

**VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE
HIERRO TOTAL Y NITRITOS EN MUESTRAS DE AGUA POTABLE EN EL
LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA (LDSP).**

PEDRO PABLO ARAQUE ROJAS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2019

**VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE
HIERRO TOTAL Y NITRITOS EN MUESTRAS DE AGUA POTABLE EN EL
LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA (LDSP).**

PEDRO PABLO ARAQUE ROJAS

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Químico

Director

Débora Alcida Nabarlatz

Ingeniera Química, PhD

Codirector

Sandra Esperanza Bayona Vergel

Ingeniera Química

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2019

Dedicatoria

Este triunfo lo dedico a mis compañeros de esta aventura: Mi madre y mis hermanos, porque tener un lugar donde ir se llama hogar. Tener a quienes amar, una familia. Tener ambas, una bendición.

Gracias por sostenerme la mano un rato y mi corazón para siempre...

¡¡¡Los Amo Infinitamente!!!

*"Hoy es el día más hermoso de nuestra vida, querido Sancho;
los obstáculos más grandes, nuestras propias indecisiones;
nuestro enemigo más fuerte, el miedo al poderoso y a nosotros mismos;
la cosa más fácil, equivocarnos; la más destructiva, la mentira y el egoísmo;
la peor derrota, el desaliento; los defectos más peligrosos, la soberbia y el rencor;
las sensaciones más gratas, la buena conciencia, el esfuerzo para ser mejores sin ser perfectos,
y, sobre todo, la disposición para hacer el bien y combatir la injusticia donde quiera que estén. (...)"*

Miguel de Cervantes Saavedra

Agradecimientos

*A Dios por darme la vida y concederme tantas bendiciones;
A mi espíritu rebelde y ansioso que me trajo hasta donde estoy hoy,
librando batallas y conquistando guerras;
A mi madre Yazmin Rojas Zuñiga, fiel creyente de mis capacidades:
gracias por su entrega, esfuerzo y dedicación;
A mis hermanos Fabian, Jorge y Astrid, gracias por perpetuar en mi memoria
los mejores momentos de mi vida;
A quien de manera inesperada llegó a formar parte de mi familia Rito Díaz,
le agradezco por su amistad y apoyo incondicional,
A quien llegue a llamar mi segunda madre, mi tía Marnilsa, quien siempre creyó en mí;
A mi ángel de la guarda: María Efigenia, que sin su formación nada de esto hubiese sido posible;
A mi nana Gabriela, quien en todo momento estuvo disponible para mí, aliviándome y dándome fuerzas,
A mis ahijadas Mayra y Salome quienes me motivan a luchar por brindarles un mejor futuro;
A mis compañeros de ingeniería química con los que compartí momentos inolvidables,
es especial a mis chinomaticas: Dayanna, Laura, Luisa y Paola, que hicieron parte de
ésta meta y me permitieron construir paso a paso nuestro sueño y nuestra amistad;
A los integrantes del Laboratorio Departamental de Salud Pública, quienes dejaron en mí
grandes aprendizajes a nivel personal y profesional;
A la profe Debora quien confió ciegamente en mí y me asesoro en todo momento.
A quienes hoy están y a los que han partido, que siempre me apoyaron y
que han transitado conmigo este largo camino.*

Hoy me siento Feliz, Bendecido y Agradecido con Dios, con la vida y con ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

	pág
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA (LDSP)	18
1.2 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	18
1.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	19
1.3.1 Límite de detección del método	20
1.3.2 Límite de cuantificación del método	21
1.3.3 Linealidad	21
1.3.4 Exactitud.....	21
1.3.5 Precisión.....	22
1.3.6 Incertidumbre	23
1.3.7 Rechazo de datos	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GENERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. METODOLOGÍA	27
3.1 FASE 0: DOCUMENTACIÓN Y MONTAJE DE LA METODOLOGIA.....	27
3.1.1 Estandarización de los métodos.....	27
3.1.2 Materiales y Equipos	27
3.2 FASE I: PREVALIDACIÓN	27
3.2.1 Condiciones de Trabajo.....	28
3.2.2 Curvas de calibración	28
3.2.3 Preparación de reactivos y estándares de calibración	28

3.2.3.1 Hierro Total.....	28
3.2.3.2 Nitritos.....	29
3.3 FASE II: VALIDACIÓN	29
3.4 FASE III: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	30
3.4.1 Rechazo de datos	30
3.4.2 Límite de detección	30
3.4.3 Límite de cuantificación	31
3.4.4 Linealidad	31
3.4.5 Precisión.....	31
3.4.5.1 Repetibilidad.....	31
3.4.5.2 Reproducibilidad.....	31
3.4.6 Exactitud.....	32
3.4.7 Incertidumbre	32
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	33
4.1 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CADA UNO DE LOS MÉTODOS	33
4.2 LINEALIDAD	34
4.3 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA INSTRUMENTAL	35
4.4 REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y EXACTITUD CON ADICIÓN DEL ESTÁNDAR.....	36
4.5 RECHAZO DE DATOS.....	38
4.6 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	40
4.7 INCERTIDUMBRE	40
5. CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS.....	45

LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1.Resultados del LDM y LOQ de cada método.	33
Tabla 2. Datos de linealidad de la curva de calibración y criterios de aceptación para el rango de trabajo de cada método.....	34
Tabla 3.Resultados de mediciones de material volumétrico pipeta aforada de 10 mL con diferentes soluciones de concentraciones preparadas que representan valores dentro de la curva de calibración.	35
Tabla 4. Concentraciones de referencia para la repetitividad y reproducibilidad de cada método con adición de estándar.....	36
Tabla 5. t-Student calculado para un n=14 del método de hierro	39
Tabla 6. t-Student calculado para un n=14 del método de nitritos	39
Tabla 7. Medición de porcentajes de recuperación en las muestras de agua de grifo adicionando concentración estándar de hierro total y nitritos.....	40
Tabla 8. Incertidumbre debida a la curva de calibración para hierro total y nitritos	41
Tabla 9. Valores críticos para t-Student.	46
Tabla 10. Límite de detección y cuantificación de blancos para hierro y nitritos ...	48
Tabla 11. Preparación de concentraciones para la repetitividad y reproducibilidad con adición de estándar de hierro	49
Tabla 12. Mediciones de repetitividad y reproducibilidad del Analista 1 durante siete días diferentes con concentraciones adicionadas.	50
Tabla 13.Mediciones de repetitividad y reproducibilidad del Analista 2 durante siete días diferentes con concentraciones adicionadas.	51
Tabla 14. Datos estadísticos para medición de reproducibilidad, repetitividad y exactitud en la medición de los dos analistas.....	52
Tabla 15. Preparación de concentraciones para la repetitividad y reproducibilidad con adición de estándar de nitritos.....	53
Tabla 16. Mediciones de repetitividad y reproducibilidad del Analista 1 durante siete días diferentes con concentraciones adicionadas.	54

Tabla 17. Mediciones de repetitividad y reproducibilidad del Analista 2 durante siete días diferentes con concentraciones adicionadas.	55
Tabla 18. Datos estadísticos para medición de reproducibilidad, repetitividad y exactitud en la medición de los dos analistas.....	56

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Curvas de calibración para la determinación de (a) Hierro (Longitud de onda 510 nm), y (b) Nitritos (Longitud de onda 543 nm).	34
Figura 2. Repetitividad y reproducibilidad de (a) Hierro.	37
Figura 3. Repetitividad y reproducibilidad de (b) Nitritos.	37
Figura 4. Carta control para una concentración estándar (a) 0,165 mg/L Fe	38
Figura 5. Carta control para una concentración estándar (b) 0,065 mg/L NO_2^-	38
Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología.....	45
Figura 7. Diagrama de causa-efecto de las fuentes de incertidumbre	47

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Metodología	45
Anexo B. Rechazo de datos	46
Anexo C. Flujograma evaluación de la incertidumbre	47
Anexo D. Concentraciones en función del analito	48
Anexo E. Precisión para el método de análisis de hierro	49
Anexo F. Precisión para el método de análisis de nitritos	53

LISTA DE ABREVIATURAS

LDSP	: Laboratorio Departamental De Salud Pública.
SM	: Standard Methods.
IDEAM	: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.
INS	: Instituto Nacional de Salud.
IPS	: Instituciones Prestadoras de Salud.
LDM	: Límite de detección del método.
LOQ	: Límite de cuantificación del método.
LMP	: Límite máximo permitido.
CV	: Coeficiente de Variación.
A1	: Concentración estándar al 15% del rango de la curva.
A2	: Concentración estándar al 55% del rango de la curva.
A3	: Concentración estándar al 90% del rango de la curva.
M1	: Agua de Llave del Acueducto de Bucaramanga correspondiente al <50% del rango de la curva.
M1ab	: Adicionado a una concentración del 30 % del agua de la llave del acueducto de Bucaramanga.
M1aa	: Adicionado a una concentración del 60 % del agua de la llave del acueducto de Bucaramanga.
M2	: Agua empacada a una concentración del 70% del rango de la curva
LA	: Límite de Alarma.
LAI	: Límite de Alarma Inferior.
LAS	: Límite de Alarma Superior.
LC	: Límite de Control.
LCI	: Límite de Control Inferior.
LCS	: Límite de Control Superior.
n	: Número de datos a analizar.
Xbajo	: Valor más bajo de la muestra.
Xalto	: Valor más alto de la muestra.

