

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



VALIDACION DEL METODO DE 1,5-DIFENILCARBOHIDRAZIDA PARA LA
DETERMINACION DE CROMO HEXAVALENTE EN AGUA DE CONSUMO
HUMANO

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACION

PRESENTADO POR

MEIBELYN MAGDALENA GUERRA LARA
EVELIN VERONICA PINEDA MERINO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2022

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICENCIADA REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIO INTERINO

MAESTRO ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL

Maestra Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL EVALUADOR

**ASESORES DE AREA EN CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

Licenciada Ariana Lissette García de Ventura

Maestro Eliseo Ernesto Ayala Mejía

DOCENTE ASESOR

Licenciado Henry Alfredo Hernández Contreras

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dios por la vida, también porque cada día me bendice con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar al lado de las personas que más me aman, y a las que más amo, a mis padres por permitirme conocer de Dios y de su infinito amor.

Gracias a nuestro asesor Licenciado Henry Alfredo Hernández Contreras, quien con su conocimiento y experiencia nos ha guiado a lo largo de esta investigación. A la Directora de procesos de graduación y asesores de área por corregir y aportar opiniones para un mejor desarrollo del trabajo de investigación.

También al Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, por darnos la oportunidad de realizar la parte experimental de nuestro trabajo de graduación.

Este logro es gracias a todas las personas que mostraron su apoyo incondicional ya que he logrado concluir con éxito mi trabajo de graduación, no ha sido fácil el camino, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad, pude vencer todos los obstáculos presentados a lo largo de la carrera y culminó la misma con mucho esfuerzo, pero he llegado a la meta.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera me han dado un consejo en los momentos que lo necesite para avanzar en mi carrera profesional, han sido ángeles en mi camino, que me acompañaron en el avance del camino recorrido, ahora son dignos de mis agradecimientos.

Meibelyn Guerra

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser fiel y ayudarme a culminar esta meta de mi vida, por las bendiciones, la inteligencia y la fuerza para terminar este trabajo.

A mis padres, por ser mi apoyo incondicional en todas las circunstancias a las que me enfrente, ayudándome a salir siempre adelante con sus oraciones y consejos que nunca faltaron.

A mis hermanas y mi tía, porque nunca me dejaron sola a lo largo de mi carrera, por su ayuda que Dios me las bendiga siempre.

A mi novio y futuro esposo, que se convirtió en el mayor apoyo para culminar mi carrera quien tomo el papel de amigo, profesor, asesor e incluso compañero de clases estoy enormemente agradecida por contar siempre con sus consejos y regaños en cada etapa donde lo necesitaba gracias por estar en cada paso de esta experiencia y deseo de corazón que todo se multiplique para ti.

A todas las personas que hicieron que esto fuera posible nuestro asesor, amigos, compañeros y familiares.

Evelin Merino

INDICE GENERAL

	Pág. N°
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xvii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	22
3.1 El agua	22
3.1.1 Propiedades fisicoquímicas del agua	22
3.1.2 Contaminación del agua	23
3.1.3 Contaminación del agua con metales pesados	24
3.1.4 Contaminación del agua potable con Cromo Hexavalente	24
3.1.4.1 Efectos del Cromo Hexavalente sobre la salud	25
3.1.4.2 Efectos del Cromo Hexavalente sobre el ambiente	26
3.2 Principios de espectroscopia	27
3.2.1 Espectrofotometría UV-Visible	28
3.2.2 Absorción de luz por las moléculas	28
3.2.3 Espectrofotometría de absorción molecular Ultravioleta-Visible	29
3.2.4 Ley de Lambert y Beer	30
3.2.5 Limitaciones de la Ley de Lambert y Beer	31
3.2.6 Instrumentación utilizada en la espectrofotometría UV-Visible	34
3.2.7 Aplicaciones de la espectrofotometría UV-Visible	36
3.2.8 Espectrofotómetro Hach DR 2700	37
3.2.9 Principio del método	38
3.3 Validación de métodos analíticos	39
3.3.1 Ventajas de la validación de un proceso analítico	40
3.3.2 Razones por las cuales es necesario validar un método	40
3.3.3 Requisitos de la validación	40
3.3.4 Pasos de la validación	41
3.4 Protocolo de validación	41
3.5 Evaluación de los parámetros de desempeño del método	43
3.5.1 Linealidad	43
3.5.2 Exactitud	45
3.5.3 Precisión	46
3.5.4 Límites	47

3.5.5 Incertidumbre	48
3.6 Elaboración del informe de validación	49
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	51
4.1 Tipo de estudio	51
4.2 Investigación bibliográfica	51
4.3 Ámbito de aplicación	51
4.4 Parte experimental	52
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	65
5.1 Protocolo de validación	65
5.2 Evaluación de los parámetros de desempeño del método	74
5.3 Informe de validación	86
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	98
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	100
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Pág. N°
1. Propiedades del Cromo Trivalente y Hexavalente	26
2. Objetivos de la validación según el tipo de procedimiento de Ensayos	43
3. Parámetros a Validar para métodos Normalizados	44
4. Protocolo de validación del método 1,5-Difenilcarbohidrazida	66
5. Informe de validación del método 1,5-Difenilcarbohidrazida	87

INDICE DE FIGURAS

Figuras N°	Pág. N°
1. Espectro Electromagnético.	30
2. Desviaciones a la ley de Beer.	33
3. Ejemplos de interferencias instrumentales en la ley de Beer debido a los efectos de la muestra y las celdas	34
4. Esquema de un fotómetro de haz simple Hach DR2700	37
5. Partes del equipo espectrofotométrico HACH DR2700	38
6. Reacción de 1,5-Difenilcarbazona con Cromo Hexavalente	39
7. Gráfico de curva de calibración de verificación de rango de trabajo	76
8. Curva de calibración en la determinación de Cromo Hexavalente	77
9. Análisis residual de la linealidad	80
10. Contribución de incertidumbres en la medición	86

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Tabla de calibración para la determinación de Cromo Hexavalente	55
2. Análisis de varianza de la regresión lineal	58
3. Datos para el análisis de varianza- modelo matemático	61
4. Análisis de varianza de la precisión intermedia	61
5. Resumen estadísticos de Linealidad	78
6. Análisis de varianza de la regresión lineal	79
7. Resultados estadísticos del parámetro de exactitud	80
8. Resultados estadísticos del parámetro de precisión	82
9. Análisis de varianza de la precisión intermedia	82
10. Resumen estadísticos de límites	83
11. Resultados de límites de detección y de cuantificación	84

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Espectrofotómetro HACH DR 2700
2. Esquema del equipo HACH DR 2700
3. Fotografías de realización de la validación
4. Materiales, equipo y reactivos
5. Requerimientos de la guía de validación de métodos analíticos (osa) para establecer un protocolo
6. Cascada de dilución del estándar de referencia
7. Esquema de verificación de rango de trabajo del kit mediante curva de calibración
8. Guía para considerar los niveles del intervalo lineal
9. Esquema de linealidad del método
10. Formulas y formatos de tabla para el parámetro de linealidad.
11. Distribución t-Student
12. Distribución F de Fisher al 95%
13. Esquema de preparación de la exactitud del método
14. Formulas y formatos de tabla para el parámetro de exactitud del método.
15. Esquema de dilución para la precisión del método
16. Formulas y formatos de tabla para el parámetro de precisión del método
17. Esquema de preparación de límites
18. Formulas y formatos de tabla para el parámetro de límites
19. Proceso de estimación de incertidumbre guía CG 4 Eurachem / CITAC
20. Formulas y formatos de tabla para el parámetro de estimación de la incertidumbre
21. Requerimientos de la guía de validación de métodos analíticos (osa) para establecer un informe
22. Resultados obtenidos en la evaluación de parámetros de desempeño analítico de linealidad (verificación del rango de trabajo), exactitud, precisión, límites e incertidumbre
23. Cálculos para análisis de resultados de los parámetros de desempeño analítico de linealidad, exactitud, precisión, límites e incertidumbre
24. Incertidumbre del estándar de referencia certificado (ERC)

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

3.3	Tres veces la desviación estándar del blanco
10	Diez veces la desviación estándar del blanco.
Σ	Sumatoria.
Σy	Sumatoria de datos obtenidos de los ensayos
a	Ocasiones
A1	Analista 1
A ₁ , A ₂ ...	Número de ocasiones
A2	Analista 2
AOAC	Association of Analytical Chemists
APHA	American Public Health Association
	American Section of the International Association for Testing
ASTM	Materials
b	Sesgo
b%	Error relativo porcentual
b ₀	Ordenada al origen
b ₁	Pendiente
C	Grados Celsius
C	Concentración
CM _{ai}	Cuadrados medios de las ocasiones
CM _{ej}	Cuadrados medios del error
CM _{err}	Cuadrados medios del error
CM _{reg}	Cuadrados medios de la regresión
CMT	Cuadrados medios total
Conc _{dilu} ERC	Concentración del estándar de referencia diluido
Conc _{ERC}	Concentración del estándar de referencia
CV	Coefficiente de variación o desviación relativa estándar
CV _{y/x}	Coefficiente de variación de regresión
F _{calc}	F calculado
FD	Factor de disolución
gl	Grados de libertad
IC _(μ)	Intervalo de confianza de la media
IC _(β₀)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC _(β₁)	Intervalo de confianza para la pendiente
ILAC	Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios
ISO	International Organization for Standardization
j	repeticiones
K	Factor de Cobertura
Kg	Kilogramo
L	Litro
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
mg	Miligramo

mL	Mililitro
MRC	Material de Referencia Certificado
mx	Muestra
n	Número de mediciones, recobros, blancos, muestras o determinaciones
nm	Nanómetro
NSO	Norma Salvadoreña Obligatoria
OSA	Organismo Salvadoreño de Acreditación
ppm	Partes por millón (equivalente a mg/L o µg/mL)
r	repeticiones totales
R%	Recuperación aparente.
r ²	Coefficiente de determinación
S	Desviación estándar
S _{Y/X}	Desviación Estándar de Regresión.
S ₂	Varianza
S _b	Desviación estándar de los blancos
S _{b0}	Desviación estándar de la ordenada al origen
S _{b1}	Desviación estándar de la pendiente
SC _{ai}	Suma de cuadrados de las ocasiones
SC _{ej}	Suma de cuadrados del error
SC _{erg}	Suma de cuadrados de la regresión
SC _{err}	Suma de cuadrados del error
SCT	Suma de cuadrados total
SI	Sistema Internacional
st	Estándar
sxx	Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas
T	Temperatura
U	Incertidumbre
U _{CALIB}	Incertidumbre de calibración
U _{combinada}	Incertidumbre combinada
U _{diluERC}	Incertidumbre del estándar de referencia certificado diluido
U _{ERC}	Incertidumbre del Estándar de referencia certificado
UES	Universidad de El Salvador
U _{fd1}	Incertidumbre de factor de disolución
UREP	Incertidumbre de repetibilidad
U _{rep.B10}	Incertidumbre de repetibilidad Bureta 10 mL
U _{rep.MX}	Incertidumbre por repetibilidad de la muestra
U _{rep.P10}	Incertidumbre de repetibilidad Pipeta 10 mL
U _{rep.V50}	Incertidumbre de repetibilidad frasco volumétrico 50 mL
U _{TEMP}	Incertidumbre de variación por temperatura
U _V	Incertidumbre de volumen
UV-Vis	Ultravioleta visible
V	Volumen

V_1	Volumen de aforo
V_2	Volumen de alícuota
X	Media aritmética de x
X_{ref}	Valor de referencia
y	Media aritmética de y
$[Cr^{6+}]$	Concentración encontrada experimentalmente
β	Concentración en mg/L que se mide en el instrumento
T_{20}	Temperatura de referencia
$CO_{exp_{termica}}$	Coficiente de expansión térmica $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$
$[]_{Cr^{6+}}$	Concentración de masa obtenida de la medición para una muestra
$[]_{Cr^{6+}}$	incertidumbre debida a la reproducibilidad obtenida a partir de la medición de n muestras
ε	Error

RESUMEN

La validación de métodos analíticos dentro del laboratorio de análisis fisicoquímico de agua para consumo humano, es un aspecto importante para el cumplimiento del marco regulatorio. Validar el método de la 1,5-Difenilcarbohidrazida por espectrofotometría visible garantiza la integridad de los datos recolectados y las buenas prácticas. El método utilizado es oficial fue adoptado por Hach Company como el método N° 8023, el reactivo es conocido como ChromaVer® 3 y reacciona con el Cromo Hexavalente formando un complejo colorimétrico que es proporcional a su concentración, obteniendo resultados que fueron sometidos a un análisis estadístico.

