estadístico de la dispersión de los resultados de mediciones individuales. Este tipo de incertidumbre suele estar asociada a la variabilidad de los resultados debido a errores aleatorios. La repetibilidad, la reproducibilidad y la estimación de la linealidad son incertidumbres tipo A.

Evaluación tipo B de la incertidumbre

Se trata de incertidumbres que no pueden ser calculadas de forma experimental. Entonces se supone una distribución sobre la base de la experiencia o la información externa disponible, ya que no se cuenta con información sobre la posible variabilidad de la magnitud dada para hacer un análisis estadístico. La tolerancia del material volumétrico y los certificados de calibración o de pureza de reactivos son ejemplos de este.

Espectrofotómetro

Es un equipo sofisticado que utiliza las propiedades de la luz y su interacción con otras sustancias para analizarlas. Así, permite determinar la concentración de una sustancia en solución.

Estándar

Es una preparación que contiene una concentración conocida de un elemento específico o sustancia.

Factor de cobertura

Factor numérico utilizado como multiplicador de la incertidumbre típica combinada (μ_C) para obtener la incertidumbre expandida (U).

Interferencia

Modificación de la función de respuesta del método producida por la presencia de otras sustancias distintas al analito problema.

Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo de un método es el intervalo de concentración en el que puede obtenerse una exactitud y precisión adecuada al objetivo del método.

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

Ley de Beer

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Al hablar de espectrofotometría es necesario tener en cuenta la Ley de Beer-Lambert que indica cuantitativamente la forma en que el grado de atenuación depende de la concentración de las moléculas absorbentes y de la longitud del trayecto en que ocurre la absorción. Cuando la luz atraviesa un medio donde se encuentra un analito absorbente, disminuye su intensidad como consecuencia de la excitación del analito. Cuanto mayor sea la longitud del trayecto de la luz existirán más moléculas absorbentes y por lo tanto mayor será la atenuación.

Material de Referencia Certificado (MRC)

Material de Referencia, acompañado de un Certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se

expresan los valores de la propiedad, y para la cual, cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación del nivel de confianza.

Método normalizado

Método apropiado para el ensayo dentro de su alcance, publicado por organismos de normalización internacional, nacional o regional (ISO, EN, NM, ASTM, BS, DIN, IRAM, etc.) o por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos (AOAC, FIL-IDF, EPA, USP etc.)

Mensurando

Componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra.

Resolución

En los equipos digitales, se considera como resolución el dígito menos significativo que pueda ser claramente leído por el operador.

ANEXO B

MÉTODO DE REFERENCIA

Ilustración B- 1 Método turbidimétrico para la determinación de sulfatos

4-178

INORGANIC NONMETALS (1977)

d. Filtration and weighing: Filter BaSO₄ at room temperature. Wash precipitate with several small portions of warm distilled water until washings are free of Cl⁻, as indicated by testing with AgNO₃-HNO₃ reagent. If a membrane filter is used add a few drops of silicone fluid to the suspension before filtering, to prevent adherence of precipitate to holder. Dry filter and precipitate by the same procedure used in preparing filter. Cool in a desiccator and weigh.

5. Calculation

$$\text{mg SO}_4^{2-}/\text{L} = \frac{\text{mg BaSO}_4 \times 411.6}{\text{mL sample}}$$

6. Bibliography

See Section 4500-SO₄²⁻.C.7.

4500-SO₄²⁻ E. Turbidimetric Method

1. General Discussion

a. Principle: Sulfate ion (SO₄²⁻) is precipitated in an acetic acid medium with barium chloride (BaCl₂) so as to form barium sulfate (BaSO₄) crystals of uniform size. Light absorbance of the BaSO₄ suspension is measured by a photometer and the SO₄²⁻ concentration is determined by comparison of the reading with a standard curve.

b. Interference: Color or suspended matter in large amounts will interfere. Some suspended matter may be removed by filtration. If both are small in comparison with the SO₄²⁻ concentration, correct for interference as indicated in ¶ 4d below. Silica in excess of 500 mg/L will interfere, and in waters containing large quantities of organic material it may not be possible to precipitate BaSO₄ satisfactorily.

In potable waters there are no ions other than SO₄²⁻ that will form insoluble compounds with barium under strongly acid conditions. Make determination at room temperature; variation over a range of 10°C will not cause appreciable error.

c. Minimum detectable concentration: Approximately 1 mg SO₄²⁻/L.

2. Apparatus

a. Magnetic stirrer: Use a constant stirring speed. It is convenient to incorporate a fixed resistance in series with the motor operating the magnetic stirrer to regulate stirring speed. Use magnets of identical shape and size. The exact speed of stirring is not critical, but keep it constant for each run of samples and standards and adjust it to prevent splashing.

b. Photometer: One of the following is required, with preference in the order given:

1) *Nephelometer.*

2) *Spectrophotometer,* for use at 420 nm, providing a light path of 2.5 to 10 cm.

3) *Filter photometer,* equipped with a violet filter having maximum transmittance near 420 nm and providing a light path of 2.5 to 10 cm.

c. Stopwatch or electric timer.

d. Measuring spoon, capacity 0.2 to 0.3 mL.

3. Reagents

a. Buffer solution A: Dissolve 30 g magnesium chloride, MgCl₂·6H₂O, 5 g sodium acetate, CH₃COONa·3H₂O, 1.0 g po-

tassium nitrate, KNO₃, and 20 mL acetic acid, CH₃COOH (99%), in 500 mL distilled water and make up to 1000 mL.

b. Buffer solution B (required when the sample SO₄²⁻ concentration is less than 10 mg/L): Dissolve 30 g MgCl₂·6H₂O, 5 g CH₃COONa·3H₂O, 1.0 g KNO₃, 0.111 g sodium sulfate, Na₂SO₄, and 20 mL acetic acid (99%) in 500 mL distilled water and make up to 1000 mL.

c. Barium chloride, BaCl₂, crystals, 20 to 30 mesh. In standardization, uniform turbidity is produced with this mesh range and the appropriate buffer.

d. Standard sulfate solution: Prepare a standard sulfate solution as described in 1) or 2) below; 1.00 mL = 100 µg SO₄²⁻.

1) Dilute 10.4 mL standard 0.0200N H₂SO₄ titrant specified in Alkalinity, Section 2320B.3c, to 100 mL with distilled water.

2) Dissolve 0.1479 g anhydrous Na₂SO₄ in distilled water and dilute to 1000 mL.

4. Procedure

a. Formation of barium sulfate turbidity: Measure 100 mL sample, or a suitable portion made up to 100 mL, into a 250-mL erlenmeyer flask. Add 20 mL buffer solution and mix in stirring apparatus. While stirring, add a spoonful of BaCl₂ crystals and begin timing immediately. Stir for 60 ± 2 s at constant speed.

b. Measurement of barium sulfate turbidity: After stirring period has ended, pour solution into absorption cell of photometer and measure turbidity at 5 ± 0.5 min.

c. Preparation of calibration curve: Estimate SO₄²⁻ concentration in sample by comparing turbidity reading with a calibration curve prepared by carrying SO₄²⁻ standards through the entire procedure. Space standards at 5-mg/L increments in the 0- to 40-mg/L SO₄²⁻ range. Above 40 mg/L accuracy decreases and BaSO₄ suspensions lose stability. Check reliability of calibration curve by running a standard with every three or four samples.

d. Correction for sample color and turbidity: Correct for sample color and turbidity by running blanks to which BaCl₂ is not added.

5. Calculation

$$\text{mg SO}_4^{2-}/\text{L} = \frac{\text{mg SO}_4^{2-} \times 1000}{\text{mL sample}}$$

If buffer solution A was used, determine SO₄²⁻ concentration directly from the calibration curve after subtracting sample absorbance before adding BaCl₂. If buffer solution B was used sub-

Continuación

tract SO₄²⁻ concentration of blank from apparent SO₄²⁻ concentration as determined above; because the calibration curve is not a straight line, this is not equivalent to subtracting blank absorbance from sample absorbance.

6. Precision and Bias

With a turbidimeter,* in a single laboratory with a sample having a mean of 7.45 mg SO₄²⁻/L, a standard deviation of 0.13

* Hach 2100 A.

mg/L and a coefficient of variation of 1.7% were obtained. Two samples dosed with sulfate gave recoveries of 85 and 91%.

7. Bibliography

- SHEEN, R.T., H.L. KAHLER & E.M. ROSS. 1935. Turbidimetric determination of sulfate in water. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 7:262.
 THOMAS, J.F. & J.E. COTTON. 1954. A turbidimetric sulfate determination. *Water Sewage Works* 101:462.
 ROSSUM, J.R. & P. VILLARRUZ. 1961. Suggested methods for turbidimetric determination of sulfate in water. *J. Amer. Water Works Assoc.* 53: 873.

4500-SO₄²⁻ F. Automated Methylthymol Blue Method

1. General Discussion

a. Principle: Barium sulfate is formed by the reaction of the SO₄²⁻ with barium chloride (BaCl₂) at a low pH. At high pH excess barium reacts with methylthymol blue to produce a blue chelate. The uncomplexed methylthymol blue is gray. The amount of gray uncomplexed methylthymol blue indicates the concentration of SO₄²⁻.

b. Interferences: Because many cations interfere, use an ion-exchange column to remove interferences.

Molybdenum, often used to treat cooling waters, has been shown to cause a strong positive bias with this method, even with as little as 1 mg Mo/L.

c. Application: This method is applicable to potable, ground, surface, and saline waters as well as domestic and industrial wastewaters over a range from about 10 to 300 mg SO₄²⁻/L.