X_{prom}	: Valor promedio de los resultados.
%R	: Porcentaje de recuperación.
u_{Te}	: Incertidumbre debida a la temperatura.
u_R	: Incertidumbre debida a la repetibilidad.
u_T	: Incertidumbre debida a la tolerancia del instrumento.

RESUMEN

TITULO: VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL Y NITRITOS EN MUESTRAS DE AGUA POTABLE EN EL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA (LDSP)*

AUTOR: PEDRO PABLO ARAQUE ROJAS**

PALABRAS CLAVE: VALIDACIÓN, ESPECTROFOTÓMETRO, T-STUDENT, CARTAS CONTROL

DESCRIPCIÓN:

La validación tiene como objetivo probar que los métodos de análisis cumplen con los requerimientos para el desempeño técnico establecido. Este trabajo se realizó en el Laboratorio Departamental de Salud Pública de la ciudad de Bucaramanga con el propósito de validar dos parámetros fisicoquímicos normalizados: hierro total y nitritos en agua potable, mediante espectrofotometría visible según lo establecido en el Método SM 3500-Fe B para hierro y Método SM 4500-NO₂⁻ B para nitritos (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [6] edición 23 de 2017). La determinación de estas concentraciones se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS DR6000 marca HACH. En primera instancia se realizó la verificación de las condiciones ambientales de temperatura (°C) y porcentaje de humedad relativa, durante siete días de la semana y siete horas diarias, utilizando un patrón de referencia de temperatura calibrado. Para la estandarización, se diseñó una curva de calibración para cada método con el fin de determinar la linealidad en el rango de trabajo, desde una concentración cero hasta una concentración máxima. Seguidamente se hizo la lectura de 10 blancos de reactivos utilizados para determinar los límites de detección y de cuantificación de los métodos. El registro de los datos se especificó en una matriz propuesta por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM), allí se hicieron siete concentraciones diferentes durante siete días, tanto de soluciones patrón como muestras naturales y estándares certificados, para los dos parámetros anteriormente mencionados con el fin realizar un análisis t-Student de los resultados. De igual manera se calculó la precisión, exactitud y las incertidumbres de cada parámetro fisicoquímico. Finalmente, se elaboraron las cartas control para estándares de concentraciones medias, las cuales permiten tener un registro de la trazabilidad de cada método.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Débora Alcida Nabarlantz, Ingeniera Química, PhD.

ABSTRACT

TITLE: VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF TOTAL IRON AND NITRITES IN DRINKING WATER SAMPLES IN THE DEPARTMENT PUBLIC HEALTH LABORATORY (LDSP)*

AUTHOR: PEDRO PABLO ARAQUE ROJAS**

KEYWORDS: VALIDATION, SPECTROPHOTOMETER, T-STUDENT, CONTROL CHARTS

DESCRIPTION:

The validation aims to prove that the analysis methods meet the requirements for the established technical performance. This work was carried out in the Departmental Laboratory of Public Health of the city of Bucaramanga with the purpose of validating two standardized physicochemical parameters: total iron and nitrites in drinking water, using visible spectrophotometry as established in Method SM 3500-Fe B for iron and Method SM 4500- NO₂-B for nitrites (Standard methods for the examination of water and wastewater [6] edition 23 of 2017). The determination of these variations was performed on a UV-VIS DR6000 HACH brand spectrophotometer. In the first instance, the verification of the environmental conditions of temperature (°C) and the percentage of relative humidity is carried out, during seven days of the week and seven hours a day, using a calibrated temperature reference standard. For standardization, a calibration curve was designed for each method in order to determine linearity in the working range, from a zero concentration to a maximum concentration. Next, 10 used reagent blanks were read to determine the detection and quantification limits of the methods. The registration of the data was specified in a matrix proposed by Institute of Hydrology, Meteorology and Environmental Studies (IDEAM), there were seven different concentrations during seven days, both of standard solutions as well as natural samples and certified standards, for the two parameters mentioned above in order to perform a t-Student analysis of the results. Similarly, the precision, accuracy and uncertainties of each physicochemical parameter were calculated. Finally, the control charts were prepared for medium concentration standards, which allow for a record of the traceability of each method.

* Degree work

** Physical-Chemical Engineering Department. Chemical Engineering School. Director: Débora Alcida Nabarlatz, Chemical Engineer, PhD.

INTRODUCCIÓN

La escasez de agua afecta a más del 40 por ciento de la población mundial, una cifra alarmante que probablemente crecerá con el aumento de las temperaturas globales producto del cambio climático. Aunque 2.100 millones de personas han conseguido acceso a mejores condiciones de agua y saneamiento desde 1990, la decreciente disponibilidad de agua potable de calidad es un problema importante que aqueja a todos los continentes. Esta problemática hace parte de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible puestos en marcha en 2016, liderados por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo¹.

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) coordina la Red Nacional de Laboratorios para el Control y la Vigilancia de la Calidad del Agua para Consumo Humano y da las orientaciones y directrices en esta área a los laboratorios que realicen o presten el servicio de los análisis fisicoquímicos², los cuales se realizan bajo la resolución 2115 de 2007. Los laboratorios del país que realizan dichos análisis deben presentar periódicamente validaciones de los métodos de ensayo con el fin de garantizar la calidad de sus resultados³.

Es por ello que el Laboratorio Departamental de Salud Pública (LDSP), por medio de la validación de los métodos de análisis del hierro total y nitritos busca garantizar el buen funcionamiento, la correcta implementación y asegurar una mejora continua de cada uno de los procedimientos implementados en dicha entidad.

¹ UNDP Objetivos de Desarrollo Sostenible [en línea] disponible en: <http://www.undp.org/content/undp/es/home/sustainable-development-goals.html>

² Decreto número 1575. Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano. Ministerio de la Protección Social, Bogotá, Colombia. 09 de mayo del 2007.

³ RESOLUCIÓN NÚMERO 2115." Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano." MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Bogotá, Colombia. 22 de junio del 2007.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA (LDSP)

El LDSP se encuentra ubicado en la calle 56 # 2W-68 del barrio Mutis. Es una división de la Secretaría de Salud Departamental encargada de ejecutar actividades de apoyo en la vigilancia epidemiológica de patologías de interés en salud pública, con base en las disposiciones establecidas en el decreto 2323 de 2006 (por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 09 de 1979 en relación con la Red Nacional de Laboratorios y se dictan otras disposiciones), y el decreto 3518 de 2006 (por el cual se crea y reglamenta el sistema de vigilancia en salud pública y se dictan otras disposiciones), ambos emanados del Ministerio de la Protección Social. Dentro de sus responsabilidades se encuentra el hecho de prestar servicios de análisis, diagnóstico y control de calidad de muestras enviadas por los laboratorios clínicos y demás Instituciones Prestadoras de Salud (IPS) interesados en las áreas de virología, parasitología, micobacterias, toxicología, entomología, aguas y alimentos en general. Además, realiza actividades de capacitación, asesoría técnica, investigación y supervisión a bancos de sangre y laboratorios clínicos y de alimentos⁴.

1.2 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Dentro de los estudios realizados al agua potable para garantizar que es apta para el consumo humano, se encuentran diferentes parámetros fisicoquímicos, los cuales al ser medidos deben someterse a un procedimiento de validación en el LDSP. La realización de estas mediciones está regulada por entidades

⁴ URIBE, J. et al. Actividades y resultados del Laboratorio Departamental de Salud Pública. Revista Observatorio Salud Pública Santander (Vol. 1, pp. 1–20). 2018 Recuperado de: https://web.observatorio.co/publicaciones/informe_a%C3%B1ovinum1_ldsp.pdf

gubernamentales de control, como el Instituto Nacional de Salud (INS) y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), que se encargan de acreditar los laboratorios asegurando a los clientes la confiabilidad de los resultados⁵.

La validación de estos métodos permite probar que todos los análisis que se llevan a cabo en el LDSP, son válidos y cumplen los requerimientos de desempeño técnico establecidos en la resolución 2115 de 2007 y el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 23 de 2017.

Debido a todo lo anterior, para el LDSP es importante realizar validaciones periódicas de sus métodos analíticos, en aras de evitar y controlar que se presente un aporte mayor de hierro y nitritos en el agua de consumo humano, porque esto repercutiría un problema de salud en quienes la consumen⁶.

1.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de métodos analíticos tiene como objetivo demostrar científicamente por medio de prácticas de laboratorio, que un método analítico tiene las características de desempeño adecuadas para los objetivos buscados.

Ahora bien, el LDSP necesita realizar validaciones periódicas a fin de ser acreditado por entidades gubernamentales de vigilancia y control como lo es el INVIMA y el INS; producto de ello han sido trabajos de grado previos para la validación de los parámetros fisicoquímicos normalizados para agua potable: dureza total y cálcica, alcalinidad, cloruros, sulfatos, turbiedad, color, pH y conductividad.