El desarrollo analítico se realizó de acuerdo a las especificaciones establecidas en la Guía de Validación del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA). El método es Normalizado por lo que los parámetros de desempeño que fueron estudiados son linealidad, exactitud, precisión, límites e incertidumbre. Una parte implícita en la linealidad fue la verificación del rango de trabajo, el cual al demostrar una tendencia lineal evidencia que cumple los requisitos y es apto para su uso en toda la validación. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador desde febrero del 2020 hasta octubre del 2022.

Los resultados fueron evaluados de acuerdo a criterios mostrando que la linealidad presenta un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.9999$, además con el enfoque hipotético y análisis de varianza se acepta que el modelo es lineal, la exactitud en cuanto a los datos obtenidos fueron lo más parecidos al valor de referencia presentando una \bar{X} de 0.9814, el CV de la precisión en términos de repetibilidad es del 0.1%, estando por debajo del criterio del 5% y en el caso de la precisión intermedia en el análisis de varianza entre los dos grupos, $F_{\text{calculado}}$ es menor que F_{tabla} ($0.36 < 4.41$) por lo que no existe una diferencia entre ambas variables, en cuanto la medición de límites la cuantificación será hasta una concentración de 0.007 mg/L y la detección hasta 0.002 mg/L, mientras la incertidumbre de todas la mediciones realizadas queda representada por 0.0088 mg/L considerando un factor de cobertura $k=2$. El método validado cumple en todos los parámetros demostrando obtener integridad, confiabilidad y seguridad de los resultados, pero a su vez es recomendable establecer su periodo de valides y asegurar que el método siga cumpliendo con el propósito definido.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION.

El Cromo Hexavalente es el segundo metal más común y tóxico en las fuentes de agua, por lo que se considera peligroso para el medio ambiente y la salud humana. Entre sus propiedades, resalta la anti-degradación que facilita su bioacumulación provocando que se precipite con facilidad en capas superficiales del suelo y cuerpos de agua.

Con el uso creciente de Cromo Hexavalente en materiales utilizados en las industrias del cuero, pintura y textil, la exposición humana a este metal es posible a través de la inhalación, los alimentos y el agua potable, lo que presenta un riesgo potencial. Algunos de los problemas de salud que puede causar incluyen reacciones alérgicas, erupciones - cutáneas, - irritación, hemorragias nasales, indigestión, úlceras, cáncer de pulmón e incluso la muerte. En cuanto a su impacto ambiental, en altas concentraciones el Cromo Hexavalente se acumula en plantas aumentando la probabilidad de plagas y provocando en animales severos efectos negativos como enfermedades, defectos de nacimiento, infertilidad y formación de tumores. En este sentido, de acuerdo al Reglamento Técnico Salvadoreño RTS 13.02.01:14 Agua. Agua de consumo humano. Requisitos de calidad e inocuidad. Se establece que el límite máximo permisible para agua de consumo humano del metal Cromo es de 0.05 mg/mL.

La importancia de realizar la validación radica en dos puntos importantes, primero es adaptar el método a las condiciones del laboratorio en términos de uso de materiales y equipos, y segundo, asegurar los resultados, pues en la actualidad la aplicación de estos métodos ha incrementado convirtiéndose en una necesidad.

El laboratorio de aguas cuenta con la certificación para realizar este tipo de análisis, pero es preciso ir implementando cada vez más metodologías que demuestren que los métodos con los que se cuentan tienen las características de funcionamiento adecuados a los requerimientos normativos para su aplicación.

En vista de seguir aumentando métodos que cumplan estos requisitos de se ha validado el método para la determinación del contenido de Cromo Hexavalente en una matriz de agua potable del sistema del alcantarillado público que abastece a la Universidad de El Salvador en San Salvador.

El estudio se realizó espectrofotométricamente utilizando el reactivo ChromaVer 3 de Hach, método N° 8023, edición 1, este es aceptado por U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) y adaptado por Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater como 3500 Cr B.

El tipo de validación es prospectiva para métodos normalizados, las características y criterios de desempeño se establecieron de acuerdo con los lineamientos de la guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA); en un periodo de estudio que abarcó de febrero 2020 a octubre de 2022 en el Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, obteniendo resultados que demostraron mediante las pruebas y su respectivo estadístico la capacidad, confiabilidad, reproducibilidad, optimización y estandarización del método, por lo que, puede utilizarse en dicho laboratorio para el propósito previsto.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el método de 1,5-Difenilcarbohidrazida para la determinación de Cromo Hexavalente en agua de consumo humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1** Realizar el protocolo de validación correspondiente al método de 1,5-Difenilcarbohidrazida para la determinación de Cromo Hexavalente en el rango de 0.010 a 0.700 mg/L Cr⁶⁺.
- 2.2.2** Evaluar los parámetros de desempeño (linealidad, exactitud, precisión, límites e incertidumbre) para el método de la 1,5-Difenilcarbohidrazida para la determinación de Cromo Hexavalente.
- 2.2.3** Analizar los resultados de cada parámetro mediante tratamiento estadístico para determinar el cumplimiento de los criterios de aceptación y la capacidad del método en el análisis de muestras de agua de consumo humano.
- 2.2.4** Realizar el informe de la validación del método de 1,5-Difenilcarbohidrazida para la determinación de Cromo Hexavalente.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 El agua. ⁽¹⁾

El agua es un compuesto con propiedades únicas de gran importancia para la vida, la naturaleza y el determinante exclusivo de los procesos físicos, químicos y biológicos que gobiernan el medio natural. Es una molécula sencilla por átomos pequeños, dos de hidrogeno y uno de oxígeno, unidos por enlaces covalentes muy fuertes que hacen que la molécula sea muy estable.

El agua es el elemento más importante de la vida y el desarrollo de todos los seres vivos, pero, la escasez de agua dulce a nivel mundial es un tema que debería tratarse como prioridad, debido a que en relación con la cantidad total de agua en el planeta: sólo un 3%, del cual menos del 1% es accesible para el consumo humano, el resto se encuentra congelada en los glaciares o a grandes profundidades.

Esta limitante con respecto al agua dulce lleva a una preocupación mayor, el agua potable o agua apta para el consumo humano, que, según un estudio de la Organización de las Naciones Unidas, de los 6,250 millones de habitantes solamente 5,150 millones de habitantes tienen acceso, es decir que existen 1,100 millones que carecen de este vital líquido.

En El Salvador, así como en otras partes del mundo, las principales razones por las que esta situación se agrava son: el derroche indiscriminado de agua potable y la falta de herramientas educativas para crear conciencia sobre el uso adecuado y su conservación.

3.1.1 Propiedades fisicoquímicas del agua. ⁽¹⁾

El agua es un elemento del que dependen todos, están vital que, desde un criterio fisicoquímico, sus temperaturas de transformación de un estado a otro han sido tomadas como puntos fijos de referencia, a pesar de que su punto de congelación (0°C) y ebullición (100°C), sean anormales debido a las asociaciones moleculares.

A temperatura ambiente, el agua es incolora, inodora, e insípida y en grandes volúmenes posee una tonalidad azul debido a la refracción de la luz al atravesarla.

La densidad del agua es casi igual a la unidad (0.9999 g/mL a 20°C), su tensión superficial varía con la temperatura, disminuyendo desde 75.5 dinas/cm a 0°C hasta un valor nulo en el punto crítico (aquél en el coexisten los tres estados físicos de la sustancia), así como los gases disueltos y con la presencia de otras sustancias presentes en el agua. El valor del pH de aguas superficiales está entre 6.00 - 8.50, siendo las aguas subterráneas más ácidas que las superficiales.

Teniendo una alta capacidad calorífica con un mínimo de 34-35°C, actúa como bomba de calor en la regulación del clima de la tierra, es así como los océanos actúan como termostatos realizando un tránsito reversible de energía, desde las aguas cálidas hacia las zonas frías. El agua posee una alta reactividad que se pone en manifiesto en su poder de disolución de materiales. Un proceso de disolución implica el cambio en propiedades físicas y químicas de la disolución ya constituida, con respecto tanto al soluto como el propio disolvente.

La temperatura del agua se establece por la absorción de radiación en las capas superiores del líquido. Las variaciones de la temperatura afectan a la solubilidad de sales y gases en agua, y en general a todas sus propiedades, tanto físicas como microbiológicas. La conductividad es producida por los electrolitos disueltos en agua y en ella influye: terrenos drenados, composición mineralógica, tiempo de contacto, gases disueltos, pH, y todo lo que afecte a la solubilidad de las sales. El agua a temperatura ambiente, es incolora, inodora, e insípida y en grandes volúmenes posee una tonalidad azul debido a la refracción de la luz al atravesarla.

3.1.2 Contaminación del agua. ⁽¹⁾

La Organización Mundial de la Salud define la contaminación del agua de la siguiente manera: “Debe considerarse que el agua está contaminada cuando su composición o su estado están alterados de tal modo que ya no reúnen las condiciones a una u otra o al conjunto de utilidades a las que se hubiera destinado en su estado natural. En otras palabras, es cualquier cambio químico, físico o biológico en la calidad del agua que tiene un efecto dañino en todos los organismos que vivan o la consuman. Por lo tanto, se considera que una persona puede experimentar graves problemas de salud cuando bebe agua contaminada.

Existen varios tipos de agentes contaminantes del agua, siendo los primeros los patógenos. Estos incluyen: bacterias, virus, protozoos y los parásitos que ingresan desde los sistemas de aguas residuales y las aguas residuales sin tratar al alcantarillado de distribución.

