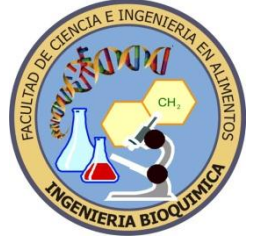




UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

***VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE CLORO LIBRE RESIDUAL, CROMO
HEXAVALENTE, CROMO TOTAL Y NITRITOS EN MUESTRAS
DE AGUA, EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y
CONTROL AMBIENTAL "CICAM"***

Proyecto de Graduación, modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AUTOR: Aníbal Javier Macas Acurio

DIRECTOR: Roman Rodríguez M., Dr. Rer. Nat., Ph.D.

Ambato – Ecuador
2011

APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

Roman Rodríguez M., Dr. Rer. Nat., Ph.D.

Siendo el Director del proyecto de Investigación realizado bajo el tema: **“Validación de métodos analíticos para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos en muestras de agua, en el Centro de Investigaciones y Control Ambiental CICAM”**, por el egresado Aníbal Javier Macas Acurio; tengo a bien afirmar que el estudio es idóneo y reúne los requisitos de una tesis de grado de Ingeniería Bioquímica; y el graduando posee los méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado examinador que sea designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, Octubre de 2011

.....
Roman Rodríguez, Dr. Rer. Nat., Ph.D. .

TUTOR DEL PROYECTO

AUTORÍA DE LA TESIS

Los contenidos del presente Trabajo de investigación denominado: “**Validación de métodos analíticos para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos en muestras de agua, en el Centro de Investigaciones y Control Ambiental CICAM**”, le corresponden exclusivamente a Egdo. Aníbal Javier Macas Acurio; y, Roman Rodríguez, Dr. Rer. Nat., Ph.D.; Director del Proyecto de Investigación; que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que se ha consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

Ambato, Octubre de 2011

.....
Egdo. Aníbal Javier Macas Acurio

AUTOR

.....
Roman Rodríguez, Dr. Rer. Nat., Ph.D.

TUTOR DEL PROYECTO

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Octubre 2011

Para constancia firman:

.....
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Dios, quien gracias a su voluntad ha sabido guiarme por los senderos del bien.

A mis Padres: Aníbal y Margarita por su apoyo, dedicación y amor en todo momento y por enseñarme el verdadero valor del estudio y de la vida.

A mis hermanos: Christian y Wendy por toda su comprensión y cariño.

A la memoria de mi hermana Jenny, quien a pesar de que no se encuentra conmigo, fue una ayuda y soporte incondicional en mi época de estudiante.

Aníbal Javier

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Politécnica Nacional, al equipo de trabajo del Centro de Investigaciones y Control Ambiental, en especial al Ingeniero Luis Jaramillo e Ingeniera Carola Fierro por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación, por su apoyo, por compartir su tiempo, su experiencia y conocimientos que me servirán para desarrollarme profesionalmente.

Al Doctor Roman Rodríguez, quien puso la confianza en mí, y por la ayuda incondicional a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A los profesores de la carrera de Ingeniería Bioquímica que me impartieron sus conocimientos a lo largo de estos años de estudio, y que han sido de mucha valía para la realización exitosa de este trabajo.

A mis amigos, Javier, Erika, Anita, Karina, Fernanda y Belén Q, por los momentos inolvidables que compartimos durante estos años en la universidad.

A mis dos amigos Andreita Q y Freddy B., quienes me brindaron una amistad verdadera en diferentes etapas de mi vida.

Finalmente, a la persona más especial y dulce que he conocido en mi vida, quien con su apoyo y paciencia me ha sabido dar fuerzas y ánimos para nunca desmayar y seguir adelante en circunstancias adversas de mi vida y en esta etapa de mi carrera, Gracias Lore

Aníbal Javier

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS	xiv
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	xv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
RESUMEN EJECUTIVO	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxvi

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2.1 Contextualización	2
1.2.2 Análisis Crítico.....	4
1.2.2.1 Árbol de Problemas	4
1.2.3 Prognosis	6
1.2.4 Formulación del Problema.....	6
1.2.5 Interrogantes	6
1.2.6 Delimitación.....	7
1.2.6.1 Delimitación Científica	7
1.2.6.2 Delimitación espacial.....	7
1.2.6.3 Delimitación Temporal.....	7
1.3 JUSTIFICACIÓN	7
1.4 OBJETIVOS	9
1.4.1 General.....	9
1.4.2 Específicos	9

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	10
2.2 FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA	11
2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL	11
2.4 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	12
2.4.1 SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD	14
2.4.1.1 Normalización.....	16
2.4.1.2 Normalización internacional	16
2.4.1.3 Sistema de gestión de la calidad según la norma ISO/IEC 17025.	17
2.4.2 CALIBRACIÓN Y TRAZABILIDAD	18
2.4.2.1 Calibración	18
2.4.2.2 Curva de calibración y análisis de regresión	19
2.4.2.3 Trazabilidad.....	20
2.4.2.3.1 Trazabilidad de la instrumentación.....	21
2.4.2.3.2 Trazabilidad de un resultado	22
2.4.2.3.3 Trazabilidad de un patrón.....	22
2.4.2.3.4 Trazabilidad de un equipo	22
2.4.2.3.5 Trazabilidad de muestras	23
2.4.2.4 Verificación.....	23
2.4.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS.....	24
2.4.3.1 Tipos de validación.....	25
2.4.3.2 Parámetros de desempeño del método.....	25
2.4.3.2.1 Especificidad /Selectividad	26
2.4.3.2.2 Límite de Detección.....	26
2.4.3.2.3 Límite de Cuantificación	26
2.4.3.2.4 Intervalo de trabajo e intervalo lineal	27
2.4.3.2.5 Robustez	27
2.4.3.2.6 Sensibilidad	27
2.4.3.2.7 Porcentaje de recuperación.....	28
2.4.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE	28

2.4.4.1 Fuentes de incertidumbre.....	28
2.4.4.2 Cuantificación de la incertidumbre	29
2.4.4.2.1 Evaluación tipo A.....	29
2.4.4.2.2 Evaluación tipo B.....	30
2.4.4.3 Distribuciones de probabilidad	31
2.4.4.3.1 Distribución normal.....	31
2.4.4.3.2 Distribución rectangular.....	32
2.4.4.3.3 Distribución triangular.....	33
2.4.4.4 Incertidumbre expandida.....	34
2.4.4.4.1 Factor de cobertura y nivel de confianza.....	34
2.4.4.4.2 Distribución t de Student	34
2.4.4.4.3 Grados de libertad.....	36
2.4.4.4.4 Incertidumbre expandida.....	36
2.4.5 REVISIÓN DE CONCEPTOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA.....	38
2.4.5.1 Espectrofotometro UV-Visible	39
2.4.5.2 Teoría de la Espectrofotometría	39
2.4.5.3 Propiedades de La Luz.....	40
2.4.5.4 Absorción de la luz	41
2.4.5.5 Medición de los fotones como señal.....	42
2.4.5.6 Ley de Lambert Beer.....	43
2.4.5.6.1 Limitaciones de la ley de Lambert Beer.....	44
2.4.6 GENERALIDADES SOBRE LOS ANALITOS A VALIDARSE	45
2.4.6.1 Cloro libre residual.....	45
2.4.6.2 Cromo.....	47
2.4.6.3 Nitrito	48
2.5 HIPÓTESIS	49
2.5.1 Hipótesis de Investigación.....	49
2.5.2 Hipótesis Nula	50
2.5.3 Hipótesis Alternativa.....	50
2.6 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS	50
2.6.1 Variable Independiente:.....	50
2.6.2 Variable Dependiente:	50

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	51
3.2 NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN	51
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	52
3.3.1 Población.....	52
3.4.2 Muestra	52
3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	53
3.5 PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	54
3.5.1 Diseño Experimental y Estadístico	55
3.5.1.1 Diseño estadístico para la obtención de la función de respuesta, para el análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.	55
3.5.1.2 Diseño experimental para la validación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.	56
3.6 PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	57
3.6.1 PUESTA A PUNTO DE LOS MÉTODOS.....	57
3.6.1.1 Necesidad Analítica.....	57
3.6.1.2 Determinación de Cloro libre residual.....	57
3.6.1.2.1 Objeto y Alcance	57
3.6.1.2.2 Principio del método.....	57
3.6.1.2.3 Desarrollo del método	58
3.6.1.3 Determinación de Cromo hexavalente	60
3.6.1.3.1 Objeto y Alcance	60
3.6.1.3.2 Principio del método.....	61
3.6.1.3.3. Desarrollo del método	61
3.6.1.4 Determinación de Cromo total.....	63
3.6.1.4.1 Objeto y Alcance	63
3.6.1.4.2 Principio del método.....	64
3.6.1.4.3. Desarrollo del método	64
3.6.1.5 Determinación de Nitritos	66
3.6.1.5.1 Objeto y Alcance	66
3.6.1.5.2 Principio del método.....	67
3.6.1.5.3. Desarrollo del método	67

3.6.2 SISTEMA DE VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS	70
3.6.2.1 Elección de los parámetros de validación.	70
3.6.2.2 Fijación de objetivos para los parámetros de validación.	70
3.6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ESTADÍSTICO	73
3.6.3.1 Cloro libre residual.....	73
3.6.3.1.1 Elementos que se disponen para la validación	73
3.6.3.1.2 Tratamiento Estadístico.....	73
3.6.3.2 Cromo hexavalente	74
3.6.3.2.1 Elementos que se disponen para la validación	74
3.6.3.2.2 Tratamiento Estadístico.....	75
3.6.3.3 Cromo total.....	75
3.6.3.3.1 Elementos que se disponen para la validación	75
3.6.3.3.2 Tratamiento Estadístico.....	76
3.6.3.4 Nitritos	76
3.6.3.4.1 Elementos que se disponen para la validación	76
3.6.3.4.2 Tratamiento Estadístico.....	77
3.6.4 MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE DATOS	77
3.6.4.1 Modelo matemático para determinar la Recta de Calibración de Función de Respuesta	77
3.6.4.2 Modelo matemático para determinar el Intervalo de Confianza y los Límites de Confianza	80
3.6.4.3 Determinación del Límite de Detección (LD).	80
3.6.4.4 Determinación del Límite de Cuantificación (LC).	81
3.6.4.5 Determinación de la Exactitud y Precisión (% Recuperación y % CV)	81
3.6.4.6 Modelo matemático para determinar el Análisis de Varianza Simple (ANOVA)	81
3.6.4.7 Cálculo de las Incertidumbres de cloro libre residual, cromo hexavalente y cromo total.....	85
3.6.4.7.1 Incertidumbre Expandida.....	85
3.6.4.7.2 Incertidumbre Estándar Combinada	85
3.6.4.7.3 Incertidumbre de Reproducibilidad	86
3.6.4.7.4 Incertidumbre del Procedimiento.....	86
3.6.4.7.5 Incertidumbre de Calibración.....	86
3.6.4.7.6 Incertidumbre del Material de Referencia.....	87

3.6.4.7.7 Incertidumbre por Linealidad	89
3.6.4.7.8 Incertidumbre por Repetibilidad.....	90
3.6.4.8 Cálculo de las Incertidumbres de nitritos.....	91
3.6.4.8.1 Incertidumbre Expandida.....	91
3.6.4.8.2 Incertidumbre Estándar Combinada	91
3.6.4.8.3 Incertidumbre de Reproducibilidad	91
3.6.4.8.4 Incertidumbre del Procedimiento.....	92
3.6.4.8.5 Incertidumbre de Calibración.....	93
3.6.4.8.6 Incertidumbre del Material de Referencia.....	93
3.6.4.8.7 Incertidumbre por Linealidad	93
3.7.4.8.8 Incertidumbre por Repetibilidad.....	94

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS	95
4.2 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	95
4.2.1 CONTRASTES DE SIGNIFICACIÓN	95
4.2.1.1 Pruebas de significancia del Método de cloro libre residual	96
4.2.1.1.1 Material de referencia interno comparado con un material de referencia certificado.....	96
4.2.1.2 Pruebas de significancia del Método de cromo hexavalente.....	97
4.2.1.2.1 Material de referencia interno comparado con un material de referencia certificado.....	97
4.2.1.3 Pruebas de significancia para el método de nitritos	97
4.2.1.3.1 Material de referencia interno comparado con un material de referencia certificado.....	97
4.2.1.3.2 Tiempo de medición del reactivo de color.	98
4.2.1.3.3 Volumen de muestra y de reactivo de color.	99
4.2.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.....	99
4.2.2.1 Función de Respuesta.....	99
4.2.2.1.1 Función de Respuesta del método de cloro libre residual	99
4.2.2.1.2 Función de Respuesta del método de cromo hexavalente.....	100
4.2.2.1.3 Función de Respuesta del método de cromo total	100

4.2.2.1.4 Función de Respuesta del método de nitritos	100
4.2.2.2 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	101
4.2.2.2.1 Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método de cloro libre residual.....	101
4.2.2.2.2 Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método de cromo hexavalente	101
4.2.2.2.3 Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método de cromo total	102
4.2.2.2.4 Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método de nitritos.	102
4.2.2.3 Análisis de Varianza Simple	102
4.2.2.3.1 Análisis de Varianza Simple para el método de cloro libre residual	103
4.2.2.3.2 Análisis de Varianza Simple del método de cromo hexavalente	103
4.2.2.3.3 Análisis de Varianza Simple del método de cromo total.....	104
4.2.2.3.4 Análisis de varianza Simple del método de nitritos.....	104
4.2.2.4 Exactitud y Precisión	105
4.2.2.4.1 Exactitud y Precisión del método de cloro libre residual.....	105
4.2.2.4.2 Exactitud y Precisión del método de cromo hexavalente	106
4.2.2.4.3 Exactitud y Precisión del método de cromo total.....	106
4.2.2.4.4 Exactitud y Precisión del método de nitritos	107
A. Tratamiento de interferencias por análisis del color de la muestra	107
4.2.2.5 Incertidumbre	109
4.2.2.5.1 Incertidumbre del método de cloro libre residual	109
4.2.2.5.2 Incertidumbre del método de cromo hexavalente.....	109
4.2.2.5.3 Incertidumbre del método de cromo total	109
4.2.2.5.4 Incertidumbre del método de nitritos.	110
4.3 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.....	110

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES.....	111
5.2 RECOMENDACIONES	115

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1 DATOS INFORMATIVOS.....	116
6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	116
6.3 JUSTIFICACIÓN	117
6.4 OBJETIVOS	118
6.4.1 Objetivo General	118
6.4.2 Objetivos Específicos	118
6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	119
6.6 FUNDAMENTACIÓN.....	122
6.7 METODOLOGÍA.....	123
6.8 ADMINISTRACIÓN	127
6.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	127

MATERIALES DE REFERENCIA

1. BIBLIOGRAFÍA	129
2. ANEXOS	136

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Espectro electromagnético que muestra los colores del espectro visible	43
Tabla N° 2. Registro de datos para la curva de calibración.....	55
Tabla N° 3. Niveles de estudio para la obtención de la respuesta experimental ..	56
Tabla N° 4. Objetivos de validación para la determinación de cloro libre residual	71
Tabla N° 5. Objetivos de validación para la determinación cromo hexavalente ...	71
Tabla N° 6. Objetivos de validación para la determinación de cromo total.....	72
Tabla N° 7. Objetivos de validación para la determinación de nitritos.....	72
Tabla N° 8. Niveles de concentración para cada rango de concentraciones.	73
Tabla N° 9. Niveles de concentración para cada rango de concentraciones.	74
Tabla N° 10. Niveles de concentración para cada rango de concentraciones.	75
Tabla N° 11. Niveles de concentración para cada rango de concentraciones.	76

Tabla N° 12. Análisis simple de Varianza (ANOVA).....	84
Tabla N° 13. Costos del ensayo para la determinación de cloro libre residual...	119
Tabla N° 14. Costos del ensayo para la determinación de cromo hexavalente.	120
Tabla N° 15. Costos del ensayo para la determinación de cromo total.	120
Tabla N° 16. Costos del ensayo para la determinación de nitritos.	121

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro N° 1. Análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.....	53
Cuadro N° 2. Validación de los métodos.....	54
Cuadro N° 3. Modelo operativo.	126
Cuadro N° 4. Administración de la propuesta.	127
Cuadro N° 5. Previsión de la evaluación.	128
Figura 1. Árbol de Problemas.....	4
Figura 2. Organizador lógico de variables.....	13
Figura 3. Modelo de un Sistema de Gestión de Calidad.	15
Figura 4. Pirámide de la Trazabilidad de los análisis químicos	21
Figura 5. Propiedades de la distribución normal al 68%, 95% y 99%.	31
Figura 6. Gráfica de la distribución rectangular.....	32
Figura 7. Gráfica de la distribución rectangular.....	33
Figura 8. Gráfica de la distribución <i>t</i> de student.....	35
Figura 9. Diagrama para la estimación de incertidumbres de medición.....	37
Figura 10. Partes de un espectrofotómetro.....	39
Figura 11. Espectro electromagnético.....	41
Figura 12. Curva de calibración que muestran las desviaciones positiva y negativa a partir de la ley de Beer.	45
Figura 13. Porcentaje de reparto del HClO y ClO ⁻ en el agua.....	46
Figura 14. Vías de ingestión de nitrito y sus posibles efectos tóxicos.....	49
Figura 15. Reacción del cloro libre con el DPD (N,N-dietil-p-fenilenediamina) ...	58
Figura 16. Reacción del cromo hexavalente con la 1,5-difenilcarbohidracida.....	61
Figura 17. Reacción del cromo III con el hipobromito.	64
Figura 18. Reacción del nitrito con la sulfanilamida.	67

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. HOJAS DE VALIDACIÓN.

Cuadro A-1. Hoja de validación del método de cloro libre residual.

Cuadro A-2. Hoja de validación del método de cromo hexavalente.

Cuadro A-3. Hoja de validación del método de cromo total.

Cuadro A-4. Hoja de validación del método de nitritos.

ANEXO B. DATOS Y RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Tabla B-1. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones del método de cloro libre residual.

Tabla B-2. Datos experimentales obtenidos de la muestra de agua potable del método de cloro libre residual.

Tabla B-3. Datos obtenidos del material de referencia interno y material de referencia certificado a una concentración de 0,5 mg/l de cloro libre residual.

Tabla B-4. Resultados del análisis t de student para el Material de referencia certificado y Material de referencia interno.

Tabla B-5. Resultados de la prueba F para el Material de referencia certificado y Material de referencia Interno.

Tabla B-6. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la curva de calibración del método de cromo hexavalente.

Tabla B-7. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango bajo del método de cromo hexavalente.

Tabla B-8. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango alto (diluciones) del método de cromo hexavalente.

Tabla B-9. Datos obtenidos de la muestra de agua residual del método de cromo hexavalente.

Tabla B-10. Datos obtenidos del material de referencia interno y material de referencia certificado a una concentración de 0,1 mg/l cromo hexavalente.

Tabla B-11. Resultados del análisis t de student para el Material de referencia certificado y Material de referencia interno.

Tabla B-12. Resultados de la Prueba F para material de referencia interno y material de referencia certificado.

Tabla B-13. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la curva de calibración del método de cromo total.

Tabla B-14. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango bajo del método de cromo total.

Tabla B-15. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango alto (diluciones) del método de cromo total.

Tabla B-16. Datos obtenidos de la muestra de agua clara del método de cromo total.

Tabla B-17. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la curva de calibración del método de nitritos.

Tabla B-18. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango bajo del método de nitritos.

Tabla B-19. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango alto (diluciones) del método de nitritos.

Tabla B-20. Datos obtenidos de la muestra de agua residual del método de nitritos.

Tabla B-21. Datos del material de referencia interno y material de referencia certificado a una concentración de 0,2 mg/l de nitritos.

Tabla B-22. Resultados del análisis t de student para el Material de referencia certificado y Material de referencia interno.

Tabla B-23. Resultados de la Prueba F para material de referencia interno y material de referencia certificado a una concentración de 0,2 mg/l.

Tabla B-24. Datos de los tiempos de medición del estándar de 0,05 mg/l de Nitritos a 10 minutos y 1 hora.

Tabla B-25. Datos de los tiempos de medición del estándar de 0,05 mg/l de N-NO_2^- a 10 minutos y 2 horas.

Tabla B-26. Resultados del análisis t de student para los tiempos de medición a 10 minutos y 1 hora.

Tabla B-27. Resultados del análisis t de student para los tiempos de medición a 10 minutos y 2 horas.

Tabla B-28. Datos del volumen seleccionado para el análisis a una concentración de 0,05 mg/l.

Tabla B-29. Resultados del análisis *t* de student para el volumen seleccionado de muestra.

ANEXO C. LIMITES DE CONFIANZA Y FUNCIÓN DE RESPUESTA DE LOS MÉTODOS.

Tabla C-1. Límites de Confianza para el método de cloro libre residual.

Tabla C-2. Desviación estándar del blanco, límite de detección y límite de cuantificación del método de cloro libre residual.

Tabla C-3. Límites de Confianza para el método de cromo hexavalente.

Tabla C-4. Desviación estándar del blanco, límite de detección y límite de cuantificación del método de cromo hexavalente.

Tabla C-5. Límites de Confianza para el método de cromo total.

Tabla C-6. Desviación estándar del blanco, límite de detección y límite de cuantificación del método de cromo total.

Tabla C-7. Límites de Confianza para el método de nitritos.

Tabla C-8. Desviación estándar del blanco, límite de detección y límite de cuantificación del método de nitritos.

Grafico C-1. Límites de Confianza para el método de cloro libre residual.

Grafico C-2. Función de respuesta de linealidad el método de cloro libre residual.

Gráfico C-3. Recta de Calibración del método de cloro libre residual.

Grafico C-4. Límites de Confianza para el método de cromo hexavalente.

Grafico C-5. Función de respuesta de linealidad el método de cromo hexavalente.

Gráfico C-6. Recta de Calibración del método de cromo hexavalente.

Grafico C-7. Límites de Confianza para el método de cromo total.

Grafico C-8. Función de respuesta de linealidad el método de cromo total.

Gráfico C-9. Recta de Calibración del método de cromo total.

Grafico C-10. Límites de Confianza para el método de nitritos.

Grafico C-11. Función de respuesta de linealidad el método de nitritos.

Gráfico C-12. Recta de Calibración del método de nitritos

ANEXO D. EXACTITUD Y PRECISIÓN DE LOS MÉTODOS.

Tabla D-1. Recuperación para estándares de 0,1, 0,2 y 0,25 mg/l.

Tabla D-2. Recuperación y Precisión promedio en cada nivel de concentración de la curva de calibración del método de cloro libre residual.

Tabla D-3. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del método de cloro libre residual.

Tabla D-4. Recuperación en cada nivel de concentración por día del método de cloro libre residual.

Tabla D-5. Recuperación sobre una matriz real.

Tabla D-6. Resultados de la precisión para el método de cloro libre residual.

Tabla D-7. Recuperación para estándares de 0,01 y 0,02 mg/l.

Tabla D-8. Recuperación y Precisión promedio en cada nivel de concentración de la curva de calibración del método de cromo hexavalente.

Tabla D-9. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de cromo hexavalente.

Tabla D-10. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) del método de cromo hexavalente.

Tabla D-11. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de cromo hexavalente.

Tabla D-12. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) método de cromo hexavalente.

Tabla D-13. Recuperación sobre una matriz real.

Tabla D-14. Resultados de la precisión para el método de cromo hexavalente.

Tabla D-15. Recuperación para estándares de 0,02 y 0,03 mg/l.

Tabla D-16. Recuperación y Precisión promedio en cada nivel de concentración de la curva de calibración del método de cromo total.

Tabla D-17. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de cromo total.

Tabla D-18. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) del método de cromo total.

Tabla D-19. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de cromo total.

Tabla D-20. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) método de cromo total.

Tabla D-21. Recuperación sobre una matriz real.

Tabla D-22. Resultados de la precisión para el método de cromo total.

Tabla D-23. Recuperación para estándares de 0,005 y 0,01 mg/l.

Tabla D-24. Recuperación y Precisión promedio en cada nivel de concentración de la curva de calibración del método de nitritos.

Tabla D-25. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de nitritos.

Tabla D-26. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) del método de nitritos.

Tabla D-27. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de nitritos.

Tabla D-28. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) método de nitritos.

Tabla D-29. Recuperación sobre una matriz real.

Tabla D-30. Resultados de la precisión del método de nitritos.

Tabla D-31. Recuperación del análisis del color amarillo.

Tabla D-32. Recuperación del análisis del color azul.

Tabla D-33. Recuperación del análisis del color negro.

Tabla D-34. Recuperación del análisis del color rojo.

Tabla D-35. Porcentaje de recuperación del análisis del color verde.

ANEXO E. CÁLCULOS DE ANOVA

Tabla E-1. Análisis de Varianza Simple para los diferentes niveles de concentración del método de cloro libre residual.

Tabla E-2. Análisis de Varianza Simple para los diferentes niveles de concentración del método de cromo hexavalente.

Tabla E-3. Análisis de Varianza Simple para los diferentes niveles de concentración del método de cromo total.

Tabla E-4. Análisis de Varianza Simple para los diferentes niveles de concentración del método de nitritos

ANEXO F. CÁLCULOS DE INCERTIDUMBRES

Tabla F-1. Incertidumbre para el material volumétrico diluido.

Tabla F-2. Incertidumbre del Material de referencia.

Tabla F-3. Incertidumbre de linealidad.

Tabla F-4. Incertidumbre de repetibilidad.

Tabla F-5. Incertidumbre de calibración.

Tabla F-6. Incertidumbre de reproducibilidad.

Tabla F-7. Incertidumbre del procedimiento.

Tabla F-9. Incertidumbre para el material volumétrico.

Tabla F-10. Incertidumbre del Material de referencia.

Tabla F-11. Incertidumbre del Material de referencia diluido.

Tabla F-12. Incertidumbre de linealidad.

Tabla F-13. Incertidumbre de repetibilidad.

Tabla F-14. Incertidumbre de calibración.

Tabla F-15. Incertidumbre de reproducibilidad.

Tabla F-16. Incertidumbre del procedimiento.

Tabla F-17. Incertidumbre estándar combinada y expandida.

Tabla F-18. Incertidumbre para el material volumétrico.

Tabla F-19. Incertidumbre del Material de referencia.

Tabla F-20. Incertidumbre del Material de referencia diluido.

Tabla F-21. Incertidumbre de linealidad.

Tabla F-22. Incertidumbre de repetibilidad.

Tabla F-23. Incertidumbre de calibración.

Tabla F-24. Incertidumbre de reproducibilidad.

Tabla F-25. Incertidumbre del procedimiento.

Tabla F-26. Incertidumbre estándar combinada y expandida.

Tabla F-27. Incertidumbre para el material volumétrico.

Tabla F-28. Incertidumbre del Material de referencia.

Tabla F-29. Incertidumbre del Material de referencia diluido.

Tabla F-30. Incertidumbre de linealidad.

Tabla F-31. Incertidumbre de repetibilidad.

Tabla F-32. Incertidumbre de calibración.

Tabla F-33. Incertidumbre de reproducibilidad.

Tabla F-34. Incertidumbre debida al reactivo de color.

Tabla F-35. Incertidumbre debida al reactivo de color.

Tabla F-36. Incertidumbre estándar combinada y expandida.

ANEXO G. DIAGRAMAS ISHIKAWA CAUSA-EFECTO

Gráfico G-1. Incertidumbre del método

Gráfico G-2. Incertidumbre de calibración

Gráfico G-3. Incertidumbre del método

Gráfico G-4. Incertidumbre de calibración

ANEXO H. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

ANEXO H-1. Preparación de soluciones para la curva de calibración y validación de cloro libre residual

ANEXO H-2. Preparación de soluciones para la curva de calibración y validación de cromo hexavalente

ANEXO H-3. Preparación de soluciones para la curva de calibración y validación de cromo total

ANEXO H-4. Preparación de soluciones para la curva de calibración y validación de nitritos

Tabla H-1. Preparación de soluciones de cloro libre residual a partir del material de referencia.

Tabla H-2. Preparación de soluciones de cromo hexavalente a partir del material de referencia.

Tabla H-3. Preparación de soluciones de cromo total a partir del material de referencia.

Tabla H-4. Preparación de soluciones de nitritos a partir del material de referencia.

ANEXO I. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO Y PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

ANEXO I-1. Determinación de color verdadero y aparente: Procedimiento HACH 8025, Método estándar APHA de platino-cobalto.

ANEXO I-2. Preparación del reactivo de color para el análisis de nitritos.

ANEXO I-3. Estandarización del Material de referencia Interno: nitrito de Sodio

ANEXO J. USO DE LOS EQUIPOS

ANEXO J-1. Instrucción IUE/CICAM/06: Uso de la balanza analítica METTLER TOLEDO.

ANEXO J-2. Instrucción IUE/CICAM/02 para el uso del espectrofotómetro HACH DR 2800.

ANEXO J-3. Instrucción IUE/CICAM/01 para el uso del pHmetro ORION.

ANEXO K. FOTOGRAFÍAS

Fotografía K-1. Espectrofotómetro HACH DR 2800.

Fotografía K-2. Ultrasonido BRANSON.

Fotografía K-3. pHmetro ORION.

Fotografía K-4. Destilador de agua FANEM.

Fotografía K-5. Sorbona LABCONCO.

Fotografía K-6. Pocket Colorimeter II para medición de cloro libre residual.

Fotografía K-7. Estufa Linberg /Blue.

Fotografía K-8. Reactivo de color para el análisis de nitritos.

Fotografía K-9. Desarrollo de color a diferentes concentraciones de nitritos.

Fotografía K-10. Color amarillo para el análisis de interferencia del método de nitritos.

Fotografía K-11. Color azul para el análisis de interferencia del método de nitritos.

Fotografía K-12. Color negro para el análisis de interferencia del método de nitritos.

Fotografía K-13. Color rojo para el análisis de interferencia del método de nitritos.

Fotografía K-14. Color verde para el análisis de interferencia del método de nitritos.

RESUMEN EJECUTIVO

El presente Trabajo de investigación en la modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) ha sido realizado en el Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) con el propósito de desarrollar y validar los procedimientos de ensayo para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos aplicados a muestras de aguas claras y residuales, utilizando el espectrofotómetro HACH Visible DR 2800

En la parte bibliográfica se descifraron criterios importantes sobre calidad, validación, calibración y conceptos estadísticos, los cuales fueron un soporte para el correcto tratamiento de los datos y así obtener los parámetros de desempeño de los métodos.

Se validó el primer método para el análisis de cloro libre residual por, determinándose un intervalo de 0,25 hasta 5 mg/l. La exactitud, precisión e incertidumbre que se obtuvieron cumplieron con los objetivos establecidos. En todos los niveles de concentración se encontraron incertidumbres menores al 15% y coeficientes de variación de repetibilidad y de reproducibilidad menores al 5%.

El segundo método se efectuó para el análisis de cromo hexavalente, obteniéndose un rango de trabajo de 0,02 a 50 mg/l. En lo que tiene que ver a recuperación, precisión e incertidumbre se cumplieron con los objetivos establecidos. Los resultados finales reportaron incertidumbres menores al 18% y coeficientes de variación de reproducibilidad y repetibilidad menores al 5%.

El tercer método validado permitió el análisis de cromo total estableciéndose un rango de 0,03 a 100 mg/l. Se encontraron incertidumbres menores al 18% y coeficientes de variación de reproducibilidad y repetibilidad menores al 10% para los niveles de concentración.

Finalmente, se validó el método para la detección de nitrógeno de nitritos en un rango de concentraciones entre 0,01 a 100 mg/l. El análisis se validó con una incertidumbre del 20% El coeficiente de repetibilidad y reproducibilidad para todos los rangos resultó menor al 5%.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ANOVA	Análisis de Varianza
APHA	American Public Health Association
CICAM	Centro de Investigaciones y Control Ambiental
AWWA	American Water Works Association
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IEC	Comisión Electrotécnica Internacional
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
ISO	Organización Internacional de Estandarización
MRCs	Material de referencia certificado
MRi	Material de referencia interno
Rep.	Repeticiones o repetibilidad
DCA	Diseño completamente al azar
DICA	Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental
H_0	Hipótesis nula
H_a	Hipótesis alternativa
α	Nivel de significación
FR	Función de respuesta
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
CV_R	Coeficiente de variación de reproducibilidad
CV_r	Coeficiente de variación de Repetibilidad

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CLORO LIBRE RESIDUAL, CROMO HEXAVALENTE, CROMO TOTAL Y NITRITOS EN MUESTRAS DE AGUA, EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y CONTROL AMBIENTAL "CICAM"

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación es la confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido requisitos particulares para una utilización específica prevista de un método de análisis (ISO/IEC, 2004). Este es un requisito importante en la práctica del análisis químico. Sin embargo, se debe tener conocimiento de su importancia, el por qué, cuándo, y exactamente lo que se necesita para ser realizado, pero esto parece ser un limitante para los analistas químicos (EURACHEM, 1998).

Según Cámara (2004), la validación es un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que un método analítico determinado posee las características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar. Estas características se concretan en los parámetros de calidad como son: la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación, el intervalo dinámico, la sensibilidad, la selectividad y la robustez

Desde el punto de vista anterior, todos los métodos necesitan ser conocidos por los laboratorios que los utilizan para establecer sus límites de aplicación y los parámetros que se van a utilizar para su control (ASECAL S.L., 2007).

Con estos antecedentes surge la necesidad de parte de los laboratorios que realizan ensayos y calibración en establecer sistemas de validación, con el fin de implantar el sistema de gestión de calidad bajo la norma ISO 17025 (Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración), la cual contribuirá a tener mayor competitividad y garantizar a sus clientes la calidad de sus servicios y cumplir con los requisitos necesarios para la acreditación.

1.2.1 Contextualización

Contextualización macro

Los países en vías de desarrollo tienen un criterio amplio sobre la necesidad de validar sus procedimientos de ensayo, ya que es un requisito indispensable para conseguir el alcance de acreditación del laboratorio. Entre estos se encuentran los que realizan análisis físico-químicos y microbiológicos de aguas.

La validación y acreditación de ensayos analíticos se realiza en base a normas nacionales e internacionales tanto para los procedimientos de ensayo como para la estimación de la incertidumbre. En el caso del análisis de aguas, la mayoría de laboratorios se basan en las técnicas del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Métodos normalizados para el análisis de aguas y aguas residuales) de la APHA (American Public Health Association) - AWWA (American Water Works Association) y para el cálculo de la incertidumbre en Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (Guía para la Cuantificación de la incertidumbre en las mediciones analíticas) de la EURACHEM, los cuales están regidos por las ISO 17025.

La norma ISO 17025 contiene todos los requisitos que los laboratorios de ensayo y calibración deben cumplir si ellos desean demostrar que operan un sistema de calidad, es decir, si son competentes y capaces de generar resultados válidos

técnicamente (ISO/IEC, 2005). También tiene en cuenta el muestreo y que los métodos de ensayo pueden ser normalizados o bien ser desarrollados por el propio laboratorio. Otra novedad es que establece que algunas cláusulas no serán aplicables a todos los laboratorios, en concreto aquellas relacionadas con actividades que el laboratorio no lleve a cabo, por ejemplo el muestreo o el desarrollo de nuevos métodos (Ricard *et al.*, 2001).

Contextualización meso

En América Latina, existen laboratorios que desarrollan, validan y acreditan sus parámetros según la demanda de sus análisis. Tomando como referencia México los principales dificultades son: la falta de laboratorios de calibración acreditados para la calibración de instrumentos especializados, el desconocimiento y experiencia de los técnicos responsables de los laboratorios de pruebas y la falta de claridad y unificación en los criterios de las normas nacionales e internacionales sobre el tema de la trazabilidad y la estimación de la incertidumbre en las mediciones químicas, bioquímicas y biológicas (Ustaran, 2000).

Contextualización micro

En el Ecuador existen alrededor de 89 laboratorios acreditados de los cuales 28 se dedican al análisis de aguas claras y residuales, alcance que es otorgado por el OAE (Organismo de Acreditación Ecuatoriano). Esta entidad avala el profesionalismo, competencia técnica y transparencia del trabajo de los OEC (Organismos de Evaluación de la Conformidad), llevando a cabo el proceso de evaluación para confirmar que los laboratorios de ensayo, calibración, clínicos, organismos de inspección y organismos de certificación actúan conforme a las normas vigentes, es decir, están calificados técnicamente para emitir informes o certificados y realizan su trabajo con ética. Además: a) Cumple las funciones de organismo técnico nacional, en materia de la acreditación de evaluación de la conformidad para todos los propósitos establecidos en las leyes de la República, en tratados, acuerdos y convenios internacionales de los cuales el país es signatario; b) Ejerce la representación internacional en materia de acreditación de evaluación de la conformidad y coordina la suscripción de acuerdos de reconocimiento mutuo; c) Coordina, dentro del ámbito de su competencia, con

otras organizaciones tanto del sector regulador como del sector privado, las actividades relacionadas con el tema de acreditación de la evaluación de la conformidad; d) Supervisa a las entidades acreditadas y determina las condiciones técnicas bajo las cuales pueden ofrecer sus servicios a terceros (OAE, 2010).

Por lo mencionado los laboratorios deben llevar a cabo programas de ensayos de aptitud adecuados a sus necesidades, siguiendo sus propios procedimientos de ensayo; y debe asegurarse que las muestras y objetos de ensayos de aptitud sean tratados de la misma forma que las demás muestras u objetos que ingresan al laboratorio. Deben establecer políticas y procedimientos que aseguren su participación y establecer la sistemática y responsabilidades para evaluar los resultados obtenidos (OAE, 2010).

1.2.2 Análisis Crítico

1.2.2.1 Árbol de Problemas

EFFECTOS

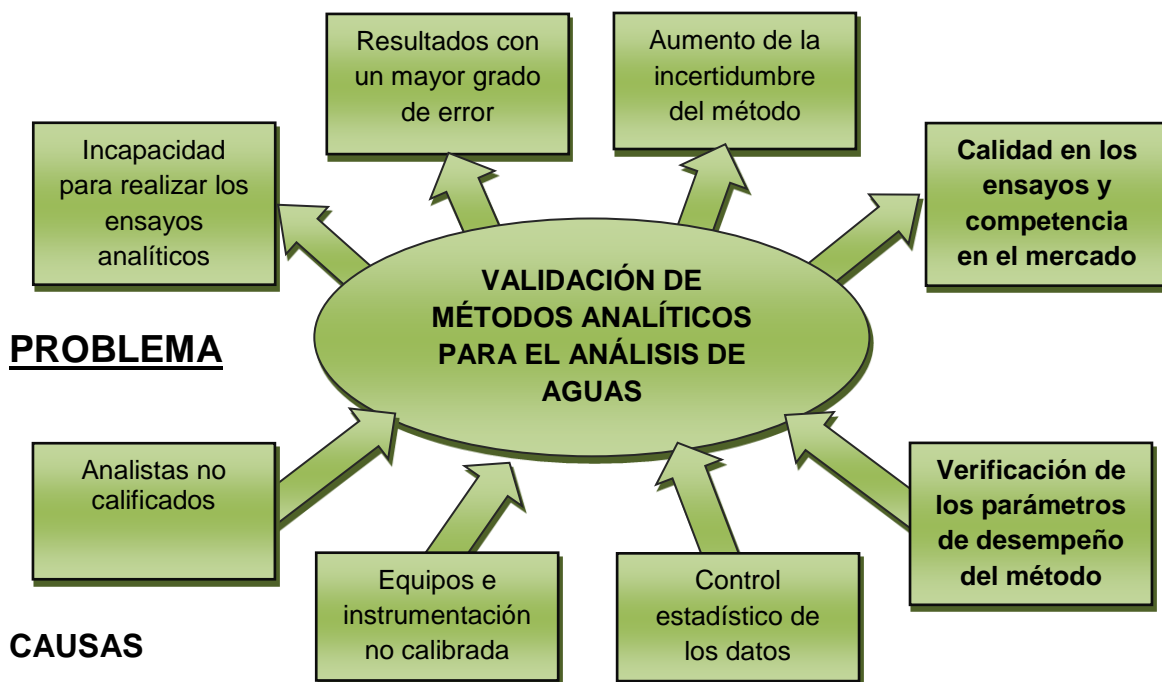


Figura 1. Árbol de Problemas.

Elaborado por: Javier Macas

Relación Causa – Efecto

Causa:

Verificación de los parámetros de desempeño del método.

Efecto:

Calidad en los ensayos y competencia en el mercado.

Los procedimientos que han sido validados por los laboratorios deberán ser verificados periódicamente para determinar si el desempeño del método, cumple con el especificado en la validación.

La verificación se relaciona a la exactitud de los resultados que genera un método analítico. La exactitud combina dos propiedades complementarias: la veracidad y la precisión de los resultados (Otto, 2000). La evaluación de la veracidad de un resultado consiste en estimar la concentración del analito en una muestra y compararla con el valor verdadero empleando el protocolo estadístico apropiado, mientras que la precisión mide el grado de incertidumbre de los resultados analíticos y se obtiene al minimizar los errores al azar (Kellner *et al.*, 1998).

Ustaran (2000), menciona que para la verificación de un método espectrofotométrico se analiza la curva de calibración con Materiales de referencia Certificados (MRCs) o Materiales de referencia internos (MRi), los cuales deben ser trazables. Con esto se establece los criterios de desempeño, de aceptación y rechazo

Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer un método a utilizar para resolver el problema analítico, ya sean de tipo estadístico o bien de tipo operativo / económico (Compañó, 2002). Esto implica que para estudiar el desempeño del método son usados equipos que se encuentren dentro de la especificación, que trabajen correctamente y que estén debidamente calibrados (EURACHEM, 1998).

Esta investigación se basa en desarrollar las metodologías para la validación de cloro libre residual, cromo Hexavalente, cromo total y nitritos, utilizando espectrofotometría Visible, aplicado al análisis de muestras de aguas claras y residuales, basándose en una serie de requerimientos y normas, tomando en cuenta principios de Química Analítica y Estadística, el mismo que contribuirá a mejorar el Sistema de gestión de Calidad que maneja el laboratorio.

1.2.3 Prognosis

El incumplimiento de la validación de los métodos analíticos: cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos conllevará a que no se amplíe la acreditación del laboratorio en dichos parámetros y que los resultados que emitan no serán confiables y consecuentemente no tendrá competitividad ni garantía para sus clientes.

1.2.4 Formulación del Problema

¿Es posible validar los métodos analíticos para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos, aplicados a muestras de agua, en el Centro de Investigaciones y Control ambiental “CICAM”?

1.2.5 Interrogantes

- ¿Están adaptados los procedimientos de ensayo a las condiciones del laboratorio?
- ¿Cuál será el tratamiento adecuado a las muestras de agua para minimizar las interferencias producidas por la matriz?
- ¿Qué parámetros analíticos de los métodos son necesarios para cumplir con el objetivo de validación?

- ¿Es posible establecer para cada método los criterios de aceptación o rechazo, dentro de un nivel de confianza del 95%?
- ¿Será factible generar el registro de los procedimientos de validación, si el método ha cumplido con los requisitos particulares para el uso específico?

1.2.6 Delimitación

1.2.6.1 Delimitación Científica

Área:	Química Analítica
Sub-área:	Análisis Cuantitativo
Sector:	Ambiente
Sub-sector:	Aguas

1.2.6.2 Delimitación espacial

El proyecto de investigación se realizó en los laboratorios del Centro de Investigaciones y Control Ambiental "CICAM" de la Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental de la Escuela Politécnica Nacional.

1.2.6.3 Delimitación Temporal

El proyecto tuvo una duración de 8 meses y fue auspiciado por el DICA y el CICAM.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Millones de medidas analíticas son realizadas diariamente en miles de laboratorios alrededor del mundo. Son innumerables las razones para realizar estas mediciones, por ejemplo: como una manera de analizar un producto con el fin comercial, apoyo al cuidado de la salud, control de la calidad del agua de consumo, análisis de la composición elemental de las aleaciones para confirmar si es utilizado en la construcción de portaviones, análisis forense en las

investigaciones criminales. Implícitamente cada aspecto de la sociedad se basa de alguna manera en las medidas analíticas (EURACHEM, 1998).

La realización de un análisis de laboratorio no es un proceso que se efectúe en forma aislada, en la mayoría de los casos se requiere de materiales, reactivos, instrumentos y personal calificado, realizando las pruebas a través de métodos o procedimientos estandarizados.

Todo laboratorio requiere de métodos analíticos fiables para cumplir con las normativas nacionales e internacionales, estableciendo así un sistema de control, para mejorar la calidad de sus servicios. Por lo tanto, es indispensable que un laboratorio deba tomar las medidas pertinentes para asegurarse de que es capaz de producir, y de que produce efectivamente, datos con el nivel necesario de incertidumbre. Dichas medidas comprenden:

- Utilización de métodos de análisis validados
- Utilización de procedimientos internos de control de calidad
- Participación en ensayos de aptitud; y
- Obtención de la certificación según una norma internacional, habitualmente ISO/IEC 17025.

Así, la validación de métodos es un componente esencial de las medidas que un laboratorio debe implementar para producir datos analíticos fiables. Al mismo tiempo que es necesaria ya que permite conocer los parámetros de desempeño del método y proporcionar un alto grado de seguridad en el análisis y confianza en los resultados que se obtienen al aplicarlo.

De este modo surge la necesidad de parte del Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) de la Escuela Politécnica Nacional, de desarrollar sistemas de validación en sus parámetros de análisis de aguas, con el fin de cumplir con las estándares de calidad establecidas en la normativa nacional e internacional, el cual contribuirá a tener mayor competitividad y garantizar a sus clientes la calidad de sus servicios, entregando los resultados en forma oportuna y segura, además que a esto se agrega la asistencia técnica e interpretación de los datos, para la debida toma de decisiones por parte del usuario final.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 General

- Validar los métodos analíticos empleados para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos en muestras de agua, en el Centro de Investigaciones y Control Ambiental "CICAM".

1.4.2 Específicos

- Adaptar los procedimientos de ensayo a las condiciones del laboratorio, con el objeto de identificar y controlar las variables de cada método.
- Establecer el tratamiento adecuado a las muestras de agua a fin de minimizar las interferencias producidas por la matriz.
- Determinar los parámetros analíticos de validación: linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión y efecto matriz.
- Establecer para cada método, los criterios de aceptación o rechazo, dentro de un nivel de confianza del 95%.
- Generar el registro de los procedimientos de validación, con el fin de proveer al CICAM de evidencia objetiva que le permita demostrar el cumplimiento de los requisitos particulares para el uso específico de cada una de las metodologías.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Para manejar un sistema de aseguramiento de la calidad de un laboratorio ambiental, se deben tener en cuenta muchos componentes como la elaboración de los protocolos analíticos e implementación de las metodologías para medición de los parámetros, la validación de las metodologías analíticas aplicadas a la evaluación de la calidad ambiental de acuerdo con las recomendaciones de las agencias nacionales e internacionales, y la vigilancia de muestras ambientales, incluyendo también la elaboración de toda la documentación relacionada (manual de funcionamiento de instrumentación y equipos , protocolos de calibración y análisis, instructivos, manuales, formatos).

Por ello el CICAM como parte del sistema de calidad que implementó desde el año 2003, cuenta con la bibliografía necesaria que es confidencial y de uso exclusivo para los analistas y tesistas que ingresan al laboratorio a realizar cualquier proceso de validación, de modo que no tengan ningún inconveniente al momento de escoger la metodología correcta y desarrollar el procedimiento específico de los parámetros escogidos.

Existe amplia documentación disponible en internet y en bibliotecas sobre criterios y procesos de validación analítica, pero información específica sobre datos o resultados relacionados con el presente proyecto no se encuentran publicados, ya que es de utilidad única y propia de cada entidad que los realiza, y del organismo acreditador.

2.2 FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA

El perfil de investigación científica tiene un fundamento de carácter cuantitativo donde se utilizaron proposiciones matemáticas, técnicas estadísticas e instrumentos muy estructurados que van a denotar relaciones funcionales entre variables, en la que predomina el análisis, la inducción y la deducción.

El análisis permite la observación y descripción del fenómeno, sus hechos, comportamiento, partes y componentes. La inducción es un modo de razonar que consiste en sacar de los hechos particulares una conclusión general. La deducción es un método de razonamiento que lleva a conclusiones partiendo de lo general, aceptado como válido, hacia aplicaciones particulares.

2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL

- **NORMA NTE - INEN ISO/IEC 17025**

Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

- **MANUAL DE CALIDAD DEL CICAM, Rev. 12**

Procedimiento General PG/CICAM/06: Cálculo de Incertidumbres

Procedimiento General PG/CICAM/07: Validación

Capítulo 21: Manejo de Objetos de ensayo

- **TEXTO ÚNICO DE LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA (TULAS)
LIBRO VI ANEXO 1.**

Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso agua (Tablas N° 1, 3, 6, 8, 11, 12, 13)

- **MÉTODO DE REFERENCIA: HACH 8021, 2da. Ed.**

Análisis de cloro libre residual, Espectrofotometría - Método DPD (N,N-diethyl-p-fenilenediamina).

- **MÉTODO DE REFERENCIA: HACH 8023, 2da. Ed.**
Análisis de cromo hexavalente, Espectrofotometría – Método de 1,5-difenilcarbohidracida.
- **MÉTODO DE REFERENCIA: HACH 8024, 2da Ed.**
Análisis de cromo total, Espectrofotometría - Método de la oxidación alcalina del ion hipobromito.
- **MÉTODO ESPECÍFICO: HACH 8025, 2da. Ed.**
Análisis de color verdadero y aparente, Espectrofotometría – Método estándar APHA de platino-cobalto.
- **MÉTODO DE REFERENCIA: STANDAR METHODS, Ed. 20, 4500-NO₂⁻ B**
Análisis de nitritos, Espectrofotometría – Método de diazotización.