⁵ NTC/ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Bogotá. 2005.

⁶ SCHMIDT P, THOMAS, et al. Medición de nitratos y nitritos en agua y saliva de población rural precordillerana de la VIII región, p. 119-124. [En línea]. Disponible en <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162012000200003>.

Actualmente, el laboratorio sólo cuenta con la validación de los 9 métodos analíticos anteriormente nombrados, por lo cual se ve la necesidad de realizar la validación de métodos de análisis de hierro total y de nitritos, siguiendo la metodología establecida en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 23 del 2017 que será descrita a continuación.

Los métodos a validar son cuantitativos, químicos y espectrofotométricos y las características de validación que necesitan ser evaluadas son⁷:

1.3.1 Límite de detección del método Es la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada en una muestra por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.

$$LDM = X \pm 3s \quad (1)$$

donde: LDM: límite de detección del método, X: media de las lecturas del blanco o estándar de más baja concentración y s: desviación estándar de la serie de resultados del blanco o del estándar a más baja concentración.

El criterio de aceptación del valor estimado para el LDM está relacionado con la experiencia del analista en la aplicación del método. Igualmente, los datos obtenidos permiten el cálculo del Coeficiente de Variación mediante la aplicación de la ecuación 2.

$$CV = \left(\frac{s}{X} \right) \times 100 \quad (2)$$

donde: CV: coeficiente de variación, s: desviación estándar de la serie de resultados del blanco o del estándar a más baja concentración y X: media de las lecturas del blanco o estándar de más baja concentración.

Si el valor obtenido para el CV es menor o igual al 20% se acepta el valor estimado

⁷ STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. American Public Health Association, American Water World Association, Water Pollution Control Federation, 23 ed., New York, 2017. pp. 1-6 – 1-16.

para el LDM⁸. De lo contrario, se rechaza dicha estimación y se procede a la realización de nuevos análisis.

1.3.2 Límite de cuantificación del método El límite de cuantificación, también conocido como límite de determinación, es la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas.

Para el cálculo del límite de cuantificación (ecuación 3) se aplicará la siguiente relación, la cual es una función proporcional del valor obtenido para el LDM:

$$LOQ = X \pm 10s \text{ (Con blancos) (3)}$$

donde: LOQ: límite de cuantificación del método, X: media de las lecturas del blanco o estándar de más baja concentración y s: desviación estándar de la serie de resultados del blanco o del estándar a más baja concentración.

Si el coeficiente de variación de los datos obtenidos es menor o igual al 20%, se acepta dicho resultado como valor estimado para el LOQ⁹. De lo contrario se hace necesario repetir el análisis.

1.3.3 Linealidad Es la capacidad del método analítico para producir resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados del análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones.

1.3.4 Exactitud El término “exactitud”, se refiere a una combinación de veracidad y precisión de un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error. La veracidad determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una

⁸ SANDOVAL S., “Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición,” 2010, Instituto de Salud Pública de Chile.

⁹ Ibíd.

serie de resultados y un valor de referencia aceptado que puede ser determinado por recuperación.

Error (%E): es el margen de error que puede existir entre los datos en un muestreo. Cuanto más pequeño es el error, mayor veracidad indica el método [1]. Este error se calcula con la ecuación 4.

$$\% \text{ error} = \frac{\text{Valor teórico} - \text{Valor experimental}}{\text{Valor teórico}} \times 100 \quad (4)$$

Recuperación (%R): Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química adicionada a una muestra y permite ver el grado de proximidad entre una medida y el valor verdadero. Se recomienda realizar al menos 6 mediciones de cada uno en lo posible en tres niveles. Se debe considerar al elegir estos niveles el rango de la curva de calibración del método, el LOQ y el LMP establecido, de manera que los niveles seleccionados permitan entregar la mejor información posible respecto a la capacidad de recuperación del método, en cuanto a estos valores críticos [1].

$$\%R = \frac{C_e - C_0}{C_a} \times 100 \quad (5)$$

donde: C_e : es la concentración de analito obtenida, C_0 : es la concentración de analito medida en la muestra sin adicionar (blanco) y C_a : es la concentración de analito preparada.

Para que el porcentaje de recuperación realizado a las muestras de duplicado sea aceptado, éste debe estar en un rango de 80 a 120%¹⁰, sino deberá repartirse el análisis.

1.3.5 Precisión Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a la misma muestra.

¹⁰ Ibíd.

Las dos mediciones más comunes de precisión son la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad da idea de la clase de variabilidad que puede esperarse, cuando un método es realizado por un solo analista en un mismo equipo durante un período corto. Si la muestra es analizada por varios laboratorios para efectos de comparación se obtiene una medición más significativa de la precisión llamada reproducibilidad. La precisión usualmente se expresa con la desviación estándar o con la desviación estándar relativa.

1.3.6 Incertidumbre Todo resultado derivado de una medición está acompañado de un error o incertidumbre, dado que no se pueden efectuar medidas libres de errores, lo que se hace es minimizarlos y estimar su tamaño con una precisión aceptable.

La determinación de la incertidumbre incluye generalmente 4 pasos:

1. Corresponde a la determinación de las fuentes de incertidumbre, dentro de ellas están: muestreo, efectos de la muestra, sesgos instrumentales, pureza de reactivos, analista y condiciones de medición.

La incertidumbre debida a fuentes de incertidumbre se calcula con la ecuación 6.

$$u_{Te} = \pm \frac{V \cdot 4 \cdot 2 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} \quad (6)$$

donde: V: es el volumen al cual se afora la solución.

2. Expresar los componentes en una incertidumbre estándar dentro de los cuales se tienen:

- **Evaluación de la incertidumbre tipo A:** análisis estadístico de los valores de mediciones obtenidos en condiciones de medición definida. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar convertida en incertidumbre estándar empleando la ecuación 7.

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

donde: n: es el número de muestras.

- **Evaluación de incertidumbre tipo B:** información obtenida a partir de un certificado de calibración o especificaciones de los instrumentos. Si es el caso

de una especificación de un instrumento se lee un error máximo posible o resolución del instrumento y se asume distribución rectangular aplicando la ecuación 8.

$$u_T = \frac{\text{error máximo posible}}{\sqrt{3}} \quad (8)$$

3. Combinar las diferentes incertidumbres para obtener la incertidumbre estándar combinada sacando la raíz de la suma de los cuadrados de cada incertidumbre de acuerdo a la ecuación 9.

$$u_{SP} = \sqrt{(u_T^2 + u_R^2 + u_{Te}^2)} \quad (9)$$

4. Determinar la incertidumbre expandida, es decir, multiplicar la incertidumbre estándar combinada por un factor de cobertura de $k = 2$, a fin de entregar un 95% de confianza mediante la ecuación 10.

$$U = K * u_{SP} \quad (10)$$

1.3.7 Rechazo de datos El rechazo de datos se puede realizar de dos maneras, visualmente mediante la elaboración de cartas control y estadísticamente con el uso de la prueba t-Student¹¹.

Cartas control: El objetivo principal del uso de esta herramienta es controlar estadísticamente el proceso de la determinación analítica. Con el control estadístico se consigue la detección de errores sistemáticos y el aseguramiento de que los resultados ofrecidos por el laboratorio son fiables a lo largo del tiempo.

Para calcular los valores de los límites de advertencia superior (LAS) e inferior (LAI) se hace uso de las siguientes ecuaciones:

$$LAS = X + 2s \quad (11)$$

$$LAI = X - 2s \quad (12)$$

donde: X: promedio y s: desviación estándar

¹¹ SANDOVAL S., Op. Cit.

El cálculo de los valores de los límites de control superior (LCS) e inferior (LCI), se hace como sigue:

$$LCS = X + 3s \quad (13)$$

$$LCI = X - 3s \quad (14)$$

donde: X: promedio y s: desviación estándar¹²

T-Student: Se utiliza para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos, es decir que se utiliza cuando deseamos comparar dos medias. La metodología que se lleva a cabo es la siguiente:

1. Ordenar los datos de menor a mayor: [Xbajo, x2, x3, ...Xalto]
2. Calcular Xprom y s.
3. Calcular T como:
 - Para un valor alto: $T = (X_{alto} - X_{prom}) / s \quad (15)$
 - Para un valor bajo: $T = (X_{prom} - X_{bajo}) / s \quad (16)$
4. Comparar los T calculados con el t de tabla.
5. Realizar el descarte de datos si fuera lugar.

¹² VILLAMIZAR VILLABONA M.P., "Estandarización de métodos analíticos usados para el análisis de agua, en el laboratorio del centro de estudios e investigaciones ambientales (CEIAM)," Universidad Industrial de Santander, 2008.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Validar los parámetros fisicoquímicos normalizados para agua potable: concentración de Hierro total y de Nitritos en el Laboratorio Departamental de Salud Pública.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir las características de validación que se emplearán en cada uno de los protocolos.
- Validar los parámetros espectrofométricos de hierro total y nitritos.
- Estandarizar las técnicas fisicoquímicas para la determinación de la concentración de hierro total y de nitritos en muestras de agua potable en el LDSP.