2. Apparatus

a. Automated analytical equipment: An example of the required continuous-flow analytical instrument consists of the interchangeable components shown in Figure 4500-SO₄²⁻:1.

b. Ion-exchange column: Fill a piece of 2-mm-ID glass tubing about 20 cm long with the ion-exchange resin.* To simplify filling column put resin in distilled water and aspirate it into the tubing, which contains a glass-wool plug. After filling, plug other end of tube with glass wool. Avoid trapped air in the column.

3. Reagents

a. Barium chloride solution: Dissolve 1.526 g BaCl₂·2H₂O in 500 mL distilled water and dilute to 1 L. Store in a polyethylene bottle.

b. Methylthymol blue reagent: Dissolve 118.2 mg methylthymol blue† in 25 mL BaCl₂ solution. Add 4 mL 1N HCl and 71 mL distilled water and dilute to 500 mL with 95% ethanol. Store in a brown glass bottle. Prepare fresh daily.

c. Buffer solution, pH 10.1: Dissolve 6.75 g NH₄Cl in 500 mL distilled water. Add 57 mL conc NH₄OH and dilute to 1 L with

* Ion-exchange resin Bio-Rex 70, 20-50 mesh, sodium form, available from Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA 94804, or equivalent.

† Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY 14615. No. 8068 3",3" bis [N,N-bis(carboxymethyl)-aminomethyl] thymolsulfonphthalein pentasodium salt.

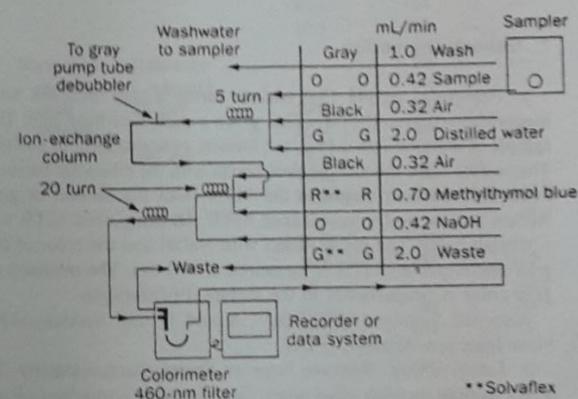


Figure 4500-SO₄²⁻:1. Sulfate manifold.

distilled water. Adjust pH to 10.1 and store in a polyethylene bottle. Prepare fresh monthly.

d. EDTA reagent: Dissolve 40 g tetrasodium ethylenediaminetetraacetate in 500 mL pH 10.1 buffer solution. Dilute to 1 L with pH 10.1 buffer solution and store in a polyethylene bottle.

e. Sodium hydroxide solution, 0.36N: Dissolve 7.2 g NaOH in 250 mL distilled water. Cool and make up to 500 mL with distilled water.

f. Stock sulfate solution: Dissolve 1.479 g anhydrous Na₂SO₄ in 500 mL distilled water and dilute to 1000 mL; 1.00 mL = 1.00 mg SO₄²⁻.

g. Standard sulfate solutions: Prepare in appropriate concentrations from 10 to 300 mg SO₄²⁻/L, using the stock sulfate solution.

4. Procedure

Set up the manifold as shown in Figure 4500-SO₄²⁻:1 and follow the general procedure described by the manufacturer.

After use, rinse methylthymol blue and NaOH reagent lines in water for a few minutes, rinse them in the EDTA solution for 10 min, and then rinse in distilled water.

ANEXO C

CERTIFICADOS

Ilustración C- 1 Certificado de calibración Balanza OHAUS



INFORME DE MANTENIMIENTO Y AJUSTES DE CALIBRACIÓN				
EQUIPO: BALANZA ANALITICA CODIGO: 06-FQ				
Compañía:	METREXLAB CIA LTDA	Balanza Marca:	OHAUS	
Cliente:	LABORATORIO LACONAL DE LA UTA	Modelo:	AR2140	
Dirección:	Av Colombia y Chile - Ambato	Serie:	11261225032813P	
Contacto:	Ing Gladis Risueño	Max:	220 g	
		d=	0,0001 g	
		e=	0,001 g	
Informe Número:	LACONAL-0614-06.FQ-0509			
Fecha de emisión del informe:	15 Septiembre del 2014	Ubicación:	Area de Balanzas	
Temperatura Ambiente:	21 +/- 2 °C	HR:	45 +/- 5 %	
PRUEBAS METROLOGICAS				
Excentricidad				
	Carga Ensayo	Posición	Lectura	Desviación Centro
Unidades	(g)	(g)	(g)	(g)
	50,0000	Centro	50,0000	
	50,0000	Fondo Izquierdo	50,0000	0,0000
	50,0000	Fondo Derecha	50,0000	0,0000
	50,0000	Frente Derecha	49,9999	0,0001
	50,0000	Frente Izquierda	50,0000	0,0000
	50,0000	Centro	50,0001	0,0001
Linealidad				
	Valor Nominal	Lectura	Desviación	
Unidades	(g)	(g)	(g)	
-X- Absoluto				
-- Diferencial	Tara	Tara+Referencia	Desv. Referencia	
	(g)	(g)	(g)	
1	0,5000	0,5000	0,0000	
2	1,0000	1,0000	0,0000	
3	5,0000	5,0000	0,0000	
4	10,0000	10,0001	0,0001	
5	20,0000	20,0001	0,0001	
6	50,0000	49,9999	-0,0001	
7	100,0000	99,9997	-0,0003	
8	200,0000	200,0001	0,0001	
Repetibilidad				
Nº	Vacio	Carga	Carga - Vacio	
Unidades	(g)	(g)	(g)	
1	0,0000	99,9999	99,9999	
2	0,0000	99,9999	99,9999	
3	0,0000	99,9999	99,9999	
4	0,0000	99,9998	99,9998	
5	0,0000	99,9998	99,9998	

Página Número: 1 de 2

Ref: LACONAL-0614-06.FQ-0509

Av. Eloy Alfaro N44-349 y Río Coca (Diagonal Tv.)
 Telf: (593-2) 3340991
 Telefax: (593-2) 3341010
 Cel: 0999442186
 E-mail: sertec@metrexlab.com
 Quito - Ecuador

Sensibilidad		
Carga de Ensayo	Lectura	Desviación
200.0000	200,0001	0,0001
Cumple Tolerancias	Error Máximo Permitido +/-	0,0003(g)
SI -X- NO --		

ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE COMBINADA DE LOS ENSAYOS DE MEDICIÓN	
$\mu_{cal} =$	0,00023(g)
La incertidumbre combinada ha sido estimada evaluando todos los factores que influyen sobre el resultado medido. Los factores a considerarse son repetibilidad, sensibilidad, no linealidad, carga descentrada, incertidumbre de las pesas patrón y resolución de la balanza.	
μ_{cal} = Incertidumbre típica de calibración k = Factor de cobertura (probabilidad de cobertura de 95,45%) U = Incertidumbre expandida de la medición $U = \mu_{cal} \cdot k (k=2)$	

DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD	
De acuerdo a los resultados obtenidos y tolerancias estimadas el equipo se encuentra trabajando:	
CORRECTAMENTE: <input checked="" type="checkbox"/>	USO CONDICIONADO: <input type="checkbox"/>
EN TOLERANCIAS: <input checked="" type="checkbox"/>	FUERA DE TOLERANCIAS: <input type="checkbox"/>

PROCEDIMIENTO DEL TRABAJO REALIZADO	
Se realiza revisión y verificación previa para determinar el estado inicial de la balanza.	
Se realiza mantenimiento preventivo, limpieza y revisión de las partes mecánicas y/o electrónicas de la balanza	
Se realizan ajustes de calibración siguiendo el procedimiento dado por los fabricantes o por experiencia adquirida.	
Se realiza la verificación para obtener los datos suficientes para llenar el Informe Técnico de Mantenimiento y Calibración.	
La verificación consiste en pruebas de carga excéntrica, linealidad, repetibilidad, sensibilidad, cálculos de la desviación estándar de linealidad y repetibilidad, estimación de la incertidumbre combinada de calibración. El procedimiento seguido esta acorde a las directrices dadas en la publicación "BALANZAS EN LA GESTIÓN DE LA CALIDAD" de METTLER TOLEDO de Suiza.	

IDENTIFICACIÓN DE LAS PESAS PATRÓN UTILIZADAS			
Juego de Pesas No B149512904	Certificado No.: LPC-M-3013-392	Clase:	F1
Juego de Pesas No B132196801	Certificado No.: LPC-M-E-2013-048	Clase:	E2
<i>El presente Reporte Técnico fue realizado utilizando pesas con trazabilidad al SI a través de patrones nacionales del INEN.</i>			

TIPO DE TRABAJO REALIZADO			
AJUSTES <input checked="" type="checkbox"/>	MANTENIMIENTO <input checked="" type="checkbox"/>	REPARACIÓN <input type="checkbox"/>	INSTALACIÓN <input type="checkbox"/>
VERIFICACIÓN <input checked="" type="checkbox"/>			

OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES	
Se realiza mantenimiento ajustes de calibración y verificación.	
Funcionalmente la balanza se encuentra trabajando correctamente y dentro de tolerancias.	
Se adjunta el certificado de calibración de las masas utilizadas para las pruebas de verificación.	