El segundo tipo de contaminantes del agua son los que consumen oxígeno y se dividen en: nitratos, fosfatos y bacterias; los primeros son considerados nutrientes solubles, pero en una concentración constante en el agua promueven el crecimiento de algas, que inicialmente pueden ser una forma de vida acuática, pero si crecen en exceso, serían peligrosas debido a la demanda de oxígeno que pueden necesitar; por otro lado, las bacterias descomponen los desechos, por lo que requieren grandes cantidades de oxígeno para absorber causando desabastecimiento hasta el punto en que otras formas de vida acuática mueren.

El tercer grupo de contaminantes del agua son los agentes contaminantes inorgánicos disueltos, como ácidos, sales y metales tóxicos. Grandes cantidades de estos compuestos harán que el agua deje de ser categorizada como potable y provocar además la muerte de la vida acuática.

3.1.3 Contaminación del agua con metales pesados. ⁽¹⁾

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre, no pueden ser degradados o destruidos, algunos metales pesados (por ejemplo, cobre, selenio, zinc) son esenciales para mantener el metabolismo del cuerpo humano. Sin embargo, a concentraciones más altas pueden conducir a la intoxicación. Metal pesado se refiere a cualquier elemento químico metálico que tiene una densidad relativamente alta y es tóxico o venenoso en concentraciones bajas. El envenenamiento por metales pesados podría resultar, por ejemplo, de la contaminación del agua de consumo (tuberías de plomo), las concentraciones en el aire por estar cerca de las fuentes de emisión, o la ingesta a través de la cadena alimentaria.

3.1.4 Contaminación del agua potable con Cromo Hexavalente. ^(2,3)

El Cromo Hexavalente es un metal de importante uso industrial en diversos productos y diferentes procesos; suele encontrarse en dos estados estructurales distintos y muy estables, el Cromo III o Trivalente y Cromo VI o Hexavalente, pero es el Cromo en su estado de oxidación +6 considerado el más peligroso incluso en pequeñas cantidades. El cuadro N° 1 resume algunas de las propiedades por la cual se diferencian según su estructura.

Las fuentes importantes de contaminación por Cromo Hexavalente son las relacionadas con el ambiente ocupacional, las cuales han incrementado considerablemente con el aumento del desarrollo industrial, entre las principales actividades relacionadas con la contaminación se pueden mencionar la minería y la industria.

En la industria, el Cromo Hexavalente se utiliza principalmente en el revestimiento de metales (cromados) con fines estéticos, para decoración y para cambios de color de distintos materiales. Además, este elemento es un importante agente en los procesos de curtido de pieles y tratamiento de maderas. Otras industrias que aumentan el riesgo de contaminación por Cromo Hexavalente se pueden mencionar las del cemento, colorantes, construcción, curtidurías, metalurgia, pinturas (anticorrosivas) y material fotográfico.

Cuadro N° 1. Propiedades del Cromo Trivalente y Hexavalente. ⁽⁴⁾

CARACTERÍSTICA	CROMO TRIVALENTE	CROMO HEXAVALENTE
Color	Verde	Naranja
Muta génico	No	Si
Carcinogénico	No	Si
Considerado residuo peligroso (EE.UU.)	No	Si
Considerado residuo peligroso (Europa)	No	Si
Poder Curtiente	Si	No
Elemento esencial para el metabolismo de seres humanos	Si	No
Presente en alimentos	Si: Carnes rojas, pollo, lentejas, nueces, yema de huevo, etc.	No
Transformación natural	No, es muy estable	No

3.1.4.1 Efectos del Cromo Hexavalente sobre la salud. ⁽⁴⁾

Las personas pueden estar expuestas al Cromo Hexavalente o con compuestos del metal a través de la inhalación, los alimentos o bebidas y a través del contacto directo de la piel. La mayoría de las personas consumen alimentos que contienen Cromo III, la vía principal de ingerir Cromo trivalente, ocurre de forma natural a través de vegetales, frutas, carnes, levaduras y cereales.

El Cromo en estado de oxidación +3 es un nutriente esencial para el ser humano y su deficiencia puede causar enfermedades cardíacas y algunos trastornos metabólicos como la diabetes. Pero incluso ingerir demasiado Cromo III puede causar efectos en la salud, como erupciones en la piel, por lo que, aunque este sea esencial debe consumirse en condiciones moderadas.

El contenido de Cromo puede variar debido a las diferentes formas de cocinar y almacenar los alimentos, por ejemplo, cuando se almacenan en latas o frascos de acero, las concentraciones de Cromo pueden aumentar e incluso cambiar su estado de oxidación lo que puede tener un efecto marcado en la salud. Por otro lado, el agua potable que es tan esencial para la vida debería no contener o contener Cromo Hexavalente que este dentro de los límites permisibles, por lo que es necesario tener en cuenta que si una fuente puede estar contaminada sería un acto imprescindible verificar la ausencia del peligroso Cromo (VI).

El Cromo (VI) representa un eminente riesgo para la salud humana, especialmente para quienes trabajan en la industria siderúrgica y textil, el problema es conocido ya que causa varios efectos sobre la salud. Puede causar reacciones alérgicas como erupción cutánea en contacto con la piel, al ser inhalado puede producir irritación nasal y sangrado.

Otros problemas de salud a causa del Cromo (VI) o hexavalente son:

- 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
- Muerte

3.1.4.2 Efectos del Cromo Hexavalente sobre el ambiente

Una fuente de agua se considera contaminado o polucionado, cuando la composición o el estado de sus aguas son directa o indirectamente modificadas por la actividad del hombre, en una medida tal, que disminuye la facilidad de utilización para todos aquellos fines, o algunos de ellos, a los que podrían servir en estado natural. ⁽⁴⁾

El Cromo Hexavalente también puede liberarse al medio ambiente durante la combustión de gas natural, petróleo crudo o carbón, la descarga de aguas urbanas e industriales y por la contaminación de los recursos agrícolas y ganaderos, al no permanecer ni formar parte de la atmósfera se deposita en el suelo y el agua cambiando de una forma a otra, dependiendo de las condiciones presentes causando que los canales superficiales y cuerpos de agua se contaminen hasta el punto de ser insuficientes los procesos de auto depuración de los mismos. ⁽⁴⁾

En el Salvador existen entidades reguladoras encargadas de controlar sectores o industrias que ofrecen servicios básicos para los ciudadanos y exigir su cumplimiento, dentro de ellas podemos mencionar la Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:08 Agua. Agua potable ⁽⁵⁾ y el Reglamento Técnico Salvadoreño RTS 13.02.01:14 Agua. Agua de Consumo Humano. Requisitos de Calidad e Inocuidad. ⁽⁶⁾

Dentro de sus requisitos de límites permisibles de calidad físico químicos para sustancias químicas de tipo inorgánico de alto riesgo para la salud y para agua de consumo, establece que el metal Cromo Hexavalente puede estar presente en un máximo de 0,05 mg/L, además incorpora que, para efecto de control de calidad por parte del administrador de agua, se aceptaran:

- Análisis realizados en el Laboratorio Nacional de Referencia o Laboratorios acreditados que cuenten con la certificación para el análisis a realizar, también
- Debe realizarse un análisis con una frecuencia de cada año (intermedio) y cada tres años (completo) para determinar el parámetro del sistema, debido a que la presencia de esta sustancia toxica es un peligro latente para la salud del ser humano. ^(5,6)

3.2 Principios de espectroscopia. ^(7, 8)

Los espectrofotómetros UV-VIS son instrumentos de laboratorio utilizados para análisis cualitativos y cuantitativos de compuestos químicos, estas técnicas de análisis tienen gran importancia para los diferentes sectores de la industria, estas industrias son: química, farmacéutica, entre muchas otras.

Una de las principales utilidades del espectrofotómetro es que tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática (de una longitud de onda particular) a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. Como también la relación de la intensidad del color en una muestra y su relación a la cantidad de soluto dentro de la misma.

3.2.1 Espectrofotometría UV-Visible. ⁽⁸⁾

La espectrofotometría UV-Visible se basa en la medición de propiedades ópticas que derivan de la interacción de la radiación electromagnética con la materia como la absorción y emisión de luz (así como la luminiscencia), entendiéndose como luz aquella porción del espectro electromagnético que se maneja con espejos y lentes, es decir las regiones ultravioleta y visible.

Estos métodos se desarrollaron rápidamente a partir de la segunda mitad del siglo 20 debido a la imperiosa necesidad de incrementar características como sensibilidad, selectividad, límite de detección, así como la rapidez y a capacidad de automatización para el análisis de gran cantidad de muestras en tiempo razonable. Un ejemplo lo da el control del ambiente que ha forzado a niveles extremos el desarrollo de nuevas técnicas y métodos capaces de analizar nuevos analitos que están presentes en diversas matrices en muy pequeñas cantidades con pocos o ningún problema de interferencia en el análisis.

Estos métodos son de una relativa facilidad de aplicación y ejecución sin embargo requieren de cuidados especiales en la forma de operar para garantizar la precisión y exactitud deseada.

3.2.2 Absorción de luz por las moléculas. ⁽⁸⁾

Toda molécula, tanto en fase gaseosa como en solución, posee una energía cuántica interna (E_{int}) compuesta por las energías electrónica (E_e), vibracional (E_{vib}) y rotacional (E_{rot}) y la misma se puede representar como:

$$E_{int} = E_e + E_{vib} + E_{rot}$$

Según la teoría cuántica, en una molécula estas energías son independientes entre sí y están cuantizadas, es decir que pueden tomar sólo ciertos y determinados valores “permitidos” por los perfiles energéticos de las mismas. Por otro lado, la misma teoría cuántica considera a la “luz” como un fenómeno de naturaleza dual (materia-onda), es decir que esta luz está compuesta por unas

partículas llamadas fotones que poseen energía definida por la frecuencia ν (o longitud de onda λ) de la onda asociada al fotón según la ley de Planck.

$$E = h\nu = h \times c/\lambda$$

De la expresión anterior donde h es la constante de Planck, ν es la frecuencia y c la velocidad de la luz se deduce que la energía del fotón varía inversamente proporcional con la longitud de onda λ . Esta cantidad de energía que posee el fotón es la que determinará si una especie química adsorberá la radiación de esa longitud de onda.

La región Visible del espectro (350 a 750nm) interactúa con los electrones de valencia de las moléculas modificando la energía electrónica y el contenido definido de energía de los fotones sienta las bases para la selectividad en el proceso de absorción.