3. METODOLOGÍA

Con el fin de lograr los objetivos establecidos en este proyecto, la metodología propuesta se regirá por cuatro fases. Ver anexo A.

3.1 FASE 0: DOCUMENTACIÓN Y MONTAJE DE LA METODOLOGIA

Los procedimientos de ensayo recopilados deben ser estandarizados en un compendio de normas internacionales; en esta fase se sigue la metodología propuesta en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 23 de 2017. En él se definen las condiciones generales para los equipos, reactivos, materiales y demás, por lo que, al establecerlos en un laboratorio con unas condiciones específicas, son vitales para el procedimiento de validación de la concentración de hierro total y de nitritos.

3.1.1 Estandarización de los métodos La validación realizada es de carácter analítico estadístico, la metodología utilizada como herramienta de análisis mediante espectrometría visible se realizó según el método 3500-B (Método Fenantrolina) para hierro y el método 4500- NO₂⁻ B (Método Colorimétrico) para nitritos, de acuerdo con el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 23 de 2017.

3.1.2 Materiales y Equipos Probetas, embudo, beakers, pipetas volumétricas clase a (1 = 25 mL), matraces aforados de 50, 100, 500 y 1000 mL., balón aforado en vidrio clase a de 200 mL espátula, celda de muestra emparejada, macropipeteador, erlenmeyers, frasco lavador, espectrofotómetro UV-VIS DR 6000 marca HACH con una longitud de onda de 510 nm para hierro y 543 nm para nitritos.

3.2 FASE I: PREVALIDACIÓN

3.2.1 Condiciones de Trabajo Para la estandarización, se realiza la verificación de condiciones ambientales de temperatura (°C) y % porcentaje de humedad relativa, donde se realiza la medición de la temperatura y humedad durante 7 días de la semana y 7 horas diarias. Esta medición se realiza con un patrón de referencia de temperatura calibrado¹³.

Para el uso del espectrofotómetro de referencia UV-VIS HACH modelo 6000 SERIE1640837 se realiza la calibración del equipo de manera que esté en óptimas condiciones para realizar las mediciones correspondientes y elaboración de curvas de calibración.

3.2.2 Curvas de calibración Las curvas de calibración se realizan con 7 valores de concentraciones dentro del rango establecido para cada método de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 23 de 2017.

Para la elaboración de la curva de calibración se aplicará el método de los mínimos cuadrados, para la cual el coeficiente de correlación debe ser cercano a 1,00. El criterio de aceptación de la curva de calibración será que su coeficiente de regresión sea superior a 0,99 como mínimo.

3.2.3 Preparación de reactivos y estándares de calibración Para la realización de los ensayos se hace necesario la preparación de las siguientes soluciones.

3.2.3.1 Hierro Total Solución Madre de Hierro: Se utiliza una solución estándar certificada de 1000 mg/L de Fe de Lote HC74039781 de marca Merck. Se diluyen 5 mL de la solución madre de Hierro en un matraz aforado de 1000 mL y se afora con agua destilada; 1 mL = 1 µg de Fe.

Se preparan diariamente las siguientes soluciones:

¹³ SUÁREZ M., "Validación de métodos analíticos para la determinación de hierro, sulfatos, turbiedad, dureza total y cálcica en muestras de aguas claras y residuales," Escuela Politécnica Nacional, 2012.

- *Solución de hidroxilamina:* se disuelven 10 g de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en 100 mL de agua. *Solución tampón de acetato de amonio:* se disuelven 250 g de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ en 150 mL de agua.
- *Solución de acetato de sodio:* se disuelven 200 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 800 mL de agua.
- *Solución de fenantrolina:* se disuelven 100 mg 1,10-fenantrolina monohidrato, $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, en 100 mL de agua agitando y calentando a 80°C , se debe desechar la solución si se oscurece.
- *Permanganato de potasio, 0,02M:* se disuelven 0,316 g KMnO_4 en agua destilada y diluirlo hasta 100 mL.

3.2.3.2 Nitritos Solución Madre de Nitrito: Se utiliza una solución estándar certificada de 1000 mg/L NO_2 de Lote HC74039321 de marca Merck. Se toma 1 mL de la solución estándar y se diluye hasta 1000 mL para obtener una solución intermedia de 10 mg/ L NO_2 , luego se toma 3 mL de la solución intermedia y se completa con agua destilada en un balón aforado clase A de 200 mL.

Oxalato de sodio, 0,025M (0,05 N): se disuelve 3,350 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, grado estándar primario, en agua hasta 1000 mL.

Valorante de permanganato de potasio estándar, 0,05N: se disuelve 1,6 g de KMnO_4 , en 1 L de agua destilada.

Sulfato de amonio ferroso, 0,05M (0,05 N): se disuelven 19,607 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ más 20 mL de agua concentrada y se diluye a 1000 mL.

3.3 FASE II: VALIDACIÓN

Siguiendo el protocolo de análisis establecido en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 23 de 2017, durante siete días diferentes que pueden ser continuos o alternos se analizan un mínimo de siete

muestras, el proceso se debe procurar hacerlo a la misma hora, en condiciones ambientales entre 20°C - 25°C y un porcentaje de humedad menor al 80% utilizando como blanco agua destilada cuando aplique [5].

3.4 FASE III: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.4.1 Rechazo de datos Para esto se debe reunir como mínimo 10 datos obtenidos de mediciones repetidas de un patrón, sobre la curva de calibración del método analítico. Con estos obtener los valores de la media y la desviación estándar del conjunto de datos para establecer los límites de control del gráfico.

Elaborar el gráfico de control, colocando en el eje de las x los siete días calendario del análisis y en el eje de la y los límites de advertencia superior e inferior y los límites de control superior e inferior¹⁴.

La otra manera de evaluar el descarte de datos es calcular el t-Student, en él se asume una campana de gauss donde el 99% de los valores entran dentro y el 1% de los que quedan muy alejados de ese promedio son los que se rechazan, es decir, si el T calculado es mayor que el T de tablas (para un nivel de confianza del 99% y 14 mediciones, Anexo B, Tabla 9), el dato se rechaza. Como el número de las muestras que se va a manejar es pequeño, se pueden rechazar como máximo dos datos; si la aplicación del criterio de rechazo da positiva para más de dos datos, el ensayo deberá repetirse.

3.4.2 Límite de detección Para la determinación del LDM en el laboratorio se aplica el siguiente procedimiento:

1. Preparar de 7 a 10 estándares de concentración mínima y medir su concentración siguiendo el protocolo de análisis, utilizando como blanco agua destilada cuando aplique.

¹⁴ VILLAMIZAR VILLABONA M.P., Op. Cit.

2. Calcular la desviación estándar s .
3. Calcular el LDM aplicando la ecuación 1.

3.4.3 Límite de cuantificación Se procederá de la siguiente manera para su confirmación:

1. Preparar de 7 a 10 soluciones estándar de la concentración hallada para el LDM.
2. Calcular la desviación estándar s y el valor promedio $\bar{X}$ de las concentraciones estándares.
3. Calcular el LOQ con la ecuación 3.

3.4.4 Linealidad Para evaluar la linealidad de los métodos se preparan 7 diluciones de la solución intermedia, se realiza una curva de calibración con los valores de absorbancia de cada uno de los patrones preparados versus las respectivas concentraciones, se calcula la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación y finalmente se aplica el test de linealidad a los resultados.

3.4.5 Precisión Se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo lineal.

3.4.5.1 Repetibilidad Se calcula haciendo mediciones sobre 3 soluciones estándar a concentraciones conocidas, las cuales bajo las mismas condiciones operativas (analista, equipo, reactivos y día) se les aplica el procedimiento analítico respectivo.

3.4.5.2 Reproducibilidad Se estima haciendo 7 determinaciones sobre tres niveles de concentraciones en siete días diferentes y por dos analistas diferentes. Para ello se realizan mediciones tomando como criterio los valores de la curva y se evalúa con diferentes % de concentración de la curva 15% (A1), 55%(A2), 90%(A3), adicionalmente se toma una muestra de (M1) del acueducto de Bucaramanga a la cual se le hacen adicionados, la de concentraciones bajas se hace al 30% del

estándar y otra de concentraciones altas al 60% del estándar y una muestra M2 de Agua envasada, $M2 > M1$ para este caso 70% del estándar.

La repetibilidad y reproducibilidad se determina como coeficientes de variación utilizando la ecuación 2.

3.4.6 Exactitud Este parámetro se valora con el porcentaje de error y el porcentaje de recuperación. El cálculo se hace mediante las ecuaciones 4 y 5 respectivamente.

3.4.7 Incertidumbre Para la determinación de este parámetro se establecen las fuentes de incertidumbre durante todo el proceso teniendo en cuenta un diagrama causa-efecto Anexo C figura 7 y las fórmulas respectivas (ecuaciones de la 6 a la 10).