2.4 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

CATEGORIZACIÓN DE VARIABLES

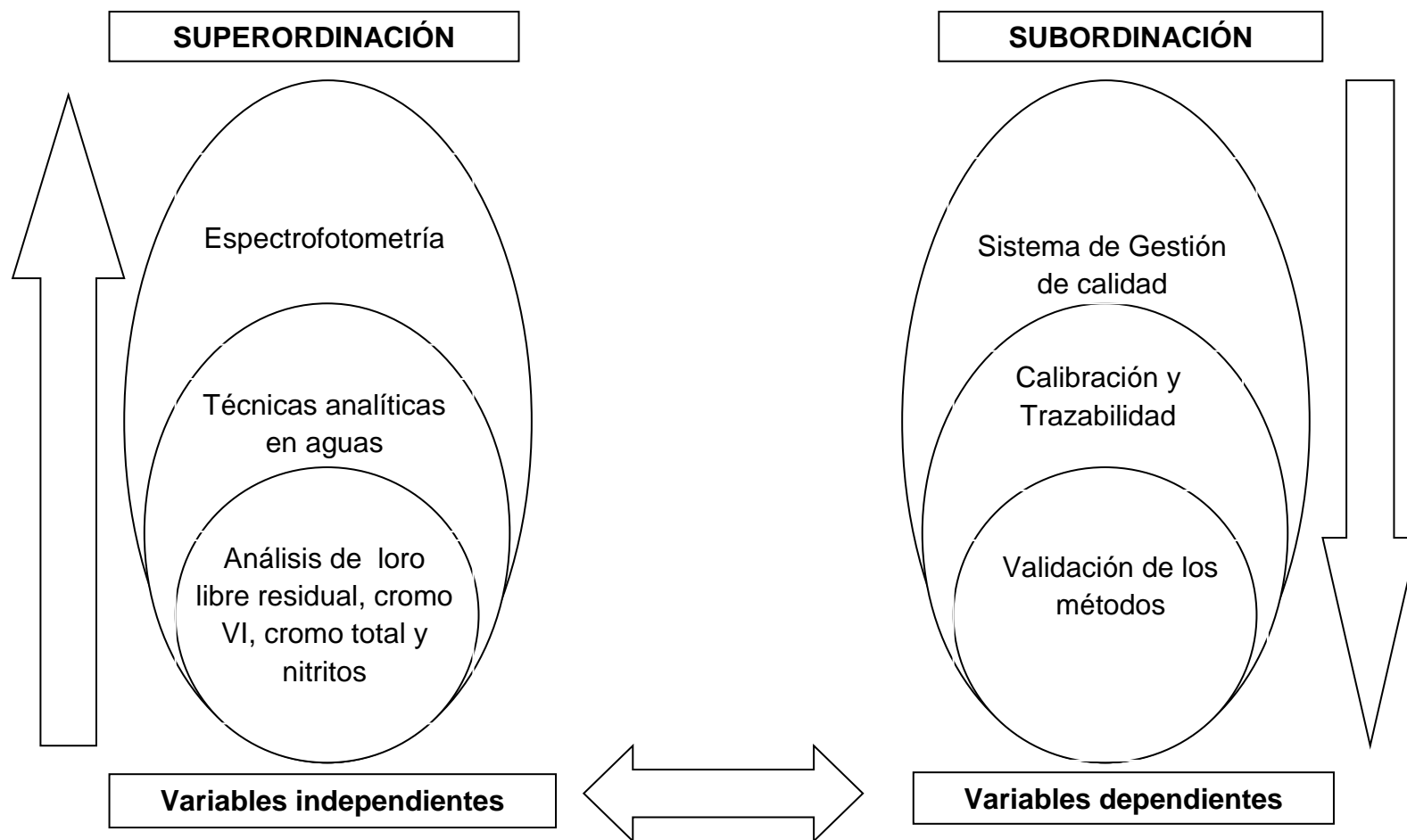


Figura 2. Organizador lógico de variables.

Elaborado por: Javier Macas.

MARCO CONCEPTUAL

2.4.1 SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD

No es posible dar un concepto de calidad, ya que dependiendo del contexto al que se aplique, se presentan definiciones diferentes. Incluso en un mismo ámbito.

La definición es y seguirá cambiando a lo largo del tiempo por tratarse de un concepto dinámico.

Quizás por este motivo, sea más correcto hablar de la visión actual de la calidad, debido a las diversas acepciones que el término tiene y que son difíciles de englobar en una única definición (Compañó, 2002).

La calidad la podemos definir actualmente como: grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requerimientos.

Un sistema de calidad (Fig. 3) es un conjunto de normas internacionales que determinan la forma de estructurar y organizar las operaciones con las que se debe ser capaz de dirigir y asegurar que la organización sea:

- Más rentable.
- Más competitiva.
- Más efectiva.
- Se adapte a las nuevas y cambiantes situaciones del mercado.

El sistema de calidad involucra todas las fases de vida de un producto y su proceso, desde la identificación inicial de las necesidades y los requerimientos del mercado hasta la satisfacción final de estos requisitos, considerando las etapas que a continuación se mencionan (Méndez *et al.*, 2002).

- Mercadotecnia.
- Ventas.
- Diseño y desarrollo de producto.
- Planeación y desarrollo de procesos.

- Adquisiciones.
- Producción y suministro de servicios.
- Verificación.
- Empaque y almacenamiento.
- Distribución.
- Instalación y puesta en marcha.
- Asistencia técnica y servicio.
- Seguimiento posterior a la venta.
- Disposición o reciclaje al final de su vida.

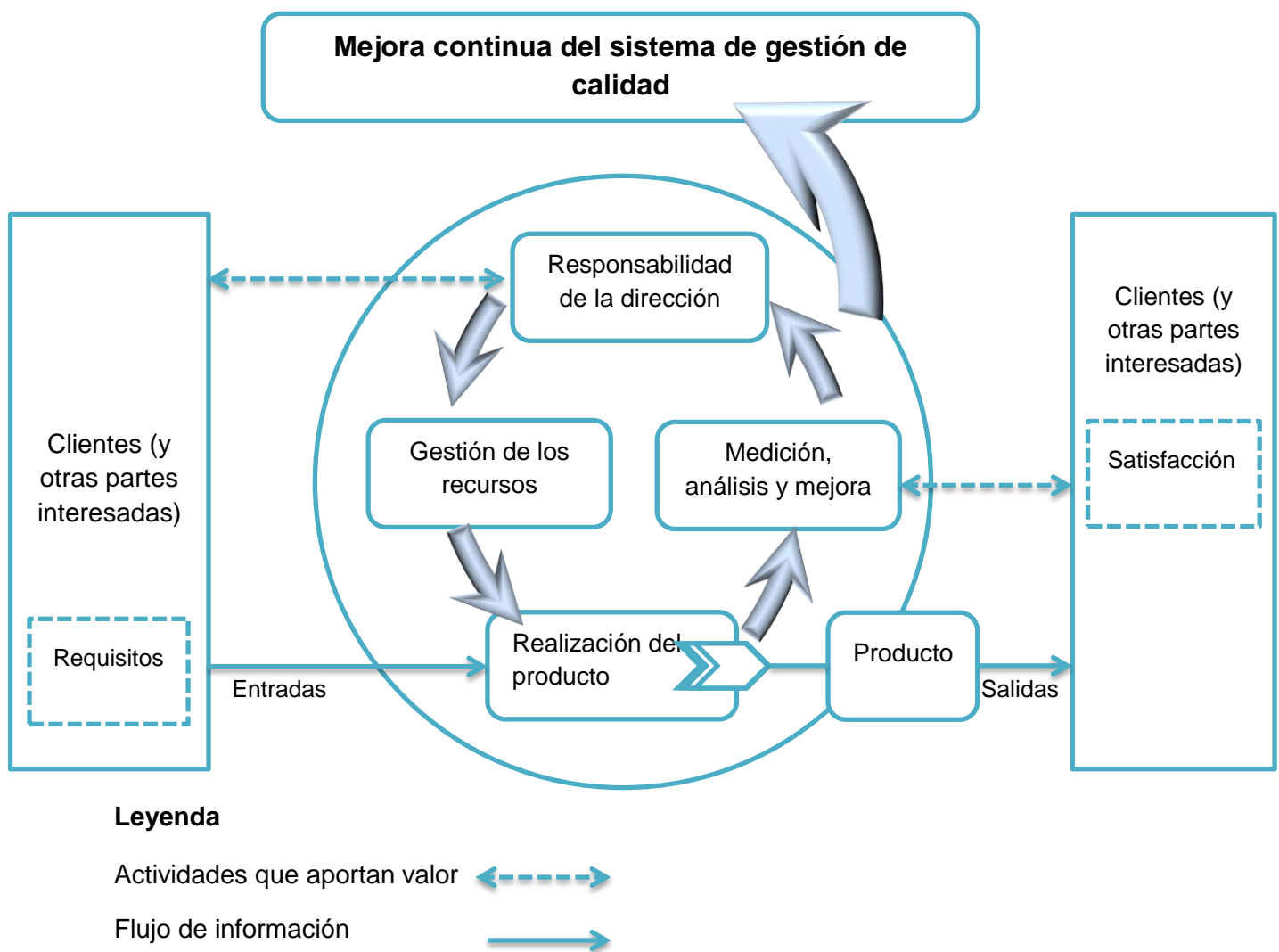


Figura 3. Modelo de un Sistema de Gestión de Calidad.

Fuente: Norma Chilena Internacional ISO 9000:2000, “Sistemas de gestión de la calidad - Fundamentos y Vocabulario”, 2000, Pp. 5

2.4.1.1 Normalización

Se entiende por norma una especificación técnica aprobada por un organismo reconocido de actividad normalizadora, para aplicación repetida o continua, cuya observancia no es en principio obligatoria.

La normalización es la actividad que tiene por objeto establecer ante problemas reales o potenciales, disposiciones destinadas a usos comunes y repetidos con el fin de obtener un nivel de ordenamiento óptimo en un contexto dado, que puede ser tecnológico, político o económico. Hace referencia a una actividad, a un hecho práctico, que luego se debe concretar en un documento que se pone a disposición del público.

La normalización permite maximizar la capacidad de producción, simplificar el trabajo, unificar criterios mínimos de calidad, facilitar la capacitación del personal, disminuir los costos de producción e incrementar la productividad y competitividad de la empresa. Toda empresa que cumple con las normas establecidas tiene, adicionalmente, la ventaja de poder certificar sus productos o servicios como medio para garantizar que éstos cumplen con los requisitos que satisfacen las expectativas del consumidor o usuario, tanto nacional como el de aquellos países que constituyen su meta de exportación.

Además promueve la creación de un idioma técnico común a todas las organizaciones y es una contribución importante para la libre circulación de los productos industriales. Igualmente, tanto el mercado local como global fomenta la competitividad empresarial, principalmente en el ámbito de las nuevas tecnologías.

2.4.1.2 Normalización internacional

El 27 de febrero de 1947 se crea la Organización Internacional de Normalización (ISO), continuadora de la originalmente llamada *International Standards Association* (ISA), la cual es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (organismos miembros de ISO).

Desde el 2004 la Federación Internacional ISO está constituida por las organizaciones de normalización más representativas de cada país. Los noventa y tres miembros activos, en su gran mayoría, son organismos privados con reconocimiento oficial y otros son instituciones gubernamentales.

Además ISO tiene treinta y seis miembros correspondientes y catorce miembros suscriptos, que son organismos de países que no cuentan con su propio instituto de normalización, por lo que no pueden participar en los estudios, pero tienen derecho a estar informados sobre los trabajos de normalización de su interés.

El trabajo de preparación de las normas internacionales se realiza a través de los comités técnicos de ISO. Cada organismo miembro interesado en una materia, para la cual se haya establecido un comité técnico, tiene el derecho de estar representado en dicho comité. Las organizaciones internacionales, públicas y privadas, en coordinación con ISO, también participan en el trabajo. ISO colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) en todas las materias de normalización electrotécnica.

Las normas internacionales son editadas de acuerdo con las reglas establecidas en la parte tres de las directivas ISO/IEC.

Con la globalización comercial se depende cada vez más de las normas internacionales, por la creciente interdependencia y exigencia de los mercados (Méndez *et al.*, 2009).

2.4.1.3 Sistema de gestión de la calidad según la norma ISO/IEC 17025.

La implantación de Sistemas de Gestión de la Calidad constituye una práctica generalizada en el ámbito empresarial. Las razones que pueden justificar este hecho son muy variadas, abarcan desde los aspectos vinculados a la disminución de costos e incrementos en la productividad, hasta aquellos otros relacionados con la necesidad de poseer un conjunto de procesos estandarizados que permitan regular y controlar las actividades y funciones que se realizan en el seno de una empresa.

La implantación de dichos Sistemas de Gestión de la Calidad se realiza dentro de algún marco de trabajo que pueda servir como referente para que la misma no se lleve a cabo de manera poco estructurada, incompleta o arbitraria.

La norma ISO/IEC 17025 es el principal estándar utilizado por laboratorios de ensayo y calibración como guía para implantar y obtener la certificación que manejan un Sistema de Gestión de Calidad. Los Requerimientos Generales para la Competencia de Laboratorios de Calibración y Ensayo se publicaron por ISO en diciembre de 1999 y se revisaron en mayo de 2005 para homologar conceptos con la versión ISO 9001:2000. Esta norma es el resultado de la asociación entre la Organización Internacional de Normas y La Comisión Electrotécnica Internacional. La norma reemplaza la Guía ISO 25 y EN 45001 e introduce un mayor énfasis en las responsabilidades del administrador y requerimientos explícitos para el mejoramiento continuo del sistema de gestión con un enfoque particular en la comunicación con el cliente (Bulltrek, 2009).

La ISO/IEC 17025 contiene dos secciones principales: Requisitos de gestión y Requisitos Técnicos. Los requisitos de gestión se relacionan principalmente con la operación y eficiencia del sistema de gestión de calidad dentro del laboratorio. Los requerimientos técnicos tratan sobre la competencia del personal, metodología y calibración/ensayo de equipos.

Esta norma cumple con los requerimientos técnicos de la ISO 9000, por tanto, toda organización que cumple con los requerimientos de ISO 17025 también cumple con los requerimientos de ISO 9000, aunque no del modo inverso (QSI Inc, 2009).

2.4.2 CALIBRACIÓN Y TRAZABILIDAD

2.4.2.1 Calibración

La calibración es un proceso que permite confirmar que la señal medida por un instrumento es correcta y garantiza que el equipo o los instrumentos utilizados para medir la señal funcionan correctamente, lo que se comprueba utilizando una

referencia conocida que produce una señal exacta. Por ejemplo las balanzas se calibración con pesos de referencia cuya masa puede seguirse hasta el prototipo de Kilogramo de platino – iridio aceptado internacionalmente (Harvey, 2002).

La mayoría de métodos analíticos contemplan una etapa de calibración analítica. En esta etapa se relaciona la respuesta instrumental con la propiedad que se está buscando, generalmente la concentración del analito o analitos de interés, normalmente mediante un modelo de línea recta. Habitualmente esta etapa suele ser la fase final del método analítico. Es importante puntualizar que, en medidas químicas el concepto de calibración tiene un doble significado, ya que además de la calibración lineal o del método, existe la calibración instrumental, en la cual se intenta expresar el valor conocido proporcionado por un patrón en la misma magnitud que mide el instrumento que se está calibrando (Riu *et al.*, 2000).

2.4.2.2 Curva de calibración y análisis de regresión

En la mayoría de casos, una serie de estándares de concentración conocida son medidos individualmente en forma ordenada ascendente. Entonces una calibración o curva de trabajo es obtenida, donde se grafica los valores de la señal analítica en función de la concentración del analito.

Esta curva de calibración es luego usada para determinar la concentración de la muestra desconocida o para determinar la respuesta del instrumento. Por lo general en el gráfico, el eje de las abscisas corresponde a la concentración del analito y el eje de las ordenadas al valor de la señal.

El propósito del análisis de regresión es de ser usado como análisis cuantitativo, en el cual se genera una ecuación que relaciona las señales de las concentraciones para encontrar un valor en particular de una muestra desconocida (Rouessac F. y A., 2007)

Este modelo consiste en encontrar la recta de calibrado que mejor se ajuste a una serie de n puntos experimentales, donde cada punto se encuentra definido por una variable x (variable independiente, generalmente concentración del analito de interés) y una variable y (variable dependiente, generalmente respuesta

instrumental). La recta de calibrado se encuentra definida por una ordenada en el origen (a) y una pendiente (b), a través de la ecuación:

$$y = a + bx \quad \text{Ec. [1]}$$

El objetivo de la curva de la regresión lineal es determinar el mejor cálculo de la pendiente b y de la ordenada en el origen a . Esto se logra minimizando el error residual entre los valores experimentales, y aquellos valores previstos por la ecuación de la recta.

2.4.2.3 Trazabilidad

La trazabilidad es importante para la comparación de resultados entre diferentes laboratorios, o en el mismo laboratorio en diferentes momentos, con un nivel aceptable de confianza. Esto se logra asegurando que todos los laboratorios usen los mismos sistemas de medida o los mismos “puntos de referencia”. En muchos casos se consigue estableciendo una cadena de calibraciones de patrones primarios nacionales o internacionales, basados en el sistema (ISO y JCGM, 2008).

Según la VIM, trazabilidad se define como “ la propiedad del resultado de una medida o del valor de un patrón mediante la cual puede relacionarse con referencias establecidas, normalmente patrones nacionales o internacionales, mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones cada una de las cuales con su incertidumbre calculada” (EURACHEM, 2000)

Según esta definición hay que asociar tres aspectos fundamentales de la trazabilidad:

1. Es exclusivamente una propiedad del resultado o valor asociado a un patrón
2. Lo relaciona con referencias establecidas y debe indicarse cómo se relaciona con dichas referencias (cadena de trazabilidad)
3. Todos los eslabones de dicha cadena y por supuesto el resultado final deben tener incertidumbres conocidas.

No se puede conseguir exactitud sin trazabilidad ni la trazabilidad tiene sentido si no lleva a resultados exactos (OAU, 2009).

Existe una amplia variedad de métodos de referencia y métodos estándares validados por organismos reconocidos internacionalmente. A veces de forma genérica se los llama “métodos normalizados”, para indicar que se ajustan a una norma o a requerimientos concretos para los que han sido validados externamente al laboratorio que los va a aplicar. Generalmente se hace por un ejercicio de intercomparación entre laboratorios seleccionados que demuestran conseguir los objetivos y la comparabilidad de sus resultados al aplicar dicho método sobre la misma muestra.

Cuando un laboratorio usa esos métodos, debe verificar que es capaz de usarlo de la misma manera y que sus resultados tienen las mismas características analíticas que las especificadas. En este proceso de validación interna asegura la trazabilidad de sus resultados al emplear dicho método. (OAU, 2009).

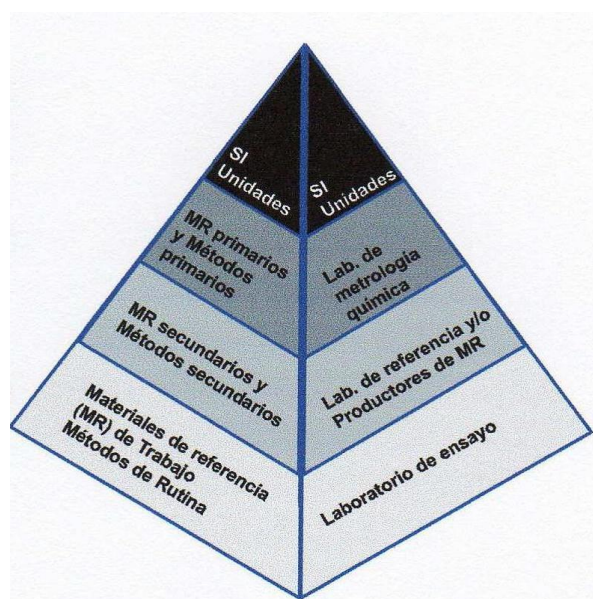


Figura 4. Pirámide de la Trazabilidad de los análisis químicos

Fuente: Hanna Instruments, Catálogo de Calibración y Certificación “Aseguramiento de la Calidad”, 2010, Pp. 5

2.4.2.3.1 Trazabilidad de la instrumentación

A nivel instrumental se precisan generalmente dos tipos de calibrados para asegurar la trazabilidad: la calibración general de equipos (calibración directa) en

la que el patrón y la medida tienen las mismas unidades y cuyo objetivo es que el equipo trabaje adecuadamente y la calibración analítica (o indirecta que define la relación que existe entre la señal instrumental y la concentración de una especie en particular y el patrón y las medidas tienen diferentes unidades.

La calibración indirecta es más compleja que la directa para asegurar la trazabilidad. Se habla de ella como la construcción de una curva de calibrado, que realmente es un modelo analítico que hay que validar.

No es posible comparar medidas o resultados y por tanto demostrar trazabilidad si cada una de estas medidas o resultados no van acompañadas de sus correspondientes incertidumbres (OAU, 2009).

2.4.2.3.2 Trazabilidad de un resultado

La trazabilidad de un resultado es su relación inequívoca con su muestra, que tiene que ver con la identificación clara de las mismas.

También significa a este nivel, documentar el proceso de obtención del resultado (quién, cómo, cuándo, ha sido obtenido el resultado) (OAU, 2009).

2.4.2.3.3 Trazabilidad de un patrón

Los patrones son referencias metrológicas. La trazabilidad también concierne a sus valores, asignados como tales referencias. La trazabilidad de dichos valores debe estar demostrada documentalmente. La trazabilidad implica aportar otro tipo de información sobre la preparación del material y la obtención de los valores de referencia, esencial en muchos casos pero algunas veces ignorada en los certificados, que entonces no son útiles como tales y reducen la calidad de dicha certificación. (OAU, 2009).

2.4.2.3.4 Trazabilidad de un equipo

Cada equipo incorporado a un laboratorio debe poseer una serie de registros documentales que constituyen la trazabilidad de dicho equipo. Empiezan con el inventario, averías calibraciones, registro de uso del equipo, etc. Las hojas de

usuario informan sobre el personal que ha trabajado con el equipo, horas de funcionamiento, número de muestras procesadas, registros de incidencias, etc (OAU, 2009).

2.4.2.3.5 Trazabilidad de muestras

La trazabilidad de las muestras incluye además su representatividad respecto al sistema o población objeto de estudio, que deberá estar definido en función de las necesidades informativas del cliente. Preservar la integridad y confidencialidad de las muestras (cadena de custodia) son aspectos derivados del concepto de trazabilidad de muestras (OAU, 2009).

2.4.2.4 Verificación

La calibración no es suficiente para asegurar que un equipo trabaja en condiciones óptimas y garantizar entonces la comparabilidad de sus medidas con las obtenidas por otros equipos u otros laboratorios.

La verificación se puede definir como la confirmación del cumplimiento de especificaciones, expresada como tolerancias. De esta definición se puede observar que la calibración y la verificación son actividades diferentes y en muchos casos complementarias (OAU, 2009).

En este proceso debe comprobarse que los resultados obtenidos al analizar la muestra de referencia son comparables a su valor de referencia asignado. En realidad, siempre habrá una diferencia entre ambos valores debida a errores aleatorios y también a un posible error sistemático (OAU, 2009)

Para comprobar si esta diferencia es únicamente debida a errores aleatorios y que, por tanto, los resultados obtenidos con el procedimiento analítico son trazables, es necesario aplicar test estadísticos. Sin embargo, la aplicación de estos test lleva consigo el riesgo de cometer dos tipos de errores. Estos errores son:

1. Concluir que los resultados no son trazables cuando en realidad sí lo son y

2. Concluir que los resultados son trazables cuando en realidad no lo son. El error cometido en 1) se conoce como error de primera especie o error tipo A. Al llevar a cabo los test estadísticos, se escoge la probabilidad α de cometer este error. Por otro lado, el error cometido en 2) se conoce como error de segunda especie o error tipo B. La probabilidad de cometer este error depende de varios factores:

La probabilidad escogida: cuanto menor sea α mayor es la probabilidad de cometer un error B. Normalmente, el valor de α escogido es 0.05. Este valor significa que hay un 5% de probabilidad de decir que el procedimiento analítico no es trazable cuando en realidad sí lo es. Esta probabilidad de equivocarse es debida a los errores aleatorios.

El error sistemático, λ , que se quiere detectar en el test estadístico: cuanto menor sea éste, mayor es la probabilidad de cometer un error B.

La precisión del procedimiento analítico y la incertidumbre del valor de referencia: cuanto peor sea la precisión del procedimiento y mayor sea la incertidumbre del valor de referencia, mayor es la probabilidad de cometer un error tipo B.

El número de veces que se ha analizado la muestra de referencia con el procedimiento: la probabilidad de cometer un error tipo B disminuye a medida que aumenta el número de análisis. (Thompson y Wood, 1995)

2.4.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS

La EURACHEM (2003), menciona que la validación de un método analítico es el proceso de establecer los parámetros y las limitaciones de desempeño del método, así como de identificar los factores que pueden influir en el cambio de dichos parámetros y limitaciones; permite demostrar que el método es adecuado para el propósito, esto es, para resolver un problema analítico particular

Un procedimiento debe ser validado en mayor o menor extensión cuando:

- Se desarrolla un método nuevo para resolver un problema particular.

- Un método establecido se modifica para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- El control de calidad indica que un método establecido está cambiando con el tiempo.
- Un método establecido se usa en un laboratorio diferente, o con diferentes analistas o instrumentación.
- Se pretende demostrar la equivalencia entre dos métodos, uno nuevo y uno estándar.

Cuando el procedimiento analítico haya sido aceptado sin cambios de una fuente reconocida, y posea una documentación de validación apropiada, no resulta recomendable asumir que la misma se ajusta a las condiciones del laboratorio sin antes comprobar y garantizar, con todas las acciones necesarias, que el laboratorio es capaz de alcanzar los niveles de aptitud declarados en el procedimiento (Crubellati y Di Risio, 2009).

2.4.3.1 Tipos de validación

En función de los laboratorios que intervienen en el proceso de validación se habla de validación interna o externa:

1. Es interna cuando el proceso se circunscribe al ámbito de un único laboratorio (desarrollo de método propio, adaptación con modificaciones importantes de un método ajeno, implementación de un método normalizado).
2. Es externa cuando se trata de un método que interesa a varios laboratorios y entonces la manera más adecuada de hacer la validación es la realización de un ejercicio de intercomparación de tipo colaborativo (CENAM, 2008).

2.4.3.2 Parámetros de desempeño del método

El funcionamiento de un método queda caracterizado por sus parámetros de desempeño, entre los que podemos mencionar:

2.4.3.2.1 Especificidad /Selectividad

Es la capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidas (EURACHEM, 1998).

La selectividad de un método se investiga usualmente estudiando su habilidad de medir el analito de interés en una muestra a la que se han añadido posibles interferentes deliberadamente. Cuando no es posible definir claramente qué interferentes están presentes, la selectividad del método puede ser investigada comparando los resultados del método que se evalúa con los obtenidos por otro método o técnica independiente (Crubellati y Di Risio, 2009).

2.4.3.2.2 Límite de Detección

Según la ISO es la “mínima concentración neta detectable”, y según la IUPAC es el “mínimo detectable valor verdadero”. El límite de detección se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Intuitivamente, el límite de detección sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente (Crubellati y Di Risio, 2009)

2.4.3.2.3 Límite de Cuantificación

Es la menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba.

También se define por diversas convenciones como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Algunas veces también se conoce como “límite de determinación”. El límite de detección es un valor indicativo y no deberá usarse en la toma de decisiones (EURACHEM, 1998).

2.4.3.2.4 Intervalo de trabajo e intervalo lineal

Es el Intervalo de las concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal, en el que, la señal de respuesta y el sistema de medición tendrá una relación lineal con la concentración del analito o el valor de la propiedad (CENAM, 2008)

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 (EURACHEM, 1998).

2.4.3.2.5 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método (cambios en una o más de las condiciones de trabajo); se dice que un método es robusto cuando se puede demostrar su invariabilidad durante el uso normal. Cuando se estudia esta característica de un método analítico, pueden ser determinadas las variables con efectos más significantes sobre el método y además definir las formas de controlarlas durante su uso (Crubellati y Di Risio, 2009).

2.4.3.2.6 Sensibilidad

Es la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración de analito, es decir, la pendiente de la función de calibración y no es sinónimo de límite de detección. Cuando la función de calibración es una recta, la sensibilidad analítica es constante en todo el intervalo de medida. Por el contrario, con funciones de calibración diferentes de la recta, la sensibilidad varía en función de la concentración del analito (CENAM, 2008).

2.4.3.2.7 Porcentaje de recuperación

La recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. En el caso ideal, se obtiene un 100%. En mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analito en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores. En validación el porcentaje de recuperación aceptable esta entre 85% hasta el 115% (CENAM, 2008)

2.4.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

La incertidumbre de un resultado es un parámetro que describe un intervalo dentro del cual se espera que se encuentre la cantidad medida, teniendo en cuenta todas las fuentes de error. Para expresar la incertidumbre se emplean dos símbolos. La incertidumbre estándar (μ) expresa el concepto como una desviación estándar. La incertidumbre expandida (U) define un intervalo que abarca una fracción grande de valores dentro de los cuales caerá la cantidad que se está midiendo y se obtiene multiplicando u por un factor de cobertura, k , elegido según el grado de confianza exigido para el rango, es decir;

$$U = \mu * k \quad \text{Ec. [2]}$$

Puesto que μ es análoga a una desviación estándar, si k es 2, entonces U proporciona aproximadamente una mitad del intervalo de confianza del 95%

Las estimaciones de la incertidumbre son importantes no solo para calcular que haya suministrado una muestra para su análisis y que exija un intervalo de valores donde debería caer la concentración verdadera del analito. También son valiosas para demostrar que un laboratorio tiene la capacidad para realizar análisis de significación legal o estatuaría. (Miller N. y C., 2002).

2.4.4.1 Fuentes de incertidumbre

Una vez determinados el mensurando, el principio, el método y el procedimiento de medición, se identifican las posibles fuentes de incertidumbre.

Estas provienen de los diversos factores involucrados en la medición como:

- a. Los resultados de la calibración del instrumento;
- b. La incertidumbre del patrón o del material de referencia;
- c. La repetibilidad de las lecturas;
- d. La reproducibilidad de las mediciones por cambio de observadores, instrumentos u otros elementos;
- e. Características del propio instrumento, como resolución, histéresis, deriva, etc.;
- f. Variaciones de las condiciones ambientales;
- g. La definición del propio mensurando;
- h. El modelo particular de la medición;
- i. Variaciones en las magnitudes de influencia.

No es recomendable desechar alguna de las fuentes de incertidumbre por la suposición de que es poco significativa sin una cuantificación previa de su contribución, comparada con las demás, apoyadas en mediciones. Es preferible la inclusión de un exceso de fuentes que ignorar algunas entre las cuales pudiera descartarse alguna importante.

2.4.4.2 Cuantificación de la incertidumbre

Se distinguen dos métodos principales para cuantificar las fuentes de incertidumbre:

2.4.4.2.1 Evaluación tipo A

La incertidumbre de una magnitud de entrada X_i obtenida a partir de observaciones repetidas bajo condiciones de repetibilidad, se estima con base en la dispersión de los resultados individuales.

Si X_i se determina por n mediciones independientes, resultando en valores q_1, q_2, \dots, q_n , el mejor estimado x_i para el valor de X_i es la media de los resultados individuales:

$$x_i = \bar{q} = \frac{1}{n} * \sum_{j=1}^n q_j \quad \text{Ec. [3]}$$

La dispersión de los resultados de la medición q_1, q_2, \dots, q_n para la magnitud de entrada X_i se expresa por su desviación estándar experimental:

$$s(q) = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{j=1}^n (q_j - \bar{q})^2} \quad \text{Ec. [4]}$$

La incertidumbre estándar $u(x_i)$ de X_i se obtiene finalmente mediante el cálculo de la desviación estándar experimental de la media:

$$u(x_i) = s(\bar{q}) = \frac{s(q)}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. [5]}$$

Así que resulta para la incertidumbre estándar de X_i :

$$u(x_i) = \frac{1}{\sqrt{n}} * \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2} \quad \text{Ec. [6]}$$

Para una medición que se realiza por un método bien caracterizado y bajo condiciones controladas, es razonable suponer que la distribución (dispersión) de los q_j no cambia, o sea se mantiene prácticamente igual para mediciones realizadas en diferentes días, por distintos metrólogos, etc. (esto es, la medición está bajo control estadístico). En este caso esta componente de la incertidumbre puede ser más confiablemente estimada con la desviación estándar S_p obtenida de un solo experimento anterior, que con la desviación estándar experimental $s(q)$ obtenida por un número n de mediciones, casi siempre pequeño (CENAM, 2000).

La incertidumbre estándar de la media se estima en este caso por:

$$u(x_i) = \frac{S_p}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. [7]}$$

2.4.4.2.2 Evaluación tipo B

Las fuentes de incertidumbre tipo B son cuantificadas usando información externa u obtenida por experiencia. Estas fuentes de información pueden ser:

- ✓ Certificados de calibración.

- ✓ Manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento.
- ✓ Normas o literatura.
- ✓ Valores de mediciones anteriores.
- ✓ Conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición (CENAM, 2000).

2.4.4.3 Distribuciones de probabilidad

2.4.4.3.1 Distribución normal

Los resultados de una medición repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen en buena aproximación una distribución normal.

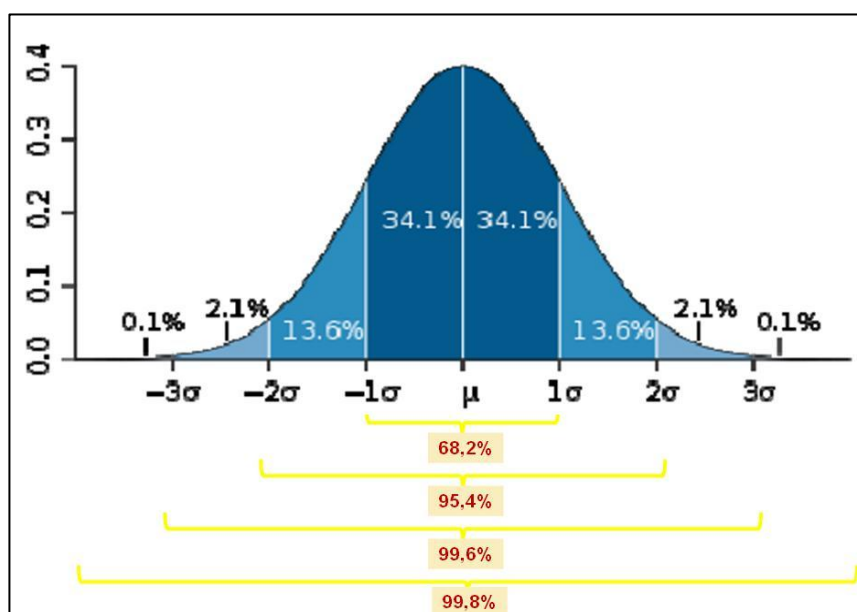


Figura 5. Propiedades de la distribución normal al 68%, 95% y 99%.

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, “Estimación de la Incertidumbre de los Resultados Analíticos”, Módulo 4

La desviación estándar experimental de la media calculada a partir de los resultados de una medición repetida, ya representa la incertidumbre estándar.

Cuando se dispone de valores de una incertidumbre expandida U , se divide entre el factor de cobertura k , obtenido ya sea directamente o a partir de un nivel de confianza dado:

$$u(x_i) = \frac{U}{k} \quad \text{Ec. [8]}$$

2.4.4.3.2 Distribución rectangular

En una distribución rectangular cada valor en un intervalo dado tiene la misma probabilidad, o la función de densidad de probabilidad es constante y existe conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada.

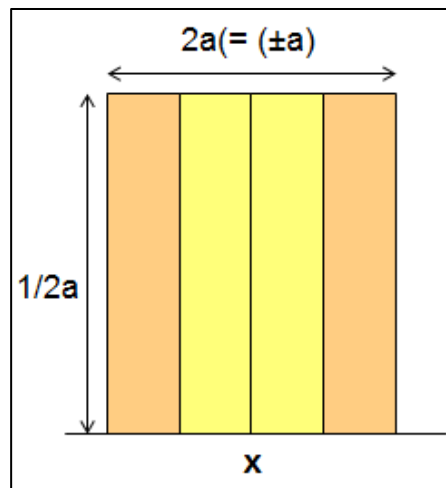


Figura 6 Gráfica de la distribución rectangular.

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, “Estimación de la Incertidumbre de los Resultados Analíticos”, Módulo 4.

Si la magnitud de entrada X_i tiene una distribución rectangular con el límite superior a_+ y el límite inferior a_- , el mejor estimado para el valor de X_i está dado por:

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2} \quad \text{Ec. [9]}$$

y la incertidumbre estándar se calcula por;

$$x_i = \frac{a_+ - a_-}{\sqrt{12}} \quad \text{Ec. [10]}$$

o por;

$$u(x_i) = \frac{a/2}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec. [11]}$$

donde $a/2$ es el semiancho del intervalo a con:

$$a = a_+ - a_- \quad \text{Ec. [12]}$$

2.4.4.3.3 Distribución triangular

Si hay evidencia de que la probabilidad es más alta para valores en el centro del intervalo y se reduce hacia los límites, puede ser más adecuado basar la estimación de la incertidumbre en una distribución triangular.

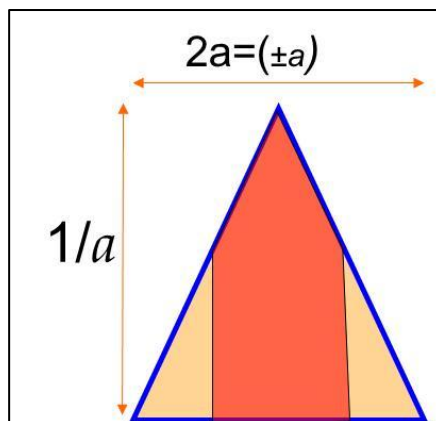


Figura 7. Gráfica de la distribución rectangular.

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, “Estimación de la Incertidumbre de los Resultados Analíticos”, Módulo 4.

Como en una distribución rectangular, para una magnitud de entrada X_i que tiene una distribución triangular con los límites a_+ y a_- , el mejor estimado para el valor de X_i está dado por:

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2} \quad \text{Ec. [13]}$$

la incertidumbre estándar se calcula en este caso por:

$$u(x_i) = \frac{a_+ + a_-}{\sqrt{324}} = \frac{a/2}{\sqrt{6}} \quad \text{Ec. [14]}$$

2.4.4.4 Incertidumbre expandida

La forma de expresar la incertidumbre como parte de los resultados de la medición depende de la conveniencia del usuario. A veces se comunica simplemente como la incertidumbre estándar combinada, otras ocasiones como un cierto número de veces tal incertidumbre, algunos casos requieren se exprese en términos de un nivel de confianza dado, etc.

2.4.4.4.1 Factor de cobertura y nivel de confianza

La incertidumbre estándar u_c representa un intervalo centrado en el mejor estimado del mensurando que contiene el valor verdadero con una probabilidad p de 68% aproximadamente, bajo la suposición de que los posibles valores del mensurando siguen una distribución normal.

Generalmente se desea una probabilidad mayor, lo que se obtiene expandiendo el intervalo de incertidumbre por un factor k , llamado factor de cobertura. El resultado se llama incertidumbre expandida U .

$$U = k * \mu_c \quad \text{Ec. [15]}$$

2.4.4.4.2 Distribución t de Student

El mejor estimado del mensurando, la media (obtenida por muestreos de n mediciones repetidas) dividida entre su desviación estándar, sigue una distribución llamada t de student, la cual refleja las limitaciones de la información disponible debidas al número finito de mediciones. Esta distribución coincide con la distribución normal en el límite cuando n tiende a infinito, pero difiere considerablemente de ella cuando n es pequeño.

La distribución t de student es caracterizada por un parámetro ν llamado número de grados de libertad.

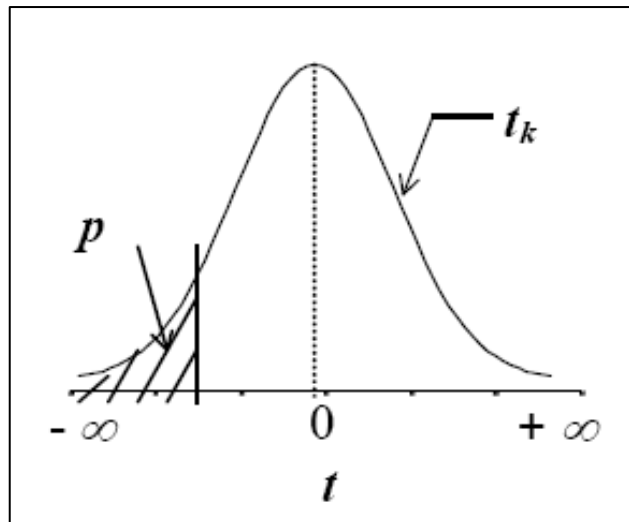


Figura 8. Gráfica de la distribución t de student.

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, “Estimación de la Incertidumbre de los Resultados Analíticos”, Módulo 4.

Es necesario ampliar el intervalo correspondiente al nivel de confianza p , por lo que:

$$U = t_p(v) * u_c \quad \text{Ec. [16]}$$

El factor $t_p(v)$ indica los límites del intervalo correspondiente al nivel de confianza p de la distribución y su valor siempre es mayor o igual que el factor k .

Cuando se combinan varias fuentes de incertidumbre con sus respectivas distribuciones para obtener la incertidumbre combinada μ_c del mensurando, el teorema del límite central permite aproximar la distribución resultante por una distribución normal. La aproximación será mejor mientras más grande sea el número de fuentes y sus contribuciones sean similares, independientemente de la forma particular de sus distribuciones.

Cuando sólo es relevante la contribución de una fuente cuya distribución no sea normal, lo más conveniente es estimar la incertidumbre expandida directamente de los parámetros de la distribución.

2.4.4.4.3 Grados de libertad

De cierta manera el número ν de grados de libertad asociado a una distribución de una magnitud (X_i o Y) puede considerarse una medida de incertidumbre.

El número efectivo de grados de libertad ν_{ef} del mensurando considera el número de grados de libertad ν_i de cada fuente de incertidumbre.

En las incertidumbres tipo A, ν_i depende directamente del número de datos considerados y disminuye conforme el número de parámetros estimados a partir de los mismos datos. La repetibilidad de una medición, estimada por la desviación estándar experimental de n lecturas tiene $n-1$ grados de libertad.

La determinación del número de grados de libertad de una incertidumbre tipo B implica el criterio del analista soportado por su experiencia, aun cuando sea subjetiva, para determinar la incertidumbre relativa, y calcular el número de grados de libertad para esa fuente específica i :

$$\nu_i \approx \frac{1}{2} * \left[\frac{\Delta u(x_i)}{u(x_i)} \right]^{-2} = \frac{1}{2} * \left[\frac{u(x_i)}{\Delta u(x_i)} \right]^2 \quad \text{Ec. [17]}$$

2.4.4.4.4 Incertidumbre expandida

La incertidumbre expandida se calcula como:

$$U = \mu_c * t_p(\nu_{ef}) \quad \text{Ec. [18]}$$

donde $t_p(\nu_{ef})$ es el factor derivado de la distribución t de student a un nivel de confianza p y ν_{ef} grados de libertad y obtenido de tablas .

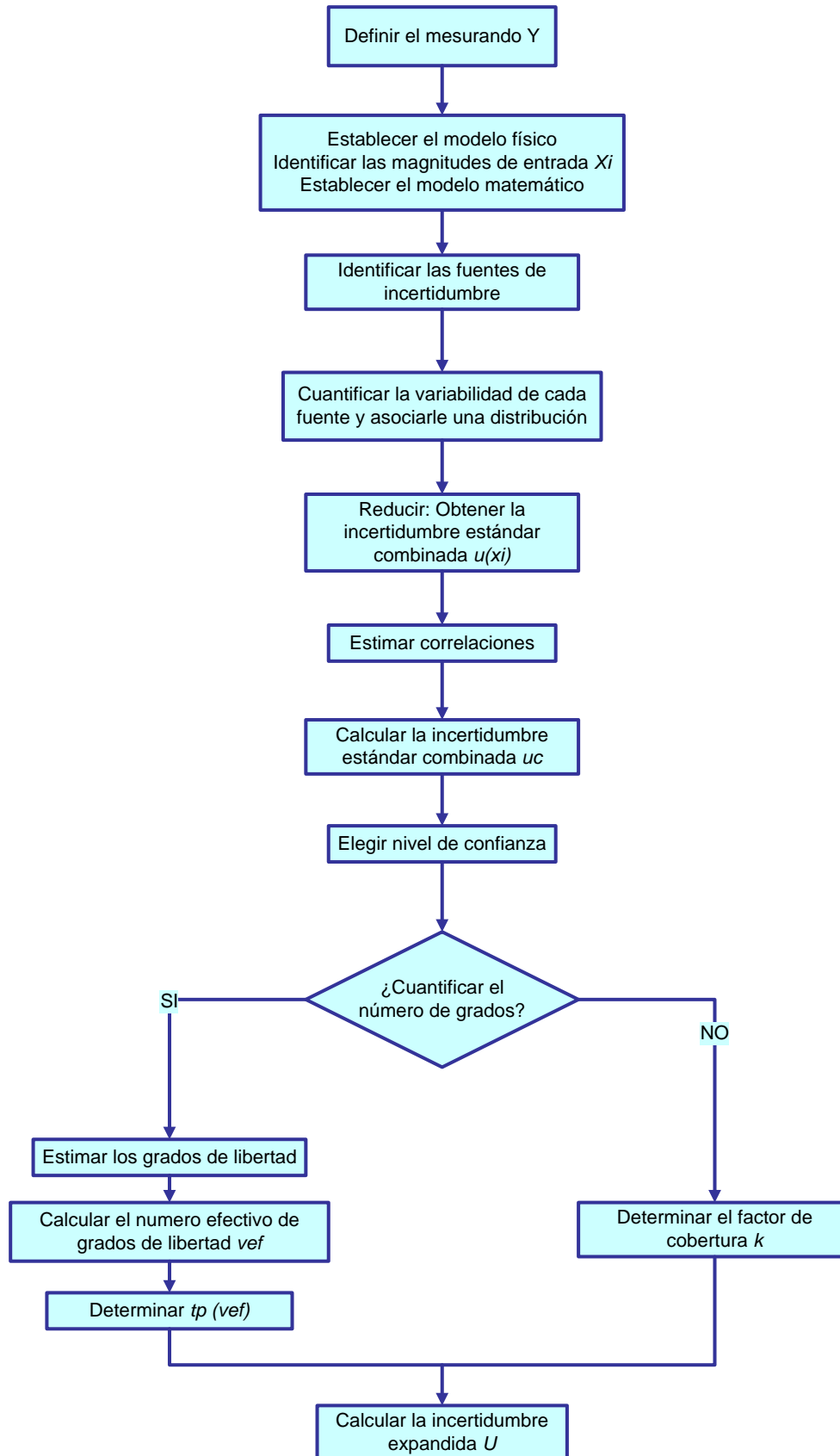


Figura 9. Diagrama para la estimación de incertidumbres de medición.

Fuente: Centro nacional de metrología, 2000, “Guía para estimar la incertidumbre de la medición”, Pp. 21

2.4.5 REVISIÓN DE CONCEPTOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA

La variación del color de un sistema, con la concentración de algún componente, constituye la base del análisis colorimétrico. En colorimetría el color se debe usualmente, a un compuesto coloreado formado mediante el agregado de un reactivo apropiado, o del mismo componente que se determina. La intensidad de color puede compararse con la obtenida tratando una cantidad conocida de la sustancia a determinar, en igual forma que la muestra en análisis.

El análisis colorimétrico, forma parte del análisis espectrofotométrico, que se basa en la medición de la cantidad de luz absorbida por una solución coloreada.

2.4.5.1 Espectrofotómetro UV-Visible

La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros. Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura, de:

1. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
3. Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos.

Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de

doble haz (con dos celdillas para dos cubetas); en nuestro caso se trabajará con los de un solo haz.

Se mide primero la absorbancia del disolvente (conocido como blanco) y al que se le asigna el valor de cero mediante el ajuste del mando, de forma que la intensidad incidente y transmitida sean iguales ($I_o = I_t$), y por tanto la absorbancia es cero.

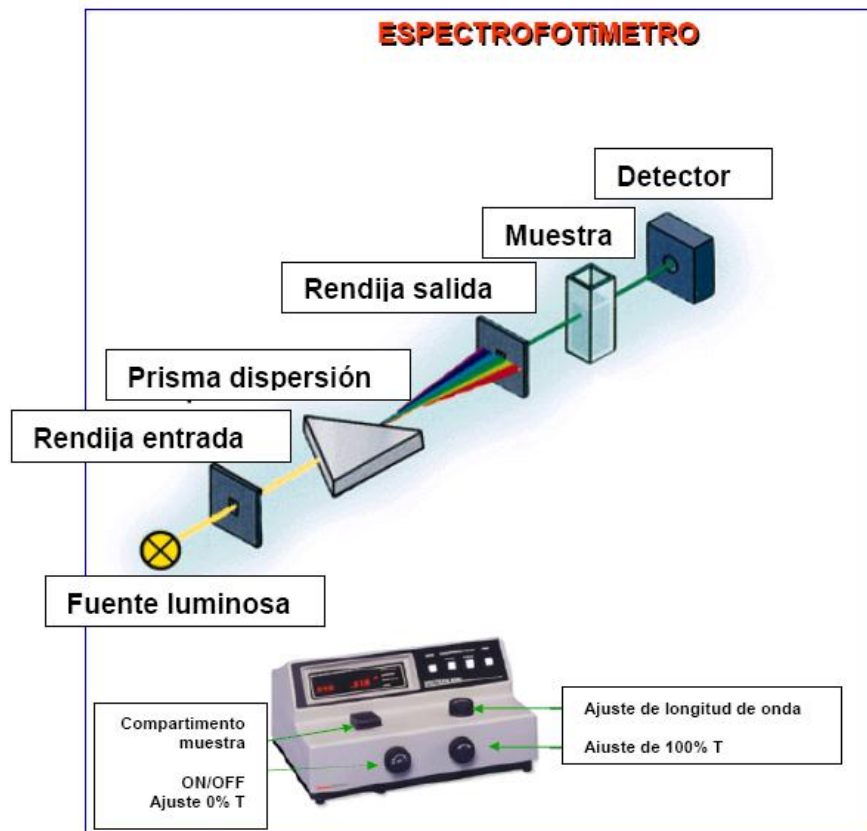


Figura10. Partes de un espectrofotómetro.