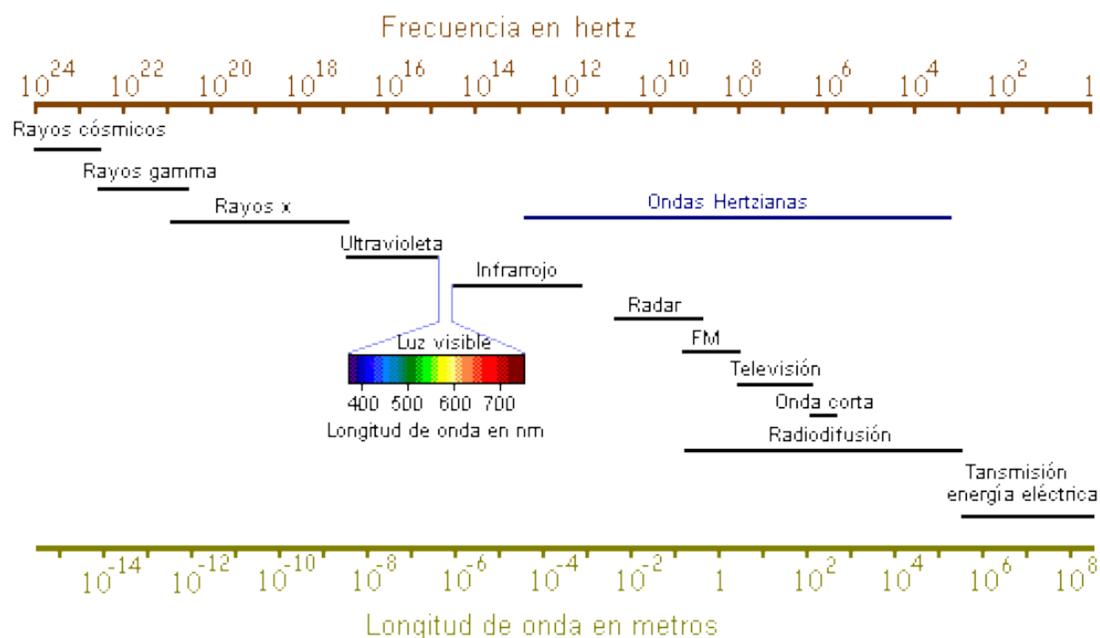


Figura N°1. Espectro Electromagnético. (9)

3.2.3 Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible. (7)

La espectrofotometría visible se basa en la absorción selectiva de radiación electromagnética en la región visible del espectro electromagnético por algunos medios químicos, de esta manera, a través de la medición de una propiedad

llamada Absorbancia, a determinada longitud de onda, es posible determinar la concentración de un analito dado si se compara con las absorbancias de soluciones patrón conocidas.

Con una apropiada preparación química se pueden analizar una gran variedad de analitos en diversas matrices. De esta manera, la absorbancia de las especies que poseen grupos “absorbentes” en sus moléculas, se pueden medir directamente y las que no son absorbentes, pueden hacerse reaccionar con un reactivo apropiado para formar una especie absorbente como por ejemplo un complejo coloreado.

3.2.4 Ley de Lambert y Beer. ⁽¹⁰⁾

La ley que rige los espectros cuantitativos de la absorción de luz es la ley de Lambert y Beer, la cual establece que, bajo ciertas condiciones experimentales fijas como longitud de onda de la radiación, camino óptico, temperatura entre otras, la Absorbancia de la especie química varía directamente con la concentración según la relación:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon_{\lambda} * b * C$$

Donde P_0 y P son las potencias lumínicas incidente y emergente del medio químico, $\epsilon_{(\lambda)}$ es el coeficiente de extinción molar, o absortividad molar, b es el trayecto óptico (cm) y C la concentración molar (M).

El coeficiente de extinción molar es una característica de la sustancia que depende en mayor grado de las posibilidades cuánticas de transición electrónica de la especie, de la sección transversal de la molécula, así como de la longitud de la onda y en menor grado de la concentración, solvente utilizado y de la temperatura.

Para una sección transversal molecular promedio de 10^{-15} cm² y una transición electrónica de alta probabilidad, el valor de $\epsilon_{(\lambda)}$ puede alcanzar un valor máximo del orden de 10^5 .

Siendo $\epsilon_{(\lambda)}$ una característica propia de la especie química que bajo ciertas condiciones experimentales permanece constante, al igual que el trayecto óptico, que por lo general es 1 cm, entonces la expresión de la ley se transforma en:

$$A = K * C$$

Donde:

A= absorbancia de la muestra

K= es una constante que depende de la longitud de onda usada, de la sustancia que se analiza y del espesor de la celda usada.

C= concentración de la muestra.

Esta ecuación indica que las condiciones experimentales están controladas y determinadas por K ; la cual representa la pendiente de la recta, la absorbancia se incrementa de manera proporcional con la concentración. Sin embargo, en las mediciones espectrofotométricas se requiere el uso de blancos (a = absorbancias de reactivos y solventes, otras interacciones) que se reflejan en un corte “a” del eje de la absorbancia, y, con lo que la ecuación se transforma en:

$$A = a + (K * C)$$

Esta ecuación representa la recta de calibración realizada a partir de patrones de concentración conocida y la misma debe ser calculada a partir del método de los mínimos cuadrados con el que se obtiene la ecuación de la recta más probable que pasa por los puntos determinados. De la misma se obtiene la concentración del analito por la expresión:

$$C = (A - a) / K$$

En el que C es la concentración de la muestra, A absorbancia de la muestra, a absorbancias de reactivos y solventes, otras interacciones y K es una constante que depende de la longitud de onda usada, de la sustancia que se analiza y del espesor de la celda usada

3.2.5 Limitaciones de la Ley de Lambert y Beer. ⁽⁷⁾

La ley de Lambert y Beer es una ley límite la cual exige condiciones casi ideales, particularmente en lo que concierne a la monocromaticidad de la radiación utilizada, los niveles de concentración inferiores a 0.01M y donde no debe haber ningún fenómeno distinto al fenómeno de absorción de luz con la sustancia a medir, en la Figura N°. 2 se ejemplifican estas desviaciones.

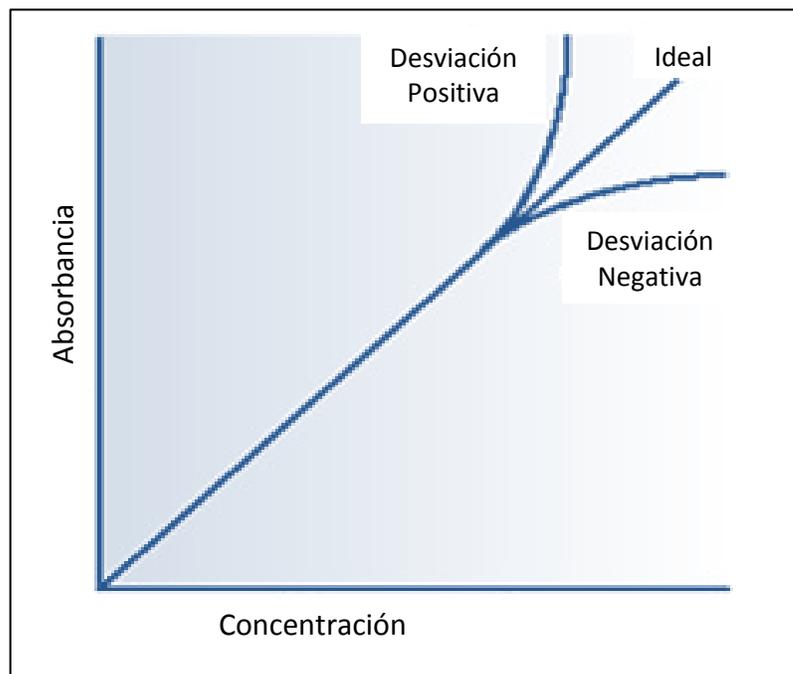


Figura N° 2. Desviaciones a la ley de Beer. ⁽¹¹⁾

Esta ley se ve alterada cuando ocurren algunos errores en el análisis al utilizar esta técnica, esto se conoce como desviaciones de la ley de Lambert – Beer y estas desviaciones pueden ocurrir debido a:

- **Limitaciones fundamentales:** Es una ley limitante solo para concentraciones bajas de analitos menores de 0.01M. A concentraciones muy altas las especies absorbentes pierden su independencia, esto es al aproximarse demasiado las moléculas interaccionan entre sí provocando que cambien sus propiedades eléctricas.
- **Interferencias químicas:** La cuales se producen como consecuencia de la asociación, disociación o reacción de las especies de interés, estas presentan una dependencia fundamentalmente del pH de la solución, de la cantidad de concentración del complejante y del Buffer, en fin, todos los factores que pudieran afectar el equilibrio de la reacción.
- **Interferencias espectrales:** la cual es debido a la radiación no monocromática, es decir no se emite una sola longitud de onda, para que se cumpla debe existir un solo coeficiente de absorptividad en el intervalo de $\lambda \pm \Delta\lambda$.

- **Interferencias instrumentales:** provocado por errores de lectura que siempre se producen, pero se hacen más graves a valores pequeños o muy grandes de absorbancias. También es provocada por la radiación parásita la cual es aquella que llega al detector y no procede de la muestra, esta se agrava más a valores altos de absorbancias y es provocada por polvos, por reflexiones o por defectos del sistema óptico.

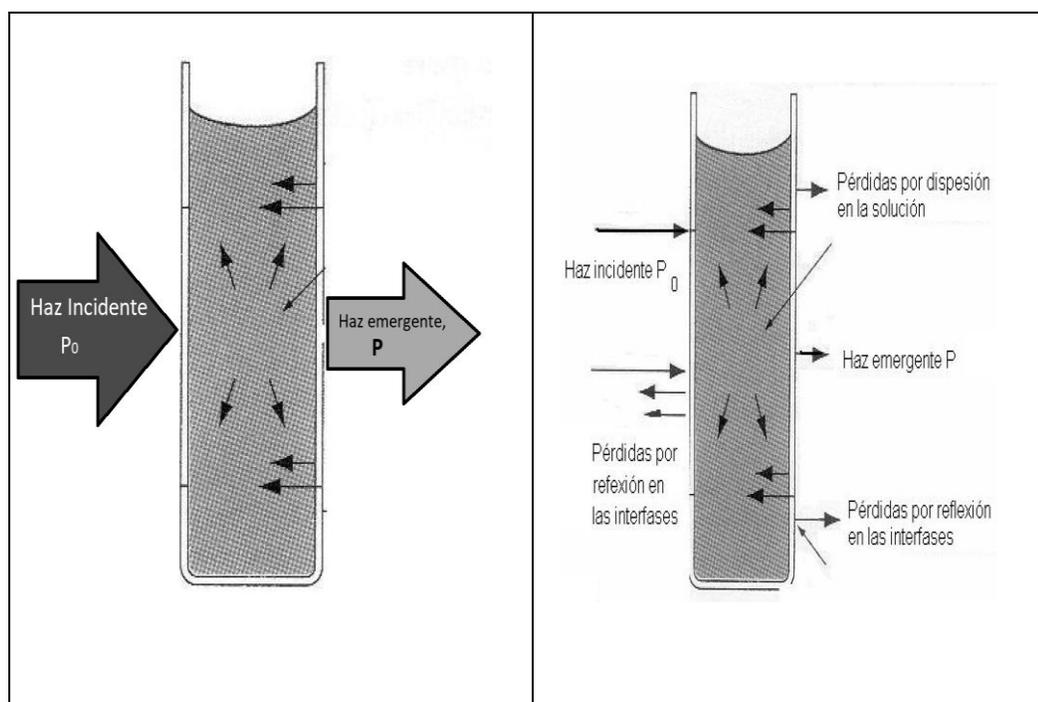


Figura N° 3. Ejemplos de interferencias instrumentales en la ley de Beer debido a los efectos de la muestra y las celdas. (7)

La presencia de cualquiera de estas interferencias provocaría automáticamente un error en el análisis que se realice, de ahí la importancia de minimizar cualquier tipo de interferencia.