FASE IV: ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE DOCUMENTOS

Consiste en la elaboración y presentación del informe de la validación de los métodos de análisis de hierro total y nitritos de forma impresa y digital, de igual manera, una carpeta que contenga los soportes que sustentan la realización del proyecto. Esta fase ocurrirá en paralelo a las demás, debido a la necesidad de tener procedimientos claros durante la práctica.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CADA UNO DE LOS MÉTODOS

Para la determinación del LDM y LOQ, se analizaron 10 réplicas de blanco de reactivos de concentración mínima, se calculó la desviación estándar de las diez réplicas, se calculó el valor promedio de todas las lecturas y el coeficiente de variación como criterio de aceptación. Se obtuvieron los siguientes resultados:

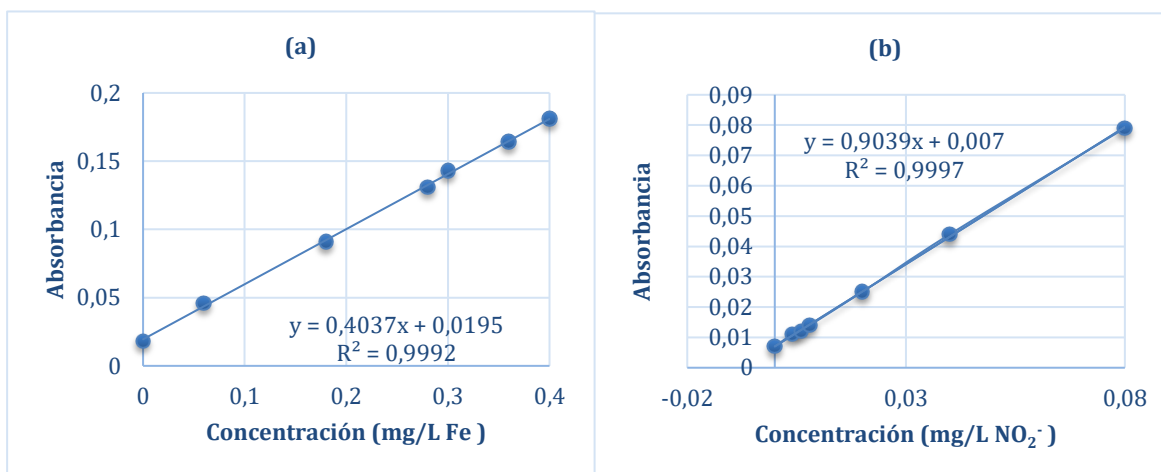
Tabla 1. Resultados del LDM y LOQ de cada método.

Parámetro	mg/L Fe	mg/L NO ₂ ⁻
X	0,031	0,004
S	0,003	0,0005
%CV	10,0	11,8
LDM	0,040	0,005
LOQ	0,063	0,009

Los valores de coeficiente de variación CV registrados en la tabla 1 para cada uno métodos, el 10% para el hierro total y del 11,8% para nitritos, son menores al 20% el cual es el valor máximo aceptado por el IDEAM en función de la concentración del analito, es decir, que los análisis cumplen con las especificaciones establecidas para los blancos, así como el criterio de precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad es aceptable. El registro de las concentraciones en función del analito para cada método se encuentra en el Anexo D, tabla 10.

4.2 LINEALIDAD

Figura 1.Curvas de calibración para la determinación de (a) Hierro (Longitud de



onda 510 nm), y (b) Nitritos (Longitud de onda 543 nm).

En la curva de calibración se observa la ecuación de la gráfica de la recta de la forma ($y = mx + b$) y coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2), de donde se obtienen los siguientes datos de aceptación según la **Tabla 2**.

Tabla 2. Datos de linealidad de la curva de calibración y criterios de aceptación para el rango de trabajo de cada método.

Parámetro	Valor experimental Hierro	Valor experimental Nitritos
Ecuación de la recta	$y = 0,4037x + 0,0195$	$y = 0,9039x + 0,007$
Pendiente	0,4037	0,9039
Intercepto	0,0195	0,007
Coeficiente de correlación (r)	0,9995	0,9998
Coeficiente. de determinación (r^2)	0,9992	0,9997

El análisis de regresión lineal para los diferentes ensayos realizados arroja que el método cumple con los supuestos de aplicación debido a que el coeficiente de correlación de hierro de 0,995 y el de nitritos de 0,9998 son mayores que el 0,9950 para aceptar la curva de calibración. Adicionalmente, se analiza el coeficiente de determinación que la condición debe ser mayor al 0,9900, siendo favorable para cada uno de los métodos.

4.3 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

Los datos obtenidos para la determinación de la precisión del sistema instrumental (donde se realizan mediciones con una pipeta aforada de 10 mL marca Brand calibrada para la toma de volúmenes iguales de 10 mL para el método de estandarización de Hierro y Nitritos) se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de mediciones de material volumétrico pipeta aforada de 10 mL con diferentes soluciones de concentraciones preparadas que representan valores dentro de la curva de calibración.

No. Ensayo	Volumen de Muestra (mL)	Hierro			Nitritos		
		0,080 mg/L Fe	0,300 mg/L Fe	0,400 mg/L Fe	0,02 mg/L NO ₂ ⁻	0,04 mg/L NO ₂ ⁻	0,08 mg/L NO ₂ ⁻
1	10,0	0,082	0,310	0,409	0,02	0,05	0,08
2	10,0	0,083	0,311	0,410	0,02	0,05	0,09
3	10,0	0,085	0,310	0,405	0,02	0,04	0,09
4	10,0	0,090	0,310	0,400	0,03	0,04	0,08
5	10,0	0,079	0,310	0,403	0,02	0,04	0,09
6	10,0	0,083	0,310	0,397	0,02	0,03	0,08
7	10,0	0,089	0,321	0,411	0,02	0,03	0,08
8	10,0	0,085	0,320	0,410	0,02	0,05	0,08

9	10,0	0,082	0,320	0,416	0,02	0,04	0,07
10	10,0	0,085	0,319	0,410	0,03	0,05	0,07
11	10,0	0,070	0,320	0,411	0,02	0,04	0,08
12	10,0	0,083	0,320	0,420	0,02	0,04	0,08
X		0,083	0,311	0,409	0,0217	0,0417	0,0808
s		0,005	0,009	0,006	0,0039	0,0072	0,0067
% CV		6,3	2,8	1,6	18	17,2	8,3
% ERROR		3,9	3,7	2,1	8,3	4,2	1,0

Tal como lo muestra la tabla el coeficiente de variación varía entre 1,6 a 17,2% siendo en todos los casos menor al límite máximo para el criterio de condición aceptable que es el 20 %. Adicionalmente, el porcentaje de error debe ser menor al 10%, cómo se puede observar el rango va de 1,0 a 8,3 lo que resulta satisfactorio y, por ende, se puede continuar con el procedimiento de validación.

4.4 REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y EXACTITUD CON ADICIÓN DEL ESTÁNDAR

Los resultados para la referencia de las mediciones tomando como criterio los valores de la curva, evaluado con diferentes % de concentración de la curva se muestran a continuación.

Tabla 4. Concentraciones de referencia para la repetitividad y reproducibilidad de cada método con adición de estándar

Muestra	Concentración mg/L Fe	Concentración mg/L NO ₂ ⁻
A1	0,06	0,012
A2	0,22	0,044

A3	0,36	0,072
M1	0,20	0,032
M1ab	0,26	0,042
M1aa	0,32	0,051
M2	0,28	0,056

Una vez establecidas las concentraciones de referencia se realizaron las mediciones por los dos analistas con duplicados durante 7 días. Los resultados se presentan en los gráficos.

Figura 2. Repetitividad y reproducibilidad de (a) Hierro.

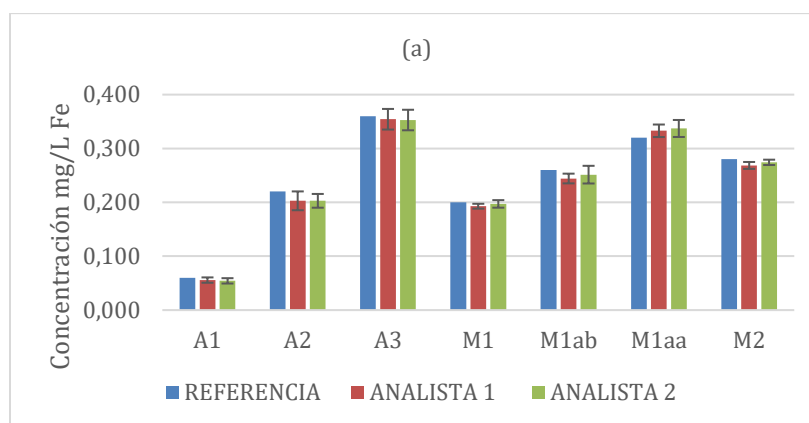
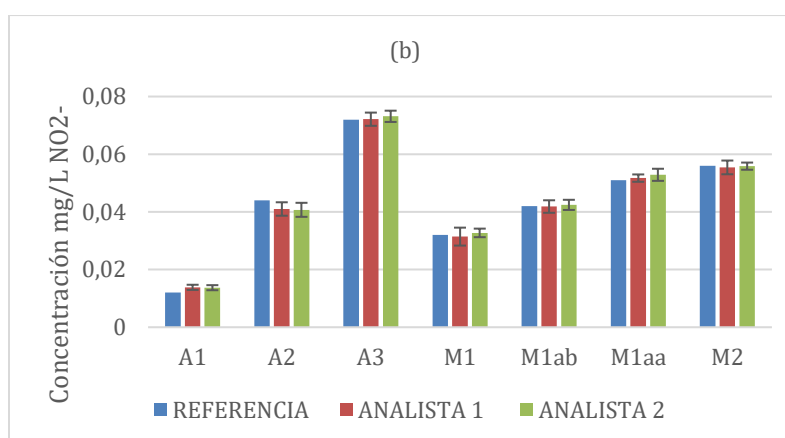


Figura 3. Repetitividad y reproducibilidad de (b) Nitritos.