Fuente: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cordova, Pp. 2

2.4.5.2 Teoría de la Espectrofotetría

Cuando llega luz (monocromática o heterocromática) a un medio homogéneo, una parte de la luz incidente se refleja, otra es absorbida por el medio y el resto es transmitida. Si la intensidad de luz incidente es I_o , la de luz absorbida I_a , la de transmitida I_t y la de luz reflejada I_r , se tiene (Voguel, 1969):

$$I_o = I_a + I_t + I_r \quad \text{Ec. [19]}$$

2.4.5.3 Propiedades de La Luz

Las ondas de luz están constituidas por campos eléctrico y magnético oscilantes, perpendiculares entre si. La longitud de onda, símbolo, es la distancia entre cresta y cresta de una onda. La frecuencia, ν , es el numero der oscilaciones completas de la onda cada segundo. La unidad de frecuencia es el segundo recíproco, s^{-1} o Hertz Una oscilación por segundo es igual a 10^6 Hz. La relación entre la frecuencia y la longitud de onda es:

$$\lambda * \nu = c \quad \text{Ec. [20]}$$

Donde c es la velocidad de la luz. En cualquier medio distinto del vacío, la velocidad de la luz es igual a $\frac{c}{n}$, donde n es el índice de refracción del medio de que se trate. Puesto que n es siempre ≥ 1 , la luz se propaga más lentamente en un medio material que el vacío. Cuando la luz pasa de un medio a otro cuyo índice de refracción es mayor, su frecuencia no varía pero su longitud de onda disminuye.

$$E = h * \nu \quad \text{Ec. [21]}$$

donde; h es la constante de Planck ($=6.6260755 * 10^{-34}$ J.s)

En espectroscopía el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles En espectroscopia de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm).

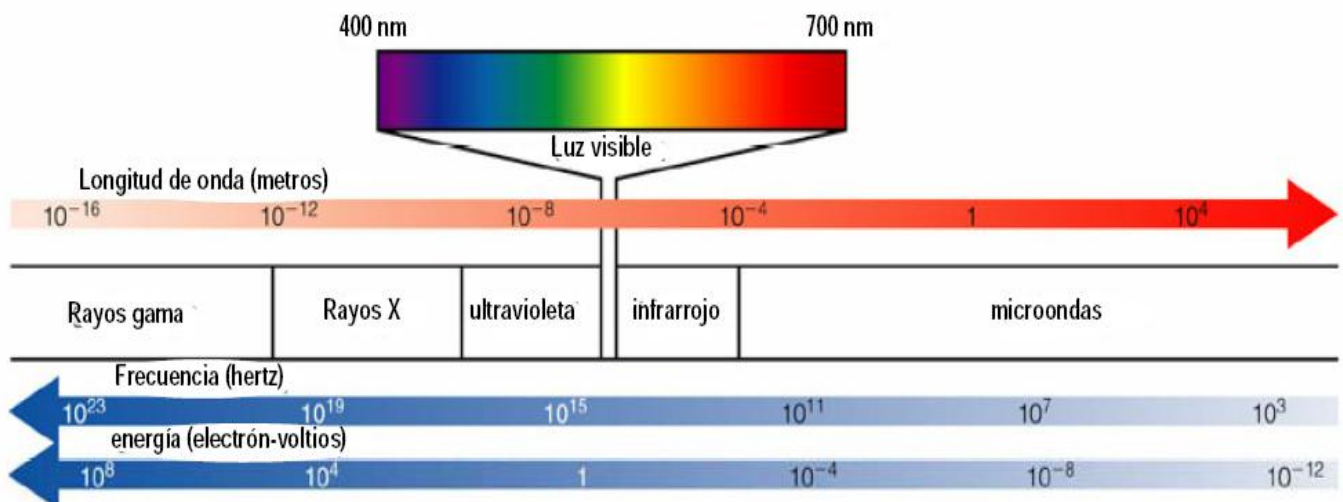


Figura 11. Espectro electromagnético.

Fuente: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cordova, Pp. 2

2.4.5.4 Absorción de la luz

Cuando una molécula absorbe un fotón, la energía de la molécula se incrementa. Se dice que la molécula pasa a un estado excitado. Si una molécula emite un fotón, su energía disminuye. El estado de menor energía de una molécula se llama estado basal o fundamental.

Cuando una muestra absorbe luz, la potencia radiante de haz de luz disminuye. La potencia radiante, P , se evalúa como energía por segundo por unidad de área de haz de luz. La luz se hace pasar por un monocromador (un prisma, una rejilla de difracción o un filtro) para aislar una sola longitud de onda.

Esta última, de potencia radiante P_0 , incide sobre una muestra de espesor b . la potencia radiante del haz emergente es P ; la muestra pueda absorber una fracción de la luz, de manera que $P \leq P_0$.

La transmitancia, T , se define como la fracción de la luz incidente que sale de la muestra.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{Ec. [22]}$$

Por lo tanto, T varía de cero a uno. La transmitancia porcentual es simplemente 100. T y varía entre cero y 100%. Una magnitud física más útil es la absorbancia, que se define como}

$$A = \log_{10} \left(\frac{P_0}{P} \right) = -\log T \quad \text{Ec. [23]}$$

Cuando no se absorbe luz, $P=P_0$ y entonces $A=0$. Cuando se absorbe 90% de la luz, 10% de ella se transmite y $P=P_0/10$. Con esto se tiene $A=1$. Cuando solo se transmite el 1% de la luz, $A=2$. La absorbancia se llama a veces densidad óptica.

La importancia de la absorbancia escriba en que es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente en la muestra (Harris, 1991).

$$A = \epsilon bc \quad \text{Ec. [24]}$$

2.4.5.5 Medición de los fotones como señal

En la espectroscopia ultravioleta visible se transfiere energía entre un fotón de radiación electromagnética y el analito. La fuente del estado energético depende de la energía del fotón.

La intensidad de los fotones que pasan a través de una muestra que contiene el analito se atenúa debido a la absorción. La medida de esta atenuación. Que recibe el nombre de absorbancia, es la que sirve de señal.

La absorción solo tiene lugar cuando la energía del fotón coincide con la diferencia de energía ΔE , entre dos niveles de energía. El gráfico de absorbancia en función de la energía de fotón se denomina espectro de absorbancia.

Cuando un analito estado de mayor energía vuelve a un estado de me menor energía, tiene lugar la emisión de un fotón. El estado de mayor energía puede lograrse de varias formas, entre ellas por el uso de energía térmica, por energía radiante de un fotón o por una reacción química. La emisión que sigue a la absorción de un fotón también recibe el nombre de fotoluminiscencia, y la que se origina tras una reacción química se llama quimioluminiscencia.

Tabla N° 1. Espectro electromagnético que muestra los colores del espectro visible.

COLOR	LONGITUD DE ONDA	FRECUENCIA	VOLTAJE
Rojo	680.27	$4.41 \cdot 10^{14}$	0.4
Amarillo	578.03	$5.19 \cdot 10^{14}$	0.72
Verde	546.45	$5.49 \cdot 10^{14}$	0.9
Azul	436.05	$6.88 \cdot 10^{14}$	1.55
Violeta	403.23	$7.44 \cdot 10^{14}$	1.78
Ultravioleta	365.41	$8.21 \cdot 10^{14}$	2.15

Fuente: Harris D., Análisis químico cuantitativo, Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de CV, 1991, USA.

2.4.5.6 Ley de Lambert Beer

La ley de Beer puede aplicarse a muestras que contienen varios componentes absorbentes, siempre que entre ellos no se produzcan interacciones. Las absorbancias individuales, A_i , son aditivas. La absorbancia total de una mezcla de dos componentes X e Y, A_{tot} , es:

$$A_{tot} = A_X + A_Y = \varepsilon_X b C_X + \varepsilon_Y b C_Y \quad \text{Ec. [25]}$$

Generalizando, la absorbancia de una mezcla de n componentes, A_m , viene dada por:

$$A_m = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i b C_i \quad \text{Ec. [26]}$$

2.4.5.6.1 Limitaciones de la ley de Lambert Beer

La ley de Beer establece que la absorbancia es proporcional a la concentración de las especies absorbentes. Esto se verifica muy bien en el caso de soluciones diluidas de la mayoría de las sustancias, las fallas aparentes de la ley de Beer en soluciones con concentraciones más altas pueden atribuirse a cambios en las especies absorbentes o en las propiedades de la solución.

Conforme una solución se vuelve más concentrada, las moléculas de soluto interactúan entre sí debido a su proximidad. Cuando una molécula interactúa con otra, es probable que cambien las propiedades eléctricas de ambas (incluyendo la absorción de luz). De ello resulta que la gráfica de absorbancia en función de la concentración deja de ser una línea recta. En el caso excepcional de una solución muy concentrada, el soluto se convierte en el solvente. Es claro que no puede esperarse que las propiedades eléctricas de una molécula sean las mismas en diferentes solventes. En algunos casos, solutos que no absorben pueden interactuar con las especies absorbentes y modificar la absorptividad aparente

La interacción física de dos solutos es solo un caso de equilibrio químico (la asociación de dos solutos) que afecta la absorbancia observada. Otro caso más simple es el de un electrolito débil, por ejemplo un ácido débil. En solución concentrada predomina la forma no disociada, HA, del ácido, Conforme se diluye la solución, la disociación se incrementa. Si la absorptividad de A⁻ no es la misma que la de HA, la solución aparenta alejarse de la ley de Beer a medida que se diluye (Harris, 1991).

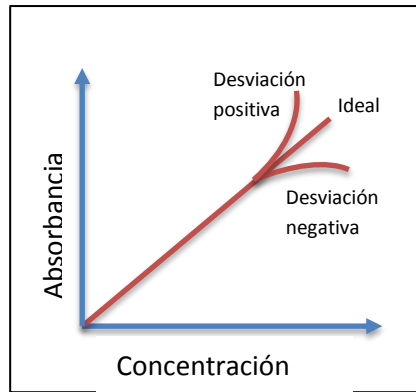


Figura 12. Curva de calibración que muestran las desviaciones positiva y negativa a partir de la ley de Beer.

Fuente: Harvey David, Química analítica moderna, Pp 272

2.4.6 GENERALIDADES SOBRE LOS ANALITOS A VALIDARSE

2.4.6.1 Cloro libre residual

El cloro (Cl_2) es un producto químico que, cuando se disuelve en agua limpia en cantidad suficiente, destruye la mayoría de los organismos causantes de enfermedades, sin poner en peligro a las personas.

Sin embargo, el cloro se consume a medida que los organismos se destruyen. Si se añade suficiente cloro quedará un poco en el agua luego de que se eliminen todos los organismos; se le llama cloro libre. El cloro libre permanece en el agua hasta perderse, eliminarse o usarse para contrarrestar una nueva contaminación (OMS, 2009).

El cloro, no se encuentra como tal en el agua, sino disociado en dos especies, el ácido hipocloroso (HClO) y el ión hipoclorito ClO^- . De estas dos especies únicamente el ácido hipocloroso tiene capacidad desinfectante. El porcentaje de reparto de ambas especies viene determinado por el pH del agua según la siguiente gráfica (Hidritec, 2011).

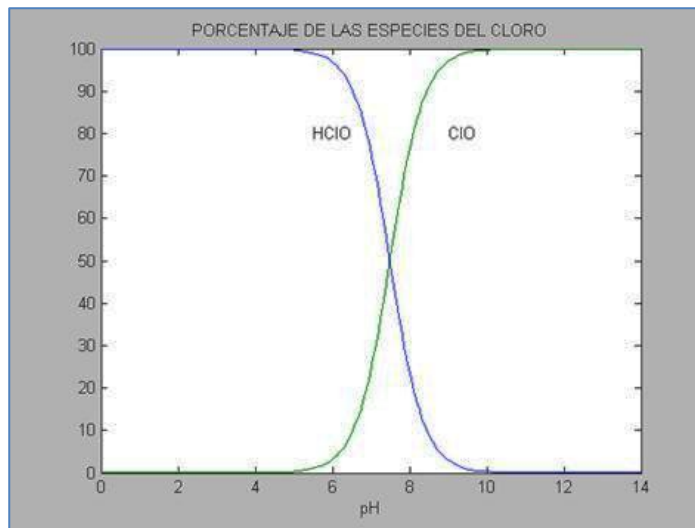


Figura 13. Porcentaje de reparto del HClO y ClO⁻ en el agua.

Fuente: <http://www.hidritec.com/doc-cloro>.

El cloro libre reacciona fácilmente con el amoníaco y ciertos compuestos de nitrógeno, formando cloro combinado. La reacción del amoníaco con el cloro produce cloroaminas: monocloroamina, dicloroamina y tricloruro de nitrógeno. La presencia y concentraciones de estas formas combinadas dependen principalmente del pH, temperatura, proporción inicial cloro-nitrógeno, demanda absoluta de cloro y tiempo de reacción. Tanto el cloro libre como el combinado pueden estar presentes simultáneamente. El cloro combinado de los suministros de agua se puede formar al tratar las aguas naturales que contienen amoníaco o por adición de amoníaco o sales de amonio (APHA, 2005).

Los efectos del cloro sobre la salud dependen de la cantidad de cloro presente, del tiempo y de la frecuencia de exposición. También dependen del estado de salud de la persona y de las condiciones del medio cuando la exposición tuvo lugar. El cloro irrita la piel, las mucosas y el aparato respiratorio pudiendo producir irritación de las mucosas oculares, de la nariz y de la garganta e hiperreactividad bronquial en individuos susceptibles. Las personas expuestas durante largos periodos de tiempo a bajas concentraciones de cloro pueden presentar una erupción que se conoce como cloracné y hasta puede producir quemaduras en la piel. No es probable que estos efectos tengan lugar a niveles de cloro encontrados normalmente en el agua (El hospital del internet, 2011).

2.4.6.2 Cromo

El cromo es un elemento natural que se encuentra en rocas, animales, plantas y el suelo. Está presente en el medio ambiente en varias formas diferentes. Las formas más comunes son el cromo (0), el cromo (III) y el cromo (VI). Los compuestos de cromo no tienen ningún sabor u olor especial (ATSDR, 2010).

El cromo entra al aire, al agua y al suelo principalmente en las formas de cromo (III) y cromo (VI) como resultado de procesos naturales o de actividades humanas. En los procesos industriales se utilizan mucho las sales de cromo, y pueden pasar al suministro de agua a través de los desechos industriales. Frecuentemente se añaden cromato al agua de refrigeración para control de la corrosión (APHA, 2005). Los desagües de galvanoplastia pueden descargar cromo (VI). El curtido de cueros y la industria textil, como también la manufactura de colorantes y pigmentos, pueden descargar cromo (III) y cromo (VI) a los cuerpos de agua (El hospital del internet, 2011).

En agua para de consumo el nivel de cromo es usualmente bajo. El cromo III es un nutriente esencial para los humanos y la falta de este puede causar condiciones del corazón, trastornos metabólicos y diabetes. Pero la ingesta de abundante cromo III puede causar efectos sobre la salud también, por ejemplo erupciones cutáneas.

El Cromo (VI) es un peligro porque causa varios efectos sobre la salud, siendo los más importantes los siguientes (Lenntech, 2009)

- Erupciones cutáneas
- Malestar de estómago y úlceras
- Problemas respiratorios
- Debilitamiento del sistema inmune
- Daño en los riñones e hígado
- Alteración del material genético
- Cáncer de pulmón

2.4.6.3 Nitrito

El nitrito es un ion de origen natural que forma parte del ciclo del nitrógeno. El nitrito sódico se utiliza como conservante alimentario, especialmente para las carnes curadas. Las condiciones anaerobias pueden favorecer la formación y persistencia del nitrito. La formación de nitrito es consecuencia de la actividad microbiana y puede ser intermitente (OMS, 2003).

Los nitritos son componentes no deseados en la composición de las aguas potables de consumo público y su presencia puede deberse a una oxidación incompleta del amoníaco o a la reducción del nitrato existente. El agua que contenga nitritos puede considerarse sospechosa de una contaminación reciente por materias fecales (APHA, 2005). La nitrificación en los sistemas de distribución puede aumentar la concentración de nitrito, que suele ser de 0,2 a 1,5 mg/l.

Los nitritos existentes en el agua pueden tener un efecto perjudicial sobre la salud de quien la consuma, porque son responsables de la formación de metahemoglobina, dando lugar a metahemoglobinemia, también llamada “síndrome del recién nacido cianótico”. El nitrato se reduce a nitrito en el estómago de los lactantes, y el nitrito puede oxidar la hemoglobina a metahemoglobina, que no puede transportar oxígeno por el organismo. La disminución del transporte de oxígeno se manifiesta clínicamente cuando la concentración de metahemoglobina alcanza o supera el 10% de la concentración normal de hemoglobina; esta enfermedad produce cianosis y, en concentraciones más altas, asfixia. La proporción normal de metahemoglobina en lactantes menores de 3 meses es menos del 3% (OMS, 2003).

También se cree que los nitritos pueden ser causantes de nitrosaminas en el organismo humano. Se conoce que las nitrosaminas producen cáncer de las vías digestivas superiores, y de hígado en animales de experimentación (APHA, 2005).

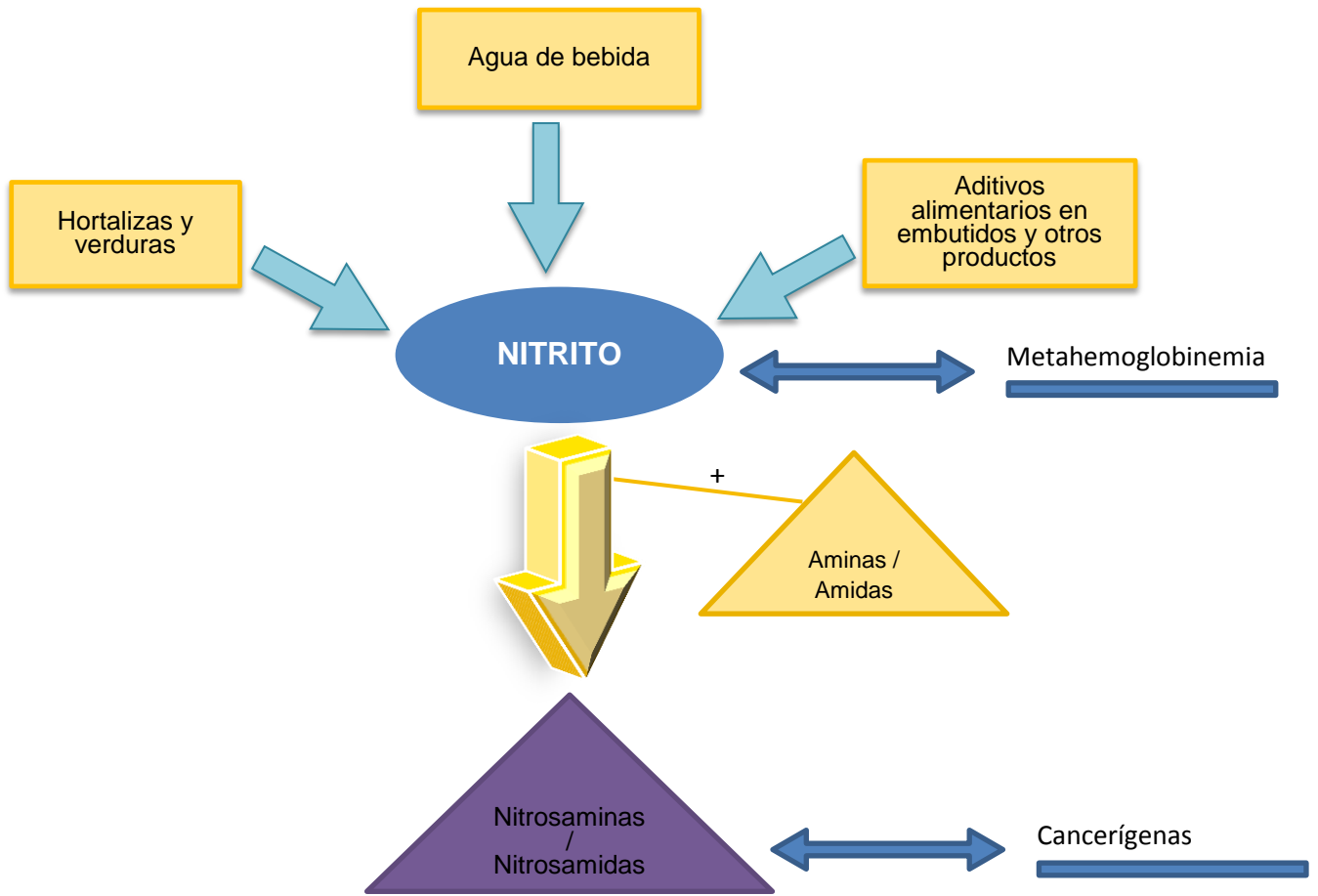


Figura 14. Vías de ingestión de nitrito y sus posibles efectos tóxicos.

Fuente: Nitrato y nitrito, http://www.euskadi.net/r33-2709/es/contenidos/información/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/vigila9513.pdf

2.5 HIPÓTESIS

2.5.1 Hipótesis de Investigación

La validación permitirá determinar los parámetros de desempeño y la incertidumbre de los métodos, empleados en el análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos, en muestras de aguas

2.5.2 Hipótesis Nula

El resultado del análisis de la respuesta experimental de los niveles de concentración del método demuestra que existe homogeneidad entre los grupos muestrales.

2.5.3 Hipótesis Alternativa

El resultado del análisis de la respuesta experimental de los niveles de concentración del método demuestra que existe heterogeneidad entre los grupos muestrales.

2.6 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

2.6.1 Variable Independiente:

Análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos, en muestras de agua.

2.6.2 Variable Dependiente:

Validación de los métodos

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN

Las modalidades de investigación en que se sustentó el presente proyecto son Experimental y Bibliográfica.

Experimental

Esta investigación permitió controlar rigurosamente las condiciones en que se desarrollará la validación para medir las modificaciones que se producirán en los analitos de estudio, controlando además las variables intervinientes.

Bibliográfica

Para la puesta a punto de la validación se recopiló información de los diferentes métodos de análisis aplicables, así como de sus características y limitaciones, con el fin de contar con un procedimiento detallado para la realización de los ensayos.

3.2 NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN

Exploratorio

Se desarrolló un sistema de validación para el análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos en aguas, a partir del estudio de técnicas para adaptarlas a las condiciones del laboratorio.

Descriptivo

Se realizaron análisis mediante el uso de espectrofotometría Visible y empleo de conocimientos sobre Metrología y Análisis Químico Cuantitativo, lo que permitió obtener datos confiables para la realización de los diferentes cálculos estadísticos y matemáticos, estableciéndose los criterios de aceptación o rechazo para la toma de decisiones.

Asociación de variables

Los parámetros analíticos a validarse permitieron conocer las características de desempeño de los métodos, los cuales serán importantes para reportar resultados confiables con un cierto nivel de incertidumbre.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.3.1 Población

En el proyecto de investigación se consideró como población los analitos Cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos

3.4.2 Muestra

Las muestras que se utilizaron para la validación son las siguientes:

- Materiales de referencia certificados e internos, los mismos son descritos en el procedimiento de cada método en los apartados 3.6.1.2.3, 3.6.1.3.3, 3.6.1.4.3, 3.6.1.5.3, literal B.
- Matriz agua clara y agua residual, dependiendo la respuesta del método.

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable Independiente: Análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.

Cuadro N° 1. Análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORÍAS	INDICADORES	ITEM BÁSICO	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
El análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos permitirá determinar las concentraciones de estos en muestras agua, proporcionando información al cliente, para la posterior toma de decisiones.	- Técnicas empleadas	-Espectrofo tometría - Titulación - pH	¿Qué técnicas se utilizarán para el análisis de Cloro libre, Cromo VI, Cromo Total y Nitritos?	Diseño Experimental
	- Trazabilidad	- Material de referencia Certificado - Material de referencia interno	¿Los resultados de una medición de un patrón certificado podrán ser comparados con un patrón interno?	
	- Función de Respuesta	- Del analito - Del equipo	¿Las interferencias afectan al resultado del análisis?	

Elaborado por: Javier Macas.

Variable Dependiente: Validación de los métodos

Cuadro N° 2 Validación de los métodos.

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORÍAS	INDICADORES	ITEM BÁSICO	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
La validación de las metodologías, en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables para su propósito perseguido.	-Parámetros analíticos de validación. - Criterios de Calidad.	- Selectividad / Especificidad - Intervalo de validación - Límite de detección - Límite de cuantificación - Precisión - Exactitud - Incertidumbre	¿Mejorará la calidad de los resultados, si se desarrolla un sistema de validación de métodos analíticos? ¿Cuál serían las ventajas de la validación de métodos analíticos?	Diseño Experimental

Elaborado por: Javier Macas

3.5 PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Se recogió datos suficientes en la puesta a punto de los métodos, de modo que se realizaron las pruebas de significancia establecidas, dependiendo la necesidad analítica del método.

Se verificó cada día la función de respuesta del método, para lo cual se registró 1 lectura diaria de cada nivel de concentración del intervalo de trabajo por 5 días, excepto para la validación de cloro libre residual donde se obtuvo 3 lecturas diarias para cada concentración.

Para el análisis de la respuesta experimental se recopiló 3 lecturas diarias de cada nivel de concentración del intervalo de validación (condiciones de repetitibilidad) durante 5 días (condiciones de reproducibilidad).

Para determinar la recuperación en matrices reales se tomó 3 medidas diarias de una concentración conocida de estándar añadido a la muestra real y 1 lectura de la muestra real sin estándar por 5 días.

3.5.1 Diseño Experimental y Estadístico

3.5.1.1 Diseño estadístico para la obtención de la función de respuesta, para el análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.

Para la elaboración de la curva de calibración se siguió el diseño estadístico establecido en el literal 3.6.3 y 3.6.4.1. A continuación se presenta el esquema para la obtención de la respuesta experimental.

Tabla Nº 2. Registro de datos para la curva de calibración

Nivel	Días (Lecturas obtenidas -L-)				
	1	2	3	4	5
0 (Blanco)	LB 1	LB 2	LB 3	LB 4	LB 5
P1	LP1 1	LP1 2	LP1 3	LP1 4	LP1 5
P2	LP2 1	LP2 2	LP2 3	LP2 4	LP2 5
P3	LP3 1	LP3 2	LP3 3	LP3 4	LP3 5
P4	LP4 1	LP4 2	LP4 3	LP4 4	LP4 5
P5	LP5 1	LP5 2	LP5 3	LP5 4	LP5 5
Pn...	LPn 1	LPn 2	LPn 3	LPn 4	LPn 5

Elaborado por: Javier Macas.

3.5.1.2 Diseño experimental para la validación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.

Para el desarrollo de la validación se estableció un Diseño de un solo factor completamente aleatorizado (DCA), donde los tratamientos fueron los 5 días (condiciones de reproducibilidad), las observaciones las 3 lecturas diarias (condiciones de repetibilidad) de los 5 niveles de concentración más el blanco y la respuesta experimental las lecturas del equipo en forma de concentración en absorbancia. En el literal 3.6.3 se muestra con más detalle el diseño experimental y el tratamiento estadístico para cada método. A continuación se exhibe el arreglo general para la obtención de la respuesta experimental.

Tabla Nº 3. Niveles de estudio para la obtención de la respuesta experimental

Nivel	Obs.	Tratamientos (Lecturas obtenidas -L-)				
		1	2	3	4	5
0 (Blanco)	1	LB 1	LB 2	LB 3	LB 4	LB 5
	2	LB 1	LB 2	LB 3	LB 4	LB 5
	3	LB 1	LB 2	LB 3	LB 4	LB 5
P1	1	LP1 1	LP1 2	LP1 3	LP1 4	LP1 5
	2	LP1 1	LP1 2	LP1 3	LP1 4	LP1 5
	3	LP1 1	LP1 2	LP1 3	LP1 4	LP1 5
P2	1	LP2 1	LP2 2	LP2 3	LP2 4	LP2 5
	2	LP2 1	LP2 2	LP2 3	LP2 4	LP2 5
	3	LP2 1	LP2 2	LP2 3	LP2 4	LP2 5
P3	1	LP3 1	LP3 2	LP3 3	LP3 4	LP3 5
	2	LP3 1	LP3 2	LP3 3	LP3 4	LP3 5
	3	LP3 1	LP3 2	LP3 3	LP3 4	LP3 5
P4	1	LP4 1	LP4 2	LP4 3	LP4 4	LP4 5
	2	LP4 1	LP4 2	LP4 3	LP4 4	LP4 5
	3	LP4 1	LP4 2	LP4 3	LP4 4	LP4 5
P5	1	LP5 1	LP5 2	LP5 3	LP5 4	LP5 5
	2	LP5 1	LP5 2	LP5 3	LP5 4	LP5 5
	3	LP5 1	LP5 2	LP5 3	LP5 4	LP5 5

Elaborado por: Javier Macas.

3.6 PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

El procedimiento para cumplir con los objetivos del proyecto de investigación se detalla a continuación.

3.6.1 PUESTA A PUNTO DE LOS MÉTODOS

3.6.1.1 Necesidad Analítica

El Centro de Investigaciones y Control Ambiental CICAM, ha visto la necesidad de seguir con la mejora continua del Sistema de Gestión de Calidad para satisfacer las expectativas de los clientes en cuanto a la calidad de los ensayos. En este caso los análisis de Cloro Libre Residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos son parámetros importantes para las empresas que requieren un control de calidad en las aguas que generan, por lo que ha visto vigente tener bajo control estos ensayos siguiendo normas estandarizadas y usando métodos confiables para su cuantificación.

3.6.1.2 Determinación de Cloro libre residual

3.6.1.2.1 Objeto y Alcance

El objeto es determinar la concentración de cloro libre residual mediante el análisis colorimétrico DPD (N,N-dietil-p-fenilenediamina), tomando como referencia el método 8021 del Manual de Análisis de Aguas de HACH Company, utilizando el espectrofotómetro DR 2800.

La técnica es aplicable a muestras de aguas claras, para un intervalo de concentraciones de 0,25 a 5 mg/l, midiéndose a 530 nm.

3.6.1.2.2 Principio del método

Este método se basa en la reacción inmediata entre el cloro libre (ácido hipocloroso o ion hipoclorito) con el indicador DPD (N,N-dietil-p-fenilenediamina) en ausencia de iones yoduro, reacciona en su forma reducida para producir DPD

oxidado de color magenta que es proporcional a la concentración de cloro (APHA, 2005).

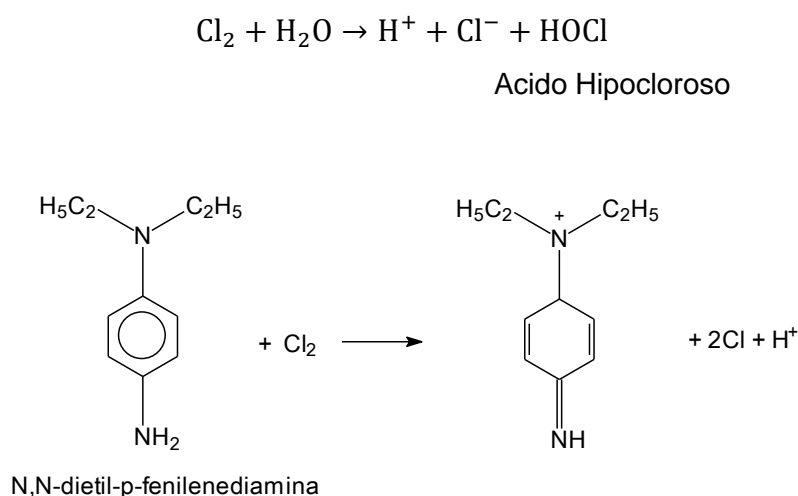


Figura 15. Reacción del Cloro libre con el DPD (N,N-dietyl-p-fenilenediamina)

3.6.1.2.3 Desarrollo del método

A. Pruebas Previas

Con la experiencia del laboratorio en la ejecución del análisis de cloro libre residual y sustentándose en bibliografía se realizaron análisis preliminares, con el fin de adecuar el método a las condiciones del laboratorio, para lo cual se analizó la forma y el tiempo de disolución del reactivo DPD sustentándose en la recuperación y la existencia o no de diferencias significativas entre el Material de referencia certificado y el material de referencia interno, para la posterior verificación del método.

Además se realizaron ensayos para determinar el límite de cuantificación, el límite de detección y el rango de trabajo del método mediante el análisis de regresión.

B. Material de referencia

- B.1 Material de Referencia Certificado (MRCs): Se utilizó la solución patrón Total Residual Chlorine de AccuStandar[®], Inc., a una concentración de 1000 mg/lit ± 1 %, del cual se partió para la preparación de las soluciones para la construcción de la curva de calibración y validación del método.

B.2 Material de Referencia Interno (MRI): Cloro Líquido proporcionado por H.V.O. a una concentración de 71000 mg/l.

C. Preparación de soluciones intermedias a partir del patrón de referencia

La solución madre fue preparada a partir del Material de referencia certificado, de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante. Partiendo de dicha solución se preparó las soluciones intermedias para la validación de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[C_1V_1]=[C_2V_2] \quad \text{Ec. [27]}$$

Donde;

C_1 : concentración del estándar que se desea preparar

V_1 : volumen del estándar que se desea preparar

C_2 : concentración de la solución intermedia

V_2 : alícuota que ser tomada de la solución intermedia.

D. Tratamiento de la muestra

Es recomendable que luego del muestreo y no más de 5 minutos se debe tomar la lectura en el equipo.

La muestra a analizar deber ser representativa, de modo que se garantice la calidad del ensayo.

E. Procedimiento de análisis

E.1 Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro HACH DR 2800
- Celdas de 10 ml.
- Pipeta volumétrica de 10 ml.

E.2 Reactivos

- Agua destilada desionizada.

- Muestra de agua clara: el manejo de objetos de ensayo se encuentra en el capítulo 21 del Manual de Calidad del CICAM
- Sobre reactivo para Cloro Libre DPD.

E.3 Procedimiento

- Verificar que el espectrofotómetro HACH DR 2800 se encuentre en buen funcionamiento.
- Seleccionar el programa para Cloro libre residual
- Llenar una celda con 10 ml de muestra.
- Añadir el contenido del sobre reactivo para Cloro libre DPD. Agitar vigorosamente de 20 segundos a 1 minuto hasta que se disuelva el reactivo
- Preparación del Blanco: Llenar otra celda con 10 ml de muestra.
- Limpiar y colocar el blanco en el porta celda y encerar.
- Colocar la otra celda y leer la absorbancia.
- Anotar los resultados obtenidos en los registros del analista para el posterior tratamiento estadístico.

F. Medidas de seguridad.

Si las muestras se van analizar luego de los 5 minutos, almacenar en un frasco oscuro y hermético a fin de evitar que se volatilice a causa de la exposición de la luz y al ambiente.

Tomar en cuenta las medidas de seguridad y elementos de protección personal recomendados por el fabricante al manipular el reactivo DPD.

3.6.1.3 Determinación de Cromo hexavalente

3.6.1.3.1 Objeto y Alcance

El objeto es determinar la concentración de cromo hexavalente mediante el análisis colorimétrico de la 1,5-difenilcarbohidracida, tomando como referencia el método 8023 del Manual de Análisis de Aguas de HACH Company, utilizando el espectrofotómetro DR 2800.

La técnica es aplicable a muestras de aguas claras y residuales, para un intervalo de concentraciones de 0,02 a 0,6 mg/l, midiéndose a 540 nm.

3.6.1.3.2 Principio del método

El método se basa en una reacción de óxido reducción donde el cromo hexavalente reacciona con la 1,5-difenilcarbohidracida en medio ácido dando un color violeta de composición desconocida. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de cromo hexavalente (NMX, 2001).

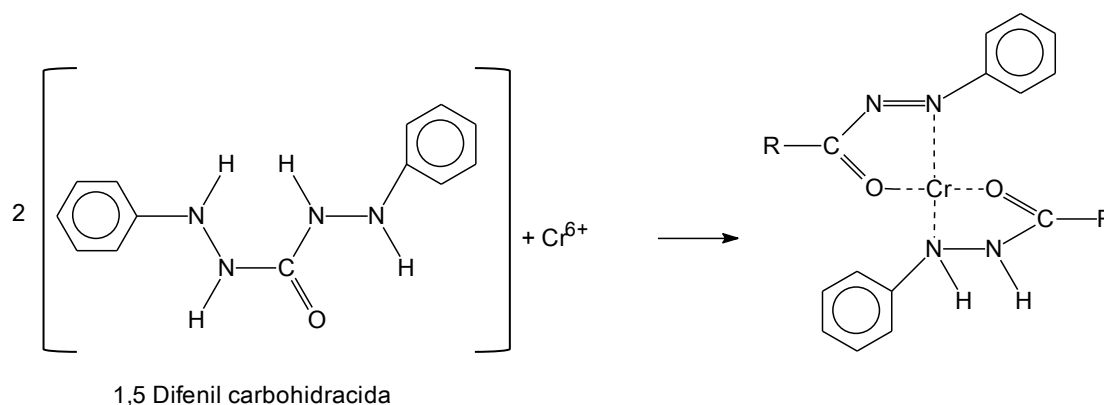


Figura 16. Reacción del Cromo Hexavalente con la 1,5-difenilcarbohidracida.

3.6.1.3.3. Desarrollo del método

A. Pruebas Previas

Se evaluó la forma y el tiempo de disolución del reactivo ChromaVer en base al análisis del porcentaje recuperación en las pruebas preliminares y; la significancia entre el Material de referencia certificado y el material de referencia interno.

Además se realizaron ensayos para determinar el límite de cuantificación, el límite de detección y el rango lineal del método.

B. Material de referencia

B.1 Material de Referencia Certificado (MRCs): Se empleó el estándar certificado Chromium (+6) in H₂O de Inorganic Ventures® a una concentración de 991 ± 2 mg/l, de la cual se preparó las soluciones para la construcción de la curva de calibración y validación del método.

B.2 Material de referencia Interno (MRI): Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$) a una concentración de 1000 mg/l, el cual se utilizó para dar trazabilidad frente al MRCs. Preparación: Se secó 2 g de $K_2Cr_2O_7$ en una estufa a 105°C por 1 hora. Se enfrió en el desecador y se pesó con precisión 1,414 g, se disolvió con agua y se aforó a 500 ml.

C. Preparación de soluciones intermedias a partir del patrón de referencia

La preparación de las soluciones se encuentra en el literal 3.6.1.1.3, parte C.

D. Tratamiento de la muestra

Antes de empezar el análisis, estabilizar las muestras al ambiente para que alcancen la temperatura del laboratorio, a fin de garantizar que el volumen a tomarse sea preciso.

Agitar vigorosamente las muestras para garantizar la homogeneidad y representatividad de la muestra, de modo que se garantice la calidad del ensayo.

El pH de la muestra debe estar entre 4-7, para lo cual se debe ajustar con HNO_3 concentrado o $NaOH$ 0.2 M.

Si la muestra contiene sólidos suspendidos y sólidos sedimentables, filtrar el volumen necesario antes del análisis.

E. Procedimiento de análisis

E.1. Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro HACH DR 2800
- Pipeta volumétrica de 25 ml

E.2 Reactivos

- Agua destilada o desionizada.
- Muestra de agua clara y residual: el manejo de objetos de ensayo se encuentra en el capítulo 21 del Manual de Calidad.
- Sobre reactivo para ChromaVer 3

E.3 Procedimiento

- Verificar que el espectrofotómetro HACH DR 2800 se encuentre en buen funcionamiento.
- Seleccionar el programa para Cromo hexavalente (# 90)
- Llenar una celda con 25 ml de muestra.
- Añadir el contenido del sobre reactivo ChromaVer 3. Agitar vigorosamente de 45 segundos hasta 1 minuto hasta que se disuelva el reactivo
- Presionar la opción "Timer >OK" y escoger la opción del tiempo de reacción de 5 minutos.
- Preparación del Blanco: Llenar otra celda con 25 ml de muestra.
- Al término del tiempo de reacción, limpiar la celda y colocar el blanco en el porta celda y encerrar.
- Colocar la otra celda y leer la absorbancia.
- Anotar los resultados obtenidos en los registros del analista para el posterior tratamiento estadístico.

F. Medidas de seguridad.

Almacenar las muestras a 4°C, y si se van analizar luego de 24 horas conservarlas con HNO₃ concentrado hasta un pH<2 (unos 2ml por litro). De esta forma se garantiza la preservación de hasta 6 meses.

Tomar en cuenta las medidas de seguridad y elementos de protección personal recomendados por el fabricante al manipular el HNO₃, NaOH y el reactivo Chromaver 3

3.6.1.4 Determinación de Cromo total

3.6.1.4.1 Objeto y Alcance

El objeto es determinar la concentración de cromo total mediante el análisis colorimétrico de la Oxidación alcalina del ion hipobromito, tomando como referencia el método 8024 del Manual de Análisis de Aguas de HACH Company, utilizando el espectrofotómetro DR 2800.

La técnica es aplicable a muestras de aguas claras, para un intervalo de concentraciones de 0,02 a 0,6 mg/l, midiéndose a 540 nm.

3.6.1.4.2 Principio del método

El cromo trivalente presente en la muestra es oxidado por el ion hipobromito, en condiciones alcalinas, a la forma hexavalente. La muestra se acidifica y se determina mediante el método de 1,5-difenilcarbohidracida. Para calcular el contenido de cromo trivalente se resta el valor de la determinación del cromo hexavalente al valor de la determinación del cromo total (HACH Company, 2005).

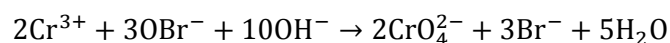


Figura 17. Reacción del Cromo III con el hipobromito.

3.6.1.4.3. Desarrollo del método

A. Pruebas Previas

Se determinó si para la disolución de los reactivos Chromium 1, Chromium 2 y el Acid Reagent se utilizará el ultrasonido, para lo cual se evaluó el porcentaje de recuperación de los ensayos previos a la validación.

Además se realizaron ensayos para determinar experimentalmente el límite de cuantificación, el límite de detección y el rango de trabajo del método mediante el análisis de regresión.

B. Material de referencia

Se empleó la solución patrón Chromium (+3) in 2% (v/v) HNO₃ de Inorganic Ventures® a una concentración de 1001 ±3 mg/l, de la cual se partió para la preparación de las soluciones para la construcción de la curva de calibración y validación del método.

C. Preparación de soluciones intermedias a partir del patrón de referencia

La preparación de las soluciones se encuentra en el literal 3.6.1.1.3, numeral C.

D. Tratamiento de la muestra

Seguir las cuatro indicaciones que se encuentran en el literal 3.6.1.1.3, numeral D.

E. Procedimiento de análisis

E.1 Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro HACH DR 2800
- Plancha de calentamiento
- Pipeta volumétrica de 25ml
- Botella Pirex con tapa de 125ml.

E.2 Reactivos

- Agua destilada o desionizada.
- Muestra de agua clara: el manejo de objetos de ensayo se encuentra en el capítulo 21 del Manual de Calidad.
- Sobre reactivo Chromium 1
- Sobre reactivo Chromium 2
- Sobre reactivo Acid Reagent
- Sobre reactivo ChromaVer 3

E.3 Procedimiento

- Verificar que el espectrofotómetro HACH DR 2800 se encuentre en buen funcionamiento.
- Seleccionar el modo programa para Cromo total (#100)
- Colocar en la botella pirex 25 ml de muestra
- Añadir el sobre Chromium 1. Tapar y mezclar por rotación.
- Colocar la muestra preparada en un baño de agua hirviendo. La temperatura de la muestra debe estar entre 70 – 85°C.
- Presionar la opción “timer >OK” y escoger la opción del tiempo de reacción de 5 minutos.
- Después de este tiempo, retirar la muestra preparada. Enfriar la botella hasta 25 °C.

- Agregar el contenido del sobre reactivo Chromium 2. Tapar el invertir para mezclar.
- Añadir el contenido de un sobre de reactivo Acid Reagent. Tapar la botella y agitar con rotación, para mezclar.
- Trasvasar la muestra a la celda de 25 ml y colocar el contenido del sobre reactivo ChromaVer 3. Agitar vigorosamente hasta que se disuelva el reactivo.
- Presionar la opción “timer >OK” y escoger la opción del tiempo de reacción de 5 minutos.
- Preparación del Blanco: Llenar otra celda con 25 ml de muestra.
- Al término del tiempo de reacción, limpiar la celda y colocar el blanco en el porta celda y encerrar.
- Colocar la otra celda y leer la absorbancia.
- Anotar los resultados obtenidos en los registros del analista para el posterior tratamiento estadístico

F. Medidas de seguridad.

Almacenar las muestras a 4°C, y si se van analizar luego de 24 horas conservarlas con HNO₃ concentrado hasta un pH<2 (unos 2ml por litro). De esta forma se garantiza la preservación de hasta 6 meses.

Tomar en cuenta las medidas de seguridad y elementos de protección personal recomendados por el fabricante al manipular el HNO₃, NaOH y el reactivo Chromium 1, Chromium 2, Acid Reagent y ChromaVer 3

3.6.1.5 Determinación de Nitritos

3.6.1.5.1 Objeto y Alcance

El objeto es determinar la concentración de nitrógeno de nitritos mediante el análisis colorimétrico de diazotización, tomando como referencia el método 4500-NO₂- B del Standar Methods for the examination of water and wastewater Ed. 21 y utilizando el espectrofotómetro HACH DR 2800.

La técnica es aplicable a muestras de aguas claras y residuales, para un intervalo de concentraciones de 0,01 a 0,5 mg/l de N-NO_2^- , midiéndose a 543 nm.

3.6.1.5.2 Principio del método

El método consiste en que los nitritos presentes reaccionan, para formar ácido nitroso que reacciona con la sulfanilamida por una reacción de diazotización para formar una sal de diazonio, la cual por copulación con el N-(1-naftil) etilendiamina forma un colorante azóico de color púrpura rojizo. El contenido de Nitritos es directamente proporcional a la intensidad de color (NMX, 2001).

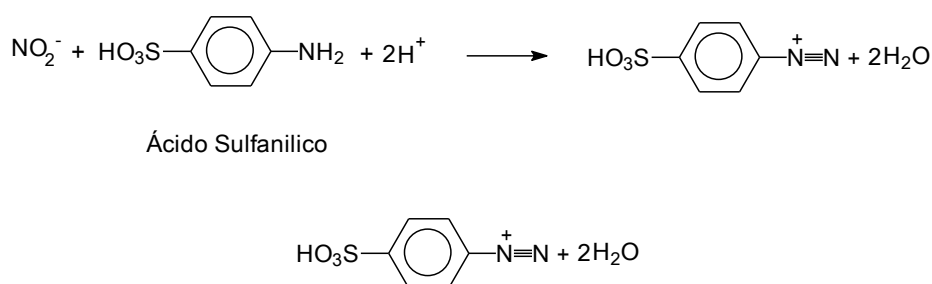


Figura 18. Reacción del Nitrito con la sulfanilamida.

3.6.1.5.3. Desarrollo del método

A. Pruebas Previas

Con el propósito de analizar la interferencia del método producto de la intensidad de color de la muestra, se realizó diferentes ensayos para establecer una escala de color a partir de cual se puede analizar la muestra, en base al cálculo del porcentaje de recuperación.

Adicionalmente se llevaron a cabo pruebas de significancia para dar trazabilidad al Material de Referencia Interno frente a un Material de referencia Certificado; igualmente entre el volumen de la muestra a analizar y entre los tiempos de reacción para el desarrollo de color antes de la medición.

Además se realizaron ensayos para determinar el límite de cuantificación, el límite de detección y el rango de trabajo del método mediante el análisis de regresión.

B. Material de referencia

B.1 Material de Referencia Certificado (MRCs): Se usó la solución patrón Nitrite as Nitrogen proporcionado por AccuStandar[®], Inc., a una concentración de 1000 mg/l \pm 1 % de N-NO₂⁻ (para transformar a NO₂ multiplicar por 3,285), del cual se dio trazabilidad frente al Material de Referencia Interno.

B.2 Material de Referencia Interno (MRI): Nitrito de Sodio (NaNO₂) a una concentración de 1000 mg/l a partir de cual se preparó las soluciones para la construcción de la curva de calibración y validación del método. Preparación: Se pesó 4,928 g NaNO₂, se diluyo en agua destilada, se aforó a 1000 ml y se colocó 1m de Cloroformo para preservar el estándar.

Para conocer la concentración verdadera se valoró el estándar, el procedimiento se encuentra en el Anexo H, numeral 2.

C. Preparación de soluciones intermedias a partir del patrón de referencia

La preparación de las soluciones se encuentra en el literal 3.6.1.1.3, numeral C.

D. Tratamiento de la muestra

Antes de empezar el ensayo, dejar que las muestras alcancen la temperatura del laboratorio, a fin de garantizar que el volumen a tomarse sea preciso.

Agitar vigorosamente las muestras para garantizar la homogeneidad y representatividad de la muestra, de modo que se garantice la calidad del ensayo.

El pH de la muestra debe estar entre 5 y 9 para lo cual se debe ajustar con NH₄OH concentrado o HCl 1N.

Si la muestra contiene solidos suspendidos y solidos sedimentables, filtrar el volumen necesario antes del análisis.