La condición de monocromaticidad es difícil de realizar experimentalmente y lo que se logra es aislar un rango de longitudes de onda, el cual debe ser entonces lo más estrecho posible y las mejores condiciones de medición se obtienen cuando esta se realiza en el máximo de la curva.

Fuera de estas condiciones exigidas por la ley de Beer se producen desviaciones de la linealidad las cuales pueden ser positivas o negativas.

3.2.6 Instrumentación utilizada en la espectrofotometría UV-Visible. ⁽⁷⁾

Los instrumentos utilizados en la espectrofotometría UV-Visible son los fotómetros y espectrofotómetros, los cuales están formados por distintos componentes: una fuente de radiación (fuente fotónica), un sistema óptico de lentes y espejos para la colimación y dirección del haz luminoso, un dispositivo seleccionador de la longitud de onda (monocromador), un porta muestra (celda), el detector de la radiación (detector fotónico) y procesador de la señal.

Finalmente, la señal procesada se puede presentar de manera digital en una pantalla o display. En la Figura N° 4 se muestra un esquema general de un sistema espectrofotométrico.

A. La fuente fotónica continúa. ⁽⁷⁾

La fuente de radiación debe proporcionar una salida luminosa potente, constante y uniforme sobre una amplia región espectral. Las lámparas incandescentes como el filamento de wolframio-halógeno se usan para el caso del rango visible ($\lambda > 350 \text{ nm}$) mientras que para el rango ultravioleta ($190 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$) se utiliza una lámpara de deuterio o de hidrogeno.

Muchos espectrofotómetros están dotados de ambos tipos de lámparas a fin de cubrir todo el rango útil de la porción ultravioleta y visible del espectro.

B. El monocromador. ⁽⁷⁾

El monocromador es parte fundamental de un espectrofotómetro, su tarea es la de seleccionar un haz de radiación con un ancho de banda y potencia definidos. Este contiene diversos componentes como rendijas de entrada y salida (regulables o fijas), espejos colimadores y localizadores, además de un elemento dispersor, que puede ser un prisma o una red de difracción plana.

El prisma como elemento dispersor fue sustituido ya hace mucho tiempo por las redes de difracción planas ya que, para obtener buen poder de resolución, de captación de la luz y de dispersión se requiere de prismas grandes que puedan medir con precisión las líneas discretas en los espectros de emisión o las bandas de absorción.

C. Celdas y porta muestras. ⁽⁷⁾

Las celdas en el porta muestras son en general de base cuadrada de 1 cm de lado y paredes perfectamente paralelas y perpendiculares entre sí. Dos paredes funcionan como “las ventanas” y las mismas deben ser transparentes en el rango espectral de trabajo, para el rango visible son confeccionadas de vidrio o plástico y de cuarzo para el rango ultravioleta, pero existen celdas cilíndricas de 1 a varios centímetros de espesor.

Las celdas de medición pueden ser la causa de algunas interferencias físicas como dispersión de luz por ralladuras o absorción parcial del haz de luz por grasa o sucio en las paredes. Igualmente, el mal posicionamiento de las mismas impide que el haz de luz incida realmente perpendicular a la ventana de la celda, lo que hace $b \neq 1$ cm.

Algunos fotómetros están equipados con celdas redondas las cuales tienen la desventaja de que pueden quedar mal posicionadas con respecto al haz de luz y el camino óptico disminuye, con lo que la absorbancia medida también será menor.

Se pueden encontrar en el mercado gran diversidad de celdas para distintas aplicaciones como técnicas de flujo continuo, termostalizadas, celdas desmontables, celdas para gases, entre otras.

D. El detector fotónico y procesamiento de la señal. ⁽⁷⁾

El detector fotónica es un traductor óptico electrónico que convierte el impulso lumínico en un impulso eléctrico, cuya intensidad debe ser proporcional a la intensidad luminosa que incide sobre él, el mismo debe poseer alta sensibilidad, debe tener una respuesta lineal en un amplio rango espectral, producir una señal que se pueda amplificar y tener bajo nivel de ruido algunas de estas características pertenecen a los tubos fotoemisores

El detector fotónico más utilizado en los espectrofotómetros modernos es el tubo fotomultiplicador, aunque algunos están provistos con arreglo de diodos, son una combinación de un cátodo fotoemisor y una cadena interna de díodos multiplicadores de electrones. Sin embargo, el primero presenta mejores características de sensibilidad y rango lineal.

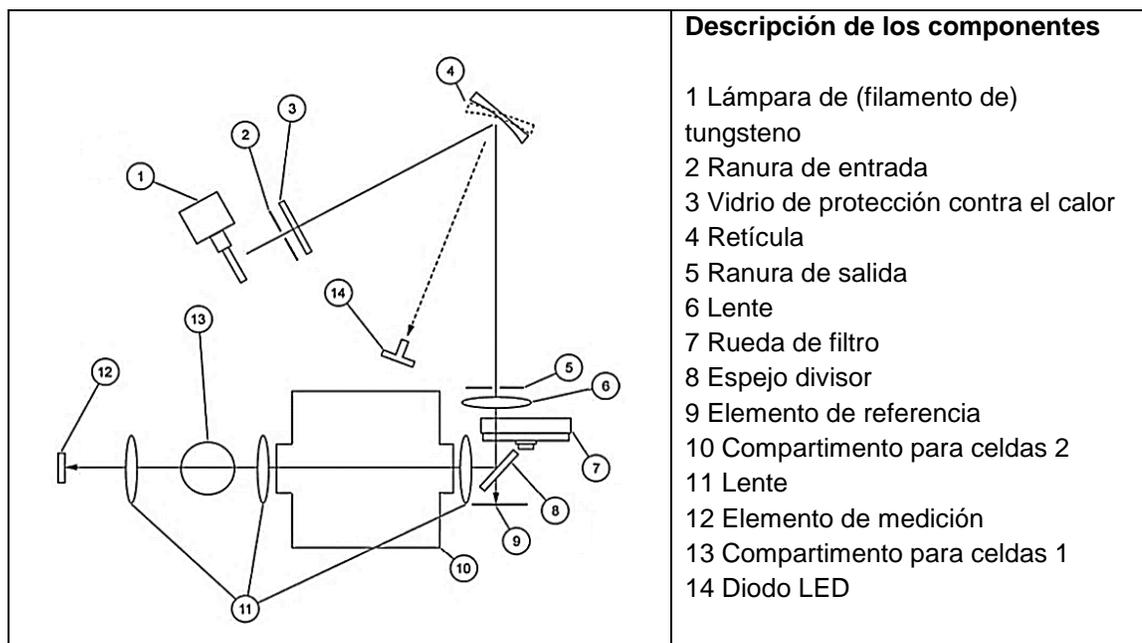


Figura N° 4. Esquema de un fotómetro de haz simple Hach DR2700. ⁽¹²⁾

La ventaja del espectrofotómetro multicanal, radica en la velocidad con que se pueden obtener los espectros en todo dominio espectral con respecto a los instrumentos secuenciales clásicos. Por último, la señal saliente del detector debe ser trabajada. El sistema de medida y procesamiento de los datos depende del tipo de instrumento, modo de operación, detector y la forma final que debería tomar la señal procesada. El procesamiento puede comprender diferentes transformaciones como amplificación, división de tensión, conversiones corriente-tensión o analógico-digital, operaciones matemáticas como integración, logaritmos y diferenciación.

3.2.7 Aplicaciones de la espectrofotometría UV-Visible. ⁽⁸⁾

La espectrofotometría UV-visible es una de las metodologías analíticas cuantitativas más utilizadas para la determinación de especies químicas, a nivel de trazas. Esto se debe a que muchas de estas especies, tanto orgánicas como inorgánicas, poseen características espectrales de absorción en esta región del espectro electromagnético. Las aplicaciones de esta metodología se encuentran en muchos campos y dominios de la actividad social y económica, procesos industriales, agricultura, medicina y ciencias de la salud, ingeniería ambiental, ciencia de los alimentos, ciencia de suelos, investigación básica y aplicada, entre otros.

Su uso permite la determinación cuantitativa de muchas sustancias químicas que pueden ir desde metales hasta fármacos y sustancias orgánicas de interés biológico, la realización de estudios cinéticos de reacciones lentas en solución, la determinación de curvas de titulación, por otro lado, la recopilación de espectros de absorción en bases de datos permite la identificación de sustancias y la determinación de su grado de pureza.

El análisis espectrofotométrico UV-Visible es aplicable al análisis de trazas que se encuentran a niveles de concentración entre 10^{-4} y 10^{-5} M, pudiéndose determinar inclusive trazas a niveles de hasta 10^{-7} M. Para determinaciones cuantitativas de calidad se requiere de instrumentos de calidad y mucha rigurosidad en el tratamiento de la muestra y los patrones.

3.2.8 Espectrofotómetro Hach DR 2700. ⁽¹²⁾

El espectrofotómetro está diseñado para trabajo en el laboratorio o análisis de campo en la determinación de múltiples analitos. El instrumento es capaz de medir más de 300 sustancias o características. Posee un rango de longitud de onda múltiple que va desde 400 a 900 nm, con una precisión de $\pm 1,5$ nm, resolución de 1 nm y ancho de banda máximo de 5 nm (ver Anexo N° 1 y 2).

Los modos de lectura incluyen transmitancia, absorbancia, y concentración.

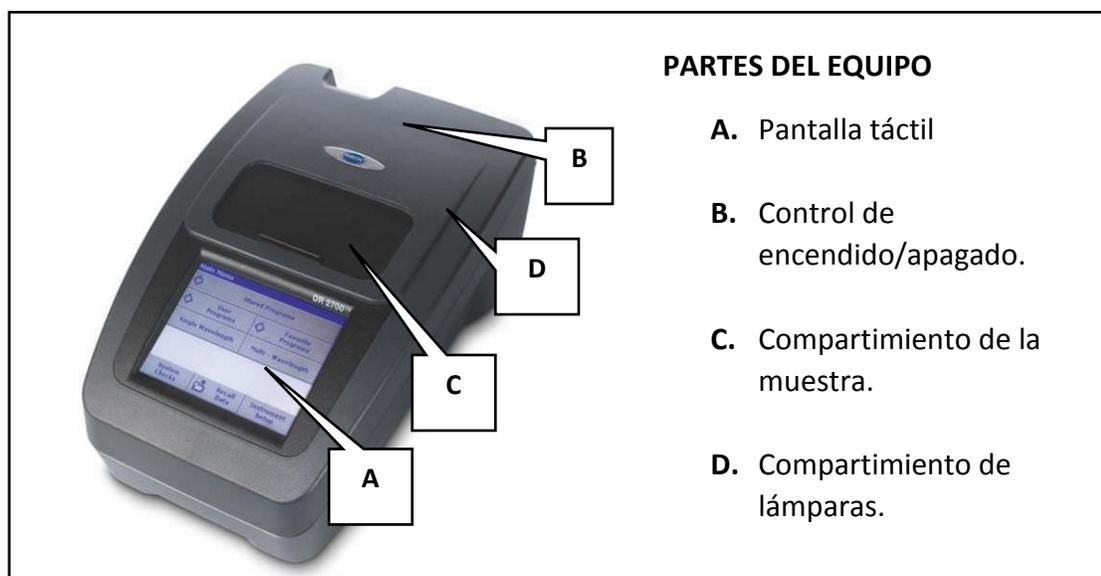


Figura N°5. Partes del equipo espectrofotométrico HACH DR2700. ⁽¹²⁾

3.2.9 Principio del método. (2,13,14)

El método para la determinación de Cromo Hexavalente, establece que el analito absorbe la máxima intensidad de luz en la región visible a una longitud de onda de 540 nm en el espectrofotómetro. Este método utiliza una formulación de polvo seco conocido como reactivo de Cromo (ChromaVer 3), que contiene un tampón ácido combinado con 1,5-Difenilcarbohidrazida y que reacciona en presencia de Cromo Hexavalente cambiando de incoloro a púrpura.