FECHA DE REVISIÓN: 05-Junio-2014	PRÓXIMA REVISIÓN: Junio 2015
RESPONSABLE: Ing. Andrés Méndez B.	FIRMA: 
	RUC. 1791941217001

Ilustración C- 2 Certificado de calidad de balón de aforo de 1000 mL (1)

Qualitätszertifikat/Certificate of Performance Certificat de qualité/Certificado de calidad		
Messkolben, Volumetric Flask, Fioles Jaueges, Matracas Aforados		
BLAUBRAND, AW	NS29/32	Cat.-No. 937234
Nennvolumen/Nominal volume: Volume nominal/Volumen nominal:	1000.0 ml	Prüfer/Operator: Vérificateur/Comprobador: <i>Kleppik</i>
Toleranz nach/Tolerance: ± Tolérance/Tolerancia:	0.6000 ml DIN EN ISO 1042	Ausstellungsdatum/Date of issue: Date de délivrance/Fecha de exposición:
Serien-Nr./Serial-no.: Numéro de série/Número de serie:	04.02 06	01-Jul-2005
Gemessenes Volumen/Measured volume: Volume mesuré/Volumen medido:	1000.0695 ml	Prüfmittel/Testing devices/Instruments de contrôle/Instrumentos de medición:
Messunsicherheit/Uncertainty of measurement: Incertitude de mesure/Inseguridad de medición:	± 0.2000 ml	Waage/Balance: Balance/Balanza: Die Kalibrierung erfolgt alle 3 Monate./The calibration is effected every 3 months./ Le calibrage est effectué tous les 3 mois./El calibrado se efectua cada tres meses.
Einzelprüfung/Individual control Contrôle individuel/Control individual	71732 288729	800033-1, F1 (2007, DKD11801, Nr.G1-389)
<p>Diese Angaben sind Endprüfwerte bezogen auf 20 °C. Die Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die verwendeten Normale sind an die Normale der PTB angeschlossen.</p> <p>These final test values refer to 20° C. The test was effected according to ISO 4787. The used standards are connected with the standards of the PTB (German Federal Institute of Physics and Metrology).</p> <p>Les valeurs finales se réfèrent à 20° C. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés sont liés aux étalons du PTB (Institut Fédéral Physico-Technique Allemand).</p> <p>Estos valores de control final se refieren a 20° C. El control se efectuó de acuerdo con ISO 4787. Los patrones utilizados son ligados a los patrones del PTB (Organismo oficial alemán de calibrado y standards).</p>		<p>ISO 9001-14001 CERTIFIED</p> <p>BRAND GMBH + CO KG Postfach/P.O. Box 1155 97861 Wertheim/Main Germany</p> 

937234 53 5/0306/1

Ilustración C- 3 Certificado de calidad de balón de aforo de 1000 mL (2)

Qualitätszertifikat/Certificate of Performance Certificat de qualité/Certificado de calidad		B H
Messkolben, Volumetric Flask, Fioles Jaugees, Matracas Aforados		
BLAUBRAND, AW	NS29/32	Cat.-No. 937234
Nennvolumen/Nominal volume: Volume nominal/Volumen nominal:	1000.0 ml	Prüfer/Operator: Vérificateur/Comprobador: <i>Klappke</i>
Toleranz nach/Tolerance: Tolérance/Tolerancia:	± 0.6000 ml DIN EN ISO 1042	Ausstellungsdatum/Date of issue: Date de délivrance/Fecha de exposición:
Serien-Nr./Serial-no.: Número de série/Número de serie:	04.02 04	01-Jul-2005
Gemessenes Volumen/Measured volume: Volume mesuré/Volumen medido:	1000.0093 ml	Prüfmittel/Testing devices/Instruments de contrôle/Instrumentos de medición: Waage/Balance: Balance/Balanza:
Messunsicherheit/Uncertainty of measurement: Incertitude de mesure/Inseguridad de medición:	± 0.2000 ml	300300-4, 2000g/0,001 Die Kalibrierung erfolgt alle 3 Monate./The calibration is effected every 3 months./ Le calibrage est effectué tous les 3 mois./El calibrado se efectua cada tres meses.
Einzelprüfung/Individual control Contrôle individuel/Control individual	71732 288729	Gewichte/Weights/Poids/Peso: Thermometer/Thermometer: Thermomètre/Termómetro:
<p>Diese Angaben sind Endprüfwerte bezogen auf 20 °C. Die Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die verwendeten Normale sind an die Normale der PTB angeschlossen.</p> <p>These final test values refer to 20° C. The test was effected according to ISO 4787. The used standards are connected with the standards of the PTB (German Federal Institute of Physics and Metrology).</p> <p>Les valeurs finales se réfèrent à 20° C. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés sont liés aux étalons du PTB (Institut Fédéral Physico-Technique Allemand).</p> <p>Estos valores de control final se refieren a 20° C. El control se efectuó de acuerdo con ISO 4787. Los patrones utilizados son ligados a los patrones del PTB (Organismo oficial alemán de calibrado y standards).</p>		<p>800033-1, F1 (2007, DKD11801, Nr.G1-389)</p> <p>351000-3, 0-30°C/0,1°C (2008, EA Werth., Nr.3119)</p>
<p>ISO 9001-14001 CERTIFIED</p>		
<p>BRAND GMBH + CO KG Postfach/P.O. Box 1155 97861 Wertheim/Main Germany</p>		

9975 E3 5/0305/1

Ilustración C- 4 Certificado de calidad de balón de aforo de 100 mL

**Qualitätszertifikat · Certificate of Performance
Certificat de qualité · Certificado de calidad**

BLAUBRAND®
**Volumenmessgeräte · Volumetric Instruments
Appareils de volumétrie · Materiel volumétrico**




**Chargenprüfung · Batch control
Contrôle du lot · Control del lote**

Diese Angaben sind Endprüfwerte bezogen auf 20 °C. Die Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die verwendeten Normale sind an die Normale der PTB angeschlossen.

These final test values refer to 20 °C. The test was effected according to ISO 4787. The used standards are connected with the standards of the PTB (German Federal Institute of Physics and Metrology).

Ces valeurs finales se réfèrent à 20 °C. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés sont liés aux étalons du PTB (Institut Fédéral Physico-Technique Allemand).

Estos valores de control final se refieren a 20 °C. El control se efectuó de acuerdo con ISO 4787. Los patrones utilizados son ligados a los patrones del PTB (Organismo oficial alemán de calibrado y standards).



BRAND GMBH + CO KG
Postfach/P.O. Box 11 55
97861 Wertheim/Main
Germany



9955 53 · 5/0105/3

Messkolben, Volumetric Flask, Fioles Jaugees, Matraces Aforados		
BLAUBRAND, A	NS12/21	
Best.-Nr./Cat. No./Réf./Ref.:	37249	
Nennvolumen/Nominal volume: Volume nominal/Volumen nominal:	100.0	ml
Toleranz/Tolerance: Tolérance/Tolerancia:	± 0.1000	ml
	DIN EN ISO 1042	
Chargen-Nr./Batch No.:	05.04	
Numéro du lot/Número del lote:		
Mittelwert/Mean value: Valeur moyenne/Valor medio:	100.0048	ml
Standardabweichung/Standard deviation: Ecart type/Desviación standard:	± 0.0118	ml
Prüfmittel · Testing devices Instruments de contrôle · Instrumentos de medición		
Waage/Balance: Balance/Balanza:	300300-3, 2000g/0,001	
	Die Kalibrierung erfolgt alle 3 Monate./The calibration is effected every 3 months. Le calibrage est effectué tous les 3 mois./El calibrado se efectua cada tres meses.	
	800033-1, F1	
Gewichte/Weights: Poids/Peso:	(2007, DKD11801, Nr.G1-389)	
Thermometer/Thermometer: Thermomètre/Termómetro:	351000-3, 0-30°C/0,1°C (2008, EA Werth., Nr.3119)	
67468	281040	
Prüfer/Operator: Vérificateur/Comprobador:	Kleppenk	
Ausstellungsdatum/Date of issue: Date de délivrance/Fecha de exposición:	21-Mrz-2005	

Ilustración C- 5 Certificado de calidad de pipeta aforada de 5 mL

Qualitätszertifikat · Certificate of Performance Certificat de qualité · Certificado de calidad	
	
Chargenprüfung · Batch control Contrôle du lot · Control del lote	
<p>Diese Angaben sind Endprüfwerte bezogen auf 20 °C. Die Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die verwendeten Normale sind an die Normale der PTB angeschlossen.</p> <p>These final test values refer to 20 °C. The test was effected according to ISO 4787. The used standards are connected with the standards of the PTB (German Federal Institute of Physics and Metrology).</p> <p>Les valeurs finales se réfèrent à 20 °C. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés sont liés aux étalons du PTB (Institut Fédéral Physico-Technique Allemand).</p> <p>Estos valores de control final se refieren a 20 °C. El control se efectuó de acuerdo con ISO 4787. Los patrones utilizados son ligados a los patrones del PTB (Organismo oficial alemán de calibrado y standards).</p>	
<p>ISO 9001-14001 CERTIFIED</p> <p>BRAND GMBH + CO KG Postfach/P.O. Box 1155 97861 Wertheim/Main Germany</p>	

9955 53 · 5/0104/2

Vollpipette, Volum. Pipettes, Pipettes Jauges, Pipetas Aforadas BLAUBRAND, AS	
Best.-Nr./Cat. No./Réf./Ref.:	29707
Nennvolumen/Nominal volume: Volume nominal/Volumen nominal:	5.0 ml
Toleranz/Tolerance: Tolérance/Tolerancia:	± 0.0150 ml DIN 12691
Chargen-Nr./Batch No.: Número du lot/Número del lote:	04.03
Mittelwert/Mean value: Valeur moyenne/Valor medio:	5.0011 ml
Standardabweichung/Standard deviation: Ecart type/Desviación standard:	± 0.0030 ml
Prüfmittel · Testing devices Instruments de contrôle · Instrumentos de medición	
Waage/Balance: Balance/Balanza:	300400-4, 162g/0,0001
<p>Die Kalibrierung erfolgt alle 3 Monate./The calibration is effected every 3 months. Le calibrage est effectué tous les 3 mois./El calibrado se efectua cada tres meses.</p>	
Gewichte/Weights: Poids/Peso:	800033-1, F1 (2007, DKD11801, Nr.G1-389)
Thermometer/Thermometer: Thermomètre/Termómetro:	351000-3, 0-30°C/0,1°C (2008, EA Werth., Nr.3119)
Prüfer/Operator: Vérificateur/Comprobador:	<i>C. Stange</i>
Ausstellungsdatum/Date of issue: Date de délivrance/Fecha de exposición:	06-Apr-2004