Para eliminar la interferencia a causa del color de la muestra, se tiene que previamente leer el color y consultar en la escala de colores para analizar si es apto para el ensayo, de lo contrario se deberá hacer la respectiva dilución hasta

que la cantidad de color sea la adecuada para la determinación, pero esta no debe ser menor al límite de cuantificación del método. El procedimiento de ensayo se encuentra en el Anexo H, literal 1

E. Procedimiento de análisis

E.1 Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro HACH DR 2800
- Balón aforado de 50 ml.
- Pipeta volumétrica de 2 ml.
- Tubos HACH

E.2 Reactivos

- Agua destilada o desionizada.
- Muestra de agua clara y residual: el manejo de objetos de ensayo se encuentra en el capítulo 21 del Manual de Calidad.
- Reactivo de Color. La preparación se encuentra en el Anexo H, numeral 3

E.3 Procedimiento

- Verificar que el espectrofotómetro HACH DR 2800 se encuentre en buen funcionamiento.
- Seleccionar el programa para Nitritos.
- Medir 50 ml de muestra en un balón aforado.
- Agregar 2ml de reactivo de color. Mezclar.
- Esperar de 10 minutos a 1 hora (tiempo de reacción).
- Preparación del Blanco: Llenar un tubo HACH con la muestra y encerar.
- Luego del tiempo de reacción, colocar la muestra con el reactivo en otro tubo HACH y leer la absorbancia.
- Anotar los resultados obtenidos en los registros del analista para el posterior tratamiento estadístico.

F. Medidas de seguridad.

El análisis debe hacerse lo más pronto posible para evitar la conversión bacteriana del nitrito en nitrato o amoníaco, de lo contrario almacenar las muestras a 4°C hasta 48 horas.

No utilizar nunca la conservación ácida en las muestras, esto hará que la concentración de nitrito disminuya.

Tomar en cuenta las medidas de seguridad y elementos de protección personal recomendados por el fabricante al manipular los reactivos y solventes.

3.6.2 SISTEMA DE VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

3.6.2.1 Elección de los parámetros de validación.

Para la elección de los parámetros de validación se tomaron en cuenta la documentación disponible y la experiencia del laboratorio en los análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos, así como lo especificado en la norma NTE INEN ISO/IEC 17025 (inciso 5.4.5.3. Nota 1) la cual menciona que la validación incluye la especificación de los requisitos, la determinación de las características de los métodos, una verificación de que los requisitos pueden satisfacerse utilizando el método, y una declaración sobre la validez.

3.6.2.2 Fijación de objetivos para los parámetros de validación.

Para la fijación de los objetivos, en la puesta a punto de cada método se realizaron suficientes ensayos de laboratorio, a fin de definir los parámetros de validación y el intervalo de trabajo.

A continuación en las Tablas 4, 5, 6 y 7 se presentan los parámetros y objetivos de validación para cada método.

Tabla N° 4. Objetivos de validación para la determinación de cloro libre residual.

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Selectividad / Especificidad	Aplicable a aguas claras
Linealidad / Función respuesta	$R^2 > 0,995$
Límite de detección	0,013 mg/l
Límite de cuantificación	0,25 mg/l
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	$CV_r \leq 10\%$ $CV_R \leq 10\%$
Exactitud (% de Recuperación)	85-110%
Incertidumbre	$\leq 20\%$
Intervalo de validación	0,25 – 5 mg/l.

Elaborado por: Javier Macas

Tabla N° 5. Objetivos de validación para la determinación cromo hexavalente.

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Selectividad / Especificidad	Aplicable a aguas claras y residuales.
Linealidad / Función respuesta	$R^2 > 0,995$
Límite de detección	0,003mg/l
Límite de cuantificación	0,02 mg/l
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	$CV_r \leq 10\%$ $CV_R \leq 10\%$
Exactitud (% de Recuperación)	85-110%
Incertidumbre	$\leq 20\%$
Intervalo de validación	0,02 – 50 mg/l

Elaborado por: Javier Macas

Tabla N° 6. Objetivos de validación para la determinación de cromo total.

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Selectividad / Especificidad	Aplicable a aguas claras
Linealidad Recta de Adición	$R_2 > 0,995$
Límite de detección	0,009 mg/l
Límite de cuantificación	0,03mg/l
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	$CV_r \leq 10\%$ $CV_R \leq 10\%$
Exactitud (% de Recuperación)	85-110%
Incertidumbre	$\leq 20\%$
Intervalo de validación	0,03 – 100 mg/l

Elaborado por: Javier Macas

Tabla N° 7. Objetivos de validación para la determinación nitritos.

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Selectividad / Especificidad	Aplicable a aguas claras y residuales
Linealidad Recta de Adición	$R_2 > 0,995$
Límite de detección	0,0004 mg/l
Límite de cuantificación	0,01mg/l
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	$CV_r \leq 10\%$ $CV_R \leq 10\%$
Exactitud (% de Recuperación)	85-110%
Incertidumbre	$\leq 25\%$
Intervalo de validación	0,01 – 100 mg/l.

Elaborado por: Javier Macas

3.6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ESTADÍSTICO

Se estableció el diseño experimental a seguir en la validación, el cual nos permitió identificar y cuantificar los parámetros de desempeño de los métodos dentro de la investigación. Las herramientas estadísticas y cálculos matemáticos serán realizados con la ayuda del programa Microsoft Excel 2010.

En los siguientes literales se detalla el diseño experimental y estadístico para cada método.

3.6.3.1 Cloro libre residual

3.6.3.1.1 Elementos que se disponen para la validación

Para la validación del método de cloro libre residual se prepararon 6 niveles de concentración, más el blanco para la calibración del método, del cual se escogió 5 niveles para el análisis experimental. Los niveles de concentración escogidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N° 8. Niveles de concentración para cada rango de concentraciones.

<i>Rango de Concentración</i>	<i>Niveles escogidos</i>
0,2 a 5 mg/l	0,2 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 – 5 mg/l

Elaborado por: Javier Macas

Para establecer la función de respuesta, la validación del método y la recuperación de la adición del estándar a la matriz real, se siguió lo descrito en el literal 3.5. La muestra real utilizada fue de agua potable, siendo colectada de un barrio del Cantón Rumiñahui.

Adicionalmente se tomó 5 mediciones de un nivel de concentración, a fin de dar trazabilidad entre el MRi frente al MRCs, realizando una prueba de significancia

3.6.3.1.2 Tratamiento Estadístico

Para determinar la significancia entre el MRCs y el MRi se utilizó el estadístico *t* de student para comparación de medias y la prueba *F* comparación de varianzas.

Se evaluó la función de respuesta de linealidad en base al análisis de regresión lineal, para el posterior cálculo del límite de detección y cuantificación.

Se realizó el análisis de varianza simple para un factor (ANOVA) de los resultados obtenidos de cada nivel de estudio, para la obtención de la precisión (%CV_r y % CV_R).

Con el fin de obtener la exactitud del método, se calculó el porcentaje de recuperación de los datos obtenidos para los diferentes niveles de concentración y de la muestra real de agua utilizada.

Finalmente se obtuvo la incertidumbre expandida asociada a cada nivel del intervalo de trabajo.

3.6.3.2 Cromo hexavalente

3.6.3.2.1 Elementos que se disponen para la validación

Para la construcción de la curva de calibración del método de cromo hexavalente se escogieron 8 niveles de concentración y para la validación del método se escogieron 5 niveles de concentración más los blancos, dividiéndose en dos rangos. Los niveles de concentración escogidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N° 9. Niveles de concentración para cada rango de concentraciones.

<i>Rango de Concentración</i>	<i>Niveles escogidos</i>
Intervalo de calibración (0,02 - 0,6 mg/l)	0,01 - 0,02 - 0,03 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 0,6 mg/l
Rango bajo (0,02 - 0,6 mg/l)	0,02 - 0,06 mg/l
Rango alto (1 - 50 mg/l)	1 - 5 - 50 mg/l

Elaborado por: Javier Macas

Para las concentraciones del rango alto 1, 5 y 50 mg/l se realizaron diluciones 1:2, 1:10 y 1:100 respectivamente, de modo que ingresen en el intervalo de trabajo de calibración del método.

Para determinar la función de respuesta, la validación del método y la recuperación de la adición del estándar a la matriz real, se siguió lo descrito en el literal 3.5. La muestra real utilizada para analizar el efecto matriz fue de agua residual, siendo recogida de la empresa Ideal Alambrec.

Además se tomó 5 mediciones de un nivel de concentración, a fin de dar trazabilidad entre el MRi frente al MRCs, realizando una prueba de significancia.

3.6.3.2.2 Tratamiento Estadístico

El tratamiento estadístico es el mismo que para la determinación de cloro libre residual establecido en el literal 3.6.3.1.2.

3.6.3.3 Cromo total

3.6.3.3.1 Elementos que se disponen para la validación

Para la obtención de la curva de calibración del método para la determinación de Cromo total se seleccionaron 6 niveles de concentración y para la validación del método se escogieron 5 niveles de concentración más los blancos, dividiéndose en dos rangos. Los niveles de concentración elegidos se presentan en la siguiente tabla.

Tabla N° 10. Niveles de concentración para cada rango de concentraciones.

<i>Rango de Concentración</i>	<i>Niveles escogidos</i>
Intervalo de calibración (0,02 - 0,6 mg/l)	0,02 - 0,03 - 0,05 - 0,2 - 0,5 - 0,6 mg/l
Rango bajo (0,02 - 0,6 mg/l)	0,03 – 0,06 mg/l
Rango alto (1 - 100 mg/l)	1 – 10 – 100 mg/l

Elaborado por: Javier Macas

Para las concentraciones del rango alto 1, 10 y 100 mg/l se efectuaron diluciones 1:2, 1:20 y 1:200 respectivamente, de modo que ingresen en el la curva de calibración del método.

Para establecer la función de respuesta, la validación del método y la recuperación de la adición del estándar a la matriz real, se siguió lo descrito en el literal 3.5. La muestra real utilizada para analizar el efecto matriz fue de agua clara, siendo escogida de la red de agua potable del cantón Rumiñahui.

3.6.3.3.2 Tratamiento Estadístico

El tratamiento estadístico es el mismo que para la determinación de cloro libre Residual detallado en el literal 3.6.3.1.2.exceptuando las pruebas de significancia.

3.6.3.4 Nitritos

3.6.3.4.1 Elementos que se disponen para la validación

Para la obtención de la función de respuesta lineal del método para el análisis de nitritos se obtuvieron 7 niveles de concentración y para la validación del método se escogieron 5 niveles de concentración más los blancos, donde se separaron en dos rangos. Los niveles de concentración seleccionados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N° 11. Niveles de concentración para cada rango de concentraciones.

<i>Rango de Concentración</i>	<i>Niveles escogidos</i>
Intervalo de calibración (0,01 - 0,5 mg/l)	0,01 - 0,02 - 0,04 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,5 mg/l
Rango bajo (0,01 - 0,5 mg/l)	0,01 - 0,5 mg/l
Rango alto (1 - 100 mg/l)	1 - 10 - 100 mg/l

Elaborado por: Javier Macas

Para las concentraciones del rango alto 1, 10 y 100 mg/l se efectuaron diluciones 1:10, 1:50 y 1:200 respectivamente, de modo que ingresen en el la curva de calibración del método.

Para fijar la función de respuesta, la validación del método y la recuperación de la adición del estándar a la matriz real, se siguió lo descrito en el literal 3.5. La muestra real utilizada para analizar el efecto matriz fue de agua residual, siendo seleccionada una muestra que ingresó al laboratorio.

3.6.3.1.2 Tratamiento Estadístico

El tratamiento estadístico es el mismo que para la determinación de cloro libre residual detallado en el literal 3.6.3.1.2, agregando que para verificar las diferencias significativas entre los tiempos de reacción y entre el volumen de muestra recolectado, se utilizó la prueba *t* de student para comparación de medias.

Además, con el propósito de analizar la interferencia del método producto de la intensidad de color de la muestra se calculó del porcentaje de recuperación.

3.6.4 MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE DATOS

3.6.4.1 Modelo matemático para determinar la Recta de Calibración de Función de Respuesta

La calibración es la determinación de la magnitud de los errores que cometen los instrumentos al realizar la medición, considerando los parámetros y pruebas que influyen en los resultados.

En un método espectrofotométrico la curva de regresión es la relación lineal entre la señal analítica del instrumento y la concentración del analito, el cual se calcula a través de los puntos de la gráfica de calibrado, cada uno de los cuales está sujeto a un error experimental (Miller N. y C., 2002).

Para realizar la recta de calibración de la función de respuesta de los métodos, se obtuvieron las respectivas regresiones lineales con un grado de ajuste $r^2 > 0,995$. En el eje de las abscisas (X) se ubicaron la concentración real de los patrones, de acuerdo al diseño experimental diseñado y en el eje de las ordenadas (Y) las lecturas obtenidas. La ecuación de la recta será por tanto:

$$L = mP + L_0 \quad \text{Ec. [28]}$$

Donde;

L = Lectura observada

m = pendiente o coeficiente de regresión

P = Concentración de los patrones de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos respectivamente.

L_0 = Coeficiente de la ordenada, en el origen del eje de las abscisas.

Los valores de la pendiente (m), de la ordenada en el origen (L_0) y el coeficiente de correlación (r^2) se calcularon utilizando el método de los mínimos cuadrados. Las fórmulas estadísticas para los cálculos se detallan a continuación:

$$m = \frac{\sum P_i L_i - \frac{\sum P_i \sum L_i}{n}}{\sum P_i^2 - \frac{(\sum P_i)^2}{n}} \quad \text{Ec. [29]}$$

$$L_0 = \frac{\sum L_i - b \sum P_i}{n} \quad \text{Ec. [30]}$$

$$r = \frac{\sum P_i L_i - \frac{\sum P_i \sum L_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum P_i^2 - \frac{(\sum P_i)^2}{n}\right) \left(\sum L_i^2 - \frac{(\sum L_i)^2}{n}\right)}} \quad \text{Ec. [31]}$$

Donde;

n = Numero de pares de valores para el análisis de regresión

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y ordenada en el origen son importantes, considerándose la ecuación de la recta para calcularlos.

La ecuación para calcular el error de la pendiente S_m es la siguiente:

$$S_m = \frac{S_{LP}}{\sqrt{\sum(P-\bar{P})^2}} \quad \text{Ec. [32]}$$

Donde;

S_{LP} = error tipo en la recta

P_i = Concentración obtenida

\bar{P} : Media de los valores de patrones conocidos

La ecuación para el cálculo de la desviación estándar de la ordenada en el origen S_{Lo} es la siguiente:

$$S_{Lo} = S_m \sqrt{\sum \frac{(P_{MR})^2}{n}} \quad \text{Ec. [33]}$$

Donde;

S_m = Desviación tipo del coeficiente de regresión de la recta

P_{MR} = Concentración promedio del material de referencia

n = número de observaciones

La desviación estándar tipo en la estimación de L S_{LP} es:

$$S_{LP} = \sqrt{\sum \frac{(L_{obs} - L_{est})^2}{n-2}} \quad \text{Ec. [34]}$$

Donde;

L_{obs} = respuesta del equipo

L_{est} = respuesta estimada

n = número de observaciones

La desviación estándar o error tipo en la estimación de la concentración S_{PL} es por tanto:

$$S_{PL} = \frac{S_{LP}}{m} \quad \text{Ec. [35]}$$

Donde;

S_{LP} = Desviación estándar de la recta

m = Coeficiente de regresión

3.6.4.2 Modelo matemático para determinar el Intervalo de confianza y los Límites de confianza

Un intervalo de confianza es un rango de valores (calculado en una muestra) en el cual se encuentra el verdadero valor del parámetro, con una probabilidad determinada.

La probabilidad de que el verdadero valor del parámetro se encuentre en el intervalo construido se denomina nivel de confianza y la probabilidad de equivocarnos se llama nivel de significancia.

Los límites de confianza a partir del error tipo en la estimación de L se calculan a partir de los valores de P , m y S_{LP} .

Los límites de confianza superior $L_{superior}$ e inferior $L_{inferior}$ del método se determinan con las siguientes ecuaciones:

$$L_{superior} = (L_o + t * S_{LP}) + (m)P_i \quad \text{Ec. [36]}$$

$$L_{inferior} = (L_o - t * S_{LP}) + (m)P_i \quad \text{Ec. [37]}$$

Donde;

P_i = valores de los estándares conocidos

t = estadístico de student a nivel de significación 0.05

3.6.4.3 Determinación del Límite de Detección (LD).

El límite de detección se calcula en base al error estándar del blanco:

$$LD = 3 * S_{Bl} \quad \text{Ec. [38]}$$

Donde;

S_{Bl} = Desviación estándar de los valores obtenidos del blanco

3.6.4.4 Determinación del Límite de Cuantificación (LC).

El límite de cuantificación se determina utilizando la siguiente ecuación.

$$LC = 10 S_{Bl} \quad \text{Ec. [39]}$$

Si el % de recuperación obtenido no ingresa en el intervalo del 85 al 115%, se puede imponer un límite de cuantificación, acorde a las exigencias de los estándares nacionales o internacionales.

3.6.4.5 Determinación de la Exactitud y Precisión (% Recuperación y % CV)

El cálculo del porcentaje de recuperación se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración real}} \quad \text{Ec. [40]}$$

El coeficiente de variación %CV se realiza con la ecuación presentada a continuación:

$$\%CV = \frac{S}{\bar{x}} * 100\% \quad \text{Ec. [41]}$$

Donde;

\bar{x} = media del grupo muestral

S = desviación estándar de la lectura del equipo

3.6.4.6 Modelo matemático para determinar el Análisis de Varianza Simple (ANOVA)

El análisis de varianzas simples se utiliza para determinar la precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad).

Primero se debe analizar la homogeneidad de varianzas de un grupo muestral, por lo que se utiliza la prueba de G de Cochran, el mismo que se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$G_{max} = \frac{S_{max}^2}{S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_q^2} \quad \text{Ec. [42]}$$

Donde;

G_{max} = G de Cochran

s = desviación estándar de las repeticiones de cada día.

A continuación se emplea el diseño de un factor completamente aleatorizado (DCA), para determinar el estadístico F del análisis ANOVA. El modelo matemático es:

$$Y_{ij} = u + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ec. [43]}$$

Donde;

Y_{ij} = Variable respuesta en la j -ésima repetición del i -ésimo tratamiento

u = Media general

τ_i = Efecto del tratamiento i .

ε_{ij} = Error aleatorio

La media grupal se calcula con los datos obtenidos de cada durante los 5 días, utilizando la siguiente ecuación:

$$\bar{L}_i = X_m = \frac{\sum_{j=1}^p L_{ij}}{p} \quad \text{Ec. [44]}$$

Donde;

\bar{L}_i = Media grupal por día

L_{ij} = Lecturas observadas en el día

p = número de observaciones

La media general \bar{L} se obtiene con todos los valores de los 5 días, y viene dado por:

$$\bar{L} = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n L_{ij}}{n} \quad \text{Ec. [45]}$$

Donde;

L_{ij} = Lecturas observadas de los cinco días

n = número de observaciones totales

Las sumas de diferencias cuadráticas de Between SDC_B :

$$SDC_B = \sum_{i=1}^k p(\bar{L}_i - \bar{L})^2 \quad \text{Ec. [46]}$$

Donde;

\bar{L}_i = media grupal

\bar{L} = media general

Las diferencias cuadráticas de Between DCM_B :

$$DCM_B = \frac{SDC_B}{k-1} \quad \text{Ec. [47]}$$

Donde;

$k - 1$ = grados de libertad entre grupos

Las sumas de diferencias cuadráticas de Within SDC_W :

$$SDC_W = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^p (L_{ij} - \bar{L}_i)^2 \quad \text{Ec. [48]}$$

Donde;

L_{ij} = lectura observada

\bar{L}_i = media general

Las diferencias cuadráticas medias de Within DCM_W :

$$DCM_W = \frac{SDC_W}{n-k} \quad \text{Ec. [49]}$$

Donde;

$n - k$ = Grados efectivos dentro de grupos

En la tabla se muestra el análisis simple de varianzas ANOVA, entre grupos y dentro de grupos.

Tabla N° 12. Análisis de Varianza Simple (ANOVA)

Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias ($DCM = SDC/v$)
Entre grupos (Between)	$v_2 = k - 1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^k p(\bar{L}_i - \bar{L})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{k - 1}$
Dentro del grupo (Within)	$v_2 = n - k$	$SDC_w = \sum_{i=1}^k \sum_{j=i}^p p(L_{ij} - \bar{L}_i)^2$	$DCM_w = \frac{SDC_w}{n - k}$

Elaborado por: Javier Macas

Los valores de los ensayos realizados se aceptan, cuando las diferencias cuadráticas medias entre grupos son mayores a las diferencias cuadráticas medias dentro de grupos, de lo contrario se deberá revisar el proceso experimental.

Para aceptar que los grupos estudiados no existe diferencias significativas, se utiliza el estadístico F , que viene definido por:

$$F = \frac{DCM_B}{DCM_w} \quad \text{Ec. [50]}$$

Se determina el valor de F de tablas a un nivel de significación de 0,05 y grados de libertad $v_1=k-1$ y $v_2 =n-k$ (v_1 y v_2).

Si el F tabulado es mayor que el F estimado no existen diferencias significativas entre los distintos grupos muestrales. Si ocurre lo contrario se considera que las medias del grupo que son distintas entre sí.

La desviación estándar de repetibilidad S_r es igual a:

$$S_r = \sqrt{DCM_w} \quad \text{Ec. [51]}$$

La desviación estándar de reproducibilidad S_R esta dada por:

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2} \quad \text{Ec. [52]}$$

La desviación de las lecturas S_L se calcula utilizando la ecuación

$$S_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{p} \quad \text{Ec. [53]}$$

Las sumas de diferencias cuadráticas totales SDC_T :

$$SDC_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (L_{ij} - \bar{L}_i)^2 = SDC_B + SDC_W \quad \text{Ec. [54]}$$

Las diferencias cuadráticas medias totales DCM_T :

$$DCM_T = \frac{SDC_T}{(p)(q-1)} \quad \text{Ec. [55]}$$

3.6.4.7 Calculo de las Incertidumbres de cloro libre residual, cromo hexavalente y cromo total.

Para establecer el valor de la incertidumbre expandida de los métodos, se realizó los respectivos los diagramas causa y efecto o de Ishikawa, donde se analizó las fuentes de error de los procedimientos de ensayo y validación.

3.7.4.7.1 Incertidumbre Expandida

La incertidumbre de expandida del método se calcula con la siguiente fórmula:

$$U = k * \mu_{\text{método}} \quad \text{Ec. [56]}$$

Donde;

$\mu_{\text{método}}$ = Incertidumbre estándar combinada

k = factor de cobertura igual a 2

3.7.4.7.2 Incertidumbre Estándar Combinada ($\mu_{\text{método}}$)

$$\mu_{\text{método}} = \sqrt{\mu_{\text{calEq}}^2 + \mu_R^2 + \mu_{\text{procedimiento}}^2} \quad \text{Ec. [57]}$$

Donde;

μ_{calEq} = Incertidumbre de calibración del equipo

μ_R = Incertidumbre de reproducibilidad

$\mu_{procedimiento}$ = Incertidumbre del procedimiento o del análisis

3.6.4.7.3 Incertidumbre de Reproducibilidad (μ_R)

La incertidumbre de reproducibilidad es de tipo A y viene dada por:

$$\mu_R = S_R \quad \text{Ec. [58]}$$

Donde S_R es el error estándar de reproducibilidad obtenido del análisis de ANOVA de la ecuación [49].

3.6.4.7.4 Incertidumbre del Procedimiento ($\mu_{procedimiento}$)

La incertidumbre del procedimiento se basa en la incertidumbre del volumen de muestra tomado:

$$\mu_{procedimiento} = \sqrt{\left(\mu_{Vmuestra} * \frac{C_{est}}{V_{muestra}}\right)^2} \quad \text{Ec. [59]}$$

Donde;

$\mu_{Vmuestra}$ = Incertidumbre de la muestra tomada para el análisis

C_{est} = Concentración del patrón utilizado

$V_{muestra}$ = Volumen de la muestra tomada para el análisis

3.6.4.7.5 Incertidumbre de Calibración (μ_{calEq})

La ecuación global para el cálculo de la incertidumbre de calibración del equipo es la siguiente:

$$\mu_{calEq} = \sqrt{\mu_{MR}^2 + \mu_{FR}^2 + \mu_r^2} \quad \text{Ec. [60]}$$

Donde;

μ_{MR} = Incertidumbre del material de referencia

μ_{FR} = Incertidumbre de linealidad

μ_r = Incertidumbre de repetibilidad

3.6.4.7.6 Incertidumbre del Material de Referencia

A. Incertidumbre de calibración del material volumétrico (μ_{Cal})

Se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu_{Cal} = \frac{\mu_{MV}}{k} \quad \text{Ec. [61]}$$

Dónde;

μ_{MV} = Incertidumbre de calibración del material volumétrico

B. Incertidumbre debida a las condiciones ambientales ($\mu_{Temperatura}$)

Esta Incertidumbre establece la temperatura de preparación de los diferentes estándares y del procedimiento de ensayo.

$$\mu_{Temperatura} = \frac{\Delta T * X * \alpha}{\sqrt{3}} = \frac{(T_{calibración} - T_{medida}) * volumen * \alpha}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec. [62]}$$

Donde;

ΔT = Diferencia entre la temperatura de calibración del instrumento y la temperatura en el instante en que se realiza la dilución y se toma la medida

X = Volumen medido por el instrumento

α = Coeficiente de sensibilidad igual a $2,1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, este valor fue tomado del Procedimiento Específico PEC/CICAM/05 del laboratorio.

C. Incertidumbre del error de medida (μ_{error})

Esta incertidumbre se asocia a la corrección que tiene el material volumétrico en el procedimiento de calibración.

$$\mu_{error} = \frac{error}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec. [63]}$$

D. Incertidumbre de medida del material volumétrico (μ_V)

Esta incertidumbre involucra a las ecuaciones [58], [59] y [60], por lo tanto:

$$\mu_V = \sqrt{\mu_{Cal}^2 + \mu_{error}^2 + \mu_{Temperatura}^2}$$

E. Incertidumbre del material de referencia diluido (μ_{MR})

Para el cálculo de la incertidumbre del material de referencia para los diferentes niveles de concentración se parte de la expresión de dilución:

$$[C_1 V_1] = [C_2 V_2] \quad \text{Ec. [64]}$$

Donde;

C_1 = Concentración del material de referencia o de la solución intermedia

C_2 = Concentración del estándar que se desea preparar

V_1 = Alícuota a ser tomada del material de referencia o de la solución intermedia

V_2 = Volumen de aforo de la solución estándar que se desea preparar

De la ecuación anterior se despeja C_2 y se realiza la derivada parcial respecto a la concentración del material de referencia, resultando:

$$\frac{\partial C_2}{\partial C_1} = \frac{V_1}{V_2} = A \quad \text{Ec. [65]}$$

La derivada parcial respecto a la alícuota a ser tomada del material de referencia, obteniendo:

$$\frac{\partial C_2}{\partial V_1} = \frac{C_1}{V_2} = B \quad \text{Ec. [66]}$$

La derivada parcial respecto al volumen de aforo de la solución estándar que se desea preparar, resultando:

$$\frac{\partial C_2}{\partial V_2} = -\frac{C_1 V_1}{V_2^2} = C \quad \text{Ec. [67]}$$

Aplicando la ley de la propagación de las incertidumbres se tiene:

$$\mu_{MR}^2 = A^2 * \mu_{C_1}^2 + B^2 * \mu_{V_1}^2 + C^2 * \mu_{V_2}^2 = \mu_{C_2}^2 \quad \text{Ec. [68]}$$

Donde;

μ_{C1} = Incertidumbre del material de referencia o de la solución intermedia

μ_{V1} = Incertidumbre del volumen tomado del material de referencia o de la solución intermedia

μ_{V2} = Incertidumbre del volumen utilizado para el aforo de la solución a prepararse

3.6.4.7.7 Incertidumbre por Linealidad (μ_{FR})

Para el cálculo se tiene la siguiente ecuación:

$$FR = \frac{L-L_o}{m} \quad \text{Ec. [69]}$$

Donde;

L = Lectura del equipo

L_o = Corte en el origen del eje de las abscisas.

m = Pendiente de la recta

Determinando la derivada parcial respecto a la Lectura observada, se tiene:

$$\frac{\partial FR}{\partial L} = \frac{1}{m} = A \quad \text{Ec. [70]}$$

Calculando la derivada parcial respecto al corte en el origen del eje de las abscisas:

$$\frac{\partial FR}{\partial L_o} = -\frac{1}{m} = B \quad \text{Ec. [71]}$$

Estableciendo la derivada parcial respecto a la pendiente de la recta, nos da el coeficiente de sensibilidad:

$$\frac{\partial FR}{\partial m} = -\frac{L-L_o}{m^2} = C \quad \text{Ec. [72]}$$

Utilizando la ley de propagación de incertidumbres se tiene:

$$\mu_{FR}^2 = A^2 * \mu_L^2 + B^2 * \mu_{L_o}^2 + C^2 * \mu_m^2 \quad \text{Ec. [73]}$$

Donde;

μ_L = incertidumbre de la lectura del equipo

μ_{Lo} = incertidumbre del coeficiente de la ordenada al origen

μ_m = incertidumbre de la pendiente de la recta

A. Incertidumbre de la lectura del equipo (μ_L)

Se la establece utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu_L = \sqrt{\mu_{resolución}^2 + \mu_{deriva}^2} \quad \text{Ec. [74]}$$

Donde;

$$\mu_{resolución} = \frac{resolución}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec. [75]}$$

$$\mu_{deriva} = \frac{exactitud}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec. [76]}$$

B. Incertidumbre de la ordenada en el origen (μ_{Lo})

Esta incertidumbre se obtiene con la desviación estándar de la ordenada en el origen, la cual se encuentra en la ecuación [31].

$$\mu_{Lo} = S_{Lo} \quad \text{Ec. [77]}$$

C. Incertidumbre del coeficiente de regresión (μ_m)

Se calcula con la ecuación [30] de la desviación tipo de la pendiente de la recta:

$$\mu_m = S_m \quad \text{Ec. [78]}$$

3.6.4.7.8 Incertidumbre por Repetibilidad (μ_r)

Esta incertidumbre se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\mu_r = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. [79]}$$

Donde;

s = Desviación estándar de todos los datos para cada nivel de concentración

n = Número de datos.

3.6.4.8 Cálculo de las Incertidumbres de nitritos

3.6.4.8.1 Incertidumbre Expandida

La incertidumbre de expandida del método se determina de la siguiente manera:

$$U = k * u_{\text{método}} \quad \text{Ec. [80]}$$

Donde;

$U_{\text{método}}$ = Incertidumbre estándar combinada

k = factor de cobertura

3.6.4.8.2 Incertidumbre Estándar Combinada ($\mu_{\text{método}}$)

$$\mu_{\text{método}} = \sqrt{\mu_{\text{calEq}}^2 + \mu_R^2 + \mu_{\text{procedimiento}}^2} \quad \text{Ec. [81]}$$

Donde;

μ_{calEq} = Incertidumbre de calibración del equipo

μ_R = Incertidumbre de reproducibilidad

$\mu_{\text{procedimiento}}$ = Incertidumbre del procedimiento o del análisis

3.6.4.8.3 Incertidumbre de Reproducibilidad (μ_R)

Esta incertidumbre se determina de la misma forma que la mostrada en la incertidumbre para los métodos de Cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.

3.6.4.8.4 Incertidumbre del Procedimiento ($\mu_{procedimiento}$)

A. Incertidumbre debida al reactivo de color ($\mu_{React\ color}$)

Es debido al protocolo de ensayo para la preparación del reactivo de color donde intervienen diferentes incertidumbres las que se calcula con la siguiente formula:

$$\mu_{React\ color} = \sqrt{A\mu_w + B\mu_{VRC}} \quad \text{Ec. [82]}$$

Siendo A y B los coeficientes de sensibilidad que se obtuvieron a través de las derivadas parciales de la expresión de concentración $C = \frac{w}{v}$, μ_w la incertidumbre del peso y μ_{VRC} la incertidumbre del volumen de preparación del reactivo de color.

$$\frac{\partial C}{\partial w} = \frac{1}{v} = A \quad \text{Ec. [83]}$$

$$\frac{\partial C}{\partial v} = \frac{w}{v^2} = B \quad \text{Ec. [84]}$$

La contribución del peso a la incertidumbre del reactivo de color se basa en la siguiente expresión:

$$\mu_w = \sqrt{\mu_{Cal}^2 + \mu_{Temperatura}^2 + \mu_{Deriva}^2 + \mu_{Resolución}^2 + \mu_{NS}^2} \quad \text{Ec. [85]}$$

Donde;

μ_{Cal}^2 = Incertidumbre de calibración de la balanza

$\mu_{Temperatura}^2$ = Incertidumbre de la temperatura de la pesada del reactivo.

Se calcula a partir de la ecuación [59], donde X corresponde en este caso a la masa patrón, se tomó igual a 10 g de acuerdo al certificado de calibración.

μ_{Deriva}^2 = Incertidumbre de la deriva de la balanza

$\mu_{Resolución}^2$ = Incertidumbre de la resolución de la balanza

μ_{NS}^2 = Incertidumbre de los reactivos para la preparación del reactivo de color, el cual se determina en base a la desviación estándar de los pesos.

B. Incertidumbre del procedimiento ($\mu_{procedimiento}$)

Para el cálculo de la incertidumbre del procedimiento se involucra las incertidumbres del volumen de muestra tomado ($\mu_{muestra}^2$), y del volumen tomado de reactivo de color ($\mu_{React\ color}^2$), por tanto es igual a:

$$\mu_{procedimiento} = \sqrt{\mu_{muestra}^2 + \mu_{React\ color}^2} \quad \text{Ec. [86]}$$

A partir de la ecuación anterior se obtiene:

$$\mu_{procedimiento} = \sqrt{\left(\mu_{muestra} * \frac{C_{est}}{V_{muestra}}\right)^2 + \left(\mu_{React\ color} * \frac{C_{est}}{V_{React\ color}}\right)^2} \quad \text{Ec. [87]}$$

Donde

C_{est} = Concentración del estándar

$V_{muestra}$ = Volumen tomado de la muestra

$V_{React\ Color}$ = Volumen tomado del reactivo de color

3.6.4.8.5 Incertidumbre de Calibración (μ_{calEq})

Esta incertidumbre se determina de la misma forma que la mostrada en la incertidumbre para los métodos de Cloro libre residual, cromo hexavalente y cromo total.

3.6.4.8.6 Incertidumbre del Material de Referencia

Esta incertidumbre se obtiene de la misma forma que la expuesta en la incertidumbre para los métodos de Cloro libre residual, cromo hexavalente y cromo total.

3.6.4.8.7 Incertidumbre por Linealidad (μ_{FR})

Esta incertidumbre se calcula de la misma forma que la mencionada en la incertidumbre para los métodos de Cloro libre residual, cromo hexavalente y cromo total.

3.7.4.8.8 Incertidumbre por Repetibilidad (μ_r)

Esta incertidumbre se determina de la misma forma que la mostrada en la incertidumbre para los métodos de Cloro libre residual, cromo hexavalente y cromo total.

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos y los resultados de los análisis experimentales se encuentran en el ANEXO B, los mismos que se utilizaron para realizar los cálculos matemáticos y estadísticos en base a los modelos descritos en el apartado 3.6.4 para determinar los contrastes de significación y los parámetros de validación de los métodos.

Para los contrastes de significación se evaluó el material de referencia certificado (MRCs), el material de referencia interno (MRi), el tiempo de medición del reactivo de color y; el volumen de muestra y de reactivo de color.

En lo que respecta a los parámetros de validación de los métodos se determinaron la función de respuesta de linealidad, los límites de detección y cuantificación, el Análisis de varianza simple (ANOVA), la exactitud, la precisión (%CV_r y %CV_R) y finalmente las Incertidumbres expandidas asociadas a cada nivel de concentración.

4.2 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.2.1 CONTRASTES DE SIGNIFICACIÓN

Para evaluar si dos grupos muestrales difieren o no significativamente entre ellos se realizó las pruebas de hipótesis, en base los cálculos del estadístico t de

student para comparación de medias y la prueba F para comparación de varianzas a un nivel de confianza del 95%. Se estableció las hipótesis nula y alternativa para cada prueba, las cuales se presentan a continuación.

Planteamiento de Hipótesis:

- Para la prueba t de student

H_0 : $\mu_1 = \mu_2$. No existe diferencias significativas entre las medias de los grupos muestrales.

H_a : $\mu_1 \neq \mu_2$. Existe diferencias significativas entre las medias de los grupos muestrales.

- Para la prueba F

H_0 : $s_1 = s_2$. No existe diferencias significativas entre las varianzas de los grupos muestrales

H_a : $s_1 \neq s_2$. Existe diferencias significativas entre las varianzas de los materiales de los grupos muestrales

4.2.1.1 Pruebas de significancia del Método de cloro libre residual

4.2.1.1.1 Material de referencia interno comparado con un material de referencia certificado (Anexo B, Tablas: B-3, B-4 y B-5).

Se obtuvieron los valores experimentales del material de referencia certificado (MRCs) y el material de referencia interno (MRi) a una concentración de 0,5 mg/l de cloro libre residual, para la aplicación respectiva de las pruebas de hipótesis.

Los resultados para la prueba t de student demuestran que a un nivel de significancia de 0,05 el valor de t calculado es igual a 4,368; siendo mayor al t de tablas igual a 2,306; por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, es decir que existe diferencias significativas entre las medias del material de referencia interno y material de referencia certificado.

Los resultados para la prueba F indican que a un nivel de confianza del 95% el valor de F calculado, igual a 8,634; es mayor que el F crítico, igual a 6,388; por lo

tanto la diferencia entre las varianzas del material de referencia interno y el material de referencia certificado es significativa, y puede deberse no a errores aleatorios sino a errores sistemáticos.

4.2.1.2 Pruebas de significancia del Método de cromo hexavalente

4.2.1.2.1 Material de referencia interno comparado con un material de referencia certificado (Anexo B, Tablas: B-10, B-11 y B-12).

Se recolectaron 5 datos del material de referencia certificado (MRCs) y el material de referencia interno (MRi) a una concentración de 0,1 mg/L de Cr⁶⁺, para la aplicación de las pruebas t y F

Nótese, que para un nivel de confianza del 95%, el valor calculado de t igual a 1,724 es menor al valor crítico o de tablas, igual a 2,306. En consecuencia se acepta la hipótesis nula de la prueba como verdadera, según la cual no existen diferencias significativas entre los promedios del material de referencia certificado e interno.

Según los resultados, para el estadístico F calculado se obtuvo un valor de 2,268; y para el F de crítico 6,388. Según las hipótesis planteadas, se concluye que no existe significancia entre las varianzas de los materiales de referencia, la diferencia puede ser únicamente debido a efectos aleatorios.

4.2.1.3 Pruebas de significancia para el método de nitritos

4.2.1.3.1 Material de referencia interno comparado con un material de referencia certificado (Anexo B, Tablas: B-21, B-22 y B-23).

Se realizó la prueba t y F para lo cual se obtuvieron datos para el material de referencia interno y para el material de referencia certificado a una concentración de 0,2 mg/l de Nitrógeno de Nitritos.

A partir de los resultados, el valor absoluto del estadístico t calculado, igual a 1,5271; es menor que el t tabulado o valor crítico de dos colas igual a 2,306; para un nivel de confianza de 95%, por consiguiente se acepta la hipótesis nula, no hay

diferencias significativas entre las medias del material de referencia interno y del material de referencia certificado.

Para la prueba F , los resultados obtenidos denotan que el F calculado tiene un valor de 2,2; siendo menor al F crítico igual a 6,388; por tanto se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa. La diferencia entre estos valores se puede deber a errores accidentales.

4.2.1.3.2 Tiempo de medición del reactivo de color (Anexo B, Tablas: B-24 al B-27).

Se efectuaron pruebas utilizando un estándar de 0,05 mg/l de N-NO₂ para establecer el intervalo de tiempo de reacción del reactivo de color en el cual se puede tomar la medida de la muestra a analizar. Los tiempos evaluados fueron 10 minutos, 1 hora y 2 horas.

Se realizó la prueba de significancia utilizando el estadístico t de student para comparar las dos medias de los tiempos de reacción. El tiempo mínimo de reacción según bibliografía es de 10 minutos y el máximo de 2 horas, por lo que se escogieron dos intervalos, siendo el primero entre 10 minutos y 1 hora, y el segundo entre 10 minutos y 2 horas.

Los resultados para el intervalo entre 10 minutos y 1 hora denotan que el valor absoluto del estadístico t calculado, igual a 1,7253; es menor que el t tabulado o valor crítico de dos colas, igual a 2,306. Entonces se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa, no hay diferencias significativas entre medir la muestra a los 10 minutos o a 1 hora.

Para el intervalo entre 10 minutos y 2 horas, los resultados demuestran que a un nivel de significación de 0,05, el valor de t calculado, igual a 2,5560; es mayor al valor de t crítico o de tablas, igual a 2,306, por lo tanto la hipótesis alternativa es verdadera, no se obtiene el mismo resultado si se mide a los 10 minutos que a las 2 horas.

4.2.1.3.3 Volumen de muestra y de reactivo de color (Anexo B, Tablas: B-28 y B-29).

Se determinó el volumen adecuado que se debe tomar para el análisis de la muestra, así como el volumen de reactivo de color que se deber colocar para la medición, a un estándar de 0,05 mg/l de N-NO₂. Se estableció la significancia entre colocar 50 ml de muestra y 2 ml de reactivo de color; y entre tomar 25 ml de muestra más 1 ml de reactivo de color.

Los resultados obtenidos muestran que el valor para el estadístico t calculado es igual a 5,416 y es mayor al *t* de tablas, igual a 2,306; por consiguiente se rechaza la hipótesis nula, es decir que el volumen óptimo de muestra para el análisis de nitritos es de 50 ml y el volumen que se debe agregar de reactivo de color es de 2 ml.

4.2.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

4.2.2.1 Función de Respuesta

Para establecer la función de respuesta de linealidad del método, se elaboró la curva de calibración en base a la experiencia en las pruebas preliminares de la puesta a punto. Se determinó los rangos de concentración mostrados en el literal 3.73.1.1 y se evaluó el coeficiente de regresión lineal, la pendiente de la recta y la ordenada en el origen. En la Tablas: B-1, B-6- B-13 y B-17 del Anexo B se presentan los datos obtenidos para cada uno de los procedimientos de ensayo.

4.2.2.1.1 Función de Respuesta del método de cloro libre residual (Anexo A, Cuadro A-1; Anexo C, Gráfico C-3).

De acuerdo a los resultados obtenidos, para la pendiente se determinó un valor de 0,476, para la intersección al eje 0,024 y para el coeficiente de correlación se un valor de 0,99978, siendo mayor al del objetivo de validación.

Según la gráfica C-3 del Anexo C de la recta de calibración del método, existe una gran relación entre la concentración de cloro libre residual a ser analizado y la señal detectada en el equipo.

4.2.2.1.2 Función de Respuesta del método de cromo hexavalente (Anexo A, Cuadro A-2; Anexo C, Gráfico C-6).

Para la pendiente se determinó un valor de 1,883; para la intersección al eje 0,010 y para el coeficiente de determinación un valor de 0,999906; por lo tanto se acepta la validación para el parámetro de regresión lineal, ya que cumple con el objetivo establecido en $\geq 0,995$. El valor alto de este parámetro, indica que los niveles de concentración escogidos fueron los adecuados, es decir que existe una excelente relación entre la concentración del estándar medido de cromo hexavalente y la respuesta del equipo en forma de absorbancia como se puede observar en el grafico C-6 del Anexo C.

4.2.2.1.3 Función de Respuesta del método de cromo total (Anexo A, Cuadro A-3; Anexo C, Gráfico C-9).

Según los resultados obtenidos, la pendiente obtuvo un valor de 1,773, la intersección al eje 0,025 y el coeficiente de correlación lineal fue igual a 0,999958, siendo mayor al del objetivo establecido, por lo tanto cumple con la validación para este método. El valor cercano a 1 refleja que existe una gran relación de función de respuesta del método entre la concentración nominal de cromo total y la absorbancia del equipo, como se puede verificar en la curva de calibración del método presentado en el grafico C-9 del Anexo C.

4.2.2.1.4 Función de Respuesta del método de nitritos (Anexo A, Cuadro A-4; Anexo C, Gráfico C-12).

Se calculó un valor de 3,666 para la pendiente, de 0,08 para la intersección al eje y de 0,09993 para el coeficiente de correlación de la recta de calibración, por lo que se acepta el coeficiente al ser mayor al objetivo establecido para la validación. Esto demuestra que existe una excelente entre la concentración del estándar medido y la respuesta en absorbancia del método utilizado, lo cual se

puede verificar en la recta de la curva de calibración presentada en el gráfico C-12 del Anexo C.

4.2.2.2 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

El límite de detección fue calculado mediante el valor de la desviación estándar de 15 medidas de los blancos multiplicado por tres, la cual se encuentra en la ecuación [36].

El límite de cuantificación se determinó experimentalmente en base al análisis del porcentaje de recuperación de los niveles de concentración, el cual debió estar entre el límite de 85 al 115%.

4.2.2.2.1 Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método de cloro libre residual (Anexo D, Tabla D-1).

Para determinar el límite de cuantificación se evaluó la recuperación en las concentraciones de 0,1, 0,2 y 0,25 mg/l. Para 0,2 mg/l se encontró una recuperación de 86,40%, pero como la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 108:2006 "Agua Potable. Requisitos" establece que el límite máximo permisible es de 0,3 a 1,5 mg/l, se escogió la concentración de 0,25 mg/l donde se obtuvo una recuperación del 94,87%; pudiendo ser usado de forma confiable como límite inferior del rango de concentraciones validado. Para el límite de detección se determinó un valor de 0,013 mg/l.

4.2.2.2.2 Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método de cromo hexavalente (Anexo D, Tabla D-7).

Los resultados de los estándares denotan que a 0,01 mg/l se obtuvo una recuperación del 84,08%, mientras que a una concentración de 0,02 mg/l se encontró una recuperación de 104,01%, por lo que cumple con el objetivo de validación y por tanto puede ser usado como límite de cuantificación del método. Para el límite de detección se estableció un valor de 0,003 mg/l.

4.2.2.2.3 Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método de cromo total (Anexo D, Tabla D-15).

De acuerdo a los resultados presentados, la recuperación en 0,02 mg/l es igual a 87,83%, el cual se encuentra en el límite del rango permitido, que se estableció desde 85 hasta 115%, pero no pudo ser determinado como límite de cuantificación, porque a concentraciones bajas las medidas tomadas son muy inestables, por lo que se escogió la concentración de 0,03 mg/l al tener una recuperación del 97,02%. El límite de detección se obtuvo un valor de 0,009 mg/l.

4.2.2.2.4 Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método de nitritos (Anexo D, Tabla D-23).

A una concentración de 0,005 mg/l de Nitrógeno de nitritos se obtuvo una recuperación del 68,08%, mientras que para el nivel 0,01 mg/l se calculó una recuperación del 91,32%. De tal modo, se acepta la concentración de 0,01 mg/l como límite de cuantificación del método, ya que dicho valor se encuentra dentro del rango permitido del 85 al 115%. Según el cálculo para el límite de detección se determinó un valor de 0,0004 mg/l.

4.2.2.3 Análisis de Varianza Simple

El primer análisis que se efectuó fue el test de Cochran para evaluar la calidad analítica de los datos, mediante la comprobación de la homogeneidad de varianzas. Este es un supuesto importante para poder aplicar el análisis de varianza simple a un conjunto de muestras. Las hipótesis nula y alternativa se encuentran a continuación.

Planteamiento de Hipótesis para el Test de Cochran

H_0 : Existe homogeneidad de varianzas de los grupos muestrales de los diferentes niveles de concentración.

H_a : Existe heterogeneidad de varianzas de los grupos muestrales de los diferentes niveles de concentración.

Demostrada la homogeneidad de varianzas se procedió a la determinación del análisis de varianza simple para un factor (ANOVA) de los resultados obtenidos de cada nivel de estudio y de la muestra real, para la obtención del coeficiente de variación de repetibilidad (%CV_r) y del coeficiente de variación de reproducibilidad (% CV_R); y para el posterior cálculo de magnitudes para la determinación de las incertidumbres. Se estableció las hipótesis para la evaluación de los resultados, los cuales se presentan a continuación.

Planteamiento de Hipótesis para la prueba ANOVA

H₀: No existe diferencias significativas en las varianzas de los grupos muestrales de los diferentes niveles de concentración.

H_a: Existe diferencias significativas en las varianzas de los grupos muestrales de los diferentes niveles de concentración.

4.2.2.3.1 Análisis de Varianza Simple para el método de cloro libre residual (Anexo E, Tabla E-1).

Los resultados para el Test de Cochran indican que los valores para el G calculado son menores que para el G crítico o de tablas igual a 0,683; esto permite aceptar la hipótesis nula, donde las varianzas de los grupos muestrales pueden suponerse homogéneos.

En el Análisis de varianza simple, los resultados del F calculado fueron menores al valor de F crítico igual a 3,478; por tanto los grupos muestrales son homogéneos en todos los niveles de concentración dentro del rango validado, es decir que no existe diferencias significativas entre las varianzas de los mismos.

4.2.2.3.2 Análisis de Varianza Simple del método de cromo hexavalente (Anexo E, Tabla E-2).

Según los resultados de las concentraciones analizadas, los valores del G calculado fueron menores al valor de G de tablas igual a 0,683. De este modo se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa, es decir que las varianzas de

los grupos muestrales de los diferentes niveles son homogéneas, cumpliendo con el requisito necesario para la aplicación del análisis ANOVA.

Los resultados de la prueba F , denotan que para todos los niveles de concentración el valor de F calculado es menor al F crítico o de tablas, por consiguiente se acepta la hipótesis nula como verdadera, es decir que no existe diferencia significativas entre las varianzas de los grupos muestrales, ya que los mismos son homogéneos.