La transferencia de electrones entre las especies químicas provoca una reacción óxido reducción en la que el Cromo VI se reduce a Cromo III (ver Figura N°6) en solución ácida, produciendo un complejo cromóforo de color púrpura. La reacción es muy sensible y la capacidad de absorción molar basada en el Cromo es de aproximadamente 40,000 L/g.cm.

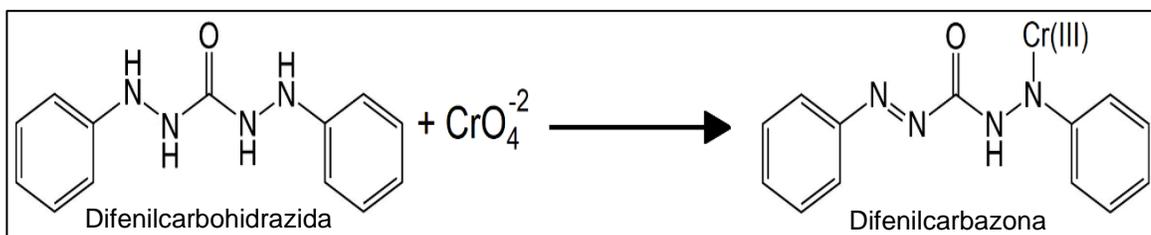


Figura N° 6. Reacción de 1,5-Difenilcarbazona con Cromo Hexavalente. (2)

La reacción con Difenilcarbohidrazida puede verse influenciada por una serie de elementos que pueden estar en estado de oxidación +6, por ejemplo, las sales Hexavalentes de Molibdeno y Mercurio reaccionarán con el reactivo para formar el complejo con el reactivo, pero la intensidad será mucho menor que la del Cromo al pH especificado.

Se pueden tolerar concentraciones de Mo o Hg de hasta 200 mg/L. El vanadio es una fuerte interferencia, pero las concentraciones de hasta 10 veces más altas que la del Cromo no causaran errores analíticos significativos.

El hierro en concentraciones superiores a 1 mg/L puede producir un color amarillo, pero el color del ion férrico (Fe^{3+}) no es fuerte y normalmente no se encuentra dificultad si la absorbancia se mide fotométricamente a la longitud de onda apropiada.

3.3 Validación de métodos analíticos. (15-17)

Los laboratorios del sector químico, industrial, farmacéutico y ambiental deben cumplir con los estándares establecidos por la organización que los controla o certifica y necesitan de la implementación de sistemas que puedan asegurar la calidad, con el propósito de lograr el más alto nivel de confiabilidad, tanto en términos de materiales, equipos y metodologías como en la calidad de los datos que se generan a partir de ellos. Uno de los factores claves que proveen calidad a los laboratorios es el empleo de métodos analíticos validados.

La validación de un método analítico es un proceso mediante el cual se demuestra por análisis de laboratorios que las capacidades del método cumple con los requisitos para la aplicación analítica prevista; es decir, es idóneo para un propósito, se define como la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos para un uso o aplicación específica, o como un proceso de verificación de que un método es adecuado para resolver un problema analítico en particular.

La validación incluye la identificación de fuentes de variabilidad y de error sistemático de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino también en el análisis de muestras reales.

En la práctica de laboratorio se utilizan diferentes tipos de validación: Validación Prospectiva, Validación Retrospectiva y Revalidación.

- **Validación prospectiva:** se aplica cuando se elabora un método analítico. Es típica de los laboratorios de investigaciones y desarrollo comprendidos en el estudio de todos los atributos analíticos necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método
- **Validación retrospectiva:** se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados. Suele efectuarse en los laboratorios de control.
- **Revalidación:** se emplea cuando un método analítico, previamente validado se ha introducido un cambio significativo. Los parámetros analíticos a estudiar se deciden en función del tipo de cambio efectuado.

3.3.1 Ventajas de la validación de un proceso analítico

Dentro de las ventajas que se pueden demostrar de una validación para un método analítico podemos mencionar:

- Comprobar que los métodos son adecuados para su uso.
- Proporcionar un conocimiento y entendimiento profundo del método analítico.
- Minimizar fallos y repeticiones, con lo que se ahorran costos asociados
- Cumplimiento con las exigencias legales (Regulatoria).
- Da seguridad y confianza en los resultados obtenidos de los análisis
- Desempeño profesional analítico con responsabilidad.

3.3.2 Razones por las cuales es necesario validar un método

Los laboratorios necesitan justificar el aseguramiento de la calidad que disponen y demostrar de que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables, como esta existen otras razones en las que es necesario validar tales como:

- Se valida cuando se ha desarrollado un nuevo método analítico.
- Cuando un método ya ha sido revisado, pero se requiere incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema
- Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico.
- Cuando control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.

3.3.3 Requisitos de la validación

Para llevar a cabo la validación de un método y que su aplicación analítica sea la prevista debemos tomar en cuenta lo siguiente:

- Cumplir con buenas prácticas de laboratorio.
- Adecuación de los instrumentos, lo cual requiere de su respectiva calificación y calibración (la evidencia de toda calibración está plasmada en un certificado original).
- Adecuación de los materiales, patrones de referencias confiables, reactivos y cristalería.

- Calificación del personal, por medio de un récord de entrenamiento y seguimiento
- Adecuación de documentación de protocolo de validación e informe de validación y certificado de validación.

3.3.4 Pasos de la validación

Cada validación de un método consiste en el desarrollo de tres pasos:

- Establecimiento del protocolo de validación.
Cuando se realiza una validación de un método analítico es necesario contar con la documentación que sea capaz de evidenciar el objetivo, definición del tema a validar, la identificación de parámetros, el diseño del plan experimental y los criterios de aceptación. Este debe ser específico para determinado método; debiendo ir fechado y firmado por los responsables de la validación y la aprobación del mismo.
- Realización de la validación.
La validación abarca varios componentes para obtener datos de calidad estos van desde la verificación de calibraciones y materiales de referencias hasta la calificación de instrumentos analíticos en esta investigación no se incluye ninguna evidencia del estado de algunos requerimientos pero contamos con que el laboratorio está acreditado por ende cumple con todo lo necesario para llevar a cabo los estudios experimentales y demostrar científicamente que el procedimiento analítico posee las características de desempeño adecuadas.
- Elaboración del informe.
El informe de validación tiene por objeto verificar que todos los datos se comparen con los criterios o datos de origen también tiene el propósito de exponer un resumen total de los datos por cada determinación y facilite evaluar los resultados.

3.4 Protocolo de validación. ⁽¹⁶⁾

El protocolo de validación se realiza en base a los parámetros de desempeño a estudiar, se documenta el resultado obtenido del desarrollo de cada parámetro en estudio y se verifica si cumple con los criterios de aceptación correspondientes.

Según el organismo Salvadoreño de Acreditación OSA, la clasificación del método se diferencia en tres casos, en los que la dificultad de la validación aumenta del primero al tercero:

- **Método Normalizado:** Se trata de un método de ensayo normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en referencias reconocidas internacionalmente. Ejemplos de referencias reconocidas: USP, FEUM, EP, BP, JP, IP, AOAC, Standard Methods, EPA, PAM, CIPAC, ASTM, ASHTO, ISO, Codex Alimentarius, FDA, FAO, CE, USDA, otras referencias serán evaluadas.
- **Método Normalizado Modificado:** Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado. Ejemplos: un método de extracción diferente o la aplicación del método en una matriz diferente a la indicada, aplicación del método en rangos distintos de trabajo.
- **Método No Normalizado:** Se trata de un método de ensayo que no se encuentra en referencias reconocidas internacionalmente.

Al evidenciar con documentos que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos debe cumplir con objetivos como los que se detallan en el cuadro N° 2 en los que verá reflejado las diferencia entre los procedimientos según sea el caso:

Cuadro N° 2. Objetivos de la validación según el tipo de procedimiento de ensayo

Método de ensayo	Objetivo de la validación
Caso 1: Método Normalizado	Comprobación de que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.
Caso 2: Método normalizado modificado	Comprobación de que la modificación introducida en el método original no afecta la capacidad del laboratorio para proporcionar resultados confiables. Ejemplos: Cambio del método de extracción, otra matriz, cambios en el pH.
Caso 3: Método no normalizado	Comprobación de que el método cumple con las características necesarias para dar resultados confiables para el fin propuesto.

En el cuadro N° 3, se registran los parámetros a validar para métodos Normalizados con lo que según el organismo Salvadoreño de Acreditación OSA se lograra examinar si el método es adecuado para su aplicación en los análisis en que se procedan.

Cuadro N° 3. Parámetros a Validar para métodos Normalizados.

Parámetros/Método	Cuantificación de componentes
Selectividad / Especificidad	No
Linealidad	Si
Exactitud	Si
Precisión	Si
Límite de Detección	+
Límite de Cuantificación	Si
Robustez	No
Incertidumbre	Si

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis o rango a validar.
 Nota: si la referencia indica los parámetros de desempeño a evaluar cuando se realicen modificaciones a los métodos, el laboratorio podrá evaluar al menos estos parámetros.

El procedimiento exacto de ejecución del método analítico se encuentra en el Protocolo de Validación en el cual se desarrolla un plan experimental que contiene las especificaciones y los diversos parámetros que aplican de acuerdo a la categoría a la que pertenece.

3.5 Evaluación de los parámetros de desempeño del método

Las pruebas de evaluación de desempeño indican el rendimiento eficiente de un método analítico, dado a que estos parámetros son las propiedades características o capacidades cuantificables que indican su grado de calidad.

3.5.1 Linealidad. ⁽¹⁶⁾

La linealidad es un parámetro donde se mide la capacidad de un método analítico para producir resultados que son proporcionales a la concentración o cantidad del analito dentro de un rango dado. Se determina por procesamiento matemático de los resultados obtenidos del análisis del analito en diferentes cantidades o concentraciones. La elección del rango y el número de puntos de prueba está estrechamente relacionada con el método utilizado. ⁽¹⁸⁾

Para utilizar este parámetro en la cuantificación de un principio activo, se recomienda de 3 a 5 niveles de concentración experimentales, mientras que para aplicarlo para la determinación de un analito es necesario series de repeticiones que incluya de 5 a 7 concentraciones cubriendo el intervalo de trabajo.