55033 264892

Ilustración C- 6 Certificado de calidad de pipeta aforada de 10 mL

Qualitätszertifikat · Certificate of Performance Certificat de qualité · Certificado de calidad	
 	
Chargenprüfung · Batch control Contrôle du lot · Control del lote	
<p>Diese Angaben sind Endprüfwerte bezogen auf 20 °C. Die Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die verwendeten Normale sind an die Normale der PTB angeschlossen.</p> <p>These final test values refer to 20 °C. The test was effected according to ISO 4787. The used standards are connected with the standards of the PTB (German Federal Institute of Physics and Metrology).</p> <p>Les valeurs finales se réfèrent à 20 °C. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés sont liés aux étalons du PTB (Institut Fédéral Physico-Technique Allemand).</p> <p>Estos valores de control final se refieren a 20 °C. El control se efectuó de acuerdo con ISO 4787. Los patrones utilizados son ligados a los patrones del PTB (Organismo oficial alemán de calibrado y standards).</p>	
<p>ISO 9001-14001 CERTIFIED</p> <p>BRAND GMBH + CO KG Postfach/P.O. Box 1155 97861 Wertheim/Main Germany</p> 	

9955 53 - 5/0604/2

Vollpipette, Volum. Pipettes, Pipettes Jauees, Pipetas Aforadas BLAUBRAND, AS	
Best.-Nr./Cat. No./Réf./Ref.:	29712
Nennvolumen/Nominal volume: Volume nominal/Volumen nominal:	10.0 ml
Toleranz/Tolerance: Tolérance/Tolerancia:	± 0.0200 ml DIN 12691
Chargen-Nr./Batch No.: Numéro du lot/Número del lote:	04.06
Mittelwert/Mean value: Valeur moyenne/Valor medio:	9.9994 ml
Standardabweichung/Standard deviation: Ecart type/Desviación standard:	± 0.0040 ml
Prüfmittel · Testing devices Instruments de contrôle · Instrumentos de medición	
Waage/Balance: Balance/Balanza:	300400-4, 162g/0,0001
Die Kalibrierung erfolgt alle 3 Monate./The calibration is effected every 3 months. Le calibrage est effectué tous les 3 mois./El calibrado se efectúa cada tres meses.	
Gewichte/Weights: Poids/Peso:	800033-1, F1 (2007, DKD11801, Nr.G1-389)
Thermometer/Thermometer: Thermomètre/Termómetro:	351000-3, 0-30°C/0,1°C (2008, EA Werth., Nr.3119)
Prüfer/Operator: Vérificateur/Comprobador:	Kleppok
Ausstellungsdatum/Date of issue: Date de délivrance/Fecha de exposición:	01-Jul-2004
57894	268736

Ilustración C- 7 Certificado de calibración de pipeta aforada de 25 mL



**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACION
LABORATORIO DE PRUEBAS DE CALIBRACION (L.P.C.)
LABORATORIO DE VOLUMEN**

CERTIFICADO DE CALIBRACION

Certificado No.: LPC-V-2013-136
Página 1 de 2

Fecha de Calibración: 2013-02-22

Instrumento: PIPETA AFORADA
Marca: IVA
Modelo o Tipo: xxxxxxxxxxxx
Clase: AS
Código de identificación: CL-V-13-190
Serie: xxxxxxxxxxxx
Capacidad: 25 ml

Observaciones: xxxxxxxxxxxx
Adhesivo No.: 114

El Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN, realizó en el Laboratorio de Volumen del LPC, la calibración del instrumento arriba descrito, utilizando patrones de referencia trazables a la unidad de masa del Sistema Internacional de Unidades SI, a través de los patrones nacionales de masa pertenecientes al Laboratorio de Pruebas de Calibración del INEN.

La calibración fue realizada bajo un Sistema de Gestión de la Calidad conforme con la NTE INEN-ISO/IEC 17025:2006.

Los resultados de la calibración y su incertidumbre se exponen en las páginas siguientes y son parte de este documento y se refieren al momento y condiciones en que se realizó la calibración.

Este Laboratorio no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado del instrumento calibrado.

El transporte del instrumento hacia y desde el Laboratorio es responsabilidad del cliente.

El usuario está obligado a tener el instrumento recalibrado en intervalos apropiados.

El presente certificado de calibración certifica los valores obtenidos expresados como los resultados de las calibraciones y no constituye un certificado de aptitud para el uso del patrón, instrumento o equipo.

Este documento no significa certificación de calidad y no debe ser utilizado con fines publicitarios. Prohibida su reproducción parcial, la reproducción total deberá hacerse con la autorización escrita de la Dirección General del INEN.


Fis. Manuel Salazar
Responsable del Laboratorio de Volumen

Oficina Principal: Rocaforte Moreno 424-29 y Arroyo, sector 11-01-006, Avulcan, QUITO, Ecuador. Tel: (593) 2 2207 497, 497 497, www.inen.gov.ec Quito, Ecuador.
 Laboratorios: Ambato: "General Bustos" para gestión No. 1, sector 2002 y 2241-006, 2245-740, 2245-079, e-mail: ambato@inen.gov.ec; Esmeraldas: "Cordero"

Página 2 de 2

Certificado No.: LPC-V-2013-136
Fecha de Calibración: 2013-02-22

CONDICIONES AMBIENTALES DEL ENSAYO

TEMPERATURA: (21 ± 2) °C
PRESION ATM.: (733 a 747) hPa
HUMEDAD REL.: (50 ± 10) %

METODO UTILIZADO: LPC PC 14, Procedimiento para calibración de frascos volumétricos método gravimétrico, balanza electrónica; basado en el Handbook 145 del NBS, Handbook for the Quality Assurance of Metrological Measurement.

INCERTIDUMBRE DE MEDIDA: La incertidumbre expandida de medida informada se ha obtenido multiplicando la incertidumbre estándar de medida por el factor de cobertura K=2 que, para una distribución normal corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95%; y, se le estimó de acuerdo al documento "Guide to the Expression of the Uncertainty in Measurement" de la ISO.

EQUIPO UTILIZADO: Balanza Mettler Toledo XP504, capacidad 520g, resolución 0,1mg; certificado: LPCI-PyM-2012-001

PATRON UTILIZADO: Agua des ionizada. **Conductividad eléctrica del agua:** 0,051 µS

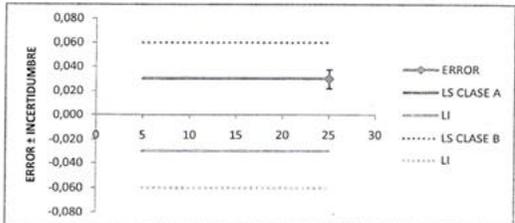
ESTADO DE RECEPCION DEL INSTRUMENTO

Marcas de escala visibles	Conforme
Libre de impurezas adheridas al recipiente	Conforme
No presenta roturas ni rajaduras	Conforme

Nota:

RESULTADOS OBTENIDOS

VOLUMEN NOMINAL (ml)	VOLUMEN MEDIDO (ml)	ERROR (ml)	ERROR MAXIMO PERMITIDO (ISO 648:2008)		INCERTIDUMBRE (k=2) (± ml)
			Clase A (± ml)	Clase B (± ml)	
25	25,030	0,030	0,03	0,06	0,008



Calibrado por: 
 Técnico de Lab.: Tigo, Patricia Salazar

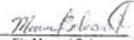
Aprobado por: 
 Responsable del Lab.: Fis. Manuel Salazar

Ilustración C- 8 Certificado de análisis del reactivo (Estándares)

Certificate of Analysis



1.06647.0000 Sodium sulfate anhydrous 99.99 Suprapur®

Batch B0939447

	Spec. Values	Batch Values		
Purity (metallic)	≥ 99.99	%	≥ 99.99	%
Assay (acidimetric)	≥ 99.5	%	99.7	%
Chloride (Cl)	≤ 5	ppm	< 5	ppm
Total nitrogen (N)	≤ 5	ppm	< 2	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.05	ppm	< 0.01	ppm
Ba (Barium)	≤ 5.0	ppm	< 0.5	ppm
Bi (Bismuth)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Ca (Calcium)	≤ 0.10	ppm	< 0.05	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Ce (Cerium)	≤ 0.005	ppm	< 0.002	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.005	ppm	< 0.002	ppm
Cr (Chromium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Cs (Caesium)	≤ 5	ppm	< 2	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Eu (Europium)	≤ 0.005	ppm	< 0.002	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
K (Potassium)	≤ 5	ppm	< 1	ppm
La (Lanthanum)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Li (Lithium)	≤ 0.1	ppm	< 0.1	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 0.05	ppm	0.01	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.010	ppm	< 0.002	ppm
Ni (Nickel)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Rb (Rubidium)	≤ 1.0	ppm	< 0.2	ppm
Sc (Scandium)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Sm (Samarium)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Sr (Strontium)	≤ 0.10	ppm	< 0.01	ppm
Tl (Thallium)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Y (Yttrium)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Yb (Ytterbium)	≤ 0.005	ppm	< 0.002	ppm
Zn (Zinc)	≤ 0.020	ppm	< 0.005	ppm