Como puede observarse, los puntos que representan las medias de cada grupo aparecen dispersos a diferentes niveles. Para el análisis realizado en hierro, se tienen porcentajes de error bajos que van desde 0,8% a 8,6% permitiendo encontrar

datos más concentrados y poca diferencia significativa de un dato a otro. No obstante, las medidas realizadas en nitritos presentan valores más altos que van de 0,2% a 15,3% lo que da lugar a una mayor dispersión e incertidumbre en la medición. Otro detalle a destacar se debe al intervalo de confianza para la media correspondiente al definido por cada analista, los valores de referencia a diferentes porcentajes de concentraciones se encuentran dentro del intervalo de confianza establecido por el laboratorio. Ver anexo E y F, tablas de la 12 a la 18.

4.5 RECHAZO DE DATOS

Debido a que en el análisis de nitritos se presenta un porcentaje de error del 15,3% valor mayor al aceptado del 10%, da lugar a incertidumbre en los datos, por ello se procede a realizar las cartas control y un análisis estadístico mediante la prueba de distribución t-Student para verificar los resultados.

Figura 4. Carta control para una concentración estándar (a) 0,165 mg/L Fe

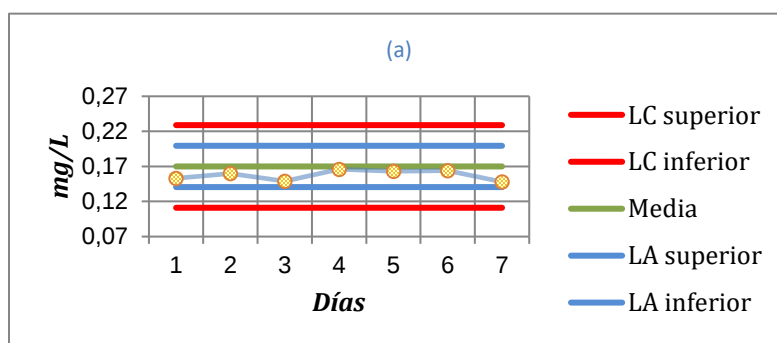
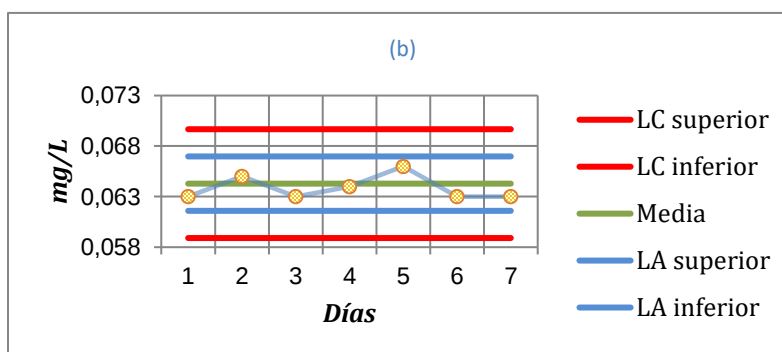


Figura 5. Carta control para una concentración estándar (b) 0,065 mg/L NO_2^-



Las cartas de control muestran la distribución de los datos para el estándar de hierro de 0,165 mg/L y de nitritos de 0,065 mg/L. Al analizar los datos obtenidos se observó que ninguno de ellos sobrepasó los límites de aceptación y no se presentan tendencias en los análisis realizados, lo que indica que la metodología no se encuentra sujeta a errores sistemáticos. Por lo cual se determinó que el proceso está en un estado de control estadístico.

La prueba t-Student se realizó de acuerdo a lo planteado en la metodología para el rechazo de datos atípicos o muy dispersos.

Tabla 5. t-Student calculado para un n=14 del método de hierro

Muestra	S	X	Xbajo	Xalto	Tbajo	Talto	Tcrit(99%)
A1	0,005	0,055	0,050	0,060	0,964	0,964	2,6585
A2	0,016	0,203	0,170	0,230	2,067	1,707	2,6585
A3	0,020	0,354	0,310	0,370	2,195	0,828	2,6585
M1	0,007	0,195	0,190	0,210	0,769	2,306	2,6585
M1ab	0,014	0,248	0,230	0,280	1,254	2,257	2,6585
M1aa	0,015	0,335	0,320	0,360	1,031	1,719	2,6585
M2	0,007	0,271	0,260	0,280	1,724	1,293	2,6585

Tabla 6. t-Student calculado para un n=14 del método de nitritos

Muestra	S	X	Xbajo	Xalto	Tbajo	Talto	Tcrit(99%)
A1	0,001	0,014	0,012	0,015	1,909	1,328	2,6585
A2	0,002	0,041	0,037	0,043	1,558	0,865	2,6585
A3	0,002	0,073	0,069	0,075	1,602	1,037	2,6585
M1	0,003	0,032	0,026	0,035	2,321	1,120	2,6585
M1ab	0,002	0,042	0,039	0,045	1,518	1,380	2,6585
M1aa	0,002	0,052	0,050	0,057	1,204	2,483	2,6585
M2	0,002	0,056	0,051	0,058	2,339	1,188	2,6585

Como resultado del t-Student no se encontraron datos atípicos, por lo que no se rechazó ninguno de los datos hallados, debido a que T_{bajo} y T_{alto} son menores que el valor de $t=2,6585$ para 14 grados de libertad y un nivel de confianza del 99%.

4.6 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

La determinación de la exactitud para hierro total y nitritos se realiza teniendo en cuenta la ecuación 5. Los resultados obtenidos con su respectivo porcentaje promedio de recuperación en muestras de agua de grifo se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Medición de porcentajes de recuperación en las muestras de agua de grifo adicionando concentración estándar de hierro total y nitritos

% Recuperación	Hierro Total		Nitritos	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
M1ab	94,0	96,7	99,7	101,0
M1aa	104,0	105,4	101,4	103,6

Los porcentajes de recuperación obtenidos por los analistas se encuentran dentro el criterio de aceptación, además presentan porcentajes menores al 20% en el coeficiente de variación (ver Anexo C, Tabla 14 y Anexo D, Tabla 18), es decir, que los métodos utilizados para medir hierro total y nitritos son exactos y admisibles para el laboratorio.

4.7 INCERTIDUMBRE

Debido a que la determinación de hierro total y nitritos son métodos analíticos espectrofotométricos, para estimar la incertidumbre de los mismos se debe tener en cuenta la respuesta del instrumento y el material de referencia certificado, la cual se calcula con las ecuaciones 6 a 10. La alícuota fue medida con una pipeta aforada

de 10 mL de tolerancia $\pm 0,02$ para ambos métodos. Los datos obtenidos para las concentraciones de 0,165 mg/L Fe y 0,065 mg/L NO_2^- se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Incertidumbre debida a la curva de calibración para hierro total y nitritos

Concentración	0,165 mg/L Fe	0,065 mg/L NO_2^-
$u_{(Te)}$	0,0046	0,0046
$u_{(R)}$	0,00095	0,00016
$u_{(T)}$	0,012	0,012
u_{SP}	0,013	0,013
U	0,165 mg/L $\pm 0,0249$	0,065 mg/L $\pm 0,0248$

La estimación de la incertidumbre expandida para hierro total de 0,165 mg/L $\pm 0,0249$ y para nitritos 0,065 mg/L $\pm 0,0248$, nos indica que los resultados no se encuentran dispersos entre sí, con un 95 % de confianza ($k=2$), teniendo en cuenta las fuentes de incertidumbre combinadas para métodos espectrofotométricos. Además, como se puede ver la mayor fuente de incertidumbre es la $u_{(T)}$ en ambos métodos.

5. CONCLUSIONES

- La validación de los métodos analíticos de hierro total y nitritos, demostró que éstos cuentan con las características de desempeño adecuadas.
- La demostración de la capacidad inicial de cada método, cumplió con los criterios de aceptación por medio del porcentaje de coeficiente de variación $<20\%$ y el porcentaje de recuperación $\%R = 80 - 120$.
- Las cartas de control realizadas con patrones de cada método, permitieron determinar que ambos procesos están bajo un estado de control estadístico.
- La incertidumbre de los métodos muestra que en la mayoría de ellos la mayor fuente de incertidumbre es la asociada a las especificaciones del instrumento
- De acuerdo con los resultados obtenidos en la validación de los métodos, se puede concluir que el método 3500-B permite medir hierro total con un intervalo de trabajo de 0,00 a 0,4 mg/L Fe, mientras que el método 4500- NO_2^- B permite medir nitritos con un intervalo de trabajo de 0,004-0,08 mg/L NO_2^- , pudiendo ser aplicados en el Laboratorio Departamental de Salud Pública.