4.2.2.3.3 Análisis de Varianza Simple del método de cromo total (Anexo E, Tabla E-3).

A nivel de confianza del 95% los valores obtenidos del estadístico G calculado son menores que el G de tablas igual a 0,683; a lo cual se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa. Las varianzas de los grupos muestrales pueden suponerse homogéneos, por lo que se puede aplicar la prueba de ANOVA para la determinación de la precisión del método.

Como se observa en la tabla, los valores de F calculados en los niveles de concentración son menores que el valor de F tabulado o valor crítico, igual a 3,478; por lo tanto no existen diferencias significativas entre las precisiones de los análisis de diferentes días para una probabilidad de 5%.

4.2.2.3.4 Análisis de Varianza Simple del método de Nitritos (Anexo E, Tabla E-4).

A partir de los valores calculados, se puede señalar que los valores de G obtenidos para todos los niveles de estudio son menores al G crítico o de tablas igual a 0,683; esto admite aceptar la hipótesis nula, donde las varianzas de los grupos muestrales son homogéneos y pueden utilizarse en el análisis ANOVA.

Nótese que para la prueba de ANOVA, a un nivel de confianza del 95% el valor de F calculado es menor al valor de F crítico igual a 3,478; y por tanto los grupos muestrales son homogéneos para todos los niveles de estudio dentro del rango

validado, es decir que no existe diferencias significativas entre las varianzas de los mismos.

4.2.2.4 Exactitud y Precisión

Para evaluar la exactitud del método se determinó el porcentaje de recuperación con la ecuación [38], en los 5 niveles de concentración, así como de una adición de un estándar conocido a una matriz real.

En el Anexo D se encuentran las concentraciones obtenidas y los porcentajes de recuperación de los métodos en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad

La precisión se determinó a partir del análisis ANOVA y con esto se calculó las desviaciones estándar de repetibilidad S_r y reproducibilidad S_R , el coeficiente de variación por repetibilidad ($\%CV_r$) y por reproducibilidad ($\%CV_R$) para cada método de análisis y de los diferentes niveles de concentración.

4.2.2.4.1 Exactitud y Precisión del método de cloro libre residual (Anexo D, Tablas: D-4, D-5 y D-6).

Para determinar la exactitud de la matriz real se añadió a la muestra de agua potable un estándar conocido de 1mg/l de Cl_2 . Los resultados obtenidos en la tabla D-4 de los cinco estándares, denotan que los valores se encuentran entre el 95 al 105%, por lo tanto cumplen con el objetivo establecido para la validación, al encontrarse los datos en el rango del 85% al 115%. En las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 mg/l el porcentaje de error es de aproximadamente 4%, esto revela que existe una baja exactitud en relación a las demás concentraciones. Para el análisis del efecto matriz (Tabla D-5), se encontró una recuperación promedio del 95,04%, el cual indica que la exactitud es alta para este analito debido a la inestabilidad del mismo.

En la Tabla D-6, se observa que la precisión en condiciones de repetibilidad no varía con la precisión en condiciones de reproducibilidad, ya que los estándares se preparaban cada día y las 3 repeticiones se midieron al mismo tiempo, por las condiciones de inestabilidad del estándar. En la concentración de 0,25 mg/l se obtiene un valor para CV_R de 4,16%, esto indica que existe una baja precisión.

Dicho lo anterior se puede notar que para cada nivel de concentración se cumplió con los objetivos de validación, ya que los porcentajes de los coeficientes son menores al 5%.

4.2.2.4.2 Exactitud y Precisión del método de cromo hexavalente (Anexo D, Tablas: D-11 a D-14).

Para determinar la recuperación del efecto matriz se colocó a la muestra de agua residual de la empresa Ideal Alabrec un estándar conocido de 0,1 mg/l de Cr⁶⁺. Los resultados obtenidos en las Tablas D-11 y D-12 denotan que los valores se encuentran entre el 95 y 105%, por lo tanto cumplen con el objetivo establecido para la validación, al encontrarse datos en el rango del 85% al 115%. Se observa que en la concentración de 0,02 mg/l la recuperación es de 94,40%, señalando que la exactitud es baja, mientras que para las demás concentraciones la exactitud es alta al encontrarse cerca del 100%, mientras que para la matriz real (Tabla D-13) se determinó un valor de 99,77%, el cual quiere decir que la exactitud real es alta para este analito.

Según los resultados de la Tabla D-14 la precisión de repetibilidad no difiere considerablemente con la precisión de reproducibilidad. Los valores 3,59% y 4,22%, demuestran que en la concentración de 0,02 mg/l existe baja precisión por lo que se encuentra cerca del límite establecido en 5% para la validación en esos parámetros. En las demás concentraciones se puede observar que la precisión es baja, por lo tanto para cada nivel de concentración se cumplió con los objetivos de validación.

4.2.2.4.3 Exactitud y Precisión del método de cromo total (Anexo D, Tablas: D-19 a D-22).

Para evaluar la recuperación de una muestra real agregó un estándar conocido de 0,05 mg/l de cromo total a la matriz de agua clara. Los resultados obtenidos en las Tablas D-19 y D-20, denotan que los valores se encuentran entre el 95 al 105%, por lo tanto cumplen con el objetivo establecido para la validación, al encontrarse datos en el rango del 85% al 115%, además que el máximo error es del 2,98%, por lo tanto la exactitud es alta para todos los niveles de concentración de este

método. Se observa que para la exactitud real (Tabla D-21) la recuperación promedio es de 98,54 %, de esta forma se acepta la validación para este método en dicho parámetro.

En el límite de cuantificación 0,03 mg/l se puede observar que los porcentajes de los coeficientes de variación son altos, por lo que la precisión para este nivel es baja, pero por encontrarse dentro del objetivo establecido que fue del 10% (Tabla D-22), cumple con la validación fijada para estos parámetros dentro del rango de 0,03 hasta 100 mg/l.

4.2.2.4.4 Exactitud y Precisión del método de nitritos (Anexo D, Tablas: D-27 a D-30).

Para determinar la recuperación de una matriz real se añadió a la muestra de agua residual un estándar conocido de 0,05 mg/l de N-NO₂. Los resultados obtenidos en las Tablas D-27 y D-28 de los cinco estándares, demuestran que las recuperaciones ingresan dentro del rango establecido en el objetivo de este método. Para 0,01 mg/l se encontró un valor de 93,2%, es decir que la exactitud es baja, pero se si considera este nivel porque además de ingresar en la curva de calibración, es el límite de cuantificación del método y según el Texto Unificado de Legislación Secundaria (Libro VI, Anexo 1, Tabla 4) el límite máximo permisible para agua dulce es de 0,0182 mg/l, y la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 108:2006 “Agua Potable. Requisitos” establece que agua potable debe existir ausencia de nitritos. Nótese que para la muestra real (Tabla D-29) la exactitud promedio es de 96,04 %, lo que indica que la exactitud es alta para este analito.

Los valores presentados en la Tabla D-30, indican que para cada nivel de concentración se cumplió con los objetivos de validación, ya que los porcentajes de los coeficientes de variación de repetibilidad y de reproducibilidad son menores al 5%. Las mejores precisiones de encontraron en las concentraciones de 0,5; 10 y 100 mg/l.

A. Tratamiento de interferencias por análisis del color de la muestra (Anexo D, Tablas: D-31 a D-35).

Se determinó que la principal interferencia para el análisis de nitritos es la intensidad de color, ya que esta causa un cambio drástico en el tono de la muestra al colocar el reactivo NED y se vea afectada en el cálculo de la concentración. Se evaluó el porcentaje de recuperación de las muestras de color amarillo, azul, negro, rojo y verde a concentraciones de 0,02 y 0,2 mg/l, para lo cual se tomó en cuenta la frecuencia en que las matrices ingresan al laboratorio y el origen de la misma.

En la Tabla D-31 del color amarillo se puede observar que, para una concentración de 0,02 mg/l la escala de color máxima que se puede leer es hasta 500 Pt-Co, donde se obtuvo una recuperación de 113,85%, pero para obtener una exactitud alta la concentración de color adecuada es de 120 Pt-Co; al contrario que para 0,2 mg/l tolera una escala de 500 Pt-Co o más, ya que se encontró un error del 3,85%.

En lo que se refiere al color azul (Tabla D-32), para obtener resultados confiables en la concentración de 0,02 mg/l se puede leer hasta un color de 11 Pt-Co donde se obtuvo una error del 5,25%, el cual es tolerable para este tipo de muestras. Para la concentración de 0,2mg/l se puede leer hasta un color de 30 Pt-Co, ya que se estableció una recuperación 99,89%, el cual indica una exactitud alta para este tipo de matriz.

En el análisis del color negro (Tabla D-34), en la concentración de 0,02 mg/l se encontró una recuperación de 96,12% a una escala de 30 Pt-Co, por lo tanto los resultados son confiables. Consecuentemente a una concentración 0,2 mg/l se puede leer hasta un color de 60 Pt-Co, ya que se obtuvo una recuperación de 98,67%.

Nótese que para el color rojo (Tabla D-34), se obtuvo una recuperación de 97,48 % y 101,53% en las concentraciones de 0,02 y 0,2 mg/l respectivamente, por lo tanto para obtener buenos resultados las muestras con color rojo se debe leer a escalas de color inferiores a 15 Pt-Co.

De los resultados obtenidos en la Tabla D-35 para el análisis del color verde, para las dos concentraciones analizadas, la escala de color óptima para obtener valores verdaderos es de 300 Pt-Co, ya que se obtienen recuperaciones de

100,21 y 100,44% respectivamente. Dicho esto se puede corroborar que la interferencia por color verde casi no repercute en el resultado final de la muestra.

4.2.2.5 Incertidumbre

La incertidumbres expandidas de los métodos se calcularon con base en el literal 3.6.4.7; y en la elaboración de los respectivos diagramas de Ishikawa (causa - efecto) para identificar todas las posibles fuentes de incertidumbre de los procedimientos de ensayo.

4.2.2.5.1 Incertidumbre del método de cloro libre residual (Anexo F, Tablas: F-1 a F-8).

Los resultados de la Tabla F-8, demuestran que las incertidumbres expandidas o de uso se encuentran dentro del valor establecido en el objetivo de validación, $\leq 15\%$. La incertidumbre más alta fue la del nivel 0,25 mg/l, obteniéndose un 10%, esto se puede justificar en el hecho de que el cloro libre es volátil e inestable a concentraciones menores y que la medida se debe ser al momento de la toma de la muestra.

4.2.2.5.2 Incertidumbre del método de cromo hexavalente (Anexo F, Tablas: F-9 a F-17).

Los valores obtenidos de las incertidumbre expandidas (Tabla F- 17) en cada nivel de concentración, se encuentran dentro del rango establecido, menor al 20%, por tal razón se acepta la validación del método para este parámetro. La incertidumbre más alta fue la de 0,02 mg/l, esto se corrobora con los resultados de exactitud y precisión que fueron bajos, es decir que es directamente proporcional a los parámetros mencionados.

4.2.2.5.3 Incertidumbre del método de cromo total (Anexo F, Tablas: F-18 a F-26).

Se puede observar en la Tabla F-26 que los resultados demuestran que las incertidumbres para el rango de concentración de 0,03 a 100 mg/l se encuentran dentro del valor establecido en el objetivo, $\leq 20\%$, por lo tanto se acepta la

validación para este parámetro. Como en la concentración de 0,03 mg/l se encontró una alta incertidumbre se deduce que es por las mismas razones que se mencionaron en el método de cromo hexavalente.

4.2.2.5.4 Incertidumbre del método de nitritos (Anexo F, Tablas: F-27 a F-36).

De acuerdo a los datos de la Tabla F-36 la incertidumbre expandida en cada nivel de concentración, se encuentran dentro del valor establecido, menor al 25%. En las concentraciones de 0,01 y 5 mg/l se encontraron incertidumbres de 20,61 y 20,20 % respectivamente, pero de igual forma se acepta la validación de método de análisis de nitrógeno de nitritos.

Al haberse efectuado todos los cálculos matemáticos y estadísticos para los parámetros de desempeño de los métodos, la validación para los análisis de Cloro libre residual, Cromo hexavalente, Cromo total y Nitritos son aceptados para posteriores ensayos y la acreditación correspondiente en el organismo competente.

El informe final y declaración de validación del método se entregó al CICAM, de acuerdo al formato especificado en el manual de Calidad. Este formato resume los resultados más relevantes para la validación, los mismos que se encuentran en el Anexo A.

4.3 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS

Según los cálculos realizados y la discusión presentada en el literal 4.2.3, se acepta la hipótesis nula, la cual indica que el resultado del análisis de la respuesta experimental de los niveles de concentración del método demuestra que existe homogeneidad entre los grupos muestrales.

Esto permitió determinar los parámetros de validación y las incertidumbres de los métodos, empleados en el análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos, en muestras de aguas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se validaron los métodos analíticos empleados en el análisis de muestras de aguas claras y residuales, utilizando espectrofotometría visible, en el Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) de la Escuela Politécnica Nacional. Esto permitió desarrollar el procedimiento de ensayo más adecuado para la determinación de: cloro libre residual por el método DPD colorimétrico, cromo hexavalente por el método de la 1,5 Difenilcarbohidracida, cromo total por el método de la reducción alcalina del ion hipobromito y nitrógeno de nitritos por el método de diazotización, con lo cual se cumplieron con los objetivos impuestos y por consiguiente se aceptó la validación para los métodos mencionados.
- Se modificaron los procedimientos de ensayo 8021, 8023 y 8024 del manual de Análisis de aguas de HACH company y 4500-NO₂⁻ B del Stándar Methods for the examination water and wastewater, con el propósito de adecuarlos a las condiciones de laboratorio en cuanto a la utilización de materiales y equipos. Para tener almacenado el programa para la determinación de nitrógeno de nitritos se utilizó el espectrofotómetro HACH DR 2800, ya que cumple con las especificaciones mencionadas en el protocolo de análisis, el cual menciona un fotómetro de filtro con un recorrido de 1 cm o más y una longitud de onda de aplicación de 543 nm. Los procedimientos de ensayo se ajustaron a las condiciones ambientales del laboratorio, donde la variación no es muy alta,

registrándose temperaturas entre 15 y 22°C. Finalmente se determinaron la forma y los tiempos de agitación para la disolución de los sobres reactivos basándose en los porcentajes de recuperación de los ensayos realizados. En el método de cloro libre residual se estableció que la agitación debe ser manual y en un tiempo de 20 segundos a 1 minuto, en el método de cromo hexavalente se determinó que la agitación debe ser manual y en un tiempo de 45 segundos a 1 minuto y; en el método de cromo total los reactivos Chromium 1, Chromium 2 y el Acid Reagent pueden ser disueltos con la ayuda del ultrasonido.

- Se estableció el tratamiento adecuado para las muestras de agua, dando un seguimiento desde su origen, muestreo y almacenamiento. En los métodos de cloro libre residual y cromo total no se eliminaron interferencias, ya que se trabajaron con muestras de agua potable colectadas de la red del cantón Rumiñahui. En el método de cromo hexavalente se ajustó la muestra de agua residual a un pH entre 4 -7 y se filtró porque contenía sólidos suspendidos y sedimentables. En el análisis de nitrógeno de nitritos se eliminó la interferencia por sólidos suspendidos filtrando y por color realizando diluciones de modo que el porcentaje de error sea minimizado. Se analizaron los colores amarillo, azul, negro, rojo y verde a concentraciones 0,02 mg/l y 0,2mg/l, estableciéndose la escala de color óptima para una tener confiabilidad en los resultados y en la calidad del ensayo.
- Se determinaron los parámetros analíticos para la validación de los métodos. La función de respuesta obtuvo un coeficiente de correlación para cloro libre residual, igual a 0,99978, para cromo hexavalente, igual a 0,9999067, para cromo total, igual a 0,999958 y para nitrógeno de nitritos, igual a 0,99993, estableciéndose así la linealidad en el intervalo trabajo. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,013 y 0,25 mg/l para el método de cloro libre residual; 0,003 y 0,02 mg/l para el método de cromo hexavalente; 0,009 y 0,03 mg/l para el método de cromo total y; 0,0004 y 0,01 mg/l para el método de nitrógeno de nitritos. Los métodos demostraron poseer una exactitud que cumple con los objetivos planteados

previamente tanto en los estándares como sobre matrices reales. Sobre estándares la exactitud fue de 96,3 a 104,6 % para Cloro libre residual; de 94,3 a 100,14% para Cromo hexavalente; de 97,02 a 100,31% y de 93,2 a 103,9% para Nitrógeno de nitritos. Sobre matrices reales se obtuvo una recuperación de 95,04% para cloro libre residual; 99,77% para cromo hexavalente; 98,54% para cromo tal y 96,04% para Nitrógeno de nitritos. Los coeficientes de variación de repetibilidad y reproducibilidad se determinaron para cada nivel de concentración en base al Análisis de Varianza Simple de un factor (ANOVA). La precisión de los métodos de cloro libre residual, Cromo hexavalente y Nitritos fueron menores al 5% y del método de Cromo Total menor al 10%, por lo que se ajustan al objetivo de validación establecido. Se encontraron valores de la incertidumbre expandida o de uso de 2,21 a 10% para el análisis de cloro libre residual; de 3,22 a 18,83% para cromo hexavalente; de 4,33 a 17,80 % para cromo total y de 5,17 a 20,61% para la determinación de nitrógeno de nitritos. Por lo tanto los resultados de la incertidumbre cumplen con los objetivos establecidos para aceptar la validación de los métodos analíticos mencionados anteriormente.

- Los contrastes de significación se efectuaron para aceptar o rechazar las hipótesis nulas y alternativas propuestas mediante el cálculo de los estadísticos t y F respectivamente. Los valores experimentales calculados con ayuda de Excel, no superaron los valores críticos, excepto para el método de cloro libre residual y para la evaluación del volumen de muestra para el análisis de nitrógeno de nitritos. Esto permitió probar que aun nivel del 95% las diferencias entre las medias muestrales y las varianzas muestrales, no fueron significativas, es decir que la diferencia entre ellos pudo atribuirse a errores aleatorios y no sistemáticos. De los resultados obtenidos en las pruebas de significación realizados en las pruebas previas en cuanto a la puesta a punto del método, se estableció lo siguiente: En el método de cloro libre residual para la comparación de un MRCs y un MRi a una concentración de 0,5 mg/l presentó diferencias significativas, por lo tanto, el MRi no puede ser utilizado para la posterior verificación del método. Para el método de cromo hexavalente el MRCs y el MRi tuvieron

la misma precisión por lo que no existe diferencias significativas y puede ser utilizado para el control de calidad del método. En la determinación de nitrógeno de nitritos, en el análisis de variabilidad entre el MRCs y el MRI se estableció que no existe diferencias significativas entre dichos estándares. En el ensayo del tiempo de reacción para el desarrollo de color de la muestra se obtiene el mismo resultado midiendo a los 10 minutos o a 1 hora. Para el volumen de muestra a analizar se debe coleccionar 50 ml y colocar 2 ml de reactivo de color, ya que existe significancia con 25 ml de muestra y 1 ml de reactivo de color.

- Se realizaron el test de Cochran y la prueba de ANOVA para establecer la uniformidad de los 15 datos de cada nivel de concentración y la significancia entre ellos utilizando la prueba F para comparación de varianzas a un nivel de confianza del 95%. Se planteó las hipótesis nula y alternativa para todos los métodos y de esta forma se evaluó que para que la validación sea aceptada debe haber homogeneidad entre la repetibilidad y reproducibilidad, es decir no debe existir diferencias significativas entre las varianzas de los grupos muestrales, caso contrario el método tiene que afinarse y buscar la fuente o fuentes de error y rediseñar el tratamiento estadístico.
- En base a los datos obtenidos y a los cálculos estadísticos y matemáticos efectuados se generó el registro documental de los procedimientos de validación, procedimientos de ensayo y calibración de los métodos con el fin de proveer al CICAM de evidencia objetiva que le permita demostrar el cumplimiento de los requisitos particulares, que servirán como soporte para la defensa en las auditorías internas y externas, para los trámites respectivos en la acreditación de los parámetros y para la mejora continua del Sistema de Gestión de calidad del laboratorio.

5.2 RECOMENDACIONES

- Es importante que para obtener resultados más confiables y exactos se deba ingresar la recta de calibración y realizar las verificaciones periódicas del equipo portátil para análisis de cloro libre residual.
- El método de nitritos por ser inestable a concentraciones bajas, se recomienda que el reactivo de color se prepare por lo mínimo cada 15 días
- Se recomienda que para cada uno de los análisis se mida el volumen de muestra usando material volumétrico, ya que el aforo de las celdas del espectrofotómetro no es exacta y se puede cometer errores sistemáticos si se toma en cuenta dicha medida.
- Dada la toxicidad de los metales cromo VI y Cromo III; y del ion nitrito, es importante realizar planes de tratamiento de las muestras que contengan altas concentraciones de estos elementos con el fin de reducir el impacto ambiental al ecosistema.
- Es importante realizar verificaciones periódicas a fin de controlar la estabilidad de los métodos en función del tiempo y seguir con la mejora continua del Sistema de Calidad que implementó en CICAM.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1 DATOS INFORMATIVOS.

Título: “Determinación del costo de los ensayos de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos, en muestras de aguas claras y residuales”

Ejecutor: Egdo. Aníbal Javier Macas Acurio

Ubicación: Escuela Politécnica Nacional – Quito- Ecuador

Beneficiarios: Escuela Politécnica Nacional – Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM)

Tiempo estimado para la ejecución: Noviembre 2010 – Julio 2011

Equipo técnico responsable: Egdo. Aníbal Macas, Dr. Roman Rodríguez e Ing. Carola Fierro

Costo: USD 2005,60

6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

Uno de los componentes más importantes de la biosfera, es el recurso hídrico. El agua es un compuesto con características únicas, de gran significación para la vida, el más abundante en la naturaleza, y determinante en los procesos físicos, químicos y biológicos que gobiernan el medio natural (Sánchez, 2010).

El agua es un recurso natural y vital, el mismo que en la actualidad está siendo contaminado a causa de las actividades indiscriminadas que realiza el hombre, con lo que ha aumentado la demanda de análisis de la misma. La necesidad de cumplir con las normativas nacionales e internacionales en todas las áreas de análisis, nos lleva a implementar y desarrollar metodologías acorde a la situación del laboratorio que lo va a realizar y a la exigencia del cliente para así garantizar y mantener la calidad de los resultados y por ende tener competencia en el mercado.

Por lo tanto para cumplir con los estándares nacionales e internacionales es necesario validar todos los métodos que realiza un laboratorio, para conocer los rangos de aplicación y el alcance que tiene el mismo. Esto involucra que se debe contar el personal idóneo, con los equipos adecuados, con el material debidamente calibrado y con los reactivos con un alto grado analítico.

El CICAM cuenta con una amplia bibliografía documental y electrónica, que es de uso confidencial y exclusivo para el personal que labora en el laboratorio, el cual fue la base para la investigación y el desarrollo de metodologías para la validación de los procedimientos ensayo en el análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos

6.3 JUSTIFICACIÓN

En los últimos tiempos se ha expandido el campo de la química analítica y por lo tanto ha aumentado la demanda de los análisis físico-químicos, gran parte de esto se atribuye a la concientización del hombre en reducir los impactos ambientales que están ocurriendo en el ecosistema y a la imposición de los organismos gubernamentales en exigir que se cumplan las ordenanzas y normas de calidad ambiental en las empresas que involucren actividades que conlleven a la explotación o al procesamiento de recursos naturales.

La ley de Gestión Ambiental, promulgada el 10 de septiembre del 2004 por el Congreso nacional es la que establece los principios y directrices de política ambiental; determina las obligaciones, responsabilidades, niveles de

participación de los sectores público y privado en la gestión ambiental y señala los límites permisibles, controles y sanciones en esta materia.

El CICAM siendo un laboratorio acreditado bajo la norma ISO 17025:2006 y que provee sus servicios a la colectividad tiene como objetivo manejar un sistema de gestión en base a las políticas de calidad, realizando análisis con responsabilidad y brindando resultados confiables, para que el consumidor tenga la certeza de tomar la mejor decisión para la disposición final de las aguas evaluadas.

De esta forma este proyecto conllevaría a determinar el valor de los análisis para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos para proponer una mejor oferta a los potenciales clientes y ganar más terreno en el mercado del análisis ambiental.

6.4 OBJETIVOS

6.4.1 Objetivo General

- Determinar el costo de los ensayos de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos, en muestras de aguas claras y residuales.

6.4.2 Objetivos Específicos

- Establecer los procedimientos de ensayo validados para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos en muestras de agua.
- Determinar los componentes para la realización del análisis de costos de los procedimientos de ensayo.
- Calcular los costos de ensayo de los análisis de los métodos.

6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

El proyecto de investigación es de tipo técnico y analítico, debido a que se utilizaron técnicas instrumentales, criterios ambientales y herramientas estadísticas para la validación de los métodos de cloro libre residual, cromo hexavalente y nitritos, para de esta forma mejorar el Sistema de Gestión de Calidad del CICAM extendiendo el alcance de acreditación.

La validación de los parámetros anteriormente mencionados es factible siendo de carácter socioeconómico y ambiental ya que esto conllevará a que el CICAM mejore rotundamente la calidad de sus ensayos para la posterior toma de decisiones de parte del cliente y este obligado en acreditar los métodos que están en proceso de implementación y validación.

A continuación se detalla los costos de los ensayos para el análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos.

Tabla N° 13. Costos del ensayo para la determinación de cloro libre residual.

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO/ENSAYO (USD)
INSUMOS Y MATERIALES			
Reactivo DPD Free Chlorine	sobre	1	0,3
Envase de plástico 50 ml.	unidad	1	0,2
Otros	ensayo	1	0,12
MAQUINARIAS Y EQUIPOS			
Espectrofotómetro DR 2800		1	0,38
Mano de Obra		1	0,32
SERVICIOS BÁSICOS			
Agua	ml	100	0,0001
Luz	min	5	0,01
IMPUESTOS			
I.V.A (12%)			1,18
Impuesto a la renta			0,36
COSTO TOTAL DEL ANÁLISIS			2,87

Elaborado por: Javier Macas.

Tabla N° 14. Costos del ensayo para la determinación de cromo hexavalente.

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO/ENSAYO (USD)
INSUMOS Y MATERIALES			
Reactivo Chromaver 3	sobre	1	0,54
Envase de plástico	unidad	1	0,5
Ácido nítrico	ml	2	0,4
Otros	ensayo	1	0,16
MAQUINARIAS Y EQUIPOS			
Espectrofotómetro DR 2800		1	0,63
Mano de Obra		1	0,32
SERVICIOS BÁSICOS			
Agua	ml	500	0,0005
Luz	min	5	0,02
IMPUESTOS			
I.V.A (12%)			1,07
Impuesto a la renta			0,36
COSTO TOTAL DEL ANÁLISIS			3,98

Elaborado por: Javier Macas

Tabla N° 15. Costos del ensayo para la determinación de cromo total.

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO/ENSAYO (USD)
INSUMOS Y MATERIALES			
Reactivo Chromium 1	sobre	1	0,38
Reactivo Chromium 2	sobre	1	0,38
Reactivo Acid Reagent	sobre	1	0,46
Reactivo Chromaver 3	sobre	1	0,54
Envase de plástico	unidad	1	0,50
Ácido nítrico	ml	2	0,40
Otros	ensayo	1	0,17
MAQUINARIAS Y EQUIPOS			
Espectrofotómetro DR 2800		1	0,63
Plancha de calentamiento		1	0,02
Mano de Obra		1	0,32

Tabla N° 15. Costos del ensayo para la determinación de cromo total.

Continuación...

SERVICIOS BÁSICOS			
Agua	ml	500	0,0010
Luz	min	5	0,05
IMPUESTOS			
I.V.A (12%)			0,91
Impuesto a la renta			0,36
COSTO TOTAL DEL ANÁLISIS			5,12

Elaborado por: Javier Macas

Tabla N° 16. Costos del ensayo para la determinación de nitritos.

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO/ENSAYO (USD)
INSUMOS Y MATERIALES			
Sulfanilamida	sobre	1	0,80
Ácido fosfórico	sobre	1	0,50
N-(1-naftil) etilendiamina dihidroclorada	sobre	1	2,50
Envase de plástico	sobre	1	0,50
Otros	unidad	1	0,14
MAQUINARIAS Y EQUIPOS			
Espectrofotómetro DR 2800		1	0,47
Mano de Obra		1	0,32
SERVICIOS BÁSICOS			
Agua	ml	500	0,0021
Luz	min	5	0,05
IMPUESTOS			
I.V.A (12%)			0,76
Impuesto a la renta			0,36
COSTO TOTAL DEL ANÁLISIS			6,40

Elaborado por: Javier Macas

6.6 FUNDAMENTACIÓN

Durante 25 años, las normas más importantes a nivel internacional para conseguir la acreditación de laboratorios han sido las sucesivas ediciones de la Guía ISO 25, más tarde la Guía ISO/IEC 25 “Requisitos generales para la competencia técnica de los laboratorios de análisis”, y después la norma Europea EN 45001 “Criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de análisis”. Estos documentos han sido remplazados en 1999 por la norma ISO/IEC 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” (INTI, 2010).

La ISO 17025 contiene los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración para demostrar la competencia de generar resultados técnicamente válidos. Se establecen los requisitos necesarios para una gestión sólida de las actividades de calidad, administración y los requisitos para la competencia técnica en los ensayos y calibraciones que realiza el laboratorio.

El laboratorio de ensayo y de calibración a ser evaluado debe contar con:

- Instalaciones adecuadas
- Instrumentos calibrados
- Participación regular en programas de ensayos de aptitud o comparaciones interlaboratorios
- Personal calificado
- Sistema de gestión de la calidad implementado, que incluya procesos de mejora continua y auditorias periódicas (OGA, 2006)

La acreditación beneficia a los laboratorios permitiéndoles determinar si están efectuando su trabajo correctamente y de acuerdo a las normas apropiadas, y les provee un punto de referencia para mantener la competencia. Una evaluación regular por un organismo de acreditación revisa todos los aspectos de las operaciones de un laboratorio relacionadas con la emisión, de forma permanente, de resultados adecuados y confiables.

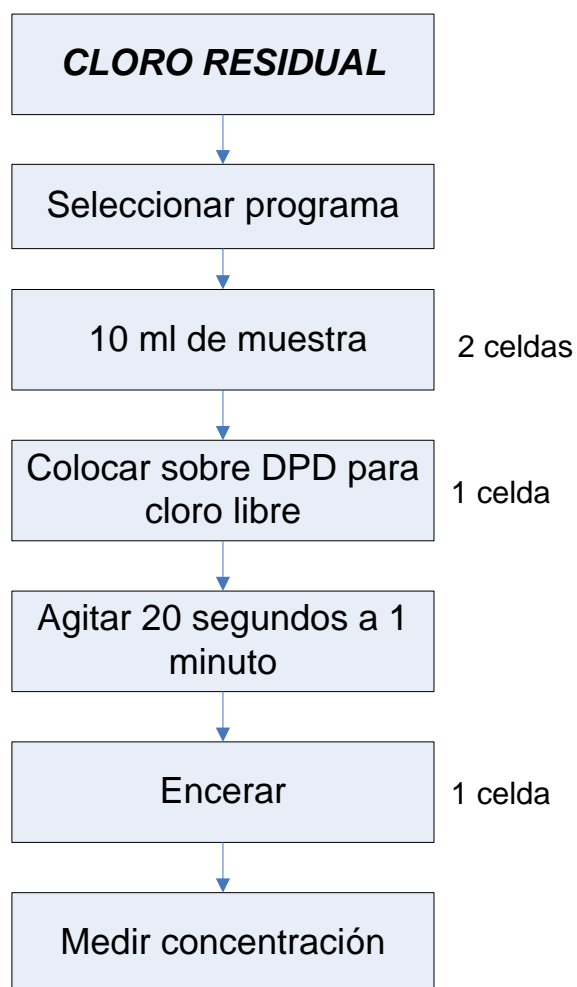
Además que es una herramienta de mercadeo muy efectiva para los laboratorios de ensayo y calibración, y una tarjeta de presentación para realizar ofertas a

clientes que requieren de laboratorios que hayan sido evaluados independientemente por un organismo competente (L&S Consultores, 2011).

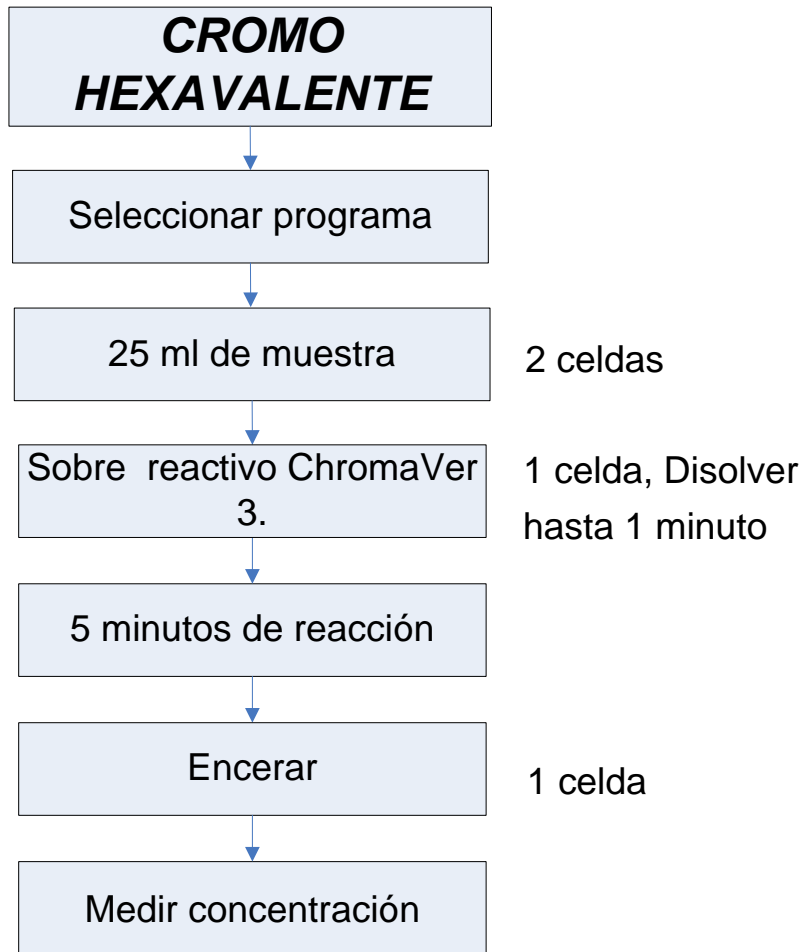
El Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE) publica en su página web el directorio de los laboratorios acreditados en el cual se encuentra el CICAM, el cual incluye referencias del laboratorio (dirección, teléfonos, etc.) más la información concerniente a los ensayos que efectúa.

6.7 METODOLOGÍA

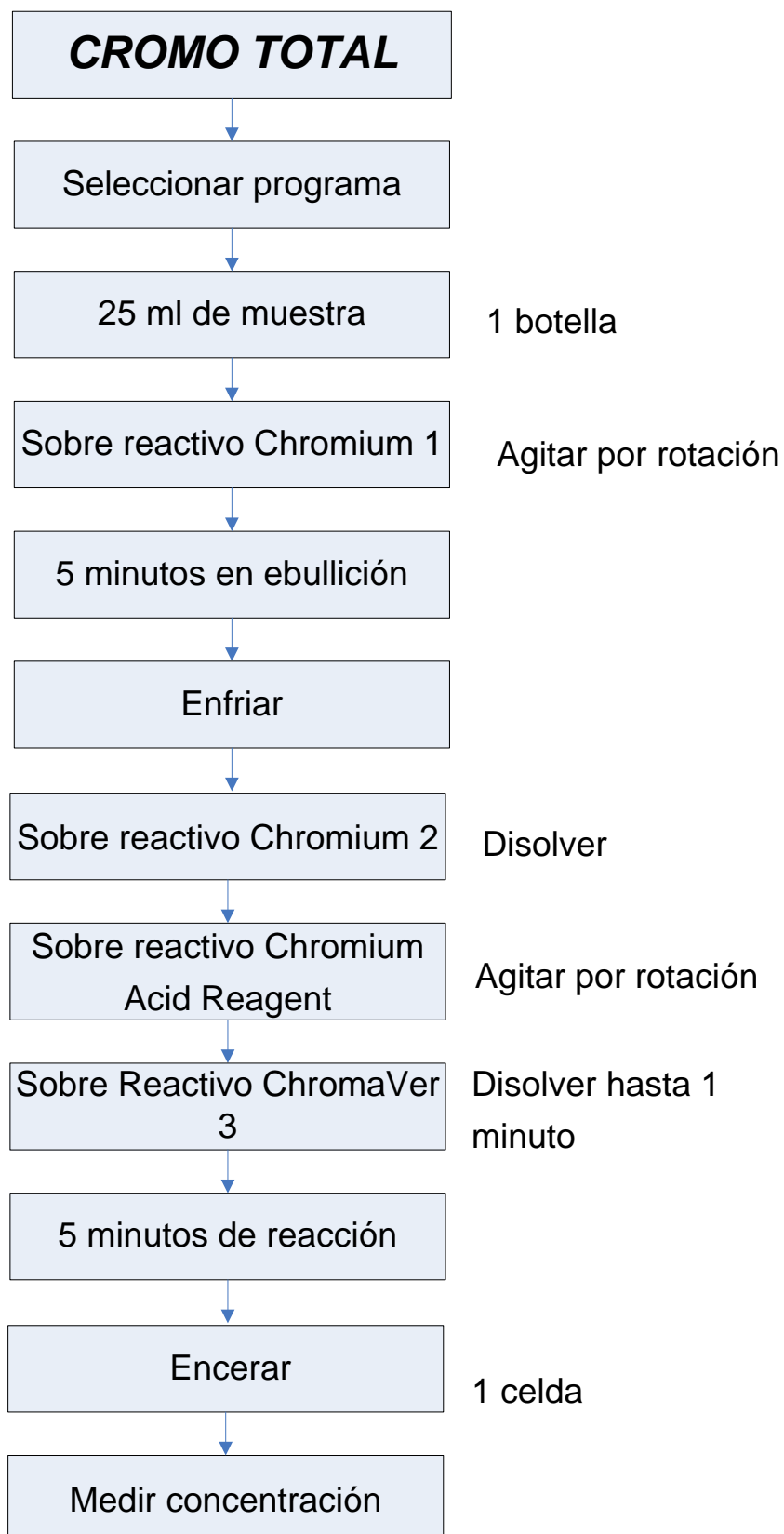
Para la realización de los procedimientos de ensayo se seguirá la siguiente metodología:



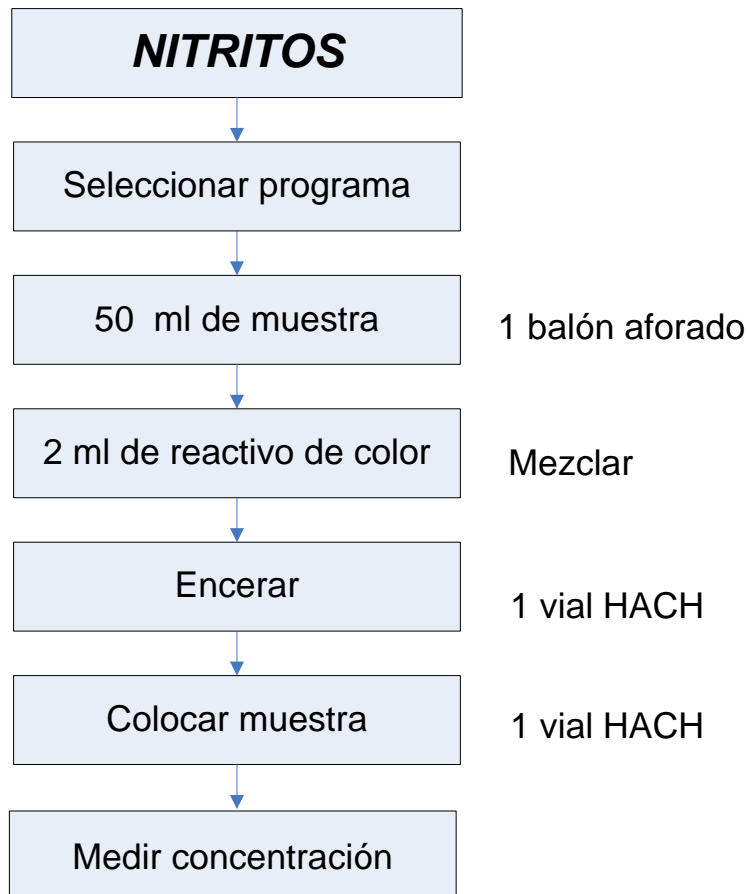
Elaborado por: Javier Macas



Elaborado por: Javier Macas



Elaborado por: Javier Macas



Elaborado por: Javier Macas

Cuadro N° 3. Modelo operativo.

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formulación de la Propuesta	Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos	Revisión Bibliográfica	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	200 USD	2 meses
2. Desarrollo de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Validación de los métodos	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	1305.6 USD	4 meses
3. Evaluación de la propuesta	Comprobación de proceso de desarrollo	Control de calidad los métodos	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	500 USD	2 meses

Elaborado por: Javier Macas

6.8 ADMINISTRACIÓN

La administración de la propuesta estuvo:

- Coordinada y evaluada por Roman Rodríguez, Dr. Rer. Nat., Ph.D., docente de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos e Ing. Carola Fierro, directora del CICAM.
- Desarrollada por: Aníbal Macas, egresado de la Carrera de Ingeniería Bioquímica

Cuadro N° 4. Administración de la propuesta.

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Ensayos de calidad y confiables para el cliente	Incapacidad para realizar los ensayos analíticos	Validar los métodos en los análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos	Determinar el costo de los análisis de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos	Investigador Javier Macas, Roman Rodríguez, Dr. Rer. Nat., Ph.D. e Ing. Carola Fierro

Elaborado por: Javier Macas

6.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Cuadro N° 5. Previsión de la evaluación.

Preguntas Básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	<ul style="list-style-type: none"> - Clientes - DECAB - Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE)
¿Por qué evaluar?	- Verificación periódica de los parámetros de desempeño de los métodos.
¿Para qué evaluar?	- Mejora continua del Sistema de Calidad
¿Qué evaluar?	- Procedimientos de ensayo y calibración.
¿Quién evalúa?	<ul style="list-style-type: none"> - Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) - Organismo de acreditación Ecuatoriano (OAE)
¿Cuándo evaluar?	- Desde la ejecución del proyecto, hasta las verificaciones continuas cada 3 meses.
¿Cómo evaluar?	- Mediante instrumentos de evaluación
¿Con qué evaluar?	- Experimentación

Elaborado por: Javier Macas

MATERIALES DE REFERENCIA

1. BIBLIOGRAFÍA

ABRIL N., BARCENA R, REYES E. et al. 2010. “Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas”. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Cordova. Pp. 2. Accedido el 26/05/2011 de:
http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica/mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf

AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES ATSDR. 2010. “El Cromo”. Departamento de salud y servicios humanos, Servicio de Salud Pública. EEUU. Pp 1-2. Accedido el 15/04/2011 de:
http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts7.pdf .

APHA, AWWA, WPCF. 2005. ”Stándar Methods for Examination of Water and Wastewater”. Editorial Díaz de Santos. 20^{va} Edición. Pp. 3-101, 4-51, 4-60, 4-145, 4-146 – 4-149

ASECAL S.L. 2007. “Curso validación de métodos analíticos físico-químicos”. Pp. 5.

BOQUÉ Ricard, MAROTO Alicia, RIU Jordi, RIUS F. Xavier. 2001. “La nueva norma europea EN ISO/IEC 17025”. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados Universitat Rovira i Virgil. Pp. 2-3. Accedido el 12/12/2010 de: <http://www.quimica.urv.es/quimio>.

BULLTEK, 2009. “ISO 17025: Acreditación de Laboratorios”. Accedido el 5/12/2010 de:
http://www.bulltek.com/ISO%209000%20INTRODUCCION/ISO%209000-2000_Spanish/ISO17025_Spanish/iso17025_spanish.html.

CÁMARA, Carmen. 2004. “Toma y tratamiento de muestras”. Volumen 3. Editorial Síntesis. Pp. 46 – 47.

CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA CENAM. 2000. “Guía para estimar la incertidumbre de la medición”. CENAM-EMA,. México. Pp. 7-11, 16-21. Accedido el 10/01/2011 de: http://www.unalmed.edu.co/~infisica/paginas/cursos/paginas_cursos/metrologia/documentos/GUM_CENAM.pdf

CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA CENAM. 2008. “Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico”. CENAM–EMA. México. Pp. 8. Accedido el 12/01/2011 de: http://www.ema.org.mx/descargas/guias_tecnicas/ensayos_clinicos/laboratoriosclinicosv00.pdfhttp://www.ema.org.mx/descargas/guias_tecnicas/ensayos_clinicos/laboratoriosclinicosv00.pdf

COMPAÑO, Ramón. 2002. “Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos”. Editorial Síntesis. España. Pp.6.

CRUBELLATI, R. y DI RISIO, C. 2009. “Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas”. Área de Desarrollo Sostenible. Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Pp. 16, 20-21, 24.

EL HOSPITAL DE INTERNET. 2011. “Efectos del cloro para la salud”. Accedido el 14/04/2011 de: http://clinica.respuestamedica.com/index.php/Efectos_del_cloro_para_la_salud

EURACHEM. 2000. “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”. EURACHEM Working Group. Second edition. Pp. 2-3, 5, 19-2. Accedido el 10/01/2011 de: <http://www.eurachem.ul.pt>

EURACHEM. 1998. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". EURACHEM Working Group. Pp. 2-3,5, 19-2. Accedido el 12/12/2010 de: <http://www.eurachem.ul.pt>

EURACHEM. 2003. "Traceability in Chemical Measurement". EURACHEM Working Group. Pp. 17. Accedido el 10/01/2011 de: <http://www.eurachem.ul.pt>

HACH COMPANY. 2005. "Manual de análisis del agua". Segunda Edición. Impreso en EEUU. Pp. 41, 44, 78, 81, 82-87.

HANNA INSTRUMENTS. 2010. "Catálogo de Calibración y Certificación Aseguramiento de la Calidad". Accedido el 20/02/2011 de: <http://www.hannainstruments.com>.

HARRIS, D. 1991. "Análisis químico cuantitativo". Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de CV. USA. Pp. 495- 497, 499

HARVEY, David. 2002. "Química Analítica Moderna". Mc Graw Hill. Primera Edición. España. Pp. 35.

HIDRITEC. 2011. "El Cloro". Accedido el 14/04/2011 de: <http://www.hidritec.com/doc-cloro.htm>

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN INEN. 2008. "Estimación de la Incertidumbre de los Resultados Analíticos". Décimo programa de Gestores de la Calidad en los Laboratorios. Módulo 4. Diapositivas: 32, 74, 76.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL INTI. 2010. "Calidad en laboratorios de ensayo y calibración". Accedido el 12/07/2011 de: <http://www.inti.gov.ar/sabercomo/sc35/inti10.php>

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION ISO, JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY JCGM. 2008. “International Vocabulary of basic and general terms in Metrology”. Working Group 2 of the Joint Committee for Guides in Metrology. First Edition. Geneva. Pp. 37-38.

INTERNATIONAL STANDARD ISO/IEC 17025. 2004. “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”. Second edition.. Pp. 1, 20. Accedido el 25/11/2010 de: <http://www.cala.ca/ISO-IEC%20FDAM%2017025.pdf>

KELLNER R., MERMET J., OTTO M., WIDMER H. 1998. “Analytical Chemistry”. Wiley-VCH: Weinheim. ISBN3-527-28610-1. Pp. 942. Accedido el 15/01/2011 de: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed077p453>

LENNTECH AGUA RESIDUAL & PURIFICACIÓN. 2009. “Cromo – Cr”. Accedido el 08/03/2011 de: <http://www.lennotech.es/periodica/elementos/cr.htm#Efectos%20del%20Cromo%20sobre%20la%20salud>

L&S CONSULTORES. 2011. “La Acreditación de Laboratorios un Reconocimiento de Competencia Técnica”. NT 003. Accedido el 13.07.2011 de: <http://www.lysconsultores.com/nt003.htm>

MÉNDEZ J., JARAMILLO D., SERRANO I. 2009. “Gestión de la calidad en procesos de servicios y productivos”. Instituto Politécnico Nacional. México, Pp. 19-21, 29-30.

MILLER, J. N. y MILLER, J. C. 2002. “Estadística y Quimiometría para Química Analítica”. Pearson Prentice Hall. Cuarta Edición. Madrid. Pp. 100-104, 119

NORMA CHILENA OFICIAL NCHO-ISO 9000: 2000. 2001. “Sistemas de gestión de la calidad - Fundamentos y vocabulario”. Instituto Nacional de Normalización INN. Primera edición. Accedido el 22/02/2011 de:
http://www.4shared.com/document/xK93BcsM/NCh_9000Of2001_ISO_9000_2000.html

OFICINA GUATEMALTECA DE ACREDITACIÓN OGA. 2006. “Guía para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración”. Sistema Nacional de Calidad. Oficina Guatemalteca de Acreditación. Accedido el 13/07/2011 de:
<http://www.oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-001.pdf>

ORGANISMO DE ACREDITACIÓN ECUATORIANO OAE. 2010. “Capacitación - Preguntas Frecuentes”. Accedido el 08/11/2010 de:
http://www.oae.gob.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=87

ORGANISMO DE ACREDITACIÓN ECUATORIANO OAE. 2010. “Criterio general: Criterios para la participación en ensayos de aptitud”. OAE CR GA10 R0. Pp. 4. Accedido el 9/11/2010 de:
http://www.oae.gob.ec/files_oae/laboratorios/OAE_R_GA10_R01.pdf

ORGANISMO DE ACREDITACIÓN URUGUAYO OAU. 2009. “Laboratorios Ambientales: Directrices para la Acreditación”. DINAMA. RLAU. Pp. 25, 51, 53-55. Accedido el 10/01/2011 de: http://www.mvotma.gub.uy/dinama/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=920&Itemid=158

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD OMS. 2009. “Medición de Cloro residual en el agua”. Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra. Accedido el 7/03/2011 de: <http://www.crid.or.cr/digitalizacion/pdf/spa/doc18189/doc18189-contenido.pdf>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD OMS. 2003. “Nitrate and nitrite in drinking-water”. Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra. Accedido el 7/03/2011 de: <http://www.crid.or.cr/digitalizacion/pdf/spa/doc18189/doc18179-contenido.pdf>

OTTO, Matthias. 2000. “Chemometrics”. Volume 14. Issue 4. ISBN 3-527-29628-X. Pp. 314. Accedido el 15/11/2010 de: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1099-128X\(200007/08\)14:4%3C375::AID-CEM637%3E3.0.CO;2-I/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1099-128X(200007/08)14:4%3C375::AID-CEM637%3E3.0.CO;2-I/abstract)

QUALITY SYSTEMS INNOVATIONS QSI Inc. 2009. “Sistemas de Calidad ISO 17025 para Laboratorios de Ensayo y Calibración”. Accedido el 17/12/2010 de: <http://www.qsinnovations.com/iso17025Espanol.html>.