Date of release (DD.MM.YYYY) 28.05.2013
 Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.05.2018

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
 EMD Millipore Corporation - A division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
 250 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321

Page 1 of 2

Certificate of Analysis

1.06647.0000 Sodium sulfate anhydrous 99.99 Suprapur®

Batch B0939447

Dr. Matthias Rampel
 Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
 EMD Millipore Corporation - A division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
 250 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321
 SALSA 990006214601 v. 13448 Date: 28.05.2013

Page 2 of 2

Ilustración C- 9 Certificado de análisis del reactivo (MRC)



Certificate of Analysis

1.06649.0000 Sodium sulfate anhydrous for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Batch AM0520749

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (alkalimetric)	≥ 99.0	%	100.1	%
Assay (alkalimetric, calculated on dried substance)	98.5 - 101.0	%	100.1	%
Identity	passes test		passes test	
Appearance of solution	passes test		passes test	
Insoluble matter	≤ 0.01	%	≤ 0.01	%
Acidity or alkalinity	passes test		passes test	
pH-value (5 %; water; 25 °C)	5.2 - 8.0		6.0	
Chloride (Cl)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Total nitrogen (N)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
As (Arsenic)	≤ 0.0001	%	≤ 0.0001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.005	%	≤ 0.005	%
Fe (Iron)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
K (Potassium)	≤ 0.002	%	≤ 0.002	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Loss on drying (130 °C)	≤ 0.5	%	≤ 0.5	%
Loss on ignition (800 °C)	≤ 0.5	%	≤ 0.5	%

Corresponds to ACS, ISO, Reag. Ph Eur

Date of release (DD.MM.YYYY) 25.03.2013
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.03.2018

Dr. Matthias Ohm
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Ilustración C- 10 Certificado del material de referencia (25 mg/L)



LACONAL

Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos

Certificado de Análisis

Material de Referencia Certificado

Sulfatos en aguas claras

Lote de reactivo AM0520749
Fecha realización reactivo 25 Marzo, 2013
Vida útil mínima reactivo 31, Marzo, 2018
Solvente (matriz) Aguas claras
Peligro N/A
Almacenamiento y manejo Al ambiente
Fecha de certificación 25 Octubre, 2015
Certificado por Químico Lander Pérez - Director

Analito	Unidades	Valor certificado	k
Sulfatos (SO_4^{2-})	mg/L	25 ± 0,79	2


Químico Lander Pérez
Director



Ilustración C- 11 Certificado del material de referencia (200 mg/L)



LACONAL
Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos

Certificado de Análisis

Material de Referencia Certificado

Sulfatos en aguas claras

Lote de reactivo AM0520749
Fecha realización reactivo 25 Marzo, 2013
Vida útil mínima reactivo 31, Marzo, 2018
Solvente (matriz) Aguas claras
Peligro N/A
Almacenamiento y manejo Al ambiente
Fecha de certificación 26 Octubre, 2015
Certificado por Químico Lander Pérez - Director

Analito	Unidades	Valor certificado	k
Sulfatos (SO_4^{2-})	mg/L	200 ± 5,61	2


Químico Lander Pérez
Director



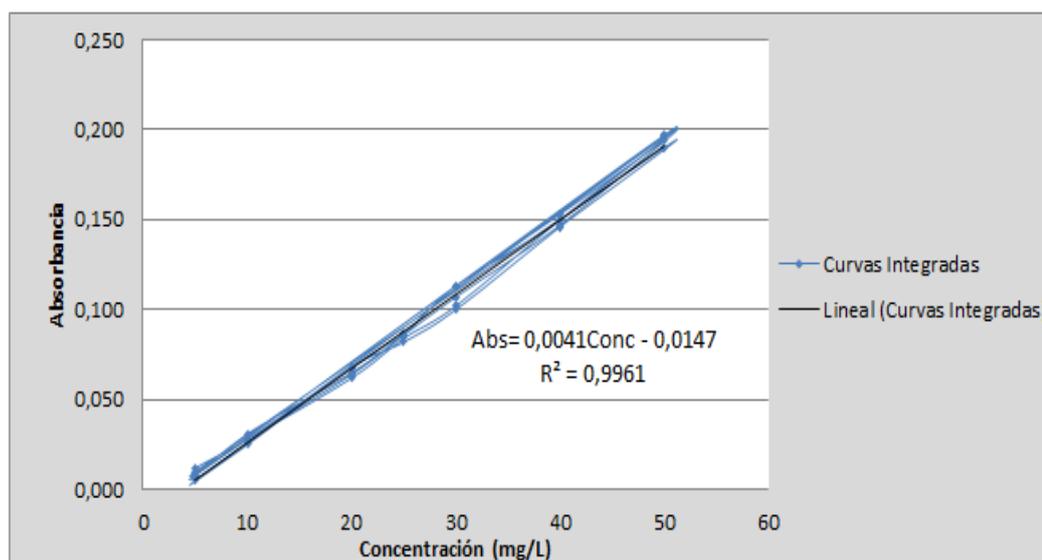
ANEXO D

ANÁLISIS DE DATOS

Ilustración D- 1 Prueba t de Student para la correlación lineal de las curvas de calibración

Ho	LA CORRELACION LINEAL NO ES SIGNIFICATIVA
Ha	LA CORRELACION LINEAL ES SIGNIFICATIVA

Niveles	Conc (mg/L)	Abs (420 nm)				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	5	0,012	0,005	0,010	0,008	0,008
2	10	0,028	0,025	0,028	0,031	0,028
3	20	0,062	0,068	0,068	0,065	0,064
4	25	0,084	0,082	0,087	0,086	0,086
5	30	0,102	0,100	0,113	0,107	0,113
6	40	0,150	0,146	0,150	0,147	0,153
7	50	0,196	0,190	0,197	0,196	0,194



# niveles	n	7	95% confianza	$t_{cal} = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$
coef. Corre	r	0,998	2 colas, v=5	
coef. Det	r ²	0,996	t crítico 2,571	t calculado 35,874

CONCLUSIÓN: EL t calculado es mayor que el t crítico por lo que se rechaza la Ho y se acepta que la correlación lineal es significativa con la probabilidad calculada

Ilustración D- 2 Prueba t de Student para exactitud en la determinación de sulfatos

Ho	No existe diferencia significativa entre el valor leído y el valor del MRC
Ha	Existe diferencia significativa entre el valor leído y el MRC

MRC: 25 mg/L

$t_{cal} = \bar{X}_\mu - \mu \left(\frac{\sqrt{n}}{S} \right)$	\bar{X}_μ	Lectura promedio (mg/L)	25,1
	S	Desviación estandar de las lectura	0,685
	n	Número de lecturas	25
	μ	Concentración del MRC (mg/L)	25

95%, $\nu=24$

t calculado 0,769

t crítico 2,06

$t_{calc} < t_{crit}$ Acepto Ho

CONCLUSIÓN: No existe diferencia significativa entre el valor obtenido de la experiencia analítica y el valor de referencia por lo que la veracidad es aceptable

MRC: 200 mg/L

$t_{cal} = \bar{X}_\mu - \mu \left(\frac{\sqrt{n}}{S} \right)$	\bar{X}_μ	Lectura promedio (mg/L)	199,1
	S	Desviación estandar de las lectura	3,503
	n	Número de lecturas	25
	μ	Concentración del MRC (mg/L)	200

95%, $\nu=24$

t calculado 1,243

t crítico 2,06

$t_{calc} < t_{crit}$ Acepto Ho

CONCLUSIÓN: No existe diferencia significativa entre el valor obtenido de la experiencia analítica y el valor de referencia por lo que la veracidad es aceptable

Ilustración D- 3 ANOVA de los 9 niveles de concentración mediante hoja de cálculo Excel

Concentración		5 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	0,360879686	4	0,090219921	1,977	0,139	2,895
Dentro de los grupos (error)	0,866924573	19	0,045627609			
Total	1,227804259	23				
Concentración		10 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	0,173105825	4	0,043276456	0,269	0,89	2,866
Dentro de los grupos (error)	3,221365315	20	0,161068266			
Total	3,39447114	24				
Concentración		20 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	0,448561025	4	0,112140256	0,506	0,731550258	2,895
Dentro de los grupos (error)	4,206962059	19	0,221419056			
Total	4,655523084	23				
Concentración		25 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	0,159338187	4	0,039834547	0,314	0,865042337	2,928
Dentro de los grupos (error)	2,285521476	18	0,126973415			
Total	2,444859664	22				
Concentración		30 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	0,576431499	4	0,144107875	0,381	0,819872451	2,866
Dentro de los grupos (error)	7,574249254	20	0,378712463			
Total	8,150680752	24				
Concentración		40 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	0,335035494	4	0,083758874	0,607	0,662479173	2,895
Dentro de los grupos (error)	2,621960625	19	0,137997928			
Total	2,95699612	23				
Concentración		50 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	0,467555727	4	0,116888932	0,597	0,669197518	2,866
Dentro de los grupos (error)	3,917991527	20	0,195899576			
Total	4,385547254	24				
Concentración		150 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	10,31084834	4	2,577712084	1,978	0,136875249	2,866
Dentro de los grupos (error)	26,06933986	20	1,303466993			
Total	36,3801882	24				
Concentración		250 mg/L				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos (Tratamientos)	16,50388587	4	4,125971469	2,467	0,078033056	2,866
Dentro de los grupos (error)	33,45429748	20	1,672714874			
Total	49,95818336	24				