Las concentraciones recomendadas para analizar según la guía de validación deben de ser de 0% a 150% del valor de la especificación en este caso el valor límite de trazas que recomiendan las normas. En general, se utiliza un mínimo de 5 niveles de concentraciones.

Los resultados de la lectura de estas concentraciones se utilizan para determinar cualitativamente el rango lineal graficando una curva de regresión ⁽¹⁹⁾. El comportamiento lineal se observa cuando la cantidad o concentración del analito se mostrará en el eje "x" y la respuesta del analito en el eje "y" en el que puede ser la absorbancia o concentración para métodos espectrofotométricos, área o altura para cromatografía o cantidad de valorante gastado para titulación

Para considerar que el método es lineal es necesario establecer los criterios de regresión que demuestren el estado lineal a lo largo de las observaciones, la mejor forma será realizando una prueba estadística de "t de Student" en el que el valor de "t calculado" se compara con el valor tabulado de "t de tabla" para el nivel de significación utilizado y con n-2 grados de libertad donde n corresponde al número total de determinaciones de "y".

El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual que 0,999, la pendiente en el intervalo de trabajo tiene que incluir al 1 y el intercepto debe incluir al cero para cumplir con el requisito de proporcionalidad como se exige para el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en los métodos espectrofotométricos.

En un modelo lineal se debe considerar los residuales que no son más que la diferencia entre el valor obtenido cuando ya se ha realizado los ajustes y el valor de referencia es decir un patrón. Los valores se representan en un gráfico donde la coordenada "x" será la concentración teórica y la coordenada "y" será el residual, su análisis permite determinar si existen datos anómalos (outliers) o atípicos.

En cuanto a la representación gráfica anterior, se debe verificar algunos aspectos tales como:

- El número de residuales positivos sea aproximadamente igual al número de residuales negativos.
- Los residuales tienen que estar distribuido aleatoriamente.
- No deben mostrar tendencia.

3.5.2 Exactitud. (16,18,20)

La evaluación práctica de la exactitud (veracidad) se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia.

Se dispone de dos técnicas básicas:

- Verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado y
- Comparación con otro método caracterizado.

El objetivo de este parámetro es producir resultados lo más cerca posible del valor real reflejando a su paso el sesgo o error en la tendencia a encontrar la concentración que se requiere.

Otra facultad de la exactitud es que es un excelente detector de interferencia que puede presentarse por excesiva o insuficiente selectividad e identificándose por la variabilidad de los resultados por ejemplo cuando se utilizan métodos analíticos muy laboriosos y con muchas etapas como extracción, purificación, existe la posibilidad de un falso positivo considerando al método inexacto o engañoso.

Para verificar la exactitud utilizando un material de referencia, se determina la media y la desviación estándar de una serie de réplicas de una prueba y se compara contra el valor caracterizado del material de referencia.

El material de referencia ideal sería un material certificado de matriz natural, muy semejante a la muestra de interés. Claramente la disponibilidad de éstos materiales es limitada. Los materiales de referencia para una validación pueden ser:

- Preparados por adición de materiales típicos con materiales de referencia con pureza certificada u otros materiales de pureza y estabilidad adecuada.
- Materiales típicos bien caracterizados, de estabilidad verificada internamente y conservados para control de calidad interno.

3.5.3 Precisión. ^(16,21)

La precisión es medida mediante la repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia este parámetro se encarga de comprobar que los resultados de pruebas analíticas repetidas realizadas en una muestra homogénea son iguales entre sí.

La repetibilidad estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto y la precisión intermedia se estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

Los parámetros estadísticos que caracteriza a la repetibilidad es la desviación estándar, el coeficiente de variación y/o una prueba de homogeneidad de varianzas en donde se demuestre de que si as varianzas son homogéneas el factor cantidad o concentración de la muestra no influye en la determinación.

Otra estimación que permite evaluar es la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media.

En la reproducibilidad se estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. Esto aplica en caso de organizaciones con diferentes laboratorios y/o cuando se requiera transferir métodos.

Éste parámetro aplica únicamente a laboratorios que tienen cedés con las cuales poder compararse. También aplica si se cuenta con historial en pruebas de intercomparación para el ensayo en estudio.

El análisis matemático es el mismo que para la repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad.

3.5.4 Límites. (16,22)

Cuando las mediciones se realizan a concentraciones bajas, existen tres conceptos generales a considerar. En primer lugar, puede ser necesario establecer un valor de resultado que es considerado un nivel de análisis significativamente diferente de cero. Regularmente, alguna acción es requerida a este nivel, tal como declarar un material contaminado. Este nivel es conocido como “valor crítico” o “límite de decisión”, en segundo lugar, es importante conocer la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado. Es decir, ¿a qué concentración real se excederá con seguridad el valor crítico descrito anteriormente? Los términos como “límite de detección” (LoD), “valor mínimo detectable”, son utilizados para este concepto. En tercer lugar, es adicionalmente importante establecer el nivel más bajo en el cual el desempeño es aceptable para una aplicación típica. Este tercer concepto usualmente es referido como el límite de cuantificación (LoQ).

También es necesario distinguir entre el límite de detección del instrumento y el límite de detección del método. El límite de detección del instrumento puede basarse en el análisis de una muestra, usualmente un blanco de reactivo, sometido directamente al instrumento (es decir, omitiendo cualquier paso de preparación de muestra), o en la relación señal/ruido. Para obtener el límite de detección de un método, debe basarse en el análisis de muestras que hayan sido sometidas a todo el proceso de medición obteniendo resultados calculados con la misma ecuación que para las muestras de ensayo. El dato más útil para la validación del método es el límite de detección del método.

Estos parámetros se relacionan con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo. Según Un resultado "positivo" no es suficiente para que el analista considere detectado un analito. Se precisa, además, conocer el límite de detección en las condiciones del método; de lo contrario se puede incurrir en un falso positivo, es decir, suponer el analito presente en la muestra cuando de hecho no lo está.

El límite de Cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable). Numéricamente es mayor el límite de cuantificación y representa la menor cantidad de analito que puede analizarse con un % de coeficiente de variación y de recuperación aceptables. Concentraciones menores pueden detectarse, pero no cuantificarse.

3.5.5 Incertidumbre. ⁽²³⁻²⁷⁾

La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el rango de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo. Una estimación de la incertidumbre debe tener en cuenta todos los efectos reconocidos que operan en el resultado. Las incertidumbres asociadas con cada efecto se combinan de acuerdo con procedimientos bien establecidos. Se describen varios enfoques para obtener una estimación de la incertidumbre de los resultados de las mediciones químicas. Estos tienen en cuenta:

- La precisión a largo plazo global del método (es decir, la precisión intermedia o la reproducibilidad);
- El sesgo y su incertidumbre, incluyendo la incertidumbre estadística que corresponde a las medidas de sesgo, y la incertidumbre en el valor de referencia;
- La calibración de equipos. Las incertidumbres asociadas con la calibración de equipos tales como pipetas y matraces volumétricos son a menudo insignificamente pequeña en comparación con la precisión global y la incertidumbre en el sesgo. Si esto se puede verificar entonces las incertidumbres de calibración no necesitan ser incluidas en la estimación de la incertidumbre;
- Cualquier efecto significativo que opera además de lo anterior

Cuando la contribución de los efectos individuales es importante, será necesario tener en cuenta las contribuciones individuales de todos los efectos individuales por separado. Se debe de tomar en cuenta que sujetos pueden entrar en consideración adicional de los efectos fuera del alcance de un estudio colaborativo. ⁽²⁸⁾

La desviación estándar de reproducibilidad configura una estimación de trabajo de la incertidumbre típica combinada siempre que:

- El sesgo del laboratorio, medido en los materiales aplicables es pequeño con respecto a la desviación estándar de la reproducibilidad,

- La repetibilidad interna es comparable con la repetibilidad del método estándar, y
- La precisión intermedia del laboratorio no es mayor que la desviación estándar de la reproducibilidad publicada.

3.6 Elaboración del informe de validación. ⁽¹⁶⁾

Luego del procedimiento de validación se debe contar con documentación que respalde de que el protocolo se ha verificado en la práctica y los resultados que se han obtenido aseguran una alta confiabilidad

El principal objetivo de un informe es presentar la información suficiente para poder concluir acerca de la validación que se ha desarrollado, debe de reunir y sintetizar los registros, resultados y la evaluación de lo que se realizó a través de las directrices establecidas en el Protocolo de Validación.

Este documento ordena la información sobre los resultados primarios y estadísticos de cada parámetro, la discusión de los resultados y las conclusiones de la validación. También es importante que incluya como anexo, todas aquellas pruebas que hagan constar el estado validado como resultados de los equipos, bitácoras u hojas de pesada.

El alcance de un informe es cumplir con los requerimientos y difundir de manera más práctica el cumplimiento de los parámetros junto a los resultados que respaldan la validación del método.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

El estudio que se realizó fue de tipo:

- **Experimental:** la validación del método de 1,5- Difenilcarbohidrazida para la determinación de Cromo Hexavalente se elaboró y se adaptó a las condiciones específicas del Laboratorio de Análisis Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- **Transversal:** la investigación se realizó en un tiempo definido comprendido entre febrero del 2020 hasta octubre del 2022, la validación logro estudiar el problema en el presente y podrá utilizarse a largo plazo.
- **Prospectivo:** a medida se desarrolló la validación del método se cumplió con cada objetivo del estudio. Además, este trabajo podrá tener aplicación útil en el futuro ya que aporó información verídica y confiable.

4.2 Investigación bibliográfica

Se realizó en las siguientes bibliotecas:

- "Dr. Benjamín Orozco" Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador (UES)
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Recursos electrónicos del portal: biblioteca.ues.edu.sv
- Internet

4.3 Ámbito de aplicación

La validación del método 1,5-Difenilcarbohidracida fue desarrollado en el Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. El estudio se realizó para obtener evidencia documental y demostrativa de que el método analítico produjo resultados dentro de los intervalos y parámetros definidos, logrando que fuera lo suficientemente confiable y reproducible para continuar cumpliendo el propósito requerido en este laboratorio.

4.4 Parte experimental

4.4.1 Método analítico

El método utilizado es aceptado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) y la Asociación Americana de Salud Pública APHA, como método estándar para el examen de agua y agua residuales llevando como nombre el método oficial 3500-Cr B. Método colorimétrico ⁽²⁹⁾ y adoptado por Hach Company como el método N° 8023 ^(2,14), método de Difenilcarbohidrazida que a su vez lo nombraron como ChromaVer® 3 donde el proveedor lo presenta como una almohada que contiene polvo seco y es el reactivo para Cromo. El análisis se realizó en el Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (ver Anexo N° 3).