RIU J, BOQUÉ R, MAROTO A, RIUS X. 2000. “Técnicas de Laboratorio”. Pp. 745 -747.

ROUESSAC F, ROUESSAC A. 2007. “Chemical Analysis. Modern Instrumentation Methods and Techniques”. John Wiley & Sons Ltd, University of Le Mans. Second Edition. France. Pp. 511.

SÁNCHEZ, Diana. 2010. “Validación de métodos para la determinación en aguas superficiales de metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinotérreos (calcio y magnesio) por volumetría con EDTA”. Instituto de hidrología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Accedido el 17/06/2011 de: <http://gemini.udistrital.edu.co/comunidad/estudiantes/dlilian/contenido.htm>

SECRETARIA DE ECONOMÍA, NORMA MEXICANA NMX. 2001. “Determinación de cromo hexavalente en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - Método de prueba”. Norma mexicana NMX-AA-044-SCFI-2001. Pp. 2. Accedido el 10/10/2010 de: <http://www.semarnat.gob.mx/.../normas/.../NMX-AA-044-SCFI-2001.pdf>

SECRETARÍA DE ECONOMÍA, NORMA MEXICANA NMX. 2001. “Determinación de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - Método de prueba”. Norma Mexicana NMX-AA-079-SCFI-2001. Pp. 2. Accedido el 15/10/2010 de: http://www.sma.df.gob.mx/sma/.../secofi_nmx_aa_079_scfi_2001.pdf

THOMPSON, M. y WOOD, R. 1995. “Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis”. Pure and Applied Chemistry. 67(5). Pp. 649-651.

USTARAN, Juan. 2000. “Una propuesta de solución a la problemática de la trazabilidad en las mediciones ambientales bajo la óptica de la NMX EC 17025”. IMNC 2000. Laboratorios ABC Química Investigación y Análisis S.A. Pp. 1-2. Accedido el 20/12/2010 de: <http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/simposio%202002/doctos/te093.pdf>

VIGILA. 2010. “Nitrato y Nitrito”. Pp. 2. Accedido el 15/12/2010 de: http://www.euskadi.net/r33-2709/es/contenidos/información/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/vigila9513.pdf

VOGUEL, A. 1969. “Química analítica cuantitativa. Teoría y práctica”. Editorial Kapelusz. Londres. Pp. 841-842.

2. ANEXOS

ANEXO A

HOJAS DE VALIDACIÓN

Cuadro A-1. Hoja de validación del método de cloro libre residual.

CUANTITATIVO	<input checked="" type="checkbox"/>	Analito: Cloro libre residual (Cl ₂)				
CUALITATIVO	<input type="checkbox"/>	Unidades: mg/l				
DE IDENTIFICACIÓN	<input type="checkbox"/>	Matriz: Aguas claras				
FUNCIÓN DE RESPUESTA		INSTRUMENTAL			DEL MÉTODO	
<i>m</i>		0,476			NA	
<i>S_m</i>		0,001			NA	
<i>b</i>		0,024			NA	
<i>S_b</i>		0,002			NA	
<i>r²</i>		0,99978			NA	
PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel: concentración	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud % recup.	U Expand %U (k = 2)
	Sr mg/l	%CVr	S_R mg/l	%CV_R		
0,25 m/l	0,009	3,74	0,010	4,16	96,3	10,00
0,5 m/l	0,011	2,15	0,011	2,15	104,0	5,48
1 m/l	0,010	0,98	0,011	1,03	104,6	3,81
2 m/l	0,021	1,02	0,024	1,19	100,5	3,41
5 m/l	0,013	0,27	0,017	0,35	99,7	2,21
Global	No aplica, ya que se reporta por niveles					
LÍMITE DE DETECCIÓN (L.D.)			0,013mg/l			
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)			0,25 mg/l			
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
INTERFERENCIAS CONOCIDAS:			Ninguna			
TIPO DE INTERFERENCIA CORRECCIÓN:			Ninguna			
INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0.25 – 5 mg/L						
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN/RECHAZO:						
EXACTITUD: 85% < %E < 110%, Datos de 96,3% hasta 104,6%, validación aceptada.						
INCERTIDUMBRE: U ≤ 15%, Datos de 2,21% hasta 10%; validación aceptada. %CVR ≤ 5%, Datos de 0,35% hasta 4,16%; validación aceptada.						

Cuadro A-2. Hoja de validación del método de cromo hexavalente.

CUANTITATIVO	<input checked="" type="checkbox"/>	Analito: Cromo Hexavalente (Cr ⁺⁶)				
CUALITATIVO	<input type="checkbox"/>	Unidades: mg/l				
DE IDENTIFICACIÓN	<input type="checkbox"/>	Matriz: Aguas claras y residuales				
FUNCIÓN DE RESPUESTA		INSTRUMENTAL			DEL MÉTODO	
m		1,883			NA	
S_m		0,005			NA	
b		0,010			NA	
S_b		0,001			NA	
r^2		0,9999067			NA	
PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel: conc. (mg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud % recup.	U Expand %U (k = 2)
	Sr mg/l	%CVr	S_R mg/l	%CV_R		
0,02	0,0007	3,59	0,008	4,22	94,4	18,83
0,6	0,005	0,85	0,005	0,90	99,2	3,22
1	0,005	0,92	0,006	1,14	99,9	16,98
5	0,003	0,65	0,004	0,73	100,1	16,89
50	0,005	0,93	0,005	0,96	99,8	16,94
Global	No aplica ya que se reporta por niveles					
LÍMITE DE DETECCIÓN (L.D.)			0,003 mg/l			
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)			0,02 mg/l			
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
INTERFERENCIAS CONOCIDAS:			Color, Turbidéz		pH	
TIPO DE INTERFERENCIA CORRECCIÓN:			Dilución		Ajuste entre 3 y 7	
INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0,02 – 50 mg/L						
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN/RECHAZO:						
EXACTITUD: 85% < %E < 110%, Datos desde 94,4% hasta 100,1%; validación aceptada.						
INCERTIDUMBRE: ≤20%, Datos desde 3,22% hasta 18,83%; validación aceptada.						
%CVR ≤5%, Datos desde 0,73 hasta 4,22%, validación aceptada						

Cuadro A-3. Hoja de validación del método de cromo total.

CUANTITATIVO	<input checked="" type="checkbox"/>	Analito: Cromo Total				
CUALITATIVO	<input type="checkbox"/>	Unidades: mg/l				
DE IDENTIFICACIÓN	<input type="checkbox"/>	Matriz: Aguas claras				
FUNCIÓN DE RESPUESTA		INSTRUMENTAL			DEL MÉTODO	
m		1,733			NA	
S_m		0,006			NA	
b		0,025			NA	
S_b		0,002			NA	
r^2		0,999958			NA	
PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel: conc.	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud % recup.	U Expand %U (k = 2)
	S_r mg/l	%CV_r	S_R mg/l	%CV_R		
0,03 mg/l	0,002	5,7	0,002	6,24	97,01	17,80
0,6 mg/l	0,005	0,86	0,006	0,98	100,1	4,33
1 mg/l	0,007	1,31	0,007	1,45	100,3	13,02
10 mg/l	0,006	0,65	0,008	1,56	99,95	13,07
100 mg/l	0,007	0,66	0,007	1,4	99,82	13,00
Global	No aplica ya que se reporta por niveles					
LÍMITE DE DETECCIÓN (L.D.)			0,009 mg/l			
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)			0,03 mg/l			
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
INTERFERENCIAS CONOCIDAS:			Ninguna			
TIPO DE INTERFERENCIA CORRECCIÓN:			Ninguna			
INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0.03 – 100 mg/L						
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN/RECHAZO:						
EXACTITUD: 85% < %E < 110%, Datos desde 97,01% hasta 100,1%; validación aceptada.						
INCERTIDUMBRE: ≤20%, Datos desde 4,33% hasta 17,80%; validación aceptada.						
%CVR ≤10%, Datos desde 0,98% hasta 6,24%, validación aceptada						

Cuadro A-4. Hoja de validación de nitritos.

CUANTITATIVO	<input checked="" type="checkbox"/>	Analito: Nitritos como N-NO ₂				
CUALITATIVO	<input type="checkbox"/>	Unidades: mg/l				
DE IDENTIFICACIÓN	<input type="checkbox"/>	Matriz: Aguas claras y residuales				
FUNCIÓN DE RESPUESTA		INSTRUMENTAL			DEL MÉTODO	
<i>m</i>		3,666			NA	
<i>S_m</i>		0,009			NA	
<i>b</i>		0,008			NA	
<i>S_b</i>		0,002			NA	
<i>r²</i>		0,99993			NA	
PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel: conc.	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud % recup.	U Expand %U (k = 2)
	S_r mg/l	%CV_r	S_R mg/l	%CV_R		
0,01 mg/l	0,0002	2,44	0,0002	2,50	93,2	20,61
0,5 mg/l	0,0027	0,53	0,0035	0,70	100,8	5,17
1 mg/l	0,0015	1,44	0,0015	1,46	103,9	20,20
10 mg/l	0,0022	1,07	0,0027	1,31	102,7	20,16
100 mg/l	0,0029	0,58	0,0036	0,71	101,9	20,04
Global	No aplica ya que se reporta por niveles					
LÍMITE DE DETECCIÓN (L.D.)			0,0004 mg/l			
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)			0,01mg/l			
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
INTERFERENCIAS CONOCIDAS:		Color			Solidos Suspendidos	
TIPO DE INTERFERENCIA CORRECCIÓN:		Dilución			Filtración	
INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0.01 – 100 mg/L						
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN/RECHAZO:						
EXACTITUD: 85% < %E < 110%, Datos desde 93,2% hasta 103,9%; validación aceptada.						
INCERTIDUMBRE: ≤25%, Datos desde 5,17% hasta 20,61%; validación aceptada.						
%CVR ≤5%, Datos desde 0,70% hasta 2,50%, validación aceptada						

ANEXO B

DATOS Y RESULTADOS

EXPERIMENTALES

Cloro Libre Residual

Tabla B-1. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones del método de cloro libre residual.

Rep.	Concentración (mg/l)	Lecturas obtenidas (Abs)				
		D1	D2	D3	D4	D5
1	0,00	0,007	0,012	0,013	0,012	0,011
2	0,00	0,010	0,008	0,012	0,009	0,009
3	0,00	0,012	0,011	0,015	0,012	0,010
1	0,20	0,108	0,109	0,106	0,110	0,106
2	0,20	0,105	0,108	0,106	0,111	0,106
3	0,20	0,107	0,106	0,110	0,108	0,108
1	0,25	0,131	0,143	0,142	0,138	0,142
2	0,25	0,137	0,140	0,144	0,135	0,140
3	0,25	0,144	0,138	0,134	0,141	0,137
1	0,50	0,274	0,277	0,265	0,271	0,280
2	0,50	0,281	0,271	0,274	0,274	0,278
3	0,50	0,268	0,268	0,263	0,271	0,268
1	1,00	0,532	0,521	0,512	0,520	0,528
2	1,00	0,527	0,525	0,527	0,522	0,520
3	1,00	0,520	0,522	0,523	0,521	0,523
1	2,00	1,000	0,976	0,981	0,985	0,971
2	2,00	0,981	0,970	0,972	0,984	0,994
3	2,00	0,988	0,980	0,971	1,005	0,969
1	5,00	2,394	2,400	2,405	2,398	2,385
2	5,00	2,411	2,397	2,410	2,400	2,402
3	5,00	2,403	2,395	2,415	2,390	2,396

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-2. Datos experimentales obtenidos de la muestra de agua potable del método de cloro libre residual.

Rep.	Lecturas Obtenidas (Abs)				
	D1	D2	D3	D4	D5
1	0,559	0,587	0,567	0,55	0,546
2	0,547	0,600	0,570	0,552	0,550
3	0,551	0,605	0,575	0,548	0,560

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-3. Datos obtenidos del material de referencia interno y material de referencia certificado a una concentración de 0,5 mg/l de cloro libre residual.

Rep.	MRCs	MRI
	Conc. obtenida (mg/l)	Conc. obtenida (mg/l)
1	0,51	0,55
2	0,53	0,55
3	0,51	0,55
4	0,53	0,54
5	0,54	0,55

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-4. Resultados del análisis *t* de student para el Material de referencia certificado y Material de referencia interno.

Parámetros	MRCs	MRI
Media	0,527	0,553
Varianza	$1,56 \cdot 10^{-4}$	$1,63 \cdot 10^{-5}$
Observaciones (n)	5,000	5,000
Grados de libertad	8,000	
Desv. Estd combinada (s_d)	$9,27 \cdot 10^{-3}$	
Estadístico <i>t</i> calculado	4,3683	
Valor crítico para <i>t</i>	2,3060	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-5. Resultados de la prueba *F* para el Material de referencia certificado y Material de referencia Interno.

Parámetros	MRCs	MRi
Media	0,527	0,553
Varianza	$1,56 \cdot 10^{-4}$	$1,63 \cdot 10^{-5}$
Observaciones	5,000	5,000
Grados de libertad	4,000	4,000
F calculado	8,634	
Valor crítico para F	6,388	

Elaborado por: Javier Macas

Cromo Hexavalente

Tabla B-6. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la curva de calibración del método de cromo hexavalente.

Concentración (mg/l)	Lecturas Obtenidas (Abs)				
	D1	D2	D3	D4	D5
0,00	0,009	0,007	0,007	0,006	0,011
0,01	0,028	0,026	0,027	0,027	0,028
0,02	0,046	0,047	0,044	0,046	0,046
0,03	0,065	0,064	0,063	0,063	0,064
0,05	0,103	0,103	0,103	0,104	0,103
0,10	0,196	0,197	0,199	0,200	0,197
0,20	0,396	0,388	0,389	0,394	0,385
0,50	0,956	0,934	0,944	0,940	0,946
0,60	1,143	1,111	1,133	1,115	1,118

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-7. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango bajo del método de cromo hexavalente.

Rep.	Concentración (mg/l)	Lecturas obtenidas (Abs)				
		D1	D2	D3	D4	D5
1	0,00	0,012	0,007	0,007	0,007	0,008
2	0,00	0,009	0,008	0,006	0,009	0,011
3	0,00	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007
1	0,02	0,047	0,045	0,047	0,044	0,047
2	0,02	0,047	0,045	0,046	0,043	0,045
3	0,02	0,044	0,043	0,047	0,046	0,046
1	0,60	1,121	1,112	1,134	1,109	1,124
2	0,60	1,127	1,124	1,119	1,109	1,120
3	0,60	1,114	1,133	1,129	1,132	1,109

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-8. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango alto (diluciones) del método de cromo hexavalente.

Rep.	Concentración (mg/l)	Lecturas obtenidas (Abs)				
		D1	D2	D3	D4	D5
1	1	0,944	0,935	0,954	0,954	0,922
2	1	0,946	0,945	0,943	0,938	0,926
3	1	0,956	0,927	0,946	0,947	0,945
1	5	0,945	0,940	0,944	0,941	0,938
2	5	0,946	0,945	0,943	0,942	0,940
3	5	0,944	0,951	0,939	0,950	0,958
1	50	0,930	0,956	0,937	0,954	0,938
2	50	0,941	0,931	0,933	0,942	0,950
3	50	0,930	0,937	0,951	0,950	0,945

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-9. Datos obtenidos de la muestra de agua residual del método de cromo hexavalente.

Rep.	Lecturas Obtenidas (Abs)				
	D1	D2	D3	D4	D5
1	0,010	0,009	0,014	0,011	0,008
2	0,011	0,010	0,012	0,009	0,007
3	0,009	0,012	0,010	0,010	0,011

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-10. Datos obtenidos del material de referencia interno y material de referencia certificado a una concentración de 0,1 mg/l cromo hexavalente.

Rep.	MRCs	MRI
	Conc. obtenida (mg/l)	Conc. obtenida (mg/l)
1	0,103	0,101
2	0,103	0,098
3	0,100	0,100
4	0,100	0,100
5	0,105	0,100

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-11. Resultados del análisis *t* de student para el Material de referencia certificado y Material de referencia interno.

Parámetros	MRCs	MRI
Media	0,102	0,100
Varianza	$4,32 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-6}$
Observaciones (n)	5,000	5,000
Grados de libertad	8,000	
Desv. Estd combinada (s_d)	$1,75 \cdot 10^{-3}$	
Estadístico <i>t</i> (calculado)	1,7240	
Estadístico <i>t</i> (tablas)	2,3060	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-12. Resultados de la Prueba *F* para material de referencia interno y material de referencia certificado.

Parámetros	MRCs	MRi
Media	0,102	0,100
Varianza	$4,32 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-6}$
Observaciones	5,000	5,000
Grados de libertad	4,000	4,000
F calculado	2,268	
Valor crítico para F (una cola)	6,388	

Elaborado por: Javier Macas

Cromo Total

Tabla B-13. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la curva de calibración del método de cromo total.

Concentración (mg/l)	Lecturas Obtenidas (Abs)				
	D1	D2	D3	D4	D5
0,00	0,026	0,032	0,032	0,026	0,020
0,02	0,062	0,057	0,060	0,052	0,055
0,03	0,079	0,075	0,083	0,072	0,071
0,05	0,112	0,115	0,113	0,110	0,104
0,20	0,354	0,380	0,381	0,373	0,386
0,50	0,899	0,880	0,886	0,884	0,888
0,60	1,057	1,087	1,057	1,060	1,076

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-14. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango bajo del método de cromo total.

Rep.	Concentración (mg/l)	Lecturas obtenidas (Abs)				
		D1	D2	D3	D4	D5
1	0,00	0,032	0,031	0,026	0,022	0,031
2	0,00	0,020	0,025	0,021	0,019	0,031
3	0,00	0,030	0,020	0,024	0,027	0,031
1	0,03	0,075	0,075	0,075	0,075	0,076
2	0,03	0,079	0,074	0,074	0,071	0,075
3	0,03	0,078	0,081	0,080	0,071	0,071
1	0,60	1,085	1,052	1,060	1,058	1,060
2	0,60	1,070	1,064	1,064	1,073	1,068
3	0,60	1,065	1,047	1,077	1,076	1,073

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-15. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango alto (diluciones) del método de cromo total.

Rep.	Concentración (mg/l)	Lecturas obtenidas (Abs)				
		D1	D2	D3	D4	D5
1	1	0,882	0,905	0,906	0,910	0,905
2	1	0,885	0,886	0,915	0,890	0,896
3	1	0,890	0,881	0,903	0,873	0,886
1	10	0,888	0,886	0,888	0,912	0,910
2	10	0,880	0,875	0,903	0,909	0,900
3	10	0,885	0,875	0,883	0,875	0,898
1	100	0,900	0,894	0,868	0,906	0,886
2	100	0,895	0,890	0,880	0,902	0,880
3	100	0,875	0,888	0,909	0,898	0,879

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-16. Datos obtenidos de la muestra de agua clara del método de cromo total.

Rep.	Lecturas Obtenidas (Abs)				
	D1	D2	D3	D4	D5
1	0,052	0,052	0,047	0,043	0,055
2	0,042	0,041	0,049	0,050	0,050
3	0,046	0,046	0,041	0,052	0,041

Elaborado por: Javier Macas

Nitritos

Tabla B-17. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la curva de calibración del método de nitritos.

Concentración (mg/l)	Lecturas Obtenidas (Abs)				
	D1	D2	D3	D4	D5
0,00	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002
0,01	0,040	0,038	0,040	0,042	0,041
0,02	0,076	0,078	0,078	0,079	0,080
0,04	0,157	0,152	0,155	0,158	0,160
0,05	0,195	0,190	0,195	0,197	0,199
0,10	0,383	0,379	0,386	0,388	0,390
0,20	0,753	0,738	0,753	0,763	0,765
0,50	1,846	1,839	1,839	1,874	1,871

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-18. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango bajo del método de nitritos.

Rep.	Concentración (mg/l)	Lecturas obtenidas (Abs)				
		D1	D2	D3	D4	D5
1	0,00	0,001	0,003	0,003	0,004	0,003
2	0,00	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
3	0,00	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002
1	0,01	0,040	0,041	0,041	0,041	0,042
2	0,01	0,042	0,040	0,041	0,041	0,042
3	0,01	0,041	0,040	0,040	0,042	0,040
1	0,50	1,849	1,865	1,850	1,869	1,873
2	0,50	1,843	1,835	1,835	1,867	1,862
3	0,50	1,842	1,842	1,845	1,852	1,857

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-19. Datos experimentales obtenidos de las diferentes concentraciones para la validación del rango alto (diluciones) del método de nitritos.

Rep.	Concentración (mg/l)	Lecturas obtenidas (Abs)				
		D1	D2	D3	D4	D5
1	1	0,385	0,390	0,392	0,380	0,388
2	1	0,385	0,375	0,386	0,374	0,387
3	1	0,386	0,376	0,385	0,387	0,380
1	10	0,754	0,732	0,756	0,768	0,740
2	10	0,756	0,745	0,752	0,763	0,767
3	10	0,752	0,750	0,758	0,757	0,758
1	100	1,841	1,868	1,840	1,875	1,845
2	100	1,854	1,837	1,845	1,867	1,863
3	100	1,843	1,842	1,839	1,855	1,867

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-20. Datos obtenidos de la muestra de agua residual del método de nitritos.

Rep.	Lecturas Obtenidas (Abs)				
	D1	D2	D3	D4	D5
1	0,002	0,001	0,002	0,004	0,002
2	0,001	0,003	0,002	0,003	0,002
3	0,001	0,003	0,001	0,003	0,004

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-21. Datos del material de referencia interno y material de referencia certificado a una concentración de 0,2 mg/l de nitritos.

Rep.	MRCs	MRI
	Conc. obtenida (mg/l)	Conc. obtenida (mg/l)
1	0,203	0,202
2	0,203	0,203
3	0,206	0,202
4	0,204	0,203
5	0,207	0,205

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-22. Resultados del análisis *t* de student para el Material de referencia certificado y Material de referencia interno.

Parámetros	MRCs	MRI
Media	0,204	0,203
Varianza	$2,92 \cdot 10^{-6}$	$1,06 \cdot 10^{-6}$
Observaciones (n)	5,000	5,000
Grados de libertad	8,000	
Desv. Estd combinada (s_d)	$1,41 \cdot 10^{-3}$	
Estadístico <i>t</i> (calculado)	1,5271	
Estadístico <i>t</i> (tablas)	2,3060	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-23. Resultados de la Prueba *F* para material de referencia interno y material de referencia certificado a una concentración de 0,2 mg/l.

Parámetros	MRCs	MRi
Media	0,204	0,203
Varianza	$2,92 \cdot 10^{-6}$	$1,06 \cdot 10^{-6}$
Observaciones	5,000	5,000
Grados de libertad	4,000	4,000
F calculado	2,2	
Valor crítico para F (una cola)	6,388	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-24. Datos de los tiempos de medición del estándar de 0,05 mg/l de Nitritos a 10 minutos y 1 hora.

Rep.	10 minutos	1 hora
	Conc. obtenida (mg/l)	Conc. obtenida (mg/l)
1	0,050	0,051
2	0,050	0,051
3	0,051	0,051
4	0,051	0,051
5	0,050	0,050

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-25. Datos de los tiempos de medición del estándar de 0,05 mg/l de N-NO₂ a 10 minutos y 2 horas.

Rep.	10 minutos	2 horas
	Conc. obtenida (mg/l)	Conc. obtenida (mg/l)
1	0,050	0,052
2	0,050	0,052
3	0,051	0,051
4	0,051	0,051
5	0,050	0,051

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-26 Resultados del análisis t de student para los tiempos de medición a 10 minutos y 1 hora.

Parámetros	10 minutos	2 horas
Media	0,050	0,051
Varianza	$2,08 * 10^{-7}$	$1,12 * 10^{-7}$
Observaciones (n)	5,000	5,000
Grados de libertad	8,000	
Desv. Estd combinada (s_d)	$4,00 * 10^{-4}$	
Estadístico t (calculado)	1,7253	
Estadístico t (tablas)	2,3060	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-27. Resultados del análisis t de student para los tiempos de medición a 10 minutos y 2 horas.

Parámetros	10 minutos	2 horas
Media	0,050	0,051
Varianza	$2,08 * 10^{-7}$	$2,38 * 10^{-7}$
Observaciones (n)	5,000	5,000
Grados de libertad	8,000	
Desv. Estd combinada (s_d)	$4,72 * 10^{-4}$	
Estadístico t (calculado)	2,5560	
Estadístico t (tablas)	2,3060	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-28. Datos del volumen seleccionado para el análisis a una concentración de 0,05 mg/l.

Rep.	50 ml.	25 ml.
	Conc. obtenida (mg/l)	Conc. obtenida (mg/l)
1	0,050	0,049
2	0,050	0,049
3	0,051	0,049
4	0,051	0,049
5	0,050	0,049

Elaborado por: Javier Macas

Tabla B-29. Resultados del análisis *t* de student para el volumen seleccionado de muestra.

Parámetros	50 ml.	25 ml.
Media	0,0504	0,0492
Observaciones (n)	5,000	5,000
Varianza	$2,08 * 10^{-7}$	$3,72 * 10^{-8}$
Grados de libertad	8,000	
Desv. Estd combinada (s_d)	$3,50 * 10^{-4}$	
Estadístico <i>t</i> (calculado)	5,4160	
Estadístico <i>t</i> (tablas)	2,3060	

Elaborado por: Javier Macas

ANEXO C

**LIMITES DE CONFIANZA Y
FUNCIÓN DE RESPUESTA DE
LOS MÉTODOS**

Cloro Libre Residual

Tabla C-1. Límites de Confianza para el método de cloro libre residual.

Límite	Ecuación
Límite superior	$y = 0,476x + 0,051$
Límite inferior	$y = 0,476x - 0,002$

Elaborado por: Javier Macas

Tabla C-2. Desviación estándar del blanco, límite de detección y límite de cuantificación del método de cloro libre residual.

Parámetro	Valor (mg/l)
Desv. Est. blanco	0,004
Límite de detección	0,013
Límite de cuantificación	0,043

Elaborado por: Javier Macas

Grafico C-1. Límites de Confianza para el método de cloro libre residual.

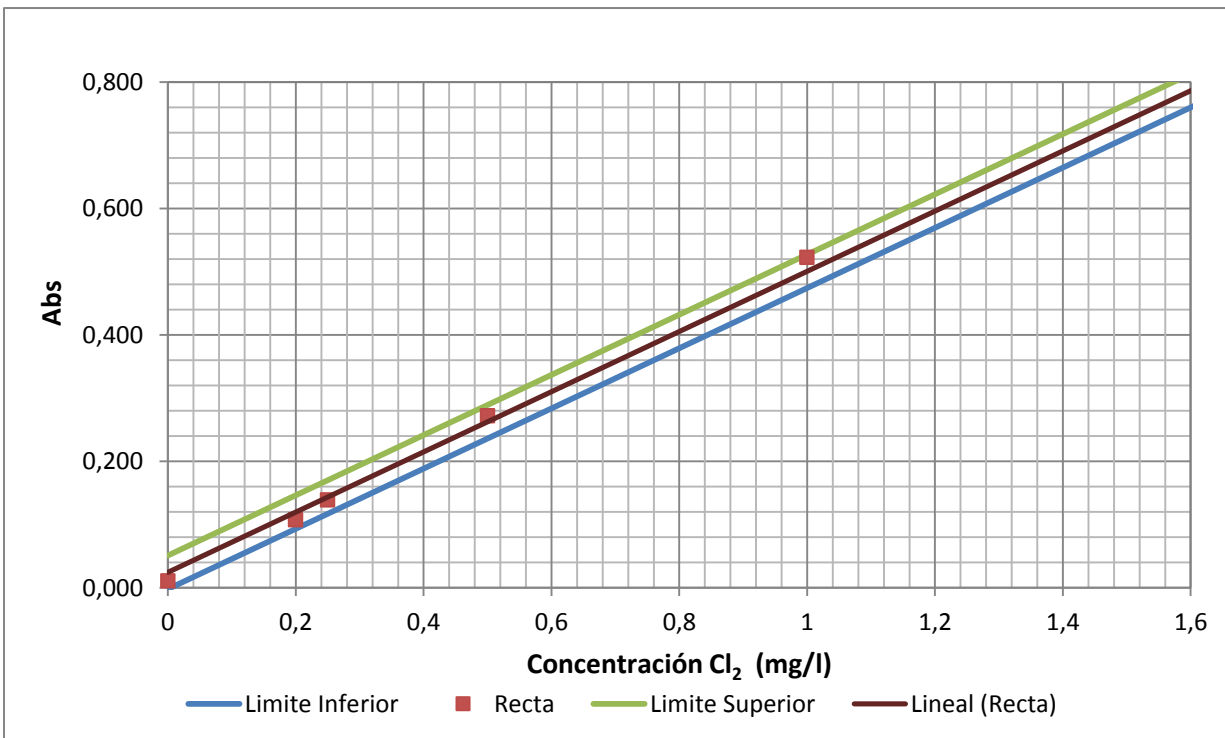


Grafico C-2. Función de respuesta de linealidad el método de cloro libre residual.

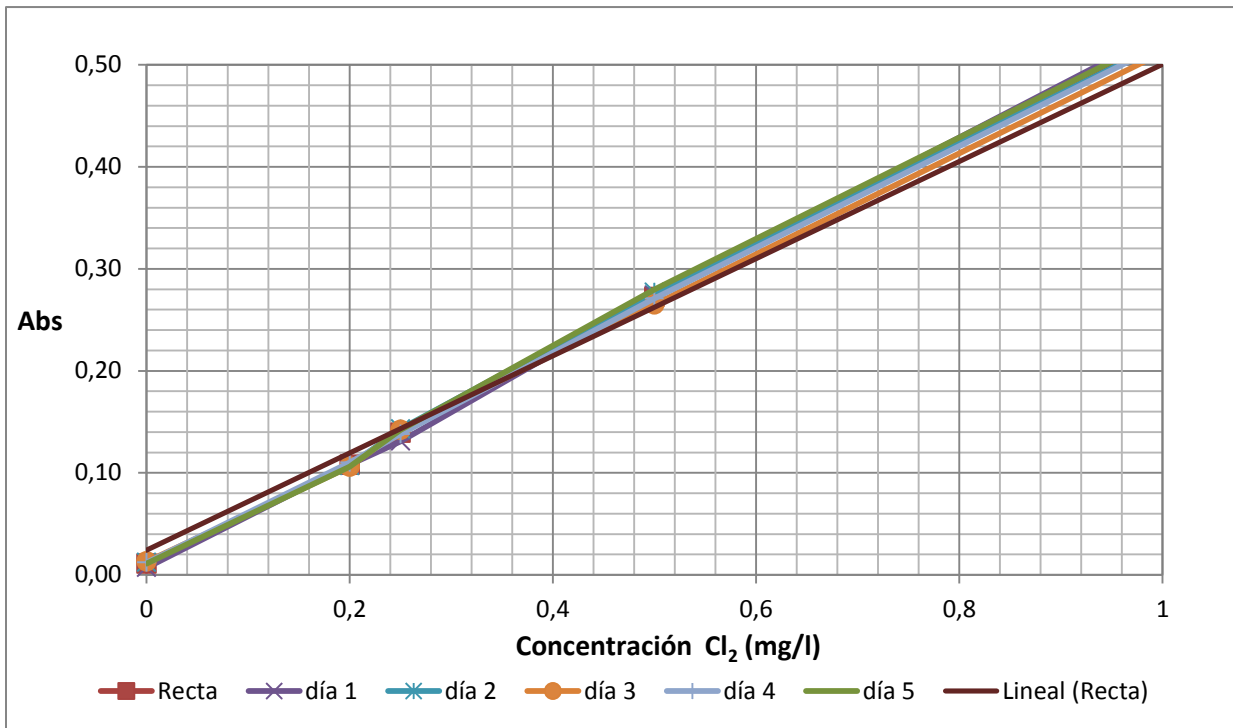
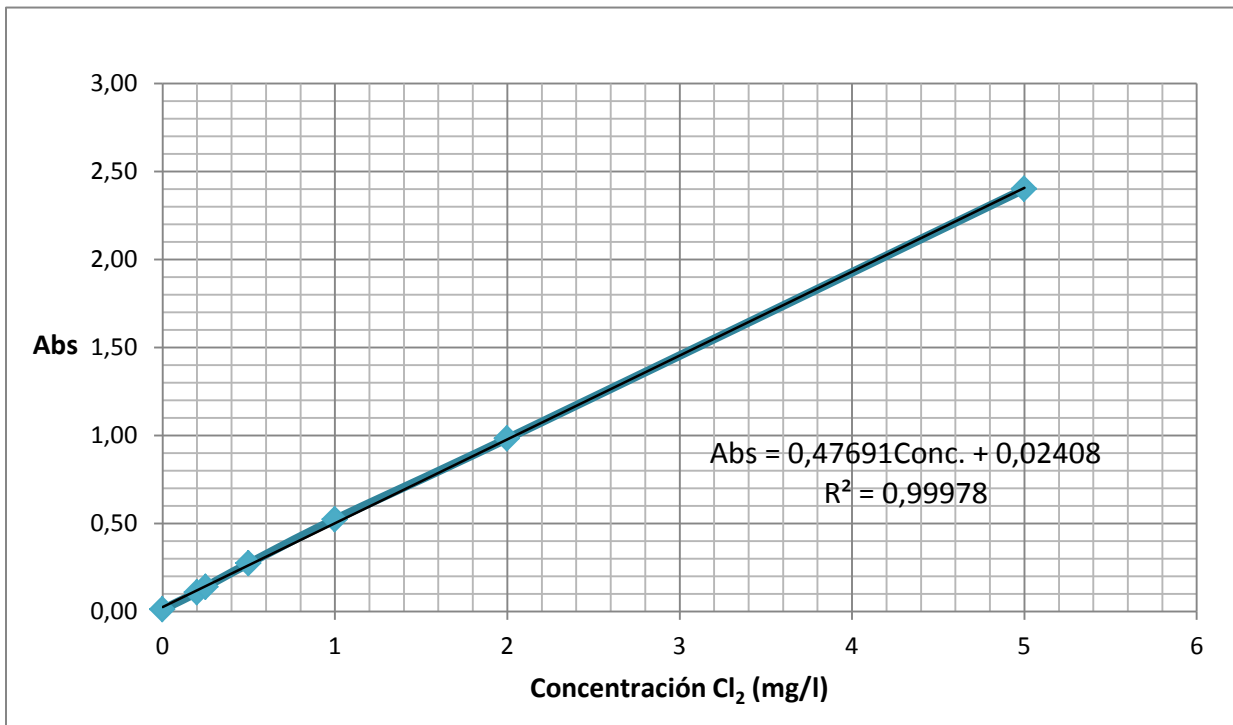


Gráfico C-3. Recta de Calibración del método de cloro libre residual.



Cromo Hexavalente

Tabla C-3. Límites de Confianza para el método de cromo hexavalente.

Límite	Ecuación
Límite Superior	$y = 1,88x + 0,025$
Límite inferior	$y = 1,88x - 0,004$

Elaborado por: Javier Macas

Tabla C-4. Desviación estándar del blanco, límite de detección y límite de cuantificación del método de cromo hexavalente.

Parámetro	Valor (mg/l)
Desv. Est. blanco	0,001
Límite de detección	0,003
Límite de cuantificación	0,010

Elaborado por: Javier Macas

Grafico C-4. Límites de Confianza para el método de cromo hexavalente.

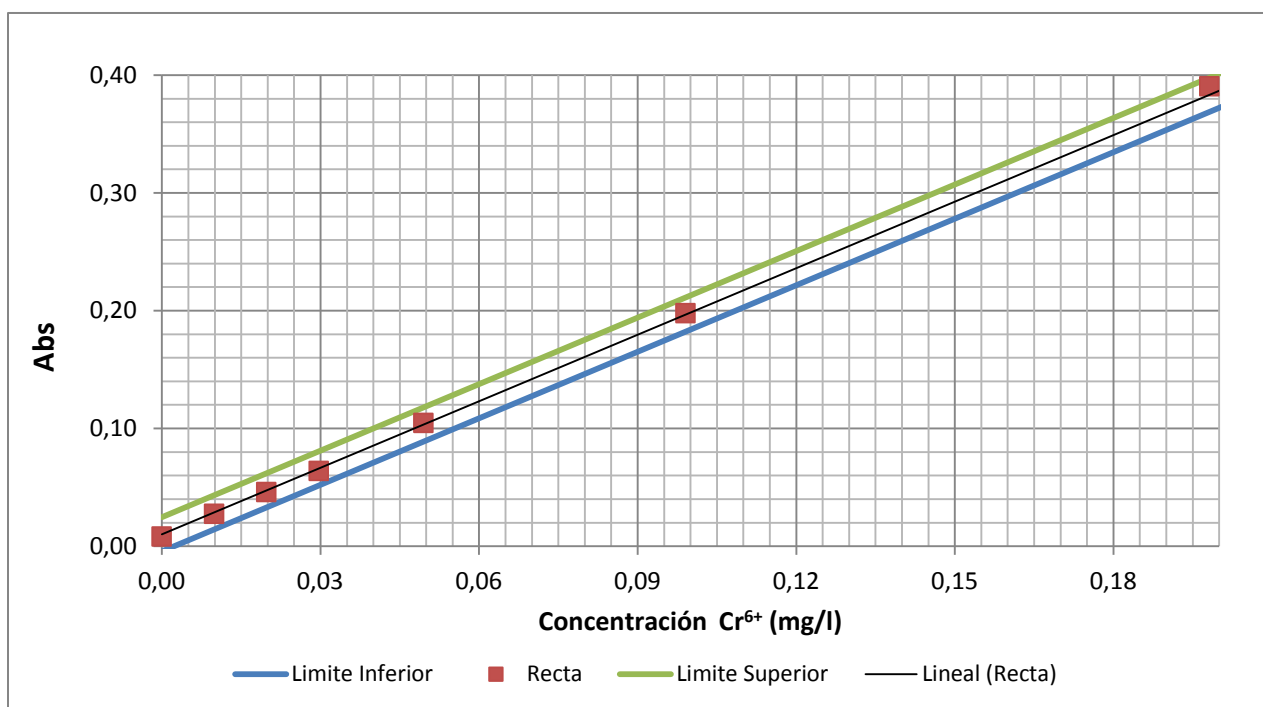


Gráfico C-5. Función de respuesta de linealidad el método de cromo hexavalente.

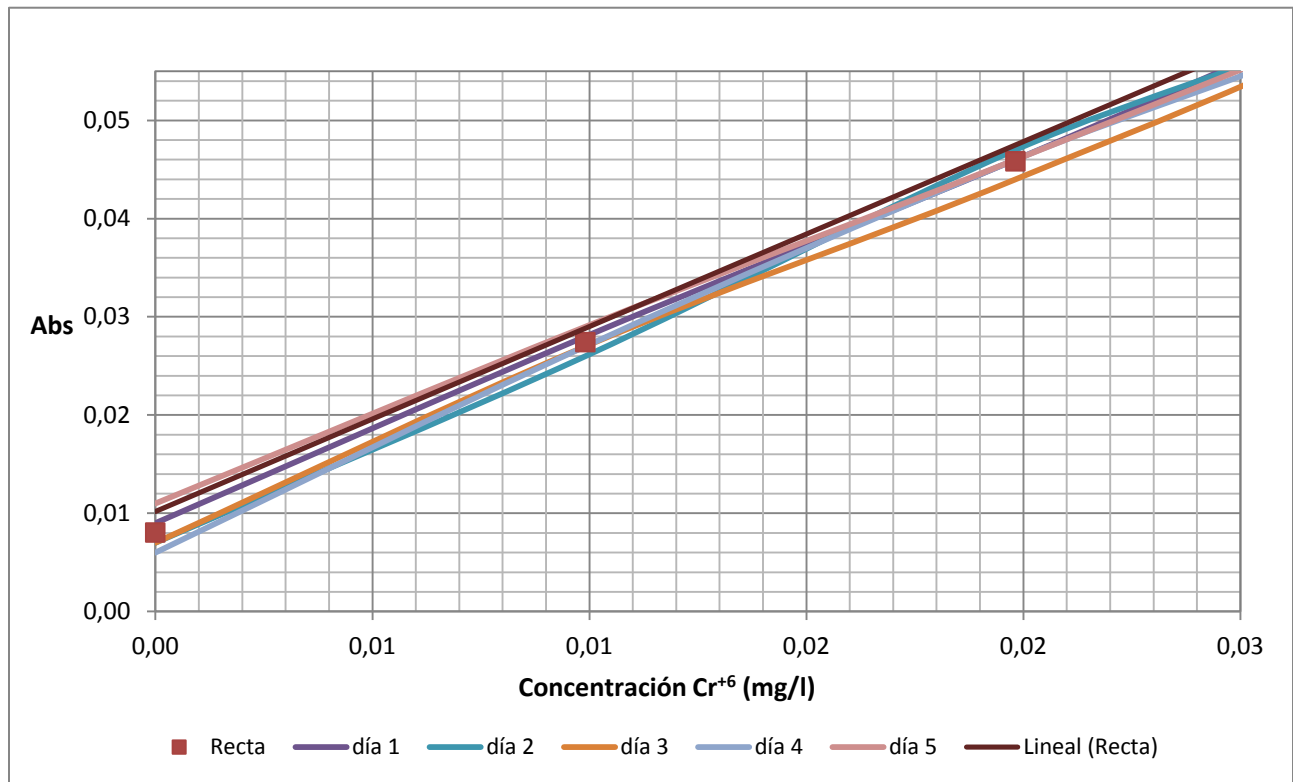
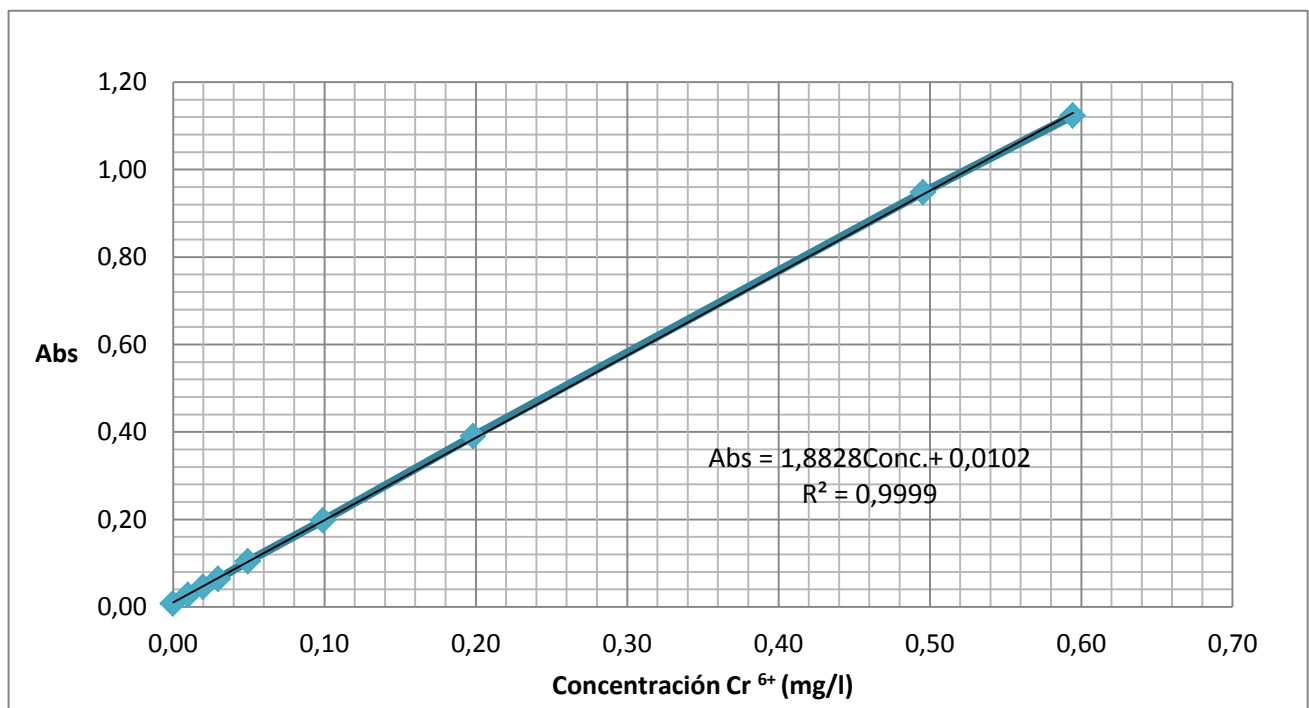


Gráfico C-6. Recta de Calibración del método de cromo Hexavalente.



Cromo Total

Tabla C-5. Límites de Confianza para el método de cromo total.

Límite	Ecuación
Límite superior	$y = 1,73x + 0,041$
Límite inferior	$y = 1,73x + 0,008$

Elaborado por: Javier Macas

Tabla C-6. Desviación estándar del blanco, límite de detección y límite de cuantificación del método de cromo total.

Parámetro	Valor (mg/l)
Desv. Est. blanco	0,003
Límite de detección	0,009
Límite de cuantificación	0,030

Elaborado por: Javier Macas

Gráfico C-7. Límites de Confianza para el método de cromo total.

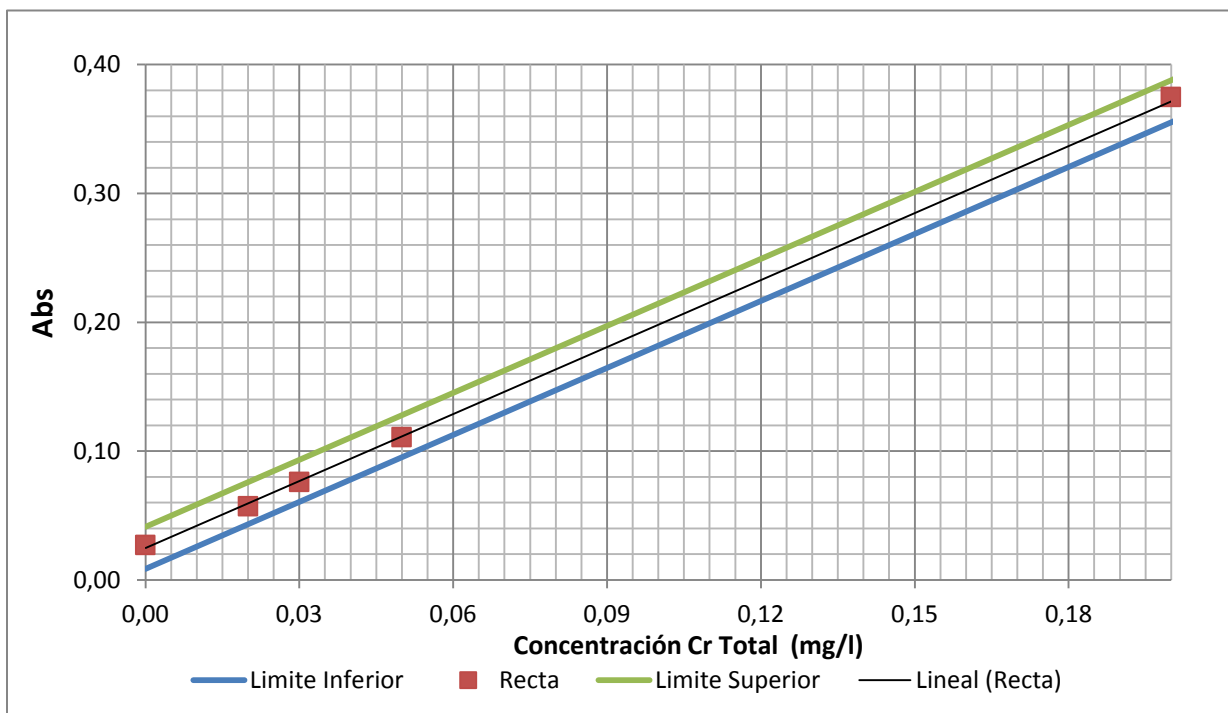


Gráfico C-8. Función de respuesta de linealidad el método de cromo total.