Ilustración D- 4 ANOVA del nivel 1 (5 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columnal	24	0,29	0,14	3,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,36	4	0,09	1,97	0,1401
Tratamientos	0,36	4	0,09	1,97	0,1401
Error	0,87	19	0,05		
Total	1,23	23			

Ilustración D- 5 ANOVA del nivel 2 (10 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columnal	25	0,05	0,00	3,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,17	4	0,04	0,27	0,8941
Tratamientos	0,17	4	0,04	0,27	0,8941
Error	3,24	20	0,16		
Total	3,41	24			

Ilustración D- 6 ANOVA del nivel 3 (20 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columnal	24	0,10	0,00	2,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,45	4	0,11	0,51	0,7282
Tratamientos	0,45	4	0,11	0,51	0,7282
Error	4,21	19	0,22		
Total	4,67	23			

Ilustración D- 7 ANOVA del nivel 4 (25 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columnal	23	0,06	0,00	1,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,16	4	0,04	0,31	0,8686
Tratamientos	0,16	4	0,04	0,31	0,8686
Error	2,28	18	0,13		
Total	2,44	22			

Ilustración D- 8 ANOVA del nivel 5 (30 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columnal	25	0,07	0,00	2,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,58	4	0,14	0,38	0,8199
Tratamientos	0,58	4	0,14	0,38	0,8199
Error	7,59	20	0,38		
Total	8,16	24			

Ilustración D- 9 ANOVA del nivel 6 (40 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat (40 mg/L)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columnal	24	0,11	0,00	0,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,33	4	0,08	0,60	0,6663
Tratamientos	0,33	4	0,08	0,60	0,6663
Error	2,62	19	0,14		
Total	2,95	23			

Ilustración D- 10 ANOVA del nivel 7 (50 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columnal	25	0,11	0,00	0,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,47	4	0,12	0,60	0,6692
Columna2	0,47	4	0,12	0,60	0,6692
Error	3,92	20	0,20		
Total	4,39	24			

Ilustración D- 11 ANOVA del nivel 8 (150 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columnal	25	0,28	0,14	0,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10,31	4	2,58	1,98	0,1369
Columna2	10,31	4	2,58	1,98	0,1369
Error	26,07	20	1,30		
Total	36,38	24			

Ilustración D- 12 ANOVA del nivel 9 (250 mg/L) mediante paquete estadístico Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentraciones	25	0,33	0,20	0,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16,50	4	4,13	2,47	0,0780
Tratamientos	16,50	4	4,13	2,47	0,0780
Error	33,45	20	1,67		
Total	49,96	24			

Ilustración D- 13 ANOVA de la muestra de agua purificada envasada (Tesalia)

Concentración	27 mg/L					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Origen de las variaciones						
Entre grupos (Tratamientos)	0,65499424	4	0,16374856	2,729	0,058	2,866
Dentro de los grupos (error)	1,20027704	20	0,060013852			
Total	1,85527128	24				

ANEXO E
DECLARACIÓN DEL
MÉTODO VALIDADO

Cuadro E- 1 Hoja de Validación del método

MÉTODO TURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE SULFATOS			
Tipo de Método:			
Cualitativo <input type="checkbox"/>		Cuantitativo <input checked="" type="checkbox"/>	
Normalizado <input type="checkbox"/>	Normalizado modificado <input checked="" type="checkbox"/>	No normalizado <input type="checkbox"/>	Nuevo <input type="checkbox"/>
Analito: Sulfatos (SO ₄ ²⁻)		Responsable Validación:	
Unidades: mg/L		Johanna Cáceres	
Matriz: Agua potable y agua purificada envasada		Fecha: 20/12/2015	
Función respuesta del método			
Pendiente (m)		0,004117	
Desviación estándar de la pendiente (s _m)		0,000045	
Intercepto (b)		-0,014746	
Desviación estándar del intercepto (s _b)		0,001324	
Coeficiente de correlación (r)		0,998063	
Coeficiente de determinación (r ²)		0,996130	
Límites			
Valores Obtenidos		Criterios de aceptación	
Límite de Detección (LoD)	Límite de Cuantificación (LoQ)	Límite de Detección (LoD)	Límite de Cuantificación (LoQ)
1,5 mg/L	4,9 mg/L	2 mg/L	5 mg/L
Comentario: En comparación con los criterios de aceptabilidad los valores obtenidos experimentalmente cumplen con lo propuesto.			
Intervalo de Trabajo Validado			
4,9-250 mg/L			
Exactitud			
%R Obtenido		Criterios de aceptación	
MRC 25 mg/L: 96% - 106%		90%-110%	
MRC 200 mg/L: 97% - 103%			
Comentario: En comparación con el criterio de aceptabilidad, los porcentajes de recuperación obtenidos en ambos materiales de referencia están dentro del rango. El porcentaje de recuperación que caracteriza al método es del MRC de 25 mg/L (100 ± 6%).			

Precisión						
Concentración (mg/L)	Valores Obtenidos				Criterios de aceptación	
	Repetibilidad		Reproducibilidad		Repetibilidad	Reproducibilidad
	S _r	%CV _r	S _R	%CV _R	%CV _r	%CV _R
5,465	0,214	3,909	0,234	4,274	<6,3	<8,4
10,354	0,401	3,876	0,401	3,876		
20,136	0,471	2,337	0,471	2,337		
24,617	0,356	1,448	0,356	1,448		
29,680	0,615	2,073	0,615	2,073		
40,105	0,371	0,926	0,371	0,926		
50,240	0,443	0,881	0,443	0,881		
149,906	1,142	0,762	1,248	0,833		
250,035	1,293	0,517	1,471	0,588		

Comentario: En comparación con los criterios de aceptabilidad establecidos, los coeficientes tanto de repetibilidad como de reproducibilidad del método, cumplen al ser aproximadamente la mitad del valor propuesto.

Incertidumbre			
Concentración (mg/L)	Valores Obtenidos		Criterio de aceptación
	U _{EXP} (mg/L)	% U _{EXP}	% U _{EXP}
5,5	0,51	9,3	≤ 20
10,4	0,42	4,0	
20,1	0,42	2,1	
24,6	0,41	1,7	
29,7	0,45	1,5	
40,1	0,42	1,0	
50,2	0,43	0,86	
149,9	1,1	0,74	
250,0	1,9	0,78	

- La mayor incertidumbre porcentual expandida es de 9,29% y corresponde al nivel de menor concentración evaluado (5,5 mg/L).
- Las incertidumbres se reportarán de acuerdo a la ecuación $\%U_{EXP} = 15,971 Conc^{-0,639}$

*Nota: Según la GUM (2008), la U_{EXP} no debe darse con un número excesivo de cifras. Basta con reportar el resultado con 2 cifras significativas.

Declaración del método validado

“El método de determinación de sulfatos por turbidimetría es aplicable para el análisis del analito SO₄²⁻ en las matrices de agua potable y agua purificada envasada y queda validado en el rango de 4,9 a 250 unidades de concentración”.

ANEXO F

MODELO DE INSTRUCTIVOS

Instructivo F- 1 Instructivo de ensayo del método de sulfatos

LACONAL

LABORATORIO DE CONTROL Y ANÁLISIS DE ALIMENTOS

INSTRUCTIVO DE ENSAYO

SULFATOS (SO₄²⁻)

(4500 SO₄²⁻ E) Standard Methods

EDICIÓN 01

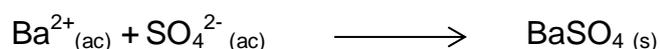
Elaborado por: Tesista	Revisado por: D. Técnico	Aprobado / Autorizado por: D. de Calidad
Nombre: Johanna Cáceres	Nombre: Ing. Gabriela Flores	Nombre: Ing. Gladys Risueño
Firma:	Firma:	Firma:
Fecha: 22/12/2015	Fecha: 22/12/2015	Fecha: 22/12/2015

DISTRIBUCION DE COPIAS CONTROLADAS					
# COPIA	RECIBE COPIA	CARGO	NOMBRE	FECHA DE RECIBIDO	FIRMA

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO DE ENSAYO	N.-
	SULFATOS (SO₄²⁻), AGUAS POTABLE Y PURIFICADA ENVASADA, (4500 SO₄²⁻ E) Standard Methods 22nd ed.	
	Edición: 01	Pág.

1. PRINCIPIO

La espectrofotometría mide la disminución de la cantidad de luz transmitida a través de una suspensión de partículas utilizando para ello un espectrofotómetro. Así, este método se basa en la medida de la turbidez producida por la reacción de precipitación del ión sulfato en medio acético con cloruro de bario con el cual forma coloides de sulfato de bario de tamaño uniforme.



Estos deben mantenerse en suspensión homogénea durante un periodo de tiempo suficientemente largo como para medir la luz transmitida en unidades de absorbancia, la cual es proporcional a la concentración de sulfatos presentes en el medio.

El contenido de sulfatos (SO₄²⁻) en una muestra problema se obtiene a partir de una curva de calibración, previamente realizada con disoluciones patrón, espectrofotométricamente a 420 nm.

2. OBJETIVO

Establecer las guías necesarias para la cuantificación de sulfatos en agua potable y agua purificada envasada

3. REFERENCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Edition. Washington, APHA. pp 4-179.

4. RANGO DE TRABAJO

De 4,9 a 250 mg SO₄/L

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- a) Pipetas volumétricas de 5, 10 y 25 mL
- b) Matraces Erlenmeyer de 125 mL
- c) Balones aforados de 100 mL

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO DE ENSAYO	N.-
	SULFATOS (SO₄²⁻), AGUAS POTABLE Y PURIFICADA ENVASADA, (4500 SO₄²⁻ E) Standard Methods 22nd ed.	
	Edición: 01	Pág.