BIBLIOGRAFÍA

COY G. A., BOJACA R. del pilar and DUQUE M.E., “Estandarización de Métodos Analíticos,” IDEAM. 2006.

CRUZ CARRILO, Jeniffer Yuliana y LIZCANO RIVERA, Aura Juliana. Validación de los parámetros fisicoquímicos normalizados para agua potable: dureza total y cálcica, alcalinidad, cloruros y sulfatos. Tesis de pregrado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, 2018.

LONDOÑO A., G. I. GIRALDO and GUTIÉRREZ Á. A., “Métodos analíticos para la evaluación de la calidad fisicoquímica del agua,” Environment International, vol. 1, no. 1. Universidad Nacional de Colombia, pp. 1-149, 2010.

MENDOZA NOSSA, Leydy Alexandra. Validación de los parámetros fisicoquímicos normalizados para agua potable: turbiedad, color, pH y conductividad. Tesis de pregrado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, 2019.

NTC/ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Bogotá. 2005.

SCHMIDT P, THOMAS, et al. Medición de nitratos y nitritos en agua y saliva de población rural precordillerana de la VIII región, p. 119-124. [En línea]. Disponible en <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162012000200003>.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. American Public Health Association, American Water World Association, Water Pollution Control Federation, 23 ed., New York, 2017.

SUÁREZ M., “Validación de métodos analíticos para la determinación de hierro, sulfatos, turbiedad, dureza total y cálcica en muestras de aguas claras y residuales,” Escuela Politécnico Nacional, 2012.

UNICEF. El agua potable y el saneamiento básico en los planes de desarrollo. Bogotá. [En línea]. (Recuperado en 18 octubre 2018). Disponible en <http://www.unicef.org.co/pdf/Agua3.pdf>.

URIBE, J. et al. Actividades y resultados del Laboratorio Departamental de Salud Pública. Revista Observatorio Salud Pública Santander (Vol. 1, pp. 1–20). 2018
Recuperado de:
https://web.observatorio.co/publicaciones/informe_a%C3%B1o_vinum1_ldsp.pdf

VILLAMIZAR VILLABONA M.P., “Estandarización de métodos analíticos usados para el análisis de agua, en el laboratorio del centro de estudios e investigaciones ambientales (CEIAM),” Universidad Industrial de Santander, 2008.

ANEXOS

Anexo A. Metodología

Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología



Anexo B. Rechazo de datos

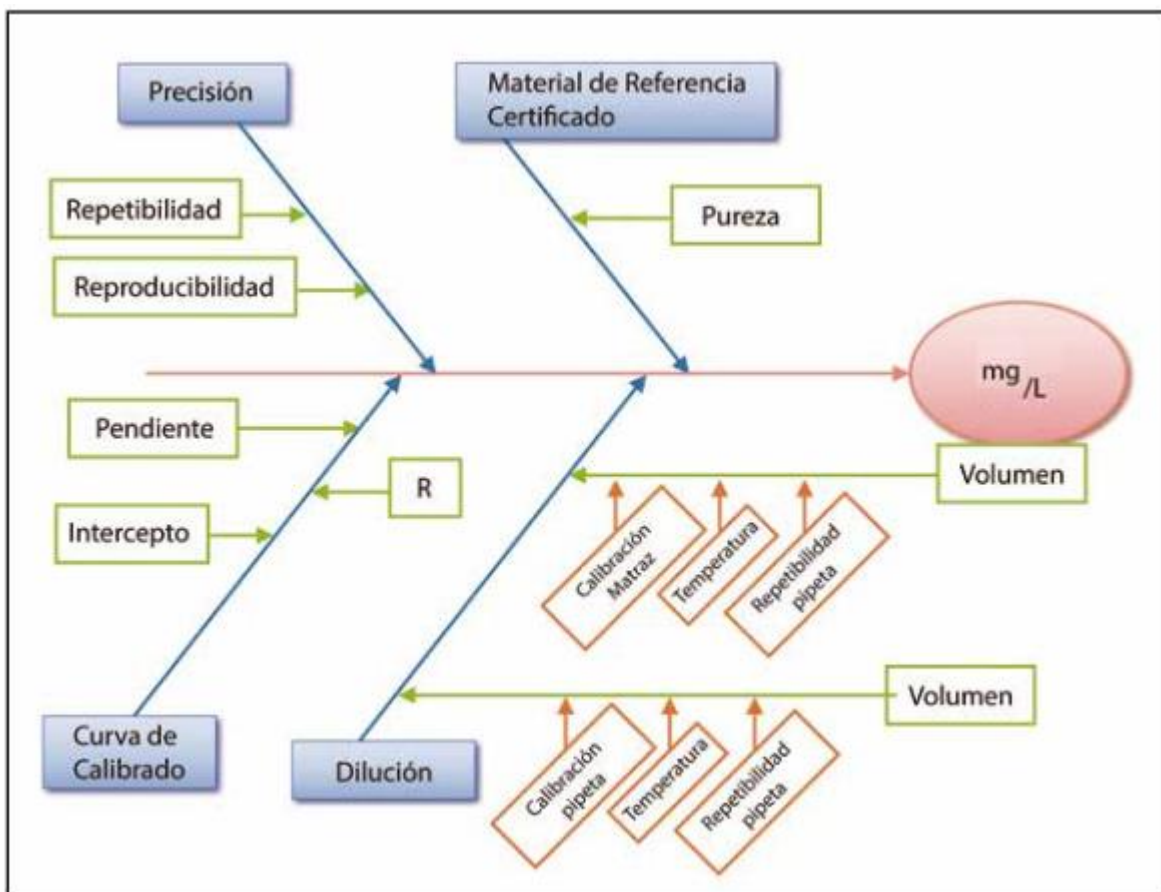
Tabla 9. Valores críticos para t-Student.

Grados de Libertad GL	95%	99%
3	1,1531	1,1546
4	1,4625	1,4925
5	1,6714	1,7489
6	1,8221	1,9442
7	1,9381	2,0973
8	2,0317	2,2208
9	2,1096	2,3231
10	2,1761	2,4097
11	2,2339	2,4843
12	2,285	2,5494
13	2,3305	2,607
14	2,3717	2,6585
15	2,409	2,7049
16	2,4433	2,747
17	2,4748	2,7854
18	2,504	2,2808
19	2,5312	2,8535
20	2,5566	2,8838
25	2,6629	3,0086
30	2,7451	3,1029
40	2,8675	3,2395
50	2,957	3,3366
60	3,0269	3,4111
70	3,0839	3,471

Fuente: INSITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS
AMBIENTALES IDEAM. Protocolo-estandarización de métodos analíticos.

Anexo C. Flujograma evaluación de la incertidumbre

Figura 7. Diagrama de causa-efecto de las fuentes de incertidumbre



Fuente: REVISTA NOVA

Anexo D. Concentraciones en función del analito

Tabla 10. Límite de detección y cuantificación de blancos para hierro y nitritos

Réplica	CONCENTRACION mg/L Fe PARA BLANCOS	CONCENTRACION mg/L NO₂⁻ PARA BLANCOS
1	0,030	0,004
2	0,030	0,005
3	0,030	0,004
4	0,030	0,004
5	0,040	0,004
6	0,030	0,004
7	0,030	0,004
8	0,030	0,004
9	0,030	0,003
10	0,030	0,004

Anexo E. Precisión para el método de análisis de hierro

Tabla 11. Preparación de concentraciones para la repetitividad y reproducibilidad con adición de estándar de hierro

	Rango de la curva 0,00-0,4 mg/L de Fe	
(A1) Estándar de Hierro 15% DE LA CURVA	Corresponde a $0,15 \times 0,4 \text{ mg/L} = 0,06 \text{ mg/L}$	
(A2) Estándar de Hierro 55% DE LA CURVA	Corresponde a $0,55 \times 0,4 \text{ mg/L} = 0,22 \text{ mg/L}$	
(A3) Estándar de Hierro 90% DE LA CURVA	Corresponde a $0,90 \times 0,4 \text{ mg/L} = 0,36 \text{ mg/L}$	
M1 (Agua Llave Acueducto de Bucaramanga)	Agua de la llave y debe ser <al 50% de la curva, para este caso $0,5 \times 0,4 \text{ mg/L} = 0,2 \text{ mg/L}$	
M1ab (30%ST)	Adicionado a concentraciones bajas <30% M1; $M1 \times 0,3 = 0,06 + 0,2 = 0,26$	
M1aa (60% ST)	Adicionado a concentraciones altas >50% de M1; $M1 \times 0,6 = 0,12 + 0,2 = 0,32$	
M2 (Agua envasada) (70% ST)	Agua empacada, $M2 \gg M1$ para este caso 70% del rango de la curva = $0,70 \times 0,4 \text{ mg/L} = 0,28 \text{ mg/L}$	

Tabla 12. Mediciones de repetitividad y reproducibilidad del Analista 1 durante siete días diferentes con concentraciones adicionadas.