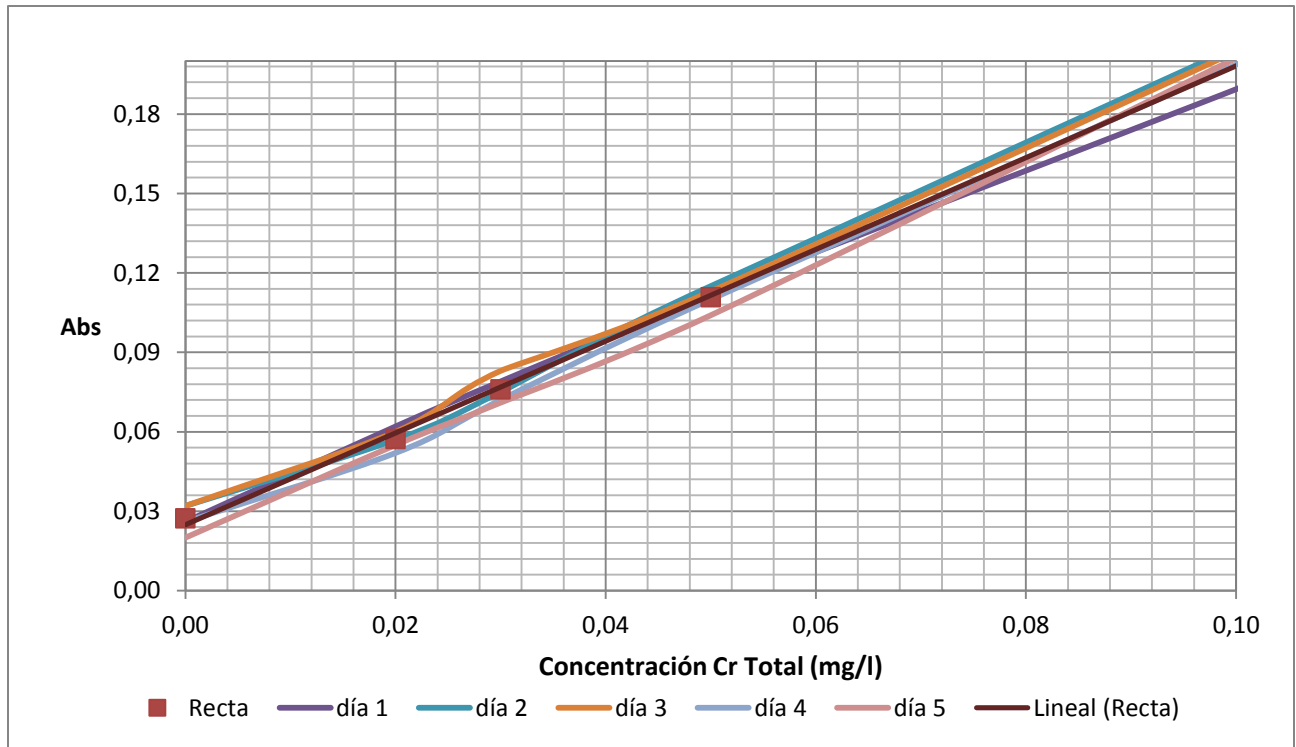
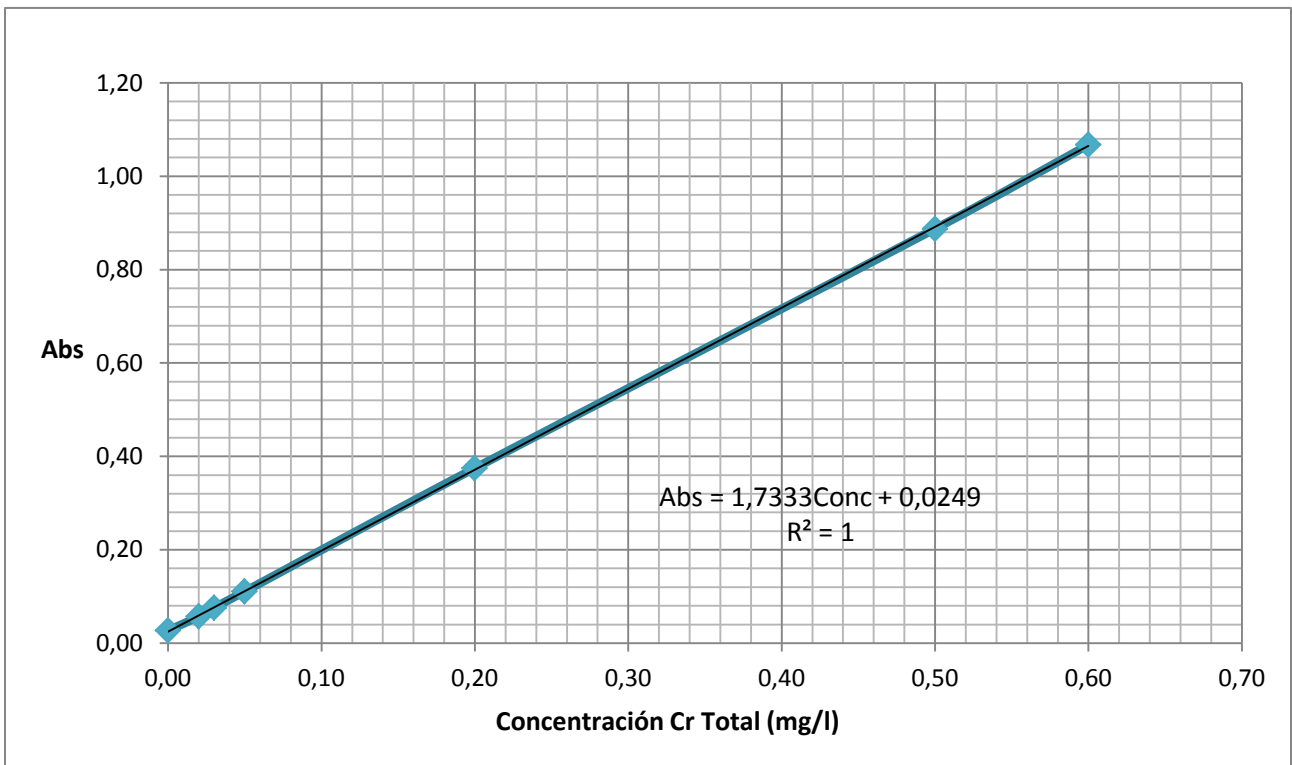


Gráfico C-9. Recta de Calibración del método de cromo total.



Nitritos

Tabla C-7. Límites de Confianza para el método de nitritos.

Límite	Ecuación
Límite Superior	$y = 3,66x + 0,025$
Límite inferior	$y = 3,66x - 0,099$

Elaborado por: Javier Macas

Tabla C-8. Desviación estándar del blanco, límite de detección y límite de cuantificación del método de nitritos.

Parámetro	Valor (mg/l)
Desv. Est. blanco	0,0001
Límite de detección	0,0004
Límite de cuantificación	0,010

Elaborado por: Javier Macas

Grafico C-10. Límites de Confianza para el método de nitritos.

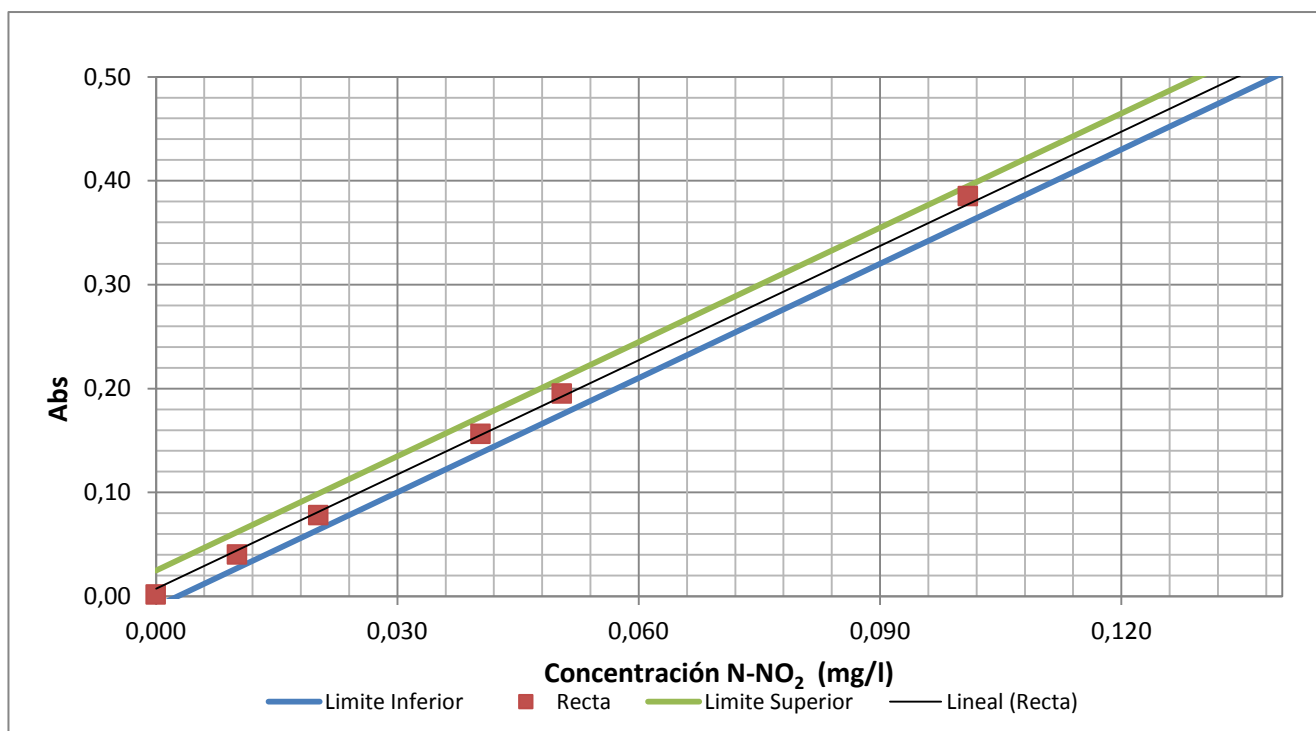


Grafico C-11. Función de respuesta de linealidad el método de nitritos.

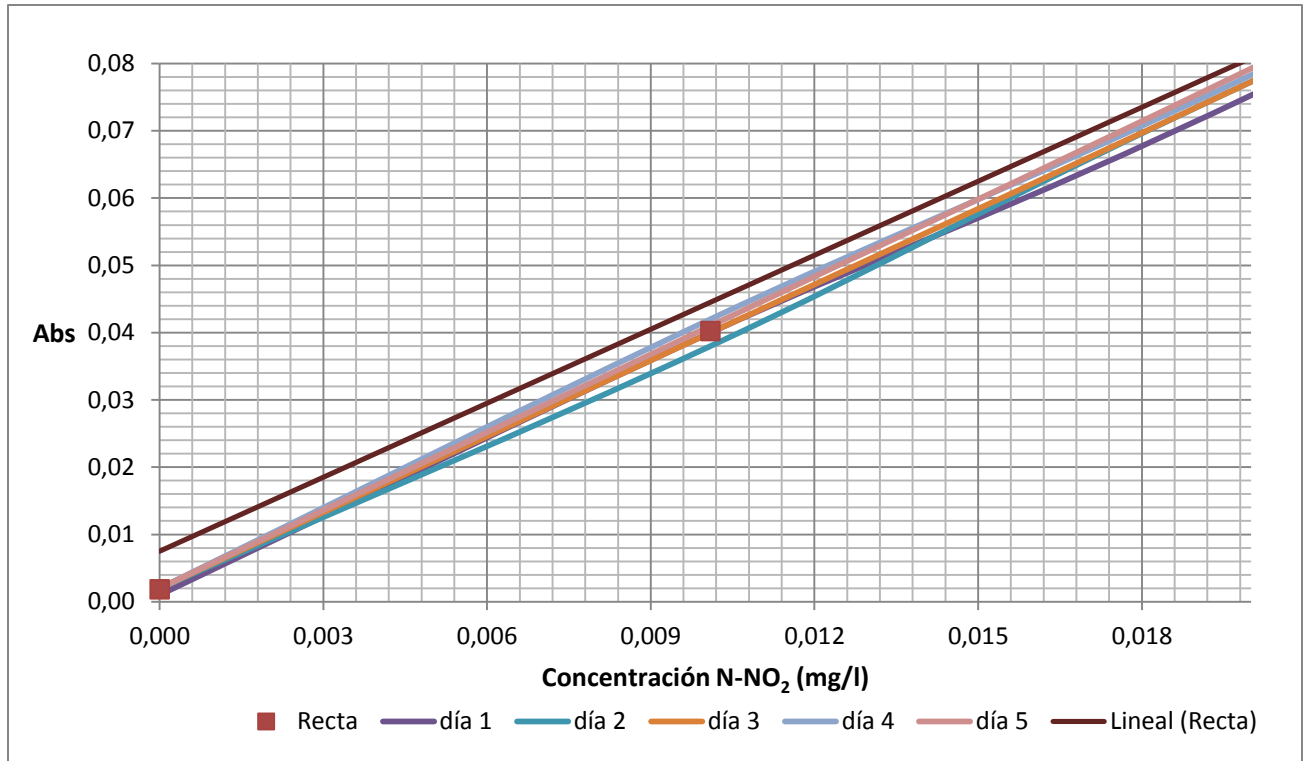
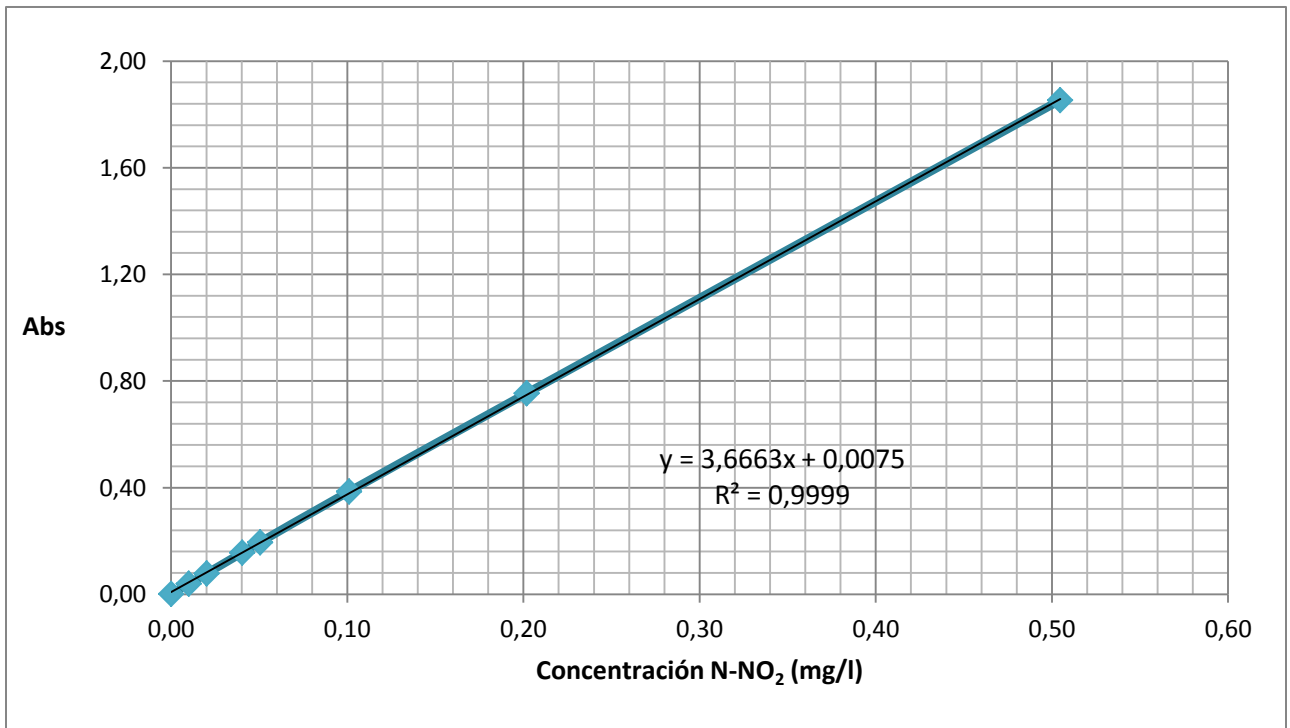


Gráfico C-12. Recta de Calibración del método de nitritos



ANEXO D

**EXACTITUD Y PRECISIÓN DE
LOS MÉTODOS**

Cloro libre residual

Tabla D-1. Recuperación para estándares de 0,1, 0,2 y 0,25 mg/l.

Rep.	0,1		0,2		0,25	
	Conc. (mg/l)	% Recup.	Conc. (mg/l)	% Recup.	Conc. (mg/l)	% Recup.
1	0,081	81,16	0,176	87,81	0,224	89,55
2	0,069	68,57	0,169	84,66	0,236	94,59
3	0,075	74,87	0,174	86,76	0,251	100,47
Promedio	0,075	74,87	0,173	86,40	0,237	94,87

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-2. Recuperación y Precisión promedio en cada nivel de concentración de la curva de calibración del método de cloro libre residual.

Conc. (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recup.	% CV
0,20	0,175	87,46	1,634
0,25	0,241	96,33	2,751
0,5	0,520	104,05	1,960
1	1,046	104,64	0,885
2	2,010	100,48	1,136
5	4,986	99,73	0,334

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-3. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del método de cloro libre residual.

Rep.	Conc. (mg/l)	Concentración Obtenida (mg/l)					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	0,25	0,224	0,249	0,247	0,238	0,247	0,241
2	0,25	0,236	0,243	0,251	0,232	0,243	
3	0,25	0,251	0,238	0,230	0,245	0,236	
1	0,5	0,524	0,530	0,505	0,518	0,536	0,520
2	0,5	0,539	0,518	0,524	0,524	0,532	
3	0,5	0,511	0,511	0,501	0,518	0,511	
1	1	1,065	1,042	1,023	1,040	1,057	1,046
2	1	1,055	1,051	1,055	1,044	1,040	
3	1	1,040	1,044	1,047	1,042	1,047	
1	2	2,048	1,997	2,008	2,016	1,987	2,010
2	2	2,008	1,985	1,989	2,014	2,035	
3	2	2,023	2,006	1,987	2,058	1,983	
1	5	4,974	4,986	4,997	4,982	4,955	4,986
2	5	5,009	4,980	5,007	4,986	4,990	
3	5	4,993	4,976	5,018	4,965	4,978	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-4. Recuperación en cada nivel de concentración por día del método de cloro libre residual.

Rep.	Conc. (mg/l)	% Recuperación					
		D1	D2	D3	D4	D5	Promedio
1	0,25	89,50	99,57	98,73	95,37	98,73	96,3
2	0,25	94,54	97,05	100,41	92,86	97,05	
3	0,25	100,41	95,37	92,02	97,89	94,54	
1	0,5	104,78	106,04	101,00	103,52	107,30	104,0
2	0,5	107,72	103,52	104,78	104,78	106,46	
3	0,5	102,26	102,26	100,16	103,52	102,26	
1	1	106,54	104,23	102,34	104,02	105,70	104,6
2	1	105,49	105,07	105,49	104,44	104,02	
3	1	104,02	104,44	104,65	104,23	104,65	
1	2	102,39	99,87	100,39	100,81	99,34	100,5
2	2	100,39	99,24	99,45	100,71	101,76	
3	2	101,13	100,29	99,34	102,91	99,13	
1	5	99,47	99,72	99,93	99,64	99,10	99,7
2	5	100,19	99,60	100,14	99,72	99,81	
3	5	99,85	99,51	100,35	99,30	99,56	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-5. Recuperación sobre una matriz real.

Días	Conc. muestra sin estándar (mg/l)	Conc. muestra + estándar (mg/l)	Conc. est. recuperado (mg/l)	% Recuperación
1	1,108	2,058	0,950	95,01
2	1,203	2,081	0,878	87,81
3	1,147	2,108	0,961	96,13
4	1,103	2,097	0,993	99,35
5	1,070	2,076	0,969	96,90
Promedio	1,134	2,084	0,950	95,04

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-6. Resultados de la precisión para el método de cloro libre residual.

Concentración (mg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	S _r mg/l	%CV _r	S _R mg/l	%CV _R
0,25	0,009	3,74	0,010	4,16
0,5	0,011	2,15	0,011	2,15
1	0,010	0,98	0,011	1,03
2	0,021	1,02	0,024	1,19
5	0,013	0,27	0,017	0,35

Elaborado por: Javier Macas

Cromo Hexavalente

Tabla D-7. Recuperación para estándares de 0,01 y 0,02 mg/l.

Rep.	0,01		0,02	
	Conc. (mg/l)	% Recuperación	Conc. (mg/l)	% Recuperación
1	0,009	89,39	0,022	108,43
2	0,008	84,08	0,021	105,78
3	0,008	78,77	0,020	97,81
Promedio	0,0083	84,08	0,021	104,01

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-8. Recuperación y Precisión promedio en cada nivel de concentración de la curva de calibración del método de cromo hexavalente.

Conc. (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recup.	% CV
0,01	0,009	92,35	4,161
0,02	0,019	95,48	2,392
0,03	0,028	95,81	1,311
0,05	0,050	101,22	1,737
0,1	0,100	100,56	0,831
0,2	0,202	101,89	1,154
0,5	0,498	100,52	1,275
0,6	0,591	99,42	1,294

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-9. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de cromo hexavalente.

Rep.	Conc. (mg/l)	Concentración Obtenida (mg/l)					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	0,02	0,020	0,018	0,020	0,018	0,020	0,019
2	0,02	0,020	0,018	0,019	0,017	0,018	
3	0,02	0,018	0,017	0,020	0,019	0,019	
1	0,6	0,590	0,585	0,597	0,584	0,592	0,590
2	0,6	0,593	0,592	0,589	0,584	0,589	
3	0,6	0,586	0,596	0,594	0,596	0,584	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-10. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) del método de cromo hexavalente.

Rep.	Conc. (mg/l)	Concentración Obtenida (mg/l)					
		D1	D2	D3	D4	D5	Promedio
1	1	0,992	0,982	1,003	1,003	0,969	0,990
2	1	0,994	0,993	0,991	0,986	0,973	
3	1	1,005	0,974	0,994	0,995	0,993	
1	5	4,965	4,938	4,960	4,944	4,928	4,962
2	5	4,970	4,965	4,954	4,949	4,938	
3	5	4,960	4,997	4,933	4,992	5,034	
1	50	48,854	50,235	49,225	50,128	49,279	49,473
2	50	49,438	48,907	49,013	49,491	49,916	
3	50	48,854	49,225	49,969	49,916	49,650	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-11. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de cromo hexavalente.

Rep.	Conc. (mg/l)	% Recuperación					
		D1	D2	D3	D4	D5	Promedio
1	0,02	98,70	93,34	98,70	90,66	98,70	94,40
2	0,02	98,70	93,34	95,86	87,98	93,34	
3	0,02	90,66	85,77	98,70	96,02	96,02	
1	0,60	99,22	98,42	100,38	98,15	99,49	99,20
2	0,60	99,76	99,49	99,04	98,15	99,13	
3	0,60	98,60	100,29	99,94	100,21	98,15	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-12. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) método de cromo hexavalente.

Rep.	Conc. (mg/l)	% Recuperación					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	1	100,10	99,13	101,17	101,17	97,74	99,86
2	1	100,31	100,20	99,99	99,45	98,17	
3	1	101,38	98,27	100,31	100,42	100,20	
1	5	100,20	99,67	100,10	99,77	99,45	100,14
2	5	100,31	100,20	99,99	99,88	99,67	
3	5	100,10	100,85	99,56	100,74	101,60	
1	50	98,59	101,38	99,35	101,17	99,45	99,85
2	50	99,77	98,70	98,92	99,88	100,74	
3	50	98,59	99,35	100,85	100,74	100,20	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-13. Recuperación sobre una matriz real.

Días	Conc. muestra sin estándar (mg/l)	Conc. muestra + estándar (mg/l)	Conc. est. recuperado (mg/l)	% Recuperación
1	0,0007	0,108	0,107	107,78
2	0,0016	0,104	0,102	103,31
3	0,0050	0,095	0,090	90,96
4	0,0007	0,101	0,101	101,53
5	0,0007	0,095	0,094	95,27
Promedio	0,002	0,101	0,099	99,77

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-14. Resultados de la precisión para el método de cromo hexavalente.

Concentración (mg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	S _r mg/l	%CV _r	S _R mg/l	%CV _R
0,02	0,0007	3,59	0,008	4,22
0,6	0,005	0,85	0,005	0,90
1	0,005	0,92	0,006	1,14
5	0,003	0,65	0,004	0,73
50	0,005	0,93	0,005	0,96

Elaborado por: Javier Macas

Cromo Total

Tabla D-15. Recuperación para estándares de 0,02 y 0,03 mg/l.

Rep.	0,02		0,03	
	Conc. (mg/l)	% Recuperación	Conc. (mg/l)	% Recuperación
1	0,017	83,99	0,031	104,07
2	0,019	92,64	0,029	96,38
3	0,017	86,87	0,027	90,61
Promedio	0,017	87,83	0,029	97,02

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-16. Recuperación y Precisión promedio en cada nivel de concentración de la curva de calibración del método de cromo total.

Conc. (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recup.	% CV
0,02	0,019	93,22	6,927
0,03	0,029	98,30	6,579
0,05	0,050	99,14	3,797
0,20	0,202	100,94	3,340
0,50	0,498	99,52	0,803
0,60	0,601	100,24	1,265

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-17. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de cromo total.

Rep.	Conc. (mg/l)	Concentración Obtenida (mg/l)					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	0,03	0,0289	0,0289	0,0289	0,0289	0,0295	0,029
2	0,03	0,0312	0,0283	0,0283	0,0266	0,0289	
3	0,03	0,0306	0,0324	0,0318	0,0266	0,0266	
1	0,60	0,612	0,593	0,597	0,596	0,597	0,6
2	0,60	0,603	0,600	0,600	0,605	0,602	
3	0,60	0,600	0,590	0,607	0,606	0,605	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-18. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) del método de cromo total.

Rep.	Conc. (mg/l)	Concentración Obtenida (mg/l)					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	1	0,989	1,016	1,017	1,021	1,016	1,003
2	1	0,992	0,994	1,027	0,998	1,005	
3	1	0,998	0,988	1,013	0,979	0,994	
1	10	9,959	9,936	9,959	10,236	10,213	9,995
2	10	9,867	9,809	10,132	10,202	10,098	
3	10	9,925	9,809	9,902	9,809	10,075	
1	100	100,977	100,285	97,285	101,670	99,362	99,82
2	100	100,400	99,823	98,670	101,208	98,670	
3	100	98,093	99,593	102,016	100,747	98,554	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-19. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de cromo total.

Rep.	Conc. (mg/l)	% Recuperación					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	0,03	96,38	96,38	96,38	96,38	98,30	97,02
2	0,03	104,07	94,45	94,45	88,69	96,38	
3	0,03	102,15	107,92	105,99	88,69	88,69	
1	0,60	101,94	98,76	99,53	99,34	99,53	100,12
2	0,60	100,49	99,92	99,92	100,78	100,30	
3	0,60	100,01	98,28	101,17	101,07	100,78	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-20. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) método de cromo total.

Rep.	Conc. (mg/l)	% Recuperación					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	1	98,90	101,55	101,67	102,13	101,55	100,31
2	1	99,25	99,36	102,71	99,82	100,52	
3	1	99,82	98,78	101,32	97,86	99,36	
1	10	99,59	99,36	99,59	102,36	102,13	99,95
2	10	98,67	98,09	101,32	102,02	100,98	
3	10	99,25	98,09	99,02	98,09	100,75	
1	100	100,98	100,29	97,28	101,67	99,36	99,82
2	100	100,40	99,82	98,67	101,21	98,67	
3	100	98,09	99,59	102,02	100,75	98,55	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-21. Recuperación sobre una matriz real.

Días	Conc. muestra sin estándar (mg/l)	Conc. muestra + estándar (mg/l)	Conc. est. recuperado (mg/l)	% Recuperación
1	0,013	0,061	0,048	96,16
2	0,012	0,064	0,051	102,69
3	0,012	0,063	0,051	101,93
4	0,014	0,064	0,050	100,00
5	0,014	0,060	0,046	91,93
Promedio	0,013	0,062	0,049	98,54

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-22. Resultados de la precisión para el método de cromo total.

Concentración (mg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	S _r mg/l	%CV _r	S _R mg/l	%CV _R
0,03	0,002	5,70	0,002	6,24
0,6	0,005	0,86	0,006	0,98
1	0,007	1,31	0,007	1,45
10	0,006	0,65	0,008	1,56
100	0,007	0,66	0,007	1,40

Elaborado por: Javier Macas

Nitritos

Tabla D-23. Recuperación para estándares de 0,005 y 0,01 mg/l.

Rep.	0,005		0,01	
	Conc. (mg/l)	% Recuperación	Conc. (mg/l)	% Recuperación
1	0,003	51,71	0,009	88,59
2	0,004	73,53	0,009	91,32
3	0,004	78,98	0,009	94,04
Promedio	0,004	68,08	0,009	91,32

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-24. Recuperación y Precisión promedio en cada nivel de concentración de la curva de calibración del método de nitritos.

Conc. (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recup.	% CV
0,01	0,009	88,30	3,690
0,02	0,019	95,48	1,897
0,04	0,041	100,56	1,950
0,05	0,051	101,42	1,714
0,1	0,103	102,04	1,123
0,2	0,204	100,90	1,420
0,5	0,504	99,77	0,935

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-25. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de nitritos.

Rep.	Conc. (mg/l)	Concentración Obtenida (mg/l)					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	0,01	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
2	0,01	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
3	0,01	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
1	0,50	0,502	0,507	0,503	0,508	0,509	0,503
2	0,50	0,501	0,498	0,498	0,507	0,506	
3	0,50	0,500	0,500	0,501	0,503	0,504	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-26. Concentración obtenida en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) del método de nitritos.

Rep.	Conc. (mg/l)	Concentración Obtenida (mg/l)					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	1	1,030	1,043	1,049	1,016	1,038	1,026
2	1	1,030	1,002	1,032	1,000	1,035	
3	1	1,032	1,005	1,030	1,035	1,016	
1	10	10,180	9,880	10,208	10,371	9,989	10,18
2	10	10,208	10,058	10,153	10,303	10,358	
3	10	10,153	10,126	10,235	10,221	10,235	
1	100	100,018	101,490	99,963	101,872	100,236	100,62
2	100	100,727	99,799	100,236	101,436	101,218	
3	100	100,127	100,072	99,908	100,781	101,436	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-27. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango bajo del método de nitritos.

Rep.	Conc. (mg/l)	% Recuperación					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	0,01	87,76	90,46	90,46	90,46	93,16	93,2
2	0,01	93,16	87,76	89,15	90,46	93,16	
3	0,01	90,46	89,15	87,76	93,16	87,76	
1	0,50	99,51	100,37	99,56	100,59	100,81	100,8
2	0,50	99,18	98,75	98,75	100,48	100,21	
3	0,50	99,13	99,13	99,29	99,67	99,94	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-28. Porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración por día del rango alto (diluciones) método de nitritos.

Rep.	Conc. (mg/l)	% Recuperación					Promedio
		D1	D2	D3	D4	D5	
1	1	101,99	103,34	103,88	100,64	102,80	103,9
2	1	101,99	99,29	102,26	99,02	102,53	
3	1	102,26	99,56	101,99	102,53	100,64	
1	10	100,84	97,87	101,12	102,74	98,95	102,7
2	10	101,12	99,63	100,57	102,06	102,60	
3	10	100,57	100,30	101,39	101,25	101,39	
1	100	100,02	101,49	99,96	101,87	100,24	101,9
2	100	100,73	99,80	100,24	101,44	101,22	
3	100	100,13	100,07	99,91	100,78	101,44	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-29. Recuperación sobre una matriz real.

Días	Conc. muestra sin estándar (mg/l)	Conc. muestra + estándar (mg/l)	Conc. est. recuperado (mg/l)	% Recuperación
1	0,000	0,047	0,047	94,04
2	0,000	0,049	0,049	97,68
3	0,000	0,047	0,047	94,04
4	0,000	0,048	0,048	96,77
5	0,000	0,049	0,049	97,68
Promedio	0,000	0,048	0,048	96,04

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-30. Resultados de la precisión del método de nitritos.

Concentración (mg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	S _r mg/l	%CV _r	S _R mg/l	%CV _R
0,01	0,0002	2,44	0,0002	2,50
0,5	0,0027	0,53	0,0035	0,70
1	0,0015	1,44	0,0015	1,46
10	0,0022	1,07	0,0027	1,31
100	0,0029	0,58	0,0036	0,71

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-31. Recuperación del análisis del color amarillo.

Conc. Estand. (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recuperación	Color (Pt-Co)
0,02	0,020	101,57	60
0,2	0,203	101,39	
0,02	0,019	98,84	120
0,2	0,203	101,67	
0,02	0,019	94,75	290
0,2	0,201	100,44	
0,02	0,022	113,85	>500
0,2	0,207	103,85	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-32. Recuperación del análisis del color azul.

Conc. Estand. (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recuperación	Color (Pt-Co)
0,02	0,020	100,21	3
0,2	0,205	102,89	
0,02	0,019	98,85	7
0,2	0,207	103,03	
0,02	0,019	94,75	11
0,2	0,201	100,44	
0,02	0,018	92,03	30
0,2	0,199	99,89	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-33. Recuperación del análisis del color negro.

Conc. Estand. (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recuperación	Color (Pt-Co)
0,02	0,019	96,12	30
0,2	0,202	101,26	
0,02	0,018	89,30	47
0,2	0,198	99,07	
0,02	0,017	87,94	60
0,2	0,197	98,67	
0,02	0,015	72,93	120
0,2	0,186	93,21	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-34. Recuperación del análisis del color rojo.

Conc. Estand. (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recuperación	Color (Pt-Co)
0,02	0,019	97,48	15
0,2	0,203	101,53	
0,02	0,018	92,03	25
0,2	0,199	99,89	
0,02	0,015	72,93	81
0,2	0,183	91,71	
0,02	0,008	42,93	250
0,2	0,141	70,57	

Elaborado por: Javier Macas

Tabla D-35. Porcentaje de recuperación del análisis del color verde.

Conc. Estand (mg/l)	Conc. Obt. (mg/l)	% Recuperación	Color (Pt-Co)
0,02	0,021	102,94	40
0,2	0,203	101,67	
0,02	0,020	100,21	100
0,2	0,205	102,62	
0,02	0,020	100,21	300
0,2	0,201	100,44	
0,02	0,017	86,57	>500
0,2	0,197	98,53	

Elaborado por: Javier Macas

ANEXO E

CÁLCULOS DE ANOVA

Tabla E-1. Análisis de Varianza Simple para los diferentes niveles de concentración del método de cloro libre residual.

Parámetros	0 mg/l	0,25 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	2 mg/l	5 mg/l	Muestra Real
Lg	0,0109	0,1391	0,2722	0,5229	0,9818	2,4001	0,5645
p	3	3	3	3	3	3	3
q	5	5	5	5	5	5	5
S_{max}²	6,33*10 ⁻⁶	4,23*10 ⁻⁵	4,23*10 ⁻⁵	6,03*10 ⁻⁵	1,93*10 ⁻⁴	7,43*10 ⁻⁵	8,63*10 ⁻⁵
G_{max} calculado	0,637	0,486	0,444	0,556	0,399	0,556	0,520
G_{max} crítico	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683

ANOVA

SDC_B	2,57*10 ⁻⁵	2,09*10 ⁻⁵	1,14*10 ⁻⁴	6,31*10 ⁻⁵	7,8*10 ⁻⁴	4,87*10 ⁻⁴	8,21*10 ⁻³
DCM_B	6,43*10 ⁻⁶	5,23*10 ⁻⁶	2,86*10 ⁻⁵	1,58*10 ⁻⁵	1,95*10 ⁻⁴	1,22*10 ⁻⁴	2,05*10 ⁻³
SDC_W	3,40 *10 ⁻⁵	1,84*10 ⁻⁴	2,84*10 ⁻⁴	2,37*10 ⁻⁴	9,63*10 ⁻⁴	4,12*10 ⁻⁴	7,03*10 ⁻³
DCM_W	3,40*10 ⁻⁶	1,84*10 ⁻⁵	2,84*10 ⁻⁵	2,37*10 ⁻⁵	9,63*10 ⁻⁵	4,12*10 ⁻⁵	7,03*10 ⁻⁴

F Crítico	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780
F calculado	1,892	0,283	1,007	0,666	2,024	2,954	2,811
S_r	0,002	0,004	0,005	0,005	0,010	0,006	0,027
S_L²	1,01*10 ⁻⁶	4,39*10 ⁻⁶	6,67*10 ⁻⁸	2,63*10 ⁻⁶	3,29*10 ⁻⁵	2,68*10 ⁻⁵	4,41*10 ⁻⁴
SDC_T	5,97*10 ⁻⁵	2,05*10 ⁻⁴	3,98*10 ⁻⁴	3,00*10 ⁻⁴	1,74*10 ⁻³	8,99*10 ⁻⁴	1,55*10 ⁻²
DCM_T	4,98*10 ⁻⁶	1,71*10 ⁻⁵	3,32*10 ⁻⁵	2,50*10 ⁻⁵	1,45*10 ⁻⁴	7,49*10 ⁻⁵	1,29*10 ⁻³
S_R	2,10*10 ⁻³	4,77*10 ⁻³	5,34*10 ⁻³	5,13*10 ⁻³	1,14*10 ⁻²	8,25*10 ⁻³	3,42*10 ⁻²
% CV_R	19,33	3,43	1,96	0,98	1,16	0,34	6,06
% Max CV_r	17,19	3,08	1,96	0,93	1,00	0,27	4,71

Elaborado por: Javier Macas

Tabla E-2. Análisis de Varianza Simple para los diferentes niveles de concentración del método de cromo hexavalente.

Parámetros	0 mg/l	0,02 mg/l	0,6 mg/l	1 mg/l	5 mg/l	50 mg/l	Muestra Real
Lg	0,0081	0,0455	1,121	0,9419	0,944	0,942	0,010
p	3	3	3	3	3	3	3
q	5	5	5	5	5	5	5
S_{max}²	4,3310 ⁻⁶	3,0010 ⁻⁶	1,7610 ⁻⁴	1,5110 ⁻⁴	1,2110 ⁻⁴	1,7010 ⁻⁴	4,3310 ⁻⁶
G_{max} calculado	0,419	0,375	0,393	0,408	0,659	0,456	0,342
G_{max} crítico	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683

ANOVA

SDC_B	1,51*10 ⁻⁵	1,37*10 ⁻⁵	2,22*10 ⁻⁴	7,69*10 ⁻⁴	2,36*10 ⁻⁵	3,66*10 ⁻⁴	1,71*10 ⁻⁵
DCM_B	3,77*10 ⁻⁶	3,43*10 ⁻⁶	5,56*10 ⁻⁵	1,92*10 ⁻⁴	5,90*10 ⁻⁶	9,15*10 ⁻⁵	4,27*10 ⁻⁶
SDC_W	2,07 *10 ⁻⁵	1,60*10 ⁻⁵	8,97*10 ⁻⁴	7,41*10 ⁻⁴	3,68*10 ⁻⁴	7,47*10 ⁻⁴	2,53*10 ⁻⁵
DCM_W	2,07*10 ⁻⁶	1,60*10 ⁻⁶	8,97*10 ⁻⁵	7,41*10 ⁻⁵	3,68*10 ⁻⁵	7,47*10 ⁻⁵	2,53*10 ⁻⁶

F Crítico	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780
F	1,822	2,145	0,619	2,260	0,160	1,224	1,684
S_r	0,001	0,001	0,009	0,009	0,006	0,009	0,002
S_L²	5,6710 ⁻⁷	6,1110 ⁻⁷	1,1410 ⁻⁵	3,9410 ⁻⁵	1,0310 ⁻⁵	5,5910 ⁻⁶	5,7810 ⁻⁷
SDC_T	3,5710 ⁻⁵	2,9710 ⁻⁵	1,1210 ⁻³	1,5110 ⁻³	3,9210 ⁻⁴	1,1110 ⁻³	4,2410 ⁻⁵
DCM_T	2,9810 ⁻⁶	2,4810 ⁻⁶	9,3210 ⁻⁵	1,2610 ⁻⁴	3,2610 ⁻⁵	9,2810 ⁻⁵	3,5310 ⁻⁶
S_R	1,6210 ⁻³	1,4910 ⁻³	1,0110 ⁻²	1,0710 ⁻²	6,8610 ⁻³	8,9610 ⁻³	1,7610 ⁻³
% CV_R	21,56	2,85	0,85	0,92	0,64	0,93	18,37
% Max CV_r	19,95	3,27	0,90	1,13	0,73	0,95	17,29

Elaborado por: Javier Macas

Tabla E-3. Análisis de Varianza Simple para los diferentes niveles de concentración del método de cromo total.

Parámetros	0 mg/l	0,03 mg/l	0,6 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l	Muestra Real
Lg	0,0260	0,0753	1,066	0,8942	0,891	0,890	0,047
p	3	3	3	3	3	3	3
q	5	5	5	5	5	5	5
S_{\max}^2	$4,13 \cdot 10^{-5}$	$1,43 \cdot 10^{-5}$	$1,08 \cdot 10^{-4}$	$3,43 \cdot 10^{-4}$	$4,22 \cdot 10^{-4}$	$4,44 \cdot 10^{-4}$	$5,03 \cdot 10^{-5}$
G_{\max} calculado	0,438	0,347	0,271	0,529	0,672	0,674	0,346
G_{\max} crítico	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683	0,683

ANOVA

SDC_B	$1,31 \cdot 10^{-4}$	$5,27 \cdot 10^{-5}$	$6,02 \cdot 10^{-4}$	$8,64 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-3}$	$6,98 \cdot 10^{-4}$	$2,04 \cdot 10^{-5}$
DCM_B	$3,28 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-5}$	$1,51 \cdot 10^{-4}$	$2,16 \cdot 10^{-4}$	$2,94 \cdot 10^{-4}$	$1,75 \cdot 10^{-4}$	$5,10 \cdot 10^{-6}$
SDC_W	$1,89 \cdot 10^{-4}$	$8,27 \cdot 10^{-5}$	$7,99 \cdot 10^{-4}$	$1,30 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-3}$	$1,32 \cdot 10^{-3}$	$2,91 \cdot 10^{-4}$
DCM_W	$1,89 \cdot 10^{-5}$	$8,27 \cdot 10^{-6}$	$7,99 \cdot 10^{-5}$	$1,30 \cdot 10^{-5}$	$1,26 \cdot 10^{-4}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	$2,91 \cdot 10^{-5}$

F Crítico	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780
F calculado	1,740	1,593	1,884	1,664	2,335	1,324	0,175
S_r	0,004	0,003	0,009	0,011	0,011	0,011	0,005
S_L^2	$4,66 \cdot 10^{-6}$	$1,63 \cdot 10^{-6}$	$2,36 \cdot 10^{-5}$	$2,88 \cdot 10^{-5}$	$5,60 \cdot 10^{-5}$	$1,42 \cdot 10^{-5}$	$8,01 \cdot 10^{-6}$
SDC_T	$3,20 \cdot 10^{-4}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	$2,16 \cdot 10^{-3}$	$2,43 \cdot 10^{-3}$	$2,02 \cdot 10^{-3}$	$3,12 \cdot 10^{-3}$
DCM_T	$2,67 \cdot 10^{-5}$	$1,13 \cdot 10^{-5}$	$1,17 \cdot 10^{-5}$	$1,80 \cdot 10^{-4}$	$2,03 \cdot 10^{-4}$	$1,68 \cdot 10^{-5}$	$2,60 \cdot 10^{-5}$
S_R	$4,85 \cdot 10^{-3}$	$3,15 \cdot 10^{-3}$	$1,02 \cdot 10^{-2}$	$1,26 \cdot 10^{-2}$	$1,35 \cdot 10^{-2}$	$1,21 \cdot 10^{-2}$	$6,09 \cdot 10^{-2}$
% CV _R	19,16	3,97	0,85	1,29	1,28	1,30	11,82
% Max CV _r	18,65	4,18	0,95	1,41	1,51	1,36	12,93

Elaborado por: Javier Macas

Tabla E-4. Análisis de Varianza Simple para los diferentes niveles de concentración del método de nitritos

Parámetros	0 mg/l	0,01 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l	Muestra Real
Lg	0,0024	0,0409	1,852	0,3837	0,754	1,852	0,002
p	3	3	3	3	3	3	3
q	5	5	5	5	5	5	5
S_{max}²	1,00*10 ⁻⁶	1,33*10 ⁻⁶	2,46*10 ⁻⁴	7,03*10 ⁻⁵	1,89*10 ⁻⁴	2,77*10 ⁻⁴	1,33*10 ⁻⁶
G_{max} calculado	0,429	0,400	0,522	0,481	0,592	0,482	0,364
G_{max} crítico	0,6831	0,6831	0,6838	0,6838	0,6838	0,6838	0,6838

ANOVA

SDC_B	2,93*10 ⁻⁶	2,27*10 ⁻⁶	1,22*10 ⁻³	1,28*10 ⁻⁴	6,42*10 ⁻⁴	1,16*10 ⁻³	7,60*10 ⁻⁶
DCM_B	7,33*10 ⁻⁷	5,67*10 ⁻⁷	3,06*10 ⁻⁴	3,21*10 ⁻⁵	1,60*10 ⁻⁴	2,89*10 ⁻⁴	1,90*10 ⁻⁶
SDC_W	4,67 *10 ⁻⁶	6,67*10 ⁻⁶	9,45*10 ⁻⁴	2,93*10 ⁻⁴	6,38*10 ⁻⁴	1,15*10 ⁻³	7,33*10 ⁻⁶
DCM_W	4,67 *10 ⁻⁷	6,67*10 ⁻⁷	9,45*10 ⁻⁵	2,93*10 ⁻⁵	6,38*10 ⁻⁵	1,15*10 ⁻⁴	7,33*10 ⁻⁷

F Crítico	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780	3,4780
F calculado	1,571	0,850	3,236	1,096	2,515	2,515	2,591
S_r	0,001	0,001	0,010	0,005	0,008	0,011	0,001
S_L²	8,89*10 ⁻⁸	3,33*10 ⁻⁸	7,04*10 ⁻⁵	9,33*10 ⁻⁷	3,22*10 ⁻⁵	5,81*10 ⁻⁵	3,89*10 ⁻⁷
SDC_T	7,60*10 ⁻⁶	8,93*10 ⁻⁶	2,17*10 ⁻³	4,21*10 ⁻⁴	1,28*10 ⁻³	2,31*10 ⁻³	1,49*10 ⁻⁵
DCM_T	6,33*10 ⁻⁷	7,44*10 ⁻⁷	1,81*10 ⁻⁴	3,51*10 ⁻⁵	1,07*10 ⁻⁴	1,92*10 ⁻⁴	1,24*10 ⁻⁶
S_R	7,45*10 ⁻⁴	8,37*10 ⁻⁴	1,28*10 ⁻²	5,50*10 ⁻³	9,80*10 ⁻³	1,32*10 ⁻²	1,06*10 ⁻³
% CV_R	31,06	2,04	0,69	1,43	1,30	0,71	46,74
% Max CV_r	40,99	2,02	0,53	1,42	1,08	0,58	64,23

Elaborado por: Javier Macas

ANEXO F

**CÁLCULOS DE
INCERTIDUMBRES**

Cloro Libre residual

Tabla F-1. Incertidumbre para el material volumétrico diluido.

EQUIPOS/MATERIALES	k	μ_{MV}	μ_{Cal}	μ_{error}	μ_{Temp}	μ_V
Pipeta volumétrica 5 ml	2	0,003	0,0015	0,009	0,0016	0,009
Pipeta volumétrica 10 ml	2	0,003	0,0015	0,001	0,0056	0,006
Pipeta volumétrica 25 ml	2	0,004	0,0020	0,021	0,0106	0,023
Balón aforado 1000 ml	2	0,050	0,0250	0,017	0,2910	0,293
Balón Aforado 250 ml	2	0,020	0,0100	0,017	0,1606	0,162
Balón Aforado 100 ml	2	0,003	0,0015	0,014	0,0594	0,061
Balón Aforado 50 ml	2	0,003	0,0015	0,015	0,0297	0,033

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-2. Incertidumbre del Material de referencia.

Concentración (mg/l)	0,25	0,5	1	2	5
Conc Solución de Referencia usada (mg/l)	5	5	5	5	MRCs
Vol Alícuota Solref. (ml)	5	25	50	100	5
Vol. Aforo (ml)	100	250	250	250	1000
Conc. Sol Preparada (mg/l)	0,25	0,5	1	2	5
A (Vol Alícuota/Vol Aforo)	0,05	0,1	0,2	0,4	0,005
B (Conc.MR/Vol Aforo (mg/l*ml))	0,05	0,02	0,02	0,02	1
C (Conc MR*Vol alícuota/Vol Aforo ² (mg/l*ml))	0,0025	0,002	0,004	0,008	-0,005
μ_{MR} (mg/l)	0,0026	0,0051	0,0102	0,0204	0,0508

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-3. Incertidumbre de linealidad.

Concentración (mg/l)	0,25	0,5	1	2	5
L	0,13907	0,27220	0,52287	0,98180	2,40007
C $(-(L-L_0)/m^2)$	-0,13907	-0,27220	-0,52287	-0,98180	-2,40007
Exactitud (mg/l)	0,01049	0,01049	0,02099	0,02099	0,02099
μ_{Deriva}	0,00606	0,00606	0,01212	0,01212	0,01212
$\mu_{Resolución}$	0,00058				
μ_L	0,00609	0,00609	0,01213	0,01213	0,01213
μ_{Lo}	0,00000				
μ_m	0,00000				
μ_{FR}	0,00609	0,00609	0,01213	0,01213	0,01213

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-4. Incertidumbre de repetibilidad.

Concentración (mg/l)	0,25	0,5	1	2	5
Desv. Estand. (Abs)	0,0038	0,0053	0,0041	0,0112	0,0080
n	15	15	15	15	15
μ_r (Abs)	0,0010	0,0014	0,0011	0,0029	0,0021
μ_r (mg/l)	0,0021	0,0029	0,0022	0,0060	0,0043

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-5. Incertidumbre de calibración.

Concentración (mg/l)	0,25	0,5	1	2	5
μ_{calEq} (mg/l)	0,0069	0,0085	0,0160	0,0245	0,0524
% μ_{calEq}	2,77	1,69	1,60	1,22	1,05

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-6. Incertidumbre de reproducibilidad.

Concentración (mg/l)	0,25	0,5	1	2	5
%μ_R (abs)	3,43	1,96	0,98	1,15	0,34
% μ_R (mg/l)	4,16	2,15	1,02	1,18	0,35

Elaborado por: **Javier Macas**

Tabla F-7. Incertidumbre del procedimiento.