- d) Balones aforados de 1000 mL
- e) Probeta de 100 mL
- f) Espátula
- g) Varilla de agitación
- h) Picetas
- i) Pera de succión
- j) Celdas espectrofotométricas de cuarzo
- k) Espectrofotómetro Evolution 60S
- l) Balanza OHAUS
- m) Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄)
- n) Cloruro de magnesio (MgCl₂.6H₂O)
- o) Acetato de sodio (CH₃COONa. 3H₂O)
- p) Nitrato de potasio (KNO₃)
- q) Ácido acético glacial 99% (CH₃COOH)
- r) Cloruro de Bario (BaCl₂)

6. CONDICIONES AMBIENTALES

Se verifica y controla que las condiciones ambientales se encuentren dentro de los rangos establecidos: Temperatura 20 ± 3°C y Humedad relativa 50 ± 10%.

De ser necesario, si dichos límites fuesen desbordados, se procede a estabilizar las condiciones ambientales requeridas y mantenidas dentro de ellos.

7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Solución Buffer: Disolver en 500 mL de agua destilada; 30 g de cloruro de magnesio (MgCl₂.6H₂O), 5 g de acetato de sodio (CH₃COONa. 3H₂O), 1 g nitrato de potasio (KNO₃) y 20 mL de ácido acético glacial 99% (CH₃COOH), una vez homogenizado el contenido, la solución se afora a 1000 mL.

Cuando se requiera realizar una nueva curva de calibración se debe seguir el siguiente procedimiento, de lo contrario, se utiliza la misma curva y se realiza lo especificado en el apartado 8 (**PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**).

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO DE ENSAYO	N.-
	SULFATOS (SO₄²⁻), AGUAS POTABLE Y PURIFICADA ENVASADA, (4500 SO₄²⁻ E) Standard Methods 22nd ed.	
	Edición: 01	Pág.

- Estándar de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄): Preparar una solución estándar de 100 mg/L. Para ello disolver 0.1479 g del reactivo en agua destilada y llevar el volumen a 1000 mL en un matraz aforado.
- Curva de calibración: Realizar la curva de calibración mediante la preparación de disoluciones de 5, 10, 20, 25, 30, 40 y 50 mg/L a partir de la solución estándar de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄).

Nivel	Volumen de la solución Estándar (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración de Na ₂ SO ₄ (mg/L)
1	5	100	5
2	10	100	10
3	20	100	20
4	25	100	25
5	30	100	30
6	40	100	40
7	50	100	50

1. Nota: Previo a la corrida de estándares realizar un blanco con agua destilada.
2. Nota: Tratar cada estándar como a una muestra como se menciona en el apartado 9 (**DETERMINACIÓN**).

8. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras no requieren un acondicionamiento previo, únicamente homogenizar y utilizar.

Si por algún motivo la muestra ha sido refrigerada, dejar que se ambiente, homogenizar y utilizar

9. DETERMINACIÓN

- Previo a la corrida de muestras realizar un blanco con agua destilada.

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO DE ENSAYO	N.-
	SULFATOS (SO₄²⁻), AGUAS POTABLE Y PURIFICADA ENVASADA, (4500 SO₄²⁻ E) Standard Methods 22nd ed.	
	Edición: 01	Pág.

- Medir como a una muestra el estándar de control interno, cuya concentración observada debe estar dentro del $\pm 6\%$ del valor real (25 mg/L); caso contrario se rechazará la medida y se repetirá la lectura y/o preparación del estándar de control.
- Tomar 100 mL de muestra (del estándar de control interno o del estándar, en caso de realizar la curva de calibración), previamente homogenizada, en un matraz erlenmeyer de 125 mL.
- Agregar 20 mL de la solución buffer y agitar por un intervalo de tiempo de alrededor 10 segundos con la finalidad de estabilizar de manera uniforme el contenido.
- Agregar una punta de espátula de cristales de cloruro de bario (BaCl₂). Para mayor seguridad pesar entre 0,3 y 0,5 g de reactivo. Agitar de manera constante por aproximadamente 60 segundos.
- Después de finalizada la agitación colocar la solución en la celda. Lavar previamente la celda tres veces con agua destilada y homogenizar con la muestra problema 3 veces.
- Medir la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro. No es aconsejable sobrepasar 5 ± 0.5 minutos para leer la turbidez de la muestra.
- Si la muestra presenta turbidez medir la absorbancia de la muestra, donde no se agregue cloruro de bario (blanco de muestra) de modo que al realizar el procedimiento de determinación de sulfatos, únicamente se detectará la turbidez del analito (SO₄²⁻).

10. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- La concentración se obtiene directamente, mediante interpolación de la absorbancia, en la curva de calibración.
- Se debe tener en cuenta la realización de diluciones o corrección de turbidez (si es que en un determinado caso la muestra inicialmente presenta un aspecto turbio).
- El resultado se expresa en mg de SO₄²⁻ por litro de muestra (mg/L)
- La incertidumbre del resultado se calcula de acuerdo a la ecuación obtenida a través del método:

$$\%U_{EXP} = 15,971 Conc^{-0,639}$$

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO DE ENSAYO	N.-
	SULFATOS (SO₄²⁻), AGUAS POTABLE Y PURIFICADA ENVASADA, (4500 SO₄²⁻ E) Standard Methods 22nd ed.	
	Edición: 01	Pág.

11. INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Los valores de la incertidumbre expandida (**U**) del método son:

- Nivel 1: 5,5 mg/L ± 9,3%
- Nivel 2: 10,4 mg/L ± 4,0%
- Nivel 3: 20,1 mg/L ± 2,1%
- Nivel 4: 24,6 mg/L ± 1,7%
- Nivel 5: 29,7 mg/L ± 1,5%
- Nivel 6: 40,1 mg/L ± 1,0%
- Nivel 7: 50,2 mg/L ± 0,86%
- Nivel 8 (dilución:5): 149,9 mg/L ± 0,74%
- Nivel 9 (dilución:10): 250,0 mg/L ± 0,78%

12. NORMAS DE SEGURIDAD Y VERIFICACIÓN DE EQUIPOS

- Verifique que la balanza se encuentre limpia, calibrada y verificada.
- Verifique que el material volumétrico se encuentre limpio.
- Ver también Instructivo general de seguridad del laboratorio I02-5.3

13. CONTROL DE CALIDAD

- El procedimiento general de control de calidad se encuentra descrito en el procedimiento general “Aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos” PG22-5.9
- Curvas de calibración: Las curvas de calibración serán aceptadas siempre que el coeficiente de determinación (r^2) sea mayor que 0.99, estas tendrán una validez de aproximadamente 1 año o cuando los controles excedan las desviaciones estándar.
- Blanco del método: Se refiere a la matriz sin analito (agua destilada) a la que se le proporciona un tratamiento similar al de una muestra. Su valor será menor al límite de detección del método, caso contrario se rechazará la lectura y/o la preparación del blanco. Se leerá cada 20 muestras o menos para asegurar la confiabilidad de los resultados.
- Estándar de control interno: La solución de control se someterá al proceso normal por el que se analiza una muestra, donde la concentración observada debe estar dentro del ± 6% del valor real (25 mg/L); caso contrario se rechazará la medida y se repetirá la lectura y/o preparación del estándar de control. Se leerá una vez cada 20

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO DE ENSAYO	N.-
	SULFATOS (SO₄²⁻), AGUAS POTABLE Y PURIFICADA ENVASADA, (4500 SO₄²⁻ E) Standard Methods 22nd ed.	
	Edición: 01	Pág.

muestras o menos, lo que servirá para determinar la exactitud del método.

- Duplicado de muestra: Con la finalidad de medir la precisión del método se leerá por duplicado una muestra aleatoria dentro de un lote de 20 muestra o menos. El valor entre ambas lecturas deberá estar entre el $\pm 3,9\%$, caso contrario se rechazarán las mediciones y se repetirá el proceso.

14. ANEXOS

Ver:

I02-5.3 Instructivo de seguridad del laboratorio.

I02-5.5 FQ-06 Instructivo de uso de Balanza OHAUS

P03-5.5 Plan de verificación de equipos

P07-5.5 Programa de verificación de equipos

P01-5.9 Plan de aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo

P02-5.9 Programa de aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo

Instructivo F- 2 Uso del espectrofotómetro EVOLUTION 60S

LACONAL

LABORATORIO DE CONTROL Y ANÁLISIS DE ALIMENTOS

INSTRUCTIVO

USO DE ESPECTROFOTÓMETRO EVOLUTION 60S

EDICIÓN 01

Elaborado por: Tesista	Revisado por: D. Técnico	Aprobado / Autorizado por: D. de Calidad
Nombre: Johanna Cáceres	Nombre: Ing. Gabriela Flores	Nombre: Ing. Gladys Risueño
Firma:	Firma:	Firma:
Fecha: 22/12/2015	Fecha: 22/12/2015	Fecha: 22/12/2015

DISTRIBUCIÓN DE COPIAS CONTROLADAS					
# COPIA	RECIBE COPIA	CARGO	NOMBRE	FECHA DE RECIBIDO	FIRMA

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO	N.-
	USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO EVOLUTION 60S CURVA ESTÁNDAR	
	Edición: 1	Pág.

1. OBJETIVO

Establecer las guías necesarias para el correcto manejo del Espectrofotómetro Evolution 60S UV-VIS.

2. REFERENCIAS

Software Instructivo y detalles del equipo Evolution 60S by Thermo Scientific.