	Días	1	2	3	4	5	6	7
CONCENTRACIONES DE TRABAJO	REF mg/L Fe	ANALISTA 1 mg/L Fe	ANALISTA 1 mg/L Fe	ANALISTA 1 mg/L Fe	ANALISTA 1 mg/L Fe	ANALISTA 1 mg/L Fe	ANALISTA 1 mg/L Fe	ANALISTA 1 mg/L Fe
(A1) Estándar de Hierro 15% DE LA CURVA	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06
(A2) Estándar de Hierro 55% DE LA CURVA	0,22	0,20	0,22	0,23	0,17	0,20	0,20	0,20
(A3) Estándar de Hierro 90% DE LA CURVA	0,36	0,35	0,37	0,36	0,36	0,31	0,37	0,36
M1 (Agua Llave Acueducto de Bucaramanga)	0,20	0,19	0,20	0,19	0,19	0,19	0,20	0,19
M1ab (30%STD)	0,26	0,24	0,24	0,23	0,24	0,25	0,26	0,25
M1aa (60% STD)	0,32	0,32	0,34	0,34	0,35	0,32	0,32	0,34
M2 (Agua envasada) (70% ST)	0,28	0,28	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26

Tabla 13. Mediciones de repetitividad y reproducibilidad del Analista 2 durante siete días diferentes con concentraciones adicionadas.

	Días	1	2	3	4	5	6	7
CONCENTRACIONES DE TRABAJO	REF mg/L Fe	ANALISTA 2 mg/L Fe	ANALISTA 2 mg/L Fe	ANALISTA 2 mg/L Fe	ANALISTA 2 mg/L Fe	ANALISTA 2 mg/L Fe	ANALISTA 2 mg/L Fe	ANALISTA 2 mg/L Fe
(A1) Estándar de Hierro 15% DE LA CURVA	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,06
(A2) Estándar de Hierro 55% DE LA CURVA	0,22	0,19	0,21	0,23	0,19	0,2	0,2	0,2
(A3) Estándar de Hierro 90% DE LA CURVA	0,36	0,35	0,37	0,35	0,36	0,31	0,37	0,36
M1 (Agua Llave Acueducto de Bucaramanga)	0,20	0,19	0,2	0,21	0,19	0,19	0,2	0,2
M1ab (30%STD)	0,26	0,24	0,23	0,24	0,28	0,25	0,27	0,25
M1aa (60% STD)	0,32	0,32	0,34	0,35	0,35	0,32	0,32	0,36
M2 (Agua envasada) (70% ST)	0,28	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	0,28

Tabla 14. Datos estadísticos para medición de reproducibilidad, repetitividad y exactitud en la medición de los dos analistas.

Xprom. Analista 1	Xprom. Analista 2	desv. Est.1 (s)	desv. Est.2 (s)	%CV 1	%CV 2	% Error 1	% Error 2
0,06	0,05	0,0049	0,0049	8,9	9,1	7,1	8,6
0,20	0,20	0,0175	0,0128	8,6	6,3	7,8	1,4
0,35	0,35	0,0192	0,0191	5,4	5,4	1,6	0,8
0,19	0,20	0,0045	0,0070	2,3	3,5	3,6	3,8
0,24	0,25	0,0090	0,0164	3,7	6,5	6,0	4,8
0,33	0,34	0,0116	0,0158	3,5	4,7	4,0	5,4
0,27	0,27	0,0064	0,0049	2,4	1,8	4,1	2,0

Anexo F. Precisión para el método de análisis de nitritos

Tabla 15. Preparación de concentraciones para la repetitividad y reproducibilidad con adición de estándar de nitritos.

	Rango de la curva 0,004-0,08 mg/L de NO_2^-
(A1) Estándar de Nitritos 15% DE LA CURVA	Corresponde a $0,15 \cdot 0,08 \text{ mg/L} = 0,012 \text{ mg/L}$
(A2) Estándar de Nitritos 55% DE LA CURVA	Corresponde a $0,55 \cdot 0,08 \text{ mg/L} = 0,044 \text{ mg/L}$
(A3) Estándar de Nitritos 90% DE LA CURVA	Corresponde a $0,90 \cdot 0,08 \text{ mg/L} = 0,072 \text{ mg/L}$
M1 (Agua Llave Acueducto de Bucaramanga)	Agua de la llave y debe ser <al 50% de la curva, para este caso $0,4 \cdot 0,08 \text{ mg/L} = 0,032 \text{ mg/L}$
M1ab (30%ST)	Adicionado a concentraciones bajas <30% M1; $M1 \cdot 0,3 = 0,0096 + 0,032 = 0,042$
M1aa (60% ST)	Adicionado a concentraciones altas >50% de M1; $M1 \cdot 0,6 = 0,0192 + 0,032 = 0,051$
M2 (Agua envasada) (70% ST)	Agua empaçada, $M2 \gg M1$ para este caso 70% del rango de la curva = $0,70 \cdot 0,08 \text{ mg/L} = 0,056 \text{ mg/L}$

Tabla 16. Mediciones de repetitividad y reproducibilidad del Analista 1 durante siete días diferentes con concentraciones adicionadas.

	Días	1	2	3	4	5	6	7
CONCENTRACIONES DE TRABAJO	REF mg/L NO2-	ANALIS TA 1 mg/L NO2-	ANALIS TA 1 mg/L NO2-	ANALIS TA 1 mg/L NO2-	ANALIS TA 1 mg/L NO2-	ANALIS TA 1 mg/L NO2-	ANALIS TA 1 mg/L NO2-	ANALIS TA 1 mg/L NO2-
(A1) Estándar de Nitritos 15% DE LA CURVA	0,012	0,015	0,014	0,014	0, 013	0,014	0,014	0,012
(A2) Estándar de Nitritos 50% DE LA CURVA	0,04	0,043	0,043	0,041	0,042	0,043	0,037	0,038
(A3) Estándar de Nitritos 90% DE LA CURVA	0,072	0,075	0,072	0,072	0,075	0,069	0,073	0,069
M1 (Agua Llave Acueducto de Bucaramanga)	0,032	0,034	0,035	0,031	0,034	0,026	0,028	0,032
M1ab (30%STD)	0,0416	0,042	0,041	0,041	0,039	0,040	0,045	0,045
M1aa (60% STD)	0,00512	0,052	0,050	0,053	0,053	0,053	0,051	0,050
M2 (Agua envasada) (70% ST)	0,056	0,053	0,057	0,057	0,058	0,051	0,057	0,055

Tabla 17. Mediciones de repetitividad y reproducibilidad del Analista 2 durante siete días diferentes con concentraciones adicionadas.

	Días	1	2	3	4	5	6	7
CONCENTRACIONES DE TRABAJO	REF mg/L NO2-	ANALIS TA 2 mg/L NO2-	ANALIS TA 2 mg/L NO2-	ANALIS TA 2 mg/L NO2-	ANALIS TA 2 mg/L NO2-	ANALIST A 2 mg/L NO2-	ANALIST A 2 mg/L NO2-	ANALIS TA 2 mg/L NO2-
(A1) Estándar de Nitritos 15% DE LA CURVA	0,012	0,012	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	0,013
(A2) Estándar de Nitritos 55% DE LA CURVA	0,04	0,043	0,043	0,039	0,042	0,043	0,037	0,038
(A3) Estándar de Nitritos 90% DE LA CURVA	0,072	0,072	0,073	0,075	0,074	0,075	0,074	0,069
M1 (Agua Llave Acueducto de Bucaramanga)	0,032	0,033	0,035	0,032	0,034	0,03	0,033	0,032
M1ab (30%STD)	0,0416	0,042	0,046	0,044	0,045	0,044	0,046	0,046
M1aa (60% STD)	0,0051 2	0,047	0,048	0,048	0,048	0,048	0,049	0,049
M2 (Agua envasada) (70% ST)	0,056	0,057	0,056	0,056	0,057	0,054	0,057	0,054

Tabla 18. Datos estadísticos para medición de reproducibilidad, repetitividad y exactitud en la medición de los dos analistas.

Xprom. Analista 1	Xprom. Analista 2	desv. Est.1 (s)	desv. Est.2 (s)	%CV 1	%CV 2	% Error 1	% Error 2
0,014	0,014	0,001	0,001	6,5	6,4	15,3	8,6
0,041	0,041	0,002	0,002	5,7	6,0	6,8	5,3
0,072	0,073	0,002	0,002	3,2	2,7	0,2	2,5
0,031	0,033	0,003	0,001	9,9	4,5	1,8	3,8
0,042	0,045	0,002	0,001	5,2	3,1	0,3	6,5
0,052	0,048	0,001	0,001	2,5	1,3	1,4	7,4
0,055	0,056	0,002	0,001	4,3	2,2	1,0	5,4