Concentración (mg/l)	0,25	0,5	1	2	5
Volumen de muestra (ml)	10				
$\mu_{Vmuestra}$	0,006				
$\mu_{procedimiento}$ (mg/l)	0,0001	0,0003	0,0006	0,0012	0,0029
% $\mu_{procedimiento}$	0,058	0,058	0,058	0,058	0,058

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-8 Incertidumbre estándar combinada y expandida

Concentración (mg/l)	0,25	0,5	1	2	5
$\mu_{método}$ (mg/l)	0,012	0,014	0,019	0,034	0,055
% $\mu_{método}$	5,00	2,74	1,90	1,71	1,11
U (mg/l)	0,024	0,028	0,038	0,068	0,110
% U	10,00	5,48	3,81	3,41	2,21

Elaborado por: Javier Macas

Cromo Hexavalente

Tabla F-9. Incertidumbre para el material volumétrico.

EQUIPOS/MATERIALES	k	μ_{MV}	μ_{Cal}	μ_{error}	μ_{Temp}	μ_V
Pipeta volumétrica 5 ml	2	0,003	0,002	0,001	-0,0005	0,0018
Pipeta volumétrica 10 ml	2	0,003	0,002	0,001	-0,0033	0,0038
Pipeta volumétrica 25 ml	2	0,040	0,020	0,021	-0,0050	0,0295
Balón aforado 1000 ml	2	0,050	0,025	0,121	-0,0667	0,1406
Balón Aforado 500 ml	2	0,030	0,015	0,266	-0,0515	0,2709
Balón Aforado 250 ml	2	0,020	0,010	0,017	-0,1046	0,1065
Balón Aforado 100 ml	2	0,030	0,015	0,014	-0,0370	0,0422
Balón Aforado 50 ml	2	0,003	0,0015	0,015	-0,0018	0,0152

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-10. Incertidumbre del Material de referencia.

Concentración (mg/l)	vol alícuota MR (ml)	Vol Aforo (ml)	A (Vol alícuota/Vol Aforo)	B [Conc MR/Vol Aforo (mg/l*ml)]	C [Conc MR*Vol alícuota/Vol Aforo ² (mg/l*ml)]	μ_{MR} (mg/l)
50	50	1000	0,05	0,991	-0,0495	0,1010
5	25	250	0,10	0,1982	-0,0198	0,0192
1	20	1000	0,02	0,04955	-0,0009	0,0003

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-11. Incertidumbre del Material de referencia diluido.

Concentración (mg/l)	0,02	0,6	1	5	50
Conc Solución de Referencia usada (mg/l)	1	1	1	5	50
Vol Alícuota Solref. (ml)	10	150	250	25	5
Vol. Aforo (ml)	500	250	500	250	500
Conc. Sol Preparada (mg/l)	0,02	0,6	0,50	0,50	0,50
A (Vol Alícuota/Vol Aforo)	0,02	0,6	0,5	0,1	0,01
B (Conc.MR/Vol Aforo (mg/l*ml))	0,00198	0,00396	0,00198	0,02000	0,09910
C (Conc MR*Vol alícuota/Vol Aforo ² (mg/l*ml))	0,00003964	0,0023784	0,000991	0,00200	0,000991
μ_{MR} (mg/l)	0,00024	0,00714	0,05068	0,01016	0,00106

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-12. Incertidumbre de linealidad.

Concentración (mg/l)	0,02	0,6
L	0,0455	1,1210
C $-(L-L_0)/m^2$	-0,0454	-1,1211
Exactitud (mg/l)	0,0026	0,0053
μ_{Deriva}	0,0015	0,0031
$\mu_{Resolución}$	0,00058	
μ_L	0,00164	0,00312
μ_{L_0}	0,00	
μ_m	0,00	
μ_F	0,00164	0,00312

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-13. Incertidumbre de repetibilidad.

Concentración (mg/l)	0,02	0,6	1	5	50
Desv. Estand. (Abs)	0,0015	0,0089	0,0104	0,0053	0,0089
<i>n</i>	15	15	15	15	15
μ_r (Abs)	0,00038	0,00231	0,00268	0,00137	0,00230
μ_r (mg/l)	0,00020	0,00123	0,00142	0,00073	0,00122

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-14. Incertidumbre de calibración.

Concentración (mg/l)	0,02	0,6	1	5	50
μ_{calEq} (mg/l)	0,0017	0,0079	0,0079	0,0079	0,0079
% μ_{calEq}	8,41	1,33	8,41	8,41	8,41

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-15. Incertidumbre de reproducibilidad.

Concentración (mg/l)	0,02	0,6	1	5	50
%μ_R (abs)	0,001	0,010	0,011	0,007	0,009
% μ_R (mg/l)	4,22	0,90	1,14	0,73	0,96

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-16. Incertidumbre del procedimiento.

Concentración (mg/l)	0,02	0,6	1	5	50
Volumen de muestra (ml)	2				
$\mu_{vmuestra}$	0,030				
$\mu_{procedimiento}$ (mg/l)	0,00002	0,00070	0,00117	0,00586	0,05859
% $\mu_{procedimiento}$	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-17. Incertidumbre estándar combinada y expandida.

Concentración (mg/l)	0,02	0,6	1	5	50
$\mu_{\text{método}}$ (mg/l)	0,002	0,010	0,010	0,010	0,059
% $\mu_{\text{método}}$	9,41	1,61	8,49	8,45	8,47
U (mg/l)	0,004	0,020	0,020	0,021	0,119
% U	18,83	3,22	16,98	16,89	16,94

Elaborado por: Javier Macas

Cromo Total

Tabla F-18. Incertidumbre para el material volumétrico.

EQUIPOS/MATERIALES	k	μ_{MV}	μ_{Ca}	μ_{error}	μ_{Temp}	μ_V
Pipeta volumétrica 5 ml	2	0,003	0,002	0,009	-0,0018	0,0090
Pipeta volumétrica 10 ml	2	0,003	0,002	0,001	-0,0061	0,0064
Pipeta volumétrica 25 ml	2	0,040	0,020	0,021	-0,0118	0,0312
Balón aforado 1000 ml	2	0,050	0,025	0,121	-0,3395	0,3613
Balón Aforado 500 ml	2	0,030	0,015	0,266	-0,1879	0,3257
Balón Aforado 250 ml	2	0,020	0,010	0,017	-0,1728	0,1739
Balón Aforado 100 ml	2	0,030	0,015	0,014	-0,0643	0,0674
Balón Aforado 50 ml	2	0,003	0,0015	0,015	-0,0321	0,0355

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-19. Incertidumbre del Material de referencia.

Concentración (mg/l)	Vol alicuota MR (ml)	Vol Aforo (ml)	A (Vol alicuota/Vol Aforo)	B [Conc MR/Vol Aforo (mg/l*ml)]	C [Conc MR*Vol alicuota/Vol Aforo² (mg/l*ml)]	μ_{MR} (mg/l)
100	50	1000	0,05	1,001	-0,0501	0,1552
10	50	500	0,1	0,2	-0,0200	0,0183
1	10	1000	0,01	0,1	-0,0010	0,0008

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-20. Incertidumbre del Material de referencia diluido.

Concentración (mg/l)	0,03	0,6	1	10	100
Conc Solución de Referencia usada (mg/l)	1	1	1	10	100
Vol Alícuota Solref. (ml)	15	150	250	25	5
Vol. Aforo (ml)	500	250	500	500	1000
Conc. Sol Preparada (mg/l)	0,03	0,6	0,50	0,50	0,50
A (Vol Alícuota/Vol Aforo)	0,03	0,6	0,5	0,05	0,005
B (Conc.MR/Vol Aforo (mg/l*ml))	0,00198	0,00396	0,00198	0,02000	0,10000
C (Conc MR*Vol alicuota/Vol Aforo² (mg/l*ml))	0,000059	0,002378	0,000991	0,001000	0,000050
μ_{MR} (mg/l)	0,00055	0,01097	0,07761	0,00779	0,00119

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-21. Incertidumbre de linealidad.

Concentración (mg/l)	0,03	0,6
L	0,07533	1,06613
C $-(L-L_0)/m^2$	-0,07533	-1,06613
Exactitud (mg/l)	0,00288	0,00577
μ_{Deriva}	0,00167	0,00333
$\mu_{Resolución}$	0,00058	
μ_L	0,00176	0,00338
μ_{L_0}	$1,17 \cdot 10^{-17}$	
μ_m	$3,83 \cdot 10^{-17}$	
μ_{FR}	0,00176	0,00338

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-22. Incertidumbre de repetibilidad.

Concentración (mg/l)	0,03	0,6	1	10	100
Desv. Estand. (Abs)	0,0031	0,0100	0,0124	0,0132	0,0120
n	15	15	15	15	15
μ_r (Abs)	0,00080	0,00258	0,00321	0,00340	0,00310
μ_r (mg/l)	0,00046	0,00149	0,00185	0,00196	0,00179

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-23. Incertidumbre de calibración.

Concentración (mg/l)	0,03	0,6	1	10	100
μ_{calEq} (mg/l)	0,0019	0,0116	0,0116	0,0116	0,0116
% μ_{calEq}	6,34	1,93	6,34	6,34	6,34

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-24. Incertidumbre de reproducibilidad.

Concentración (mg/l)	0,03	0,6	1	10	100
%μ_R (abs)	0,003	0,010	0,013	0,013	0,012
% μ_R (mg/l)	6,24	0,98	1,45	1,56	1,40

Elaborado por: **Javier Macas**

Tabla F-25. Incertidumbre del procedimiento.

Concentración (mg/l)	0,03	0,6	1	10	100
Volumen de muestra (ml)	25				
$\mu_{V\text{muestra}}$	0,031				
$\mu_{\text{procedimiento}}$ (mg/l)	0,00004	0,00075	0,00125	0,01247	0,12469
% $\mu_{\text{procedimiento}}$	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12

Elaborado por: **Javier Macas**

Tabla F-26. Incertidumbre estándar combinada y expandida.

Concentración (mg/l)	0,03	0,6	1	10	100
$\mu_{\text{método}}$ (mg/l)	0,003	0,013	0,014	0,019	0,125
% $\mu_{\text{método}}$	8,90	2,17	6,51	6,53	6,50
U (mg/l)	0,005	0,025	0,027	0,037	0,251
% U	17,80	4,33	13,02	13,07	13,00

Elaborado por: **Javier Macas**

Nitritos

Tabla F-27. Incertidumbre para el material volumétrico.

EQUIPOS/MATERIALES	k	μ_{MV}	μ_{Cal}	μ_{error}	μ_{Temp}	μ_V
Pipeta volumétrica 2 ml	2	0,003	0,002	0,002	-0,0025	0,00343
Pipeta volumétrica 5 ml	2	0,003	0,002	0,009	-0,0013	0,00888
Pipeta volumétrica 10 ml	2	0,003	0,002	0,001	-0,0050	0,00532
Pipeta volumétrica 25 ml	2	0,004	0,002	0,021	-0,0091	0,02277
Balón aforado 1000 ml	2	0,030	0,015	0,121	-0,2304	0,26075
Balón Aforado 500 ml	2	0,020	0,010	0,266	-0,1334	0,29736
Balón Aforado 250 ml	2	0,020	0,010	0,017	-0,1485	0,14986
Balón Aforado 100 ml	2	0,003	0,002	0,014	-0,0582	0,05984
Balón Aforado 50 ml	2	0,003	0,0015	0,015	-0,0027	0,01532

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-28. Incertidumbre del Material de referencia.

Concentración (mg/l)	vol alícuota MR (ml)	Vol Aforo (ml)	A (Vol alícuota/Vol Aforo)	B [Conc MR/Vol Aforo (mg/l*ml)]	C [Conc MR*Vol alícuota/Vol Aforo ² (mg/l*ml)]	μ_{MR} (mg/l)
100	100	1000	0,1	1,01	-0,10	0,239
10	50	500	0,1	0,20	-0,02	0,025
1	5	500	0,01	0,20	0,00	0,002

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-29. Incertidumbre del Material de referencia diluido.

Concentración (mg/l)	0,01	0,50	1	5	100
Conc Solución de Referencia usada (mg/l)	1	1	1	10	100
Vol Alícuota Solref. (ml)	10	250	25	10	5
Vol. Aforo (ml)	1000	500	250	500	1000
Conc. Sol Preparada (mg/l)	0,01	0,5	0,10	0,20	0,50
A (Vol Alícuota/Vol Aforo)	0,01	0,5	0,1	0,02	0,005
B (Conc.MR/Vol Aforo (mg/l*ml))	0,00101	0,00202	0,00404	0,02019	0,10000
C (Conc MR*Vol alícuota/Vol Aforo ² (mg/l*ml))	0,00001	0,00101	0,00040	0,00040	0,00050
μ_{MR} (mg/l)	0,00025	0,01242	0,02391	0,00478	0,00149

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-30. Incertidumbre de linealidad.

Concentración (mg/l)	0,01	0,5
L	0,0409	1,8524
C $(-(L-L_0)/m^2)$	-0,0409	-1,8524
Exactitud (mg/l)	0,0014	0,0027
μ_{Deriva}	0,0008	0,0016
$\mu_{Resolución}$	0,00058	
μ_L	0,00098	0,00168
μ_{L_0}	$8,92 \cdot 10^{-18}$	
μ_m	$4,61 \cdot 10^{-17}$	
μ_{FR}	0,00098	0,00168

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-31. Incertidumbre de repetibilidad.

Concentración (mg/l)	0,01	0,50	1	5	100
Desv. Estand. (Abs)	0,0008	0,0124	0,0055	0,0096	0,0128
<i>n</i>	15	15	15	15	15
μ_r (Abs)	0,00021	0,00321	0,00142	0,00247	0,00331
μ_r (mg/l)	0,00006	0,00088	0,00039	0,00067	0,00090

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-32. Incertidumbre de calibración.

Concentración (mg/l)	0,01	0,50	1	5	100
μ_{calEq} (mg/l)	0,0010	0,0126	0,0126	0,0126	0,0126
% μ_{calEq}	10,00	2,49	10,00	10,00	10,00

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-33. Incertidumbre de reproducibilidad.

Concentración (mg/l)	0,01	0,50	1	5	100
%μ_R (abs)	0,00084	0,01284	0,00550	0,00980	0,01316
% μ_R (mg/l)	2,50	0,70	1,46	1,31	0,71

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-34. Incertidumbre debida al reactivo de color.

Contribución del peso	
μ_{Cal} (g)	0,00007
$\mu_{Resolución}$ (g)	0,00006
μ_{Deriva} (g)	0,00006
$\mu_{Temperatura}$ (g)	0,00003
μ_{NS}^2 (g)	0,00212
μ_w (g)	0,0021
Contribución del volumen	
μ_{Cal} (ml)	0,010
μ_{error}	0,266
$\mu_{Temperatura}$	-0,133
$\mu V_{React\ color}$	0,297
Incertidumbre reactivo de color	
A (1/v)	0,0020
B (w/V ²)	0,0000
$\mu_{React\ color}$ (g)	4,29*10 ⁻⁶
$\mu_{React\ color}$ (ml)	0,00879

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-35. Incertidumbre debida al reactivo de color.

Concentración (mg/l)	0,01	0,5	1	5	100
Vol de muestra (ml)	50				
Vol de reactivo de color	2				
$\mu_{muestra}$	0,015				
$\mu_{React\ color}$	0,003				
$\mu_{procedimiento}$ (mg/l)	0,000004	0,00018	0,00036	0,00178	0,03532
% procedimiento	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04

Elaborado por: Javier Macas

Tabla F-36. Incertidumbre estándar combinada y expandida.

Concentración (mg/l)	0,01	0,5	1	5	100
$\mu_{\text{método}}$ (mg/l)	0,001	0,013	0,013	0,013	0,038
% $\mu_{\text{método}}$	10,30	2,58	10,10	10,08	10,02
U (mg/l)	0,002	0,026	0,025	0,026	0,075
% U	20,61	5,17	20,20	20,16	20,04

Elaborado por: Javier Macas

ANEXO G

DIAGRAMAS ISHIKAWA

CAUSA-EFECTO

Cloro Libre Residual, Cromo hexavalente y Cromo Total

Gráfico G-1. Incertidumbre del método

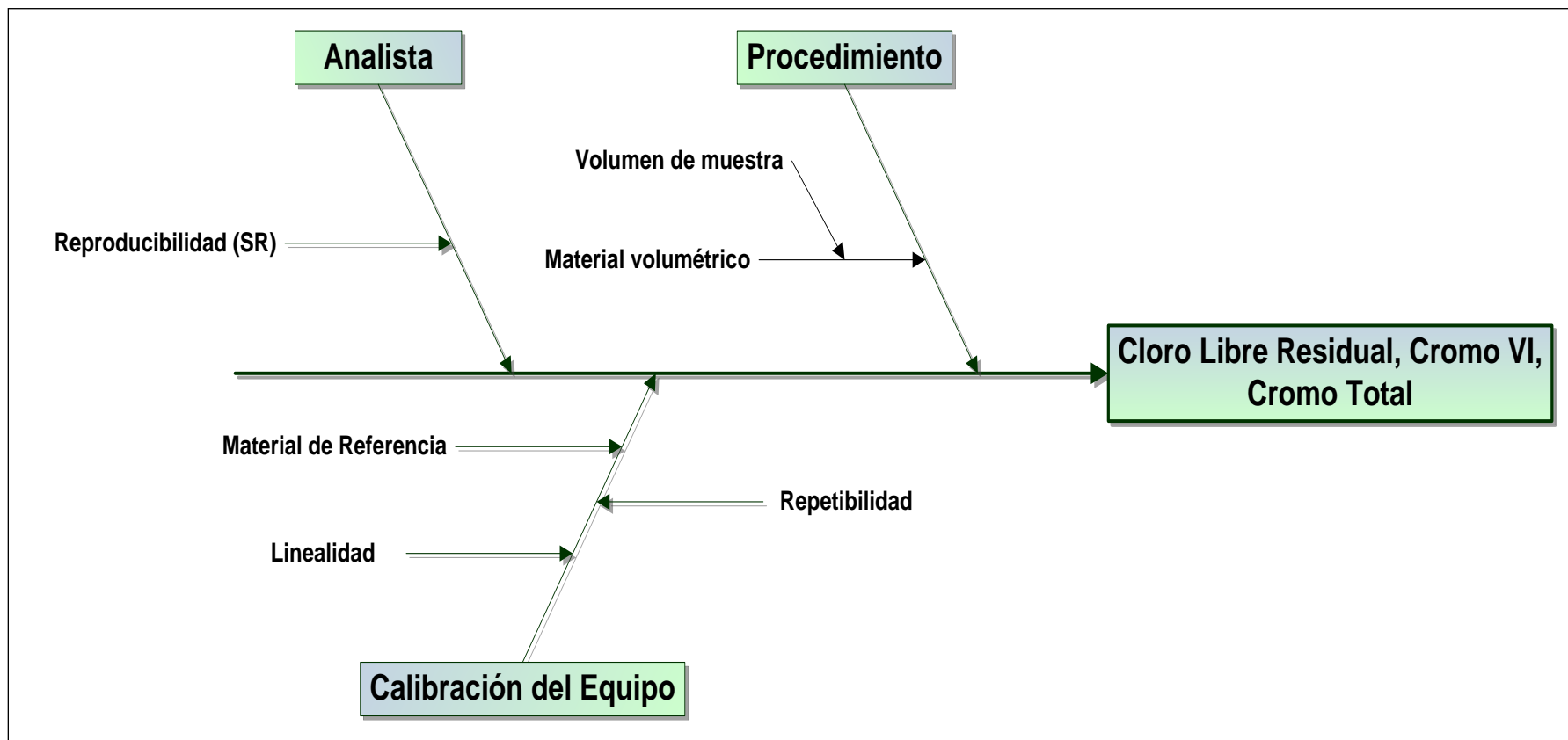
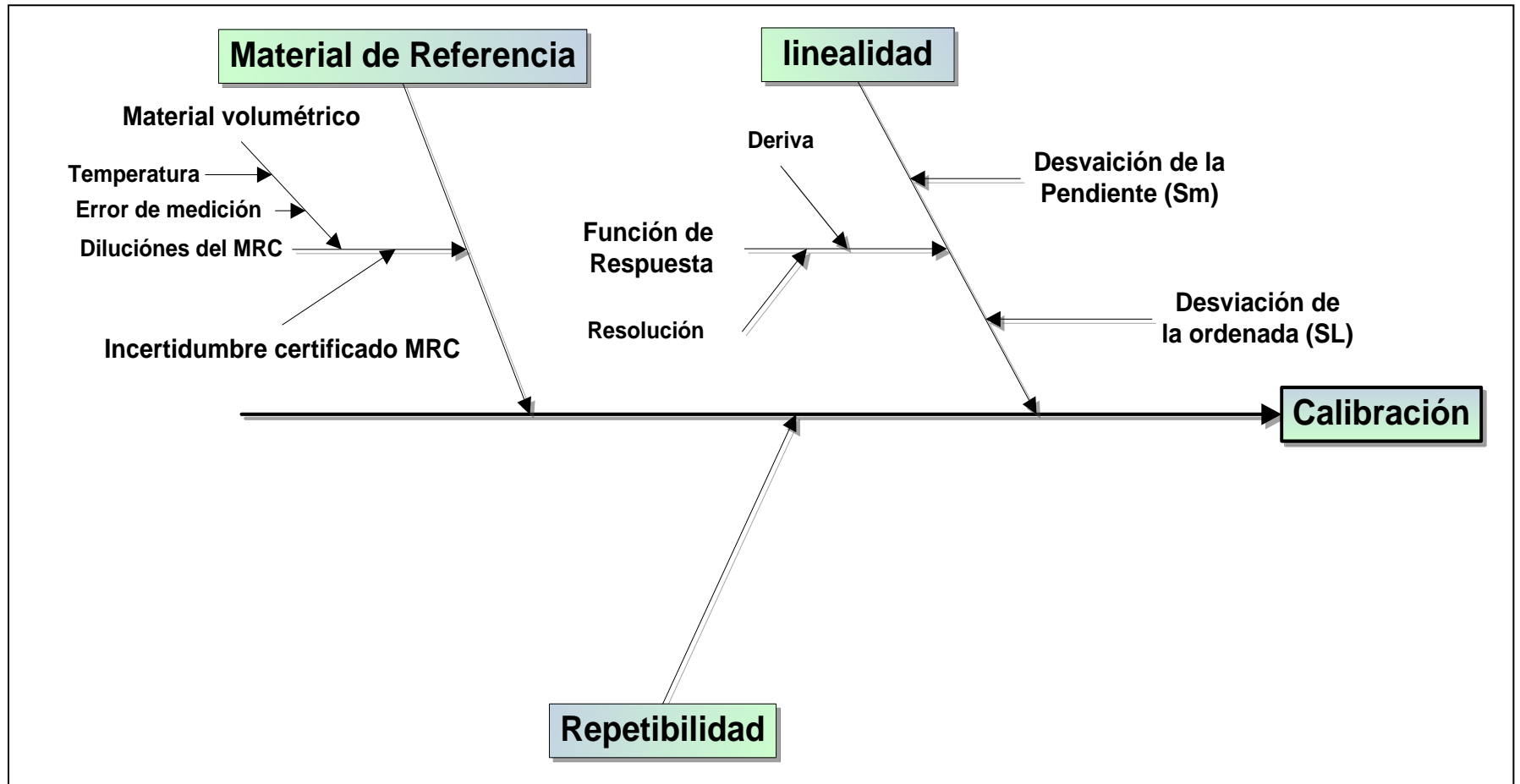


Gráfico G-2. Incertidumbre de calibración



Nitritos

Gráfico G-3. Incertidumbre del método

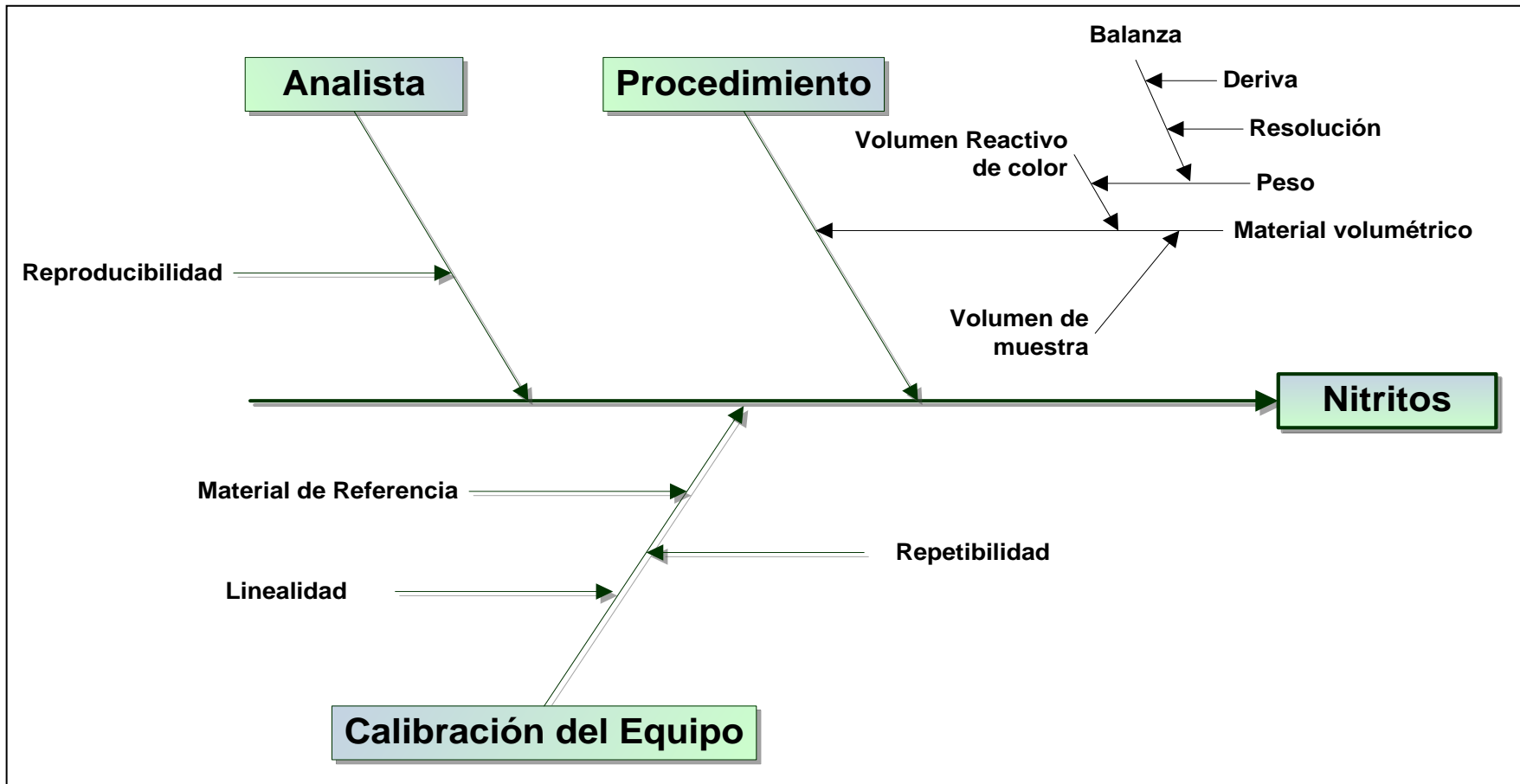
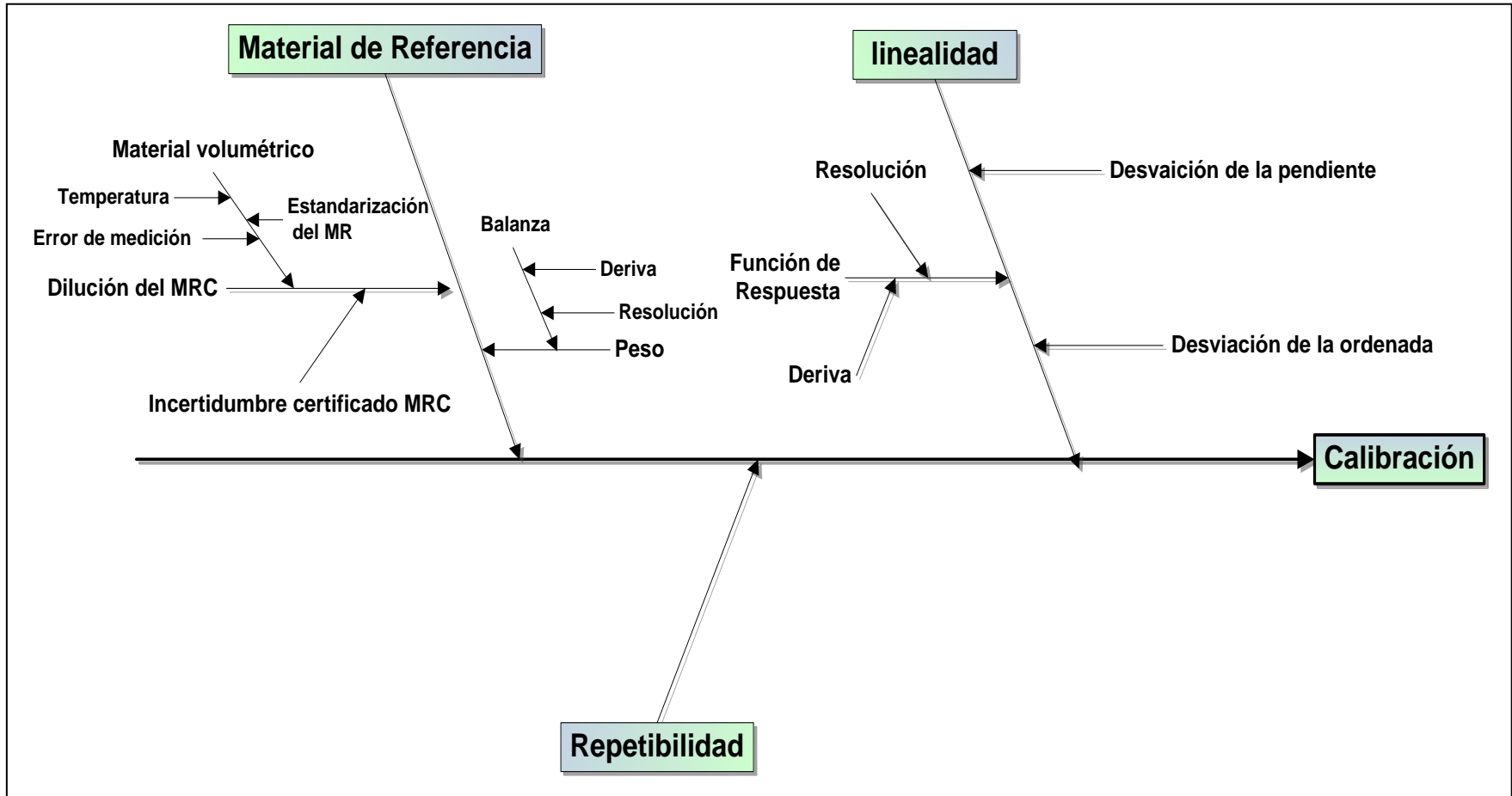


Gráfico G-4. Incertidumbre de calibración



ANEXO H

PREPARACIÓN DE

SOLUCIONES

ANEXO H-1. Preparación de soluciones la curva de calibración y validación de cloro libre residual

A partir del estándar de 1000 mg/l de Cloro libre residual se preparó la solución madre de 5 mg/l, de la cual se partió para las soluciones intermedias siguiendo el procedimiento en el literal 3.6.1.1.3, parte C, como se indica en la siguiente tabla:

Tabla H-1. Preparación de soluciones de cloro libre residual a partir del material de referencia.

C₁ (mg/l)	V₁ (ml)	C₂ (mg/l)	V₂ (ml)
5	1000	MRCs	5
0,2	250	5	10
0,25	100	5	5
0,5	250	5	25
1	250	5	50
2	250	5	100
5	1000	1000	5

Elaborado por: Javier Macas

ANEXO H-2. Preparación de soluciones la curva de calibración y validación de Cromo Hexavalente

A partir del estándar de 991±2 mg/l de Cromo Hexavalente se preparó la solución madre de 50 mg/l, de la cual se partió para las soluciones intermedias siguiendo el procedimiento en el literal 3.6.1.2.3, parte C, como se indica en la siguiente tabla:

Tabla H-2. Preparación de soluciones de cromo hexavalente a partir del material de referencia.

C₁ (mg/l)	V₁ (ml)	C₂ (mg/l)	V₂ (ml)
50	1000	MRCs	50
5	250	50	25
1	1000	50	20
0,01	500	1	5
0,02	500	1	10
0,03	500	1	15
0,05	500	1	25
0,1	100	1	10
0,2	500	1	250
0,5	500	1	250
0,6	250	1	150
1 (dilución 1:2)	500	1	250
5 (dilución 1:10)	250	5	25
50 (dilución 1:100)	500	50	5

Elaborado por: Javier Macas

ANEXO H-3. Preparación de soluciones la curva de calibración y validación de cromo total.

A partir del estándar de 1001 ±3 mg/l de Cromo Total se preparó la solución madre de 50 mg/l, que más la solución estándar de 50m g/l de Cromo hexavalente, se logró un estándar de 100 mg/l de la cual se partió para las soluciones intermedias siguiendo el procedimiento en el literal 3.6.1.3.3, parte C, como se indica en la siguiente tabla:

Tabla H-3. Preparación de soluciones de cromo total a partir del material de referencia.

C₁ (mg/l)	V₁ (ml)	C₂ (mg/l)	V₂ (ml)
100	1000	MRCs	50
10	500	100	50
1	1000	100	10
0,02	500	1	15
0,03	500	1	10
0,05	500	1	25
0,2	100	1	20
0,5	500	1	250
0,6	250	1	150
1 (dilución 1:2)	500	1	250
10 (dilución 1:20)	500	5	25
100 (dilución 1:200)	1000	50	5

Elaborado por: Javier Macas

ANEXO H-4. Preparación de soluciones la curva de calibración y validación de nitritos

A partir del estándar de 1000 mg/l de Nitrógeno de Nitritos se preparó la solución madre de 100 mg/l, de la cual se partió para las soluciones intermedias siguiendo el procedimiento en el literal 3.6.1.4.3, parte C, como se indica en la siguiente tabla:

Tabla H-4. Preparación de soluciones de nitritos a partir del material de referencia.

C₁ (mg/l)	V₁ (ml)	C₂ (mg/l)	V₂ (ml)
100	1000	MRCs	100
10	500	100	50
1	500	100	5
0,01	500	1	5
0,02	250	1	5
0,04	250	1	10
0,05	500	1	25
0,1	250	1	25
0,2	250	1	50
0,5	500	1	250
1 (dilución 1:10)	250	1	25
10 (dilución 1:50)	500	5	10
100 (dilución 1:200)	1000	50	5

Elaborado por: Javier Macas

ANEXO I

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Y PREPARACIÓN DE

REACTIVOS

ANEXO I-1. Determinación de color verdadero y aparente: Procedimiento HACH 8025, Método estándar APHA de platino-cobalto.

a. Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro HACH DR 2800
- Balón aforado de 50 ml.
- Pipeta volumétrica de 2 ml.
- Tubos HACH

b. Reactivos

- Agua desionizada
- Muestra de agua: el manejo de objetos de ensayo se encuentra en el capítulo 21 del Manual de Calidad.

c. Procedimiento de análisis

- Armar el aparato de filtrado (filtro de membrana, soporte del filtro, tubo del filtro y aspirador).
- Enjuagar el filtro vertiendo alrededor de 50 ml de agua desionizada a través del filtro. Desechar el agua del enjuague.
- Verter otros 50 ml de agua desionizada a través del filtro.
- Verter alrededor de 50 ml de la muestra a través del filtro.
- Verificar que el espectrofotómetro HACH DR 2800 se encuentre en buen funcionamiento.
- Seleccionar el método 8025, programa 125
- Medir 10 ml de agua desionizada filtrada en una celda y encerrar. La pantalla mostrará 0 Pt-Co.
- Colocar en otra celda de 10 ml de muestra filtrada y leer el color
- Anotar los resultados obtenidos en los registros del analista.

ANEXO I-2. Preparación del reactivo de color para el análisis de nitritos.

a. Materiales y Equipos

- Balanza Analítica
- Balón aforado de 500 ml.
- Balón de 50 ml.

a. Reactivos

- Agua desionizada
- Sulfanilamida
- N-(1-naftil) etilendiamina dihidroclorada
- Ácido fosfórico al 85%

b. Procedimiento

- Pesar con precisión 5 g de sulfanilamida, añadir 250 ml de agua y colocar 50 ml de Ácido fosfórico. Mezclar hasta disolver completamente.
- Pesar con precisión 0,5 g de N-(1-naftil) etilendiamina dihidroclorada y colocar en la mezcla anterior. Disolver completamente y aforar a 500 ml.
- Almacenar en un frasco oscuro y en refrigeración.

ANEXO I-3. Estandarización del Material de referencia Interno: nitrito de sodio

a. Materiales y Equipos

- Balanza Analítica
- Balón aforado de 500 ml.
- Balón de 50 ml.

b. Reactivos

- Agua desionizada
- Permanganato de potasio KMNO_4 0,05N
- Oxalato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$
- Oxalato de sodio $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,05N
- Ácido sulfúrico H_2SO_4 1:1
- Acido sulfúrico concentrado

c. Preparación de reactivos

- **Solución de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,05 N:** Pesar con precisión 31,675 g de oxalato de sodio, disolver en agua y aforar a 500 ml.
- **Solución de KMNO_4 0,05N:** Pesar con precisión 1,60 g KMNO_4 , disolver y aforar a 100 ml. con agua. Guardar en un frasco ámbar y dejarlo reposar por una semana. Sin agitar decantar el sobrenadante con mucho cuidado evitando el paso de cualquier sedimento. Valorar la disolución.
- **Ácido sulfúrico 1:1:** Colocar 125 ml de Ácido sulfúrico concentrado y aforar a 250 ml con agua desionizada.

d. Procedimiento

➤ Estandarización de la solución de KMnO_4 0,05M.

- Pesar 0,1g de oxalato de sodio y colocar en erlenmeyer de 250 ml.
- Adicionar 100 ml de agua y disolver.
- Agregar 10 ml de H_2SO_4 1:1 y calentar en seguida a 80 – 90°C.
- Valorar con la solución de KMnO_4 , hasta el primer tinte rosa que persista hasta 1 min. En la valoración la temperatura no debe ser

menor de 85°C, es recomendable mantener con calentamiento el matraz.

- Realizar un blanco con 100 ml de agua y 10 ml de H₂SO₄.
- Calcular la normalidad del permanganato en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Molaridad del KMnO}_4 = \frac{gNa_2C_2O_4}{(A - B) \times 0.33505}$$

Donde;

$gNa_2C_2O_4$ = gramos de ácido oxálico.

A = ml. consumidos por muestra; de preferencia el promedio de dos repeticiones.

B = ml. consumidos por el blanco.

- Con esto se calcula la normalidad del permanganato por:

$$\text{Normalidad del KMnO}_4 = 5 \times \text{Molaridad del KMnO}_4$$

➤ **Valoración de la disolución madre de nitritos.**

- Agregar en este orden las siguientes alícuotas: 50,0 ml de disolución de permanganato de potasio 0,05; 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 50 ml de la disolución madre de nitritos. Para adicionar la disolución madre de nitritos, sumergir la punta de la pipeta, debajo de la superficie de la disolución de permanganato de potasio y ácido sulfúrico.
- Agitar suavemente y calentar a 70 - 80°C en una parrilla.
- Eliminar el color del permanganato de potasio con las adiciones necesarias de alícuotas de 10 mL de la disolución de Na₂C₂O₄ 0,05 N.

- Valorar el exceso de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,05N con permanganato de potasio 0,05 N identificando el punto final con la presencia de un color rosa opaco.
- Llevar un blanco durante todo el proceso para hacer las correcciones necesarias en el cálculo final.
- Calcular el contenido de N- NO_2 con la siguiente formula:

$$A = \frac{[(B \times C) - (D \times E) \times 7]}{F}$$

Dónde;

A = mg/l de N- NO_2 en la disolución madre de NaNO_2 .

B = ml. totales usados de KMnO_4 .

C = normalidad del KMnO_4 estandarizado.

D = ml. totales adicionados del $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,05N.

E = normalidad del $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

F = ml. de la solución madre de NaNO_2 (50 ml.)

ANEXO J

USO DE LOS EQUIPOS

ANEXO J-1. Instrucción IUE/CICAM/06: Uso de la balanza analítica METTLER TOLEDO

Objeto

El objetivo de este procedimiento es describir la correcta utilización de la balanza analítica METTLER TOLEDO y asegurar la confiabilidad de los valores medidos.

Procedimiento

Antes de encender la balanza asegúrese de que se encuentre nivelada manteniendo el nivel de la burbuja en el centro. La burbuja se encuentra en la parte inferior trasera de la balanza. En caso de no ser así, nivelarla con los tornillos que se encuentran en la parte inferior a los costados de la misma, hasta que la burbuja, ubicada en la parte posterior de la balanza, se encuentre en el centro del círculo.

- Encender la balanza presionando la tecla **ON/OFF**.
- Tarar o encerar el equipo con la tecla ←**O/T**→ y espere hasta que sea desplegado el valor 0,0000g.
- Esperar la estabilización de la balanza, alrededor de treinta minutos.
- Verificar que la balanza esté calibrada con las pesas de referencia y anote cada una de las verificaciones en el Registro de Uso F-PEC-CICAM-01-01. Esta verificación es una vez al día y la realizará la primera persona que utiliza la balanza. El criterio de aceptación de la verificación es que la diferencia entre el valor medido y el esperado sea $\pm 0,0002$ g, caso contrario realizar un autoajuste.
- Para realizar un autoajuste de la balanza presionar la tecla **Cal/Menú** que se encuentra en la parte derecha del teclado. Presionar la tecla por tres segundos y se escuchará un ruido al interior de la balanza, el proceso de autoajuste termina cuando aparece en la pantalla la palabra Cal e

inmediatamente 0.0000 g. Luego verificar que la balanza esté calibrada con las pesas de referencia, en caso de que la balanza no está calibrada, se debe avisar al Responsable Técnico, para que éste proceda a realizar la calibración o mantenimiento.

- Una vez que la balanza haya sido verificada y cumpla con los valores esperados se procede a pesar la muestra.
- Colocar la canastilla, un vaso o lo que se vaya a utilizar como recipiente para la muestra en el centro del plato de la balanza, y se presiona la tecla ←**O/T**→ para encerrar, se espera unos segundos hasta que el valor 0.0000 g, sea desplegado en la pantalla.
- Colocar la cantidad de muestra a ser pesada dentro de la canastilla, vaso o recipiente.
- Esperar a que la balanza se estabilice y se toma el valor desplegado por la pantalla.
- Retirar la canastilla, vaso o recipiente con la muestra, si se desea pesar varias muestras, encerrar la balanza presionando la tecla ←**O/T**→ cada vez que se desee realizar una nueva pesada.
- Al terminar de pesar, realizar una pequeña limpieza de la balanza sin tocar el platillo de pesada de adentro hacia fuera con las brochas. Limpiar bien en las partes donde se mueven los vidrios (costados). No dejar formar masas
- Si es necesario limpiar con alcohol.
- Anotar el valor de peso medido en el formato F-PEC-CICIAM-01-01 Registro de uso.
- Apagar y desconectar el equipo al final del día.

ANEXO J-2. Instrucción IUE/CICAM/02 para el uso del espectrofotómetro HACH DR 2800.

Objetivo.

El objeto de este procedimiento es describir la correcta utilización del espectrofotómetro HACH y asegurar la confiabilidad de los valores medidos.

Procedimiento

- Encender el equipo presionando el botón de poder, esperar unos segundos hasta que en la pantalla aparezca el menú principal.
- Escoger STORE PROGRAM para análisis en los que se utilice reactivos HACH o SINGLE LIGHTWAVE para mediciones de absorbancia. La longitud de onda será modificada presionando el indicador de longitud de onda. Para cada análisis ver PEE.
- Colocar la muestra que servirá de blanco según el PEE en la celda del espectrofotómetro y se presiona la tecla **ZERO**, y se espera hasta que sea desplegado en la pantalla el valor 0.000.
- Retirar el blanco de la celda y colocar la muestra a ser leída, luego presionar la tecla **READ**, esperar unos segundos hasta que el valor sea desplegado y tomar la medida.

ANEXO J-3. Instrucción IUE/CICAM/01 para el uso del pHmetro ORION

Objeto

El objeto de este instructivo es describir la correcta utilización del pH-metro y asegurar la confiabilidad de los valores obtenidos.

Procedimiento

a. Preparación de la muestra

- Estabilizar la muestra a temperatura ambiente.
- Mezcle vigorosamente la muestra, para homogenizar, antes de empezar las mediciones.

b. Procedimientos de uso

- Encienda el equipo y presionar la tecla **2nd + set up**. Con yes ubicarse en 1-4 del menú principal; con la opción set up colocar **OFF** (para evitar el apagado automático). Los demás elementos del menú principal no deben ser cambiados, todos están valorados por defecto.
- Lavar con abundante agua destilada y secar con un paño limpio el electrodo antes de cada medición.
- Verificar con la solución buffer de pH 7.00 el funcionamiento del equipo, esta verificación la realizará la primera persona que utiliza el medidor de pH.
- Si en la verificación el valor leído no es el correspondiente al buffer, se procede al ajuste del equipo (Literal 4). Criterio de aceptación : Valor del buffer ± 0.05
- Luego de que el equipo esta ajustado y su medida se haya verificado, proceder a medir la muestra.
- Llenar al registro correspondiente al uso del Medidor de pH F-PEE-CICAM-02-01.
- Enjuagar el electrodo con abundante agua destilada hasta obtener un pH entre 6 y 7.

- Dejar el electrodo en la solución de KCl 3M.
- Al finalizar el día desconectar el equipo.
- Cuando se mide con grasa o aceites se debe lavar el electrodo con agua tibia y alcohol para eliminar los residuos de grasa que pueden dañar el electrodo.

c. Ajuste

- Para la verificación usar 2 Buffers correspondientes al rango ácido o básico según sea el caso.
- Oprimir **2nd + MODE (CAL)**, inmediatamente el equipo solicita la primera solución Buffer.
- Colocar el electrodo previamente lavado con agua destilada y seco dentro de la primera solución Buffer de pH = 7.00, esperar hasta que se estabilice y se visualice en la pantalla **READY**. Si el valor no corresponde a lo especificado en el frasco de la solución, presionar **SET UP**, esto permitirá cambiar cada número de la medida que se encuentre titilando al presionar los botones que se visualizan en las flechas **▲** o **▼** hasta obtener el valor especificado en la solución Buffer, se aceptará presionando **YES**.
- Seguidamente el equipo pedirá la segunda Buffer
- Colocar al electrodo previamente lavado con agua destilada y seco en la segunda solución Buffer de pH = 4.00, y esperar hasta que se estabilice la lectura, lo que indica el **READY** que aparece en la pantalla. Si el valor mostrado no corresponde al especificado por el frasco de la solución se procede como en el paso anterior. Luego del ajuste en la pantalla del equipo aparecerá el valor del slope , el cual debe estar entre 85 y 115% para indicarnos un buen ajuste del equipo, caso contrario cambiar las soluciones Buffer o la solución de llenado del electrodo y si con esto

persiste el problema notificar a Responsable Técnico para enviar al electrodo a reparación.

- Para comprobar que el equipo está bien ajustado y listo para ser usado, se presiona la tecla **MEASURE**; la medida debe corresponder a un rango comprendido al del buffer ± 0.05 .
- Anotar la medida en el registro de uso del pH-metro, así como el slope (SLP) que da el equipo.

ANEXO K

FOTOGRAFÍAS



Fotografía K-1. Espectrofotómetro HACH DR 2800



Fotografía K-2. Ultrasonido BRANSON



Fotografía K-3. pHmetro ORION



Fotografía K-4. Destilador de agua FANEM



Fotografía K-5. Sorbona LABCONCO



Fotografía K-6. Pocket Colorimeter II para medición de cloro libre residual



Fotografía K-7. Estufa Linberg /Blue



Fotografía K-8. Reactivo de color para el análisis de nitritos



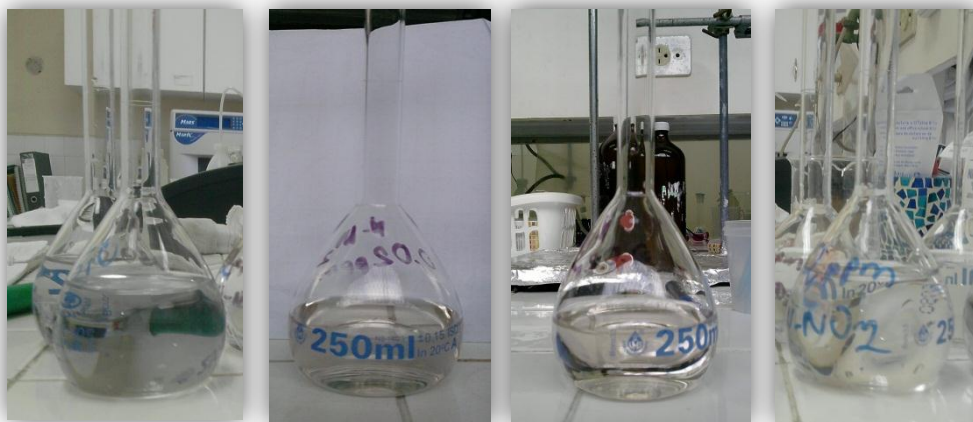
Fotografía K-9. Desarrollo de color a diferentes concentraciones de nitritos



Fotografía K-10. Color amarillo para el análisis de interferencia del método de nitritos



Fotografía K-11. Color azul para el análisis de interferencia del método de nitritos



Fotografía K-12. Color negro para el análisis de interferencia del método de nitritos



Fotografía K-13. Color rojo para el análisis de interferencia del método de nitritos.



Fotografía K-14. Color verde para el análisis de interferencia del método de nitritos.