3. INFORMACIÓN SOBRE EL EQUIPO

Marca:	<i>Thermos Scientific</i>
Modelo:	Evolution 60 S
No Serie:	t2R1R214201
Fecha de recepción:	Octubre 2011

4. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Voltaje:	100-240 V
Frecuencia:	50 – 60 Hz
Consumo de energía:	1600 W 7A

5. PROPÓSITO

El espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Evolution 60S ofrece un rendimiento y una flexibilidad excepcionales para aplicaciones ordinarias y de investigación. Específicamente se utilizará la aplicación de curva estándar, que permite realizar un experimento de análisis cuantitativo utilizando una curva de calibración de varios puntos para obtener la concentración de un analito en muestras de concentración desconocida.

6. ACTIVIDADES

6.1 Encendido del equipo

- Revisar la conexión eléctrica.

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO	N.-
	USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO EVOLUTION 60S CURVA ESTÁNDAR	
	Edición: 1	Pág.

- Asegúrese de que ninguna de las muestras se encuentra en la trayectoria de la luz durante la inicialización.
- La tapa del compartimento de muestras debe permanecer cerrado durante la inicialización del equipo.
- Encienda el equipo (botón ubicado en la parte posterior izquierda).
- Después de que el equipo se ha encendido, este realiza sus autodiagnósticos: chequea la rueda de filtros, busca el orden cero, calibra la rueda de filtros y busca el pico de energía. Esta secuencia puede observarse en la pantalla.
- El instrumento está listo para usarse una vez que se ha completado con éxito su secuencia de encendido.

6.2 Realización de curvas de calibración

- Tras la inicialización del equipo, en el menú principal, resalte la opción “Curva Estándar” y pulse “ENTER”.
- Establezca los parámetros de la curva estándar como son “Nombre de prueba”, “Longitud de onda”, “Unidades” y “Número de estándares”. Presione el botón que se encuentra por debajo de la opción “Correr Estándares”.
- Inserte mediante el panel numérico la concentración de cada estándar. Presione “Enter”.
- Coloque el blanco en la posición B del portaceldas y pulse el botón que se encuentra debajo de la opción “Blanco”.
- Coloque cada uno de los estándares en la posición B del portaceldas pulse el botón que se encuentra por debajo de la opción “Recoger estándares”.
- Una vez recogidos todos los estándares se muestra la absorbancia de cada uno de ellos, junto con la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación de la curva estándar y el gráfico.
- Si la curva estándar cumple con todos los requerimientos presione “Guardar prueba” y esta se almacenará como “SmartStart”.

6.3 Cuantificación de sulfatos

- Tras la inicialización del equipo se observa un sencillo menú que contiene solo pruebas “SmartStart”, estas corresponden a curvas de calibración almacenadas.
- Seleccionar el “SmartStart” con el nombre LINS_C_JC (Se puede elegir cualquiera de las 5 curvas almacenadas C1,C2,C3,C4 o C5).
- Seleccione el botón que se encuentra por debajo de la opción “Correr análisis”. El equipo se prepara para la inmediata medición
- Coloque el blanco en la posición B del portaceldas.
- Presione el botón que se encuentra debajo de la opción “Blanco”.
- Coloque la muestra en la posición 1 del portaceldas.
- Presione el botón que se encuentra debajo de la opción “Medir muestra”.

 LACONAL Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos	INSTRUCTIVO	N.-
	USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO EVOLUTION 60S CURVA ESTÁNDAR	
	Edición: 1	Pág.

6.4 Apagado del equipo

- Una vez culminada la cuantificación, asegúrese de que ninguna de las muestras se encuentra en la trayectoria de la luz.
- Apague el equipo presionando el botón ubicado en la parte posterior izquierda.
- Retirar la conexión eléctrica.

7. ANEXOS

Ver P01-5.5 Plan de Limpieza de equipos

Ver P02-5.5 Plan de mantenimiento de equipos

Ver P05-5.5 Programa de limpieza de equipos

Ver P06-5.5 Programa de mantenimiento de equipos

Realizado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Cargo:	Cargo:	Cargo:
Firma:	Firma:	Firma:
Fecha	Fecha	Fecha

ANEXO G

FOTOGRAFÍAS

Ilustración G- 1 Estándares para curva de calibración



Ilustración G- 2 Turbidez de los estándares



Ilustración G- 3 Estándares para corridas de muestras (sin dilución)



Ilustración G- 4 Estándares para corridas de muestras (con dilución)



Ilustración G- 5 Materiales de Referencia Certificados

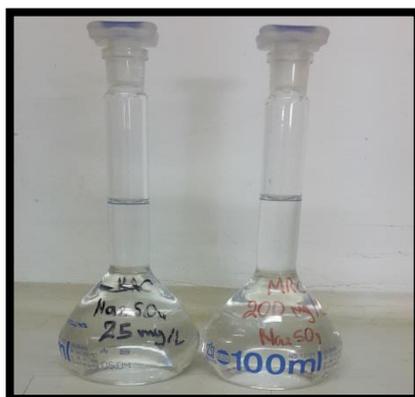


Ilustración G- 6 Muestra de agua purificada envasada “Tesalia”



Ilustración G- 7 Espectrofotómetro Evolution 60S



Ilustración G- 8 Recta de calibración 1 para la cuantificación de sulfatos

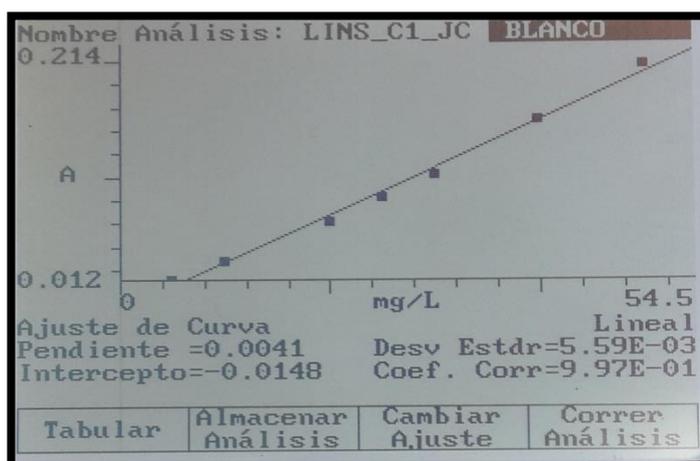


Ilustración G- 9 Recta de calibración 2 para la cuantificación de sulfatos

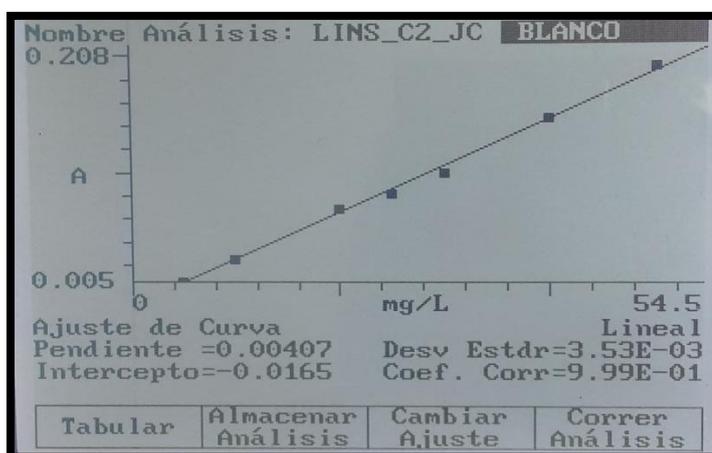


Ilustración G- 10 Recta de calibración 3 para la cuantificación de sulfatos

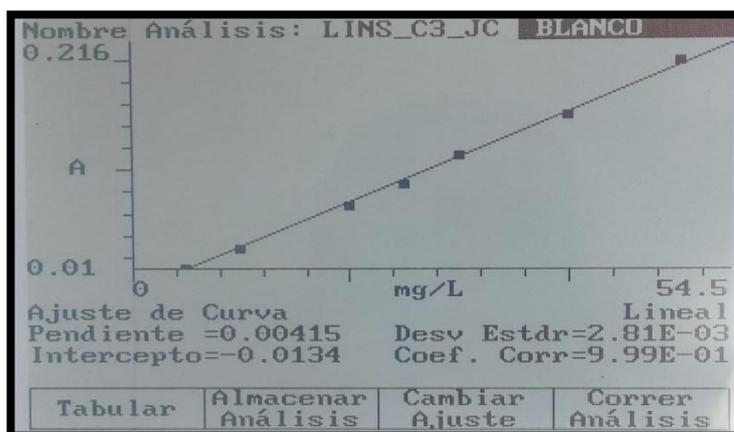


Ilustración G- 11 Recta de calibración 4 para la cuantificación de sulfatos

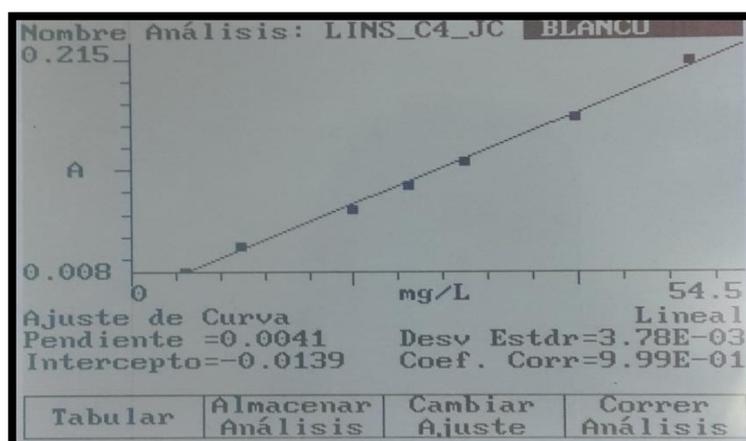


Ilustración G- 12 Recta de calibración 5 para la cuantificación de sulfatos