4.4.2 Materiales, equipo y reactivos (ver Anexo N° 4).

4.4.3 Procedimiento de medición

1. Seleccionar el método de medición en el comando "Hach Programs", seleccionando 90 Chromium, Hex.
2. Tomar 10.0 mL del solvente de la muestra en es decir agua desmineralizada o ultra pura en un tubo de ensayo o celda añadir el contenido de un sobre de reactivo en polvo Chromaver 3 y esperar 5 minutos (será el blanco).
3. Mezclar para homogenizar e iniciar el temporizador a 5 minutos.
4. En el tiempo de espera en un tubo de ensayo o celda de 10.0 mL preparar la muestra añadiendo el reactivo en polvo Chromaver 3 mezclando e iniciando otro temporizador a 5 minutos
5. Cuando el tiempo de 5 minutos se agotó tomar el blanco, limpiar la celda, colocarlo en el soporte de la celda del espectrofotómetro y leer a cero (0.00 mg/L Cr⁶⁺).
6. Luego una vez terminado el tiempo de reacción de la muestra colocar la celda en el soporte, la cual debe estar limpia y libre de huellas o manchas y proceder a leer los resultados directos en mg/L Cr⁶⁺.
7. Finalmente, el analista de la prueba, remite los datos tomados de las muestras, para generar el análisis o informe detallado.

4.4.4 Protocolo de validación. (2,16,30)

El protocolo de operación del método para esta validación se realizó, reflejando el procedimiento exacto de ejecución, de manera que se facilite la comprensión, la obtención de resultados y se asegure que el método se validó de manera adecuada. A continuación, se desglosa el contenido de acuerdo a la guía de referencia (ver Anexo N° 5):

- Identificación, Propósito y/u Objetivo: se identificó de acuerdo al control interno de documentos del laboratorio, aclara la finalidad de la validación y la fecha de realización
- Alcance: declara la generación de documentación que respalde la aplicabilidad del método
- Responsables: las personas que llevaran a cabo la validación y la aprobación del mismo.
- Parámetros a estudiar: los parámetros se seleccionan en función de las características de la muestra, concentración y el tipo de método analítico
- Muestras (Matrices): definir el tipo de muestra
- Equipos: se identifican los equipos implicados en la validación, y se incluye el comprobante de la calificación del equipo.
- Descripción del Método analítico: describe el procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, soluciones patrón, materiales, técnicas y cálculos.
- Procedimiento para la determinación de parámetros a evaluar: detalla el procedimiento a seguir, debe incluir detalles como cantidad de alícuotas, diluciones, análisis estadístico a aplicar y los criterios de aceptación que estarán basados en las necesidades o la finalidad del método.
- Autorización o aprobación: incluirá firma y fecha del gerente de aseguramiento de calidad y del analista a cargo.

4.4.5 Procedimiento de los parámetros de desempeño requeridos para la validación del método. (16, 31)

El propósito de la validación es mostrar que el Cromo Hexavalente se puede determinar utilizando el método presentado, a continuación, se describe en detalle el tratamiento que se llevó a cabo para cada parámetro, junto con los requisitos estadísticos y especificaciones de desempeño de las cuales obedece cumplir.

4.4.5.1 Linealidad

4.4.5.1.1 Verificación del kit de trabajo y la respuesta del equipo de medición mediante curva de calibración. ^(31,32)

El laboratorio para lograr el más alto nivel de precisión y confiabilidad solicitó verificar los límites de medición del kit de trabajo previo a su uso en toda la validación, por lo tanto, como esta verificación se ve incluida en la guía de validación y en este parámetro; se evaluó que el rango propuesto del instrumento o método de análisis y el procedimiento de calibración fueran aptos para el uso.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. Se prepararon seis soluciones distribuidas en el rango de cobertura de 0.010 a 0.700 mg/L, para lo cual se partió del estándar de referencia de 1000 mg/L para preparar una solución madre de 50.0 mg/L.
2. A partir de la solución de 50 mg/L de Cr⁶⁺ se preparó una solución de 10.0 mg/l, se tomó una alícuota de 10.0 mL con pipeta volumétrica y se transfirió a un matraz volumétrico de 50.0 mL; llevando a volumen con agua ultra pura ver el diagrama de la dilución en el Anexo N° 6
3. De esta solución se tomaron alícuotas con bureta de 10.0 mL, para preparar 50.0 mL de cada solución patrón (ver Anexo N° 7), a continuación, se detallan los volúmenes tomados para preparar la curva de calibración en la Tabla N° 1.
4. Para la lectura se siguió el procedimiento de medición según el punto 4.3.3

Tabla N°1. Tabla de calibración para la determinación de Cromo Hexavalente.

Tubo	Concentración inicial (mg/L)	Volumen de solución patrón (mL) a tomar	Concentración final (mg/L) a obtener
Blanco	0.000	0.0	0.000
1	0.500	1.0	0.010
2	0.500	5.0	0.050
3	10.000	0.5	0.100
4	10.000	1.5	0.300
5	10.000	2.5	*0.500
6	10.000	3.5	0.700

NOTA: las soluciones 0.010 y 0.050 mg/L se preparan a partir del estándar de *0.500 mg/L

El análisis estadístico para la verificación incluye un gráfico de regresión que explique la proporcionalidad relacionada de las dos variables de interés en una curva de calibración, por lo tanto, el criterio de aceptación es que se represente una tendencia lineal proporcional a las concentraciones medidas.

4.4.5.1.2 Linealidad

Para la linealidad del método es necesario preparar a partir de la solución madre, 5 concentraciones distintas para construir la curva de calibración, las concentraciones que se tomaron en cuenta fueron de acuerdo al rango recomendado por las tablas de referencia AOAC en la guía de validación fisicoquímico de la OSA para la cuantificación del analito a nivel trazas ver Anexo N° 8. (20, 33,34)

El procedimiento que se siguió se describe a continuación:

1. Se preparó una solución estándar a una concentración de 10.0 mg /L y partiendo de ésta se elaboró cinco diluciones de concentraciones conocidas (ver Anexo N° 9).
2. Para cada una de estas soluciones incluyendo el blanco se aplicó el tratamiento de muestra según numeral 4.3.3, para cada concentración por triplicado.
3. Se midieron las muestras en el espectrofotómetro HACH DR 2700, a una longitud de onda de 540 nm.

Para procesar los datos se elaboró una curva de calibración de la concentración medida contra concentración resultado, se calculó por medio de fórmulas y por el método de estimación por mínimos cuadrados (ver Anexo N° 10) el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza de la pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{x/y}$).

Para la aprobación formal se evaluaron, criterios de aceptación tanto para el intervalo lineal como para el intervalo de trabajo:

Intervalo lineal

- Comportamiento lineal en la gráfica de concentración versus respuesta analítica.

- El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero, cuando se incluyan concentraciones bajas en la curva.

Intervalo de trabajo

- Pendiente

Asumiendo la prueba de hipótesis con una prueba de $t_{student}$ así:

Hipótesis nula (H_0): la pendiente es igual a la unidad ($b = 1$)

Hipótesis alternativa (H_a): la pendiente es distinta a la unidad ($b \neq 1$)

$$t_{calc} = \frac{b-\mu}{sb_1} \quad \text{y} \quad t_{(0.025) (2) gl}$$

Si $t(-) \leq t_{cal} \leq t(+)$, se acepta H_0 y se rechaza H_a , Si $t(-) \geq t_{cal} \geq t(+)$, se acepta H_a y se rechaza H_0 (ver Anexo N° 11).

- Intercepto

Asumiendo la prueba de hipótesis con una prueba de $t_{student}$ de dos colas así:

Hipótesis nula (H_0): la pendiente es igual a cero ($a = 0$)

Hipótesis alternativa (H_a): la pendiente es distinto a cero ($a \neq 0$)

$$t_{calc} = \frac{b-\mu}{sb_1} \quad \text{y} \quad t_{(0.025) (2) gl}$$

Si $t(-) \leq t_{cal} \leq t(+)$, se acepta H_0 y se rechaza H_a , Si $t(-) \geq t_{cal} \geq t(+)$, se acepta H_a y se rechaza H_0 (ver Anexo N° 11).

Otros criterios tomados en cuenta son:

- El coeficiente de correlación de Pearson $r \geq 0.98$
- El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad
- Análisis de varianza, se elabora una tabla (ver Tabla N° 2) de los resultados estadísticos así:

Tabla N° 2. Análisis de varianza de la regresión lineal

	GI	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F_{cal}	$F_{(0.05)}$
Regresión	1	SC_{reg}	CM_{reg}		Tabla
Error	n-2	SC_{err}	CM_{err}	N= Número total de pruebas	
Total	n-1	SCT	CMT		

Con la utilización de las fórmulas que se encuentran en el Anexo N°10 se calculó el F_{cal} y este fue evaluado bajo el segundo planteamiento de hipótesis para encontrar si el modelo es o no el adecuado para cumplir con el criterio.

Asumiendo que para una prueba de hipótesis:

Hipótesis nula (H_0): El modelo lineal no es adecuado

Hipótesis alternativa (H_a): El modelo lineal es adecuado

$$F_{calc} = CM_{reg}/CM_{err}$$

Si F_{calc} es menor o igual a F de tabla se acepta H_0 y se rechaza H_a , si F_{calc} es mayor o igual a F de tabla se acepta H_a y se rechaza H_0 (ver Anexo N° 12).

Para la evaluación de residuales y para que se pueda considerar válido un modelo de línea recta, se debe verificar en el gráfico de residuales lo siguiente:

- El número de residuales positivos es aproximadamente igual al número de residuales negativos.
- Los residuales tienen que estar distribuido aleatoriamente de preferencia entre valores de ± 1.5
- No deben mostrar tendencia

Nota: Para dicho análisis se utilizó la ecuación lineal resultante del parámetro de linealidad.

4.4.5.2 Exactitud. (32,34,35)

La exactitud del método se demostró analizando tres niveles de concentración de soluciones estándar de Cromo Hexavalente que se prepararon por triplicado, realizando así nueve determinaciones en total.

El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente:

1. Se preparó una solución estándar de Cromo a una concentración 10.0 mg/L y partiendo de ésta se elaboraron tres diluciones (ver Anexo N° 13).
2. Cada una de estas soluciones triplicada para cada concentración fueron tratadas según numeral 4.3.3
3. Las lecturas fueron realizadas en el espectrofotómetro HACH DR2700, a una longitud de onda de 540 nm.

La parte estadística para la exactitud del método consistió en calcular el porcentaje de recuperación aparente ($R(\%)$) el sesgo (b) y el error relativo porcentual ($b(\%)$) utilizando el método de análisis con muestras fortificadas, además se calculó la media aritmética (\bar{X}), la desviación estándar (S) el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza ($IC_{(\mu)}$) el formato de tabla para el caculo de cantidad recuperada y fórmulas se encuentran en el Anexo N°14.

Los Criterios de aceptación que se tomaron en cuenta para este parámetro son:

- El promedio de la recuperación aparente debe encontrarse entre el rango de 70 % - 110 %
- El coeficiente de variación debe ser menor a 5% y
- El valor de la media debe incluirse en el intervalo.

4.4.5.3 Precisión. (18,21)

La precisión es medida en 3 parámetros repetibilidad, precisión Intermedia y reproducibilidad para efecto del Laboratorio solamente se realizó en 2 repetibilidad y precisión Intermedia. Para la repetibilidad se inició con la preparación de una solución estándar correspondiente a 0.05 mg/L Cr⁶⁺ y termino con la preparación de la muestra a continuación se especifica el procedimiento correspondiente a cada uno:

Estándar:

1. Se preparó una solución estándar a una concentración de 0.500 mg/L, (ver Anexo N° 15).
2. A esta solución se le realizó el tratamiento de muestra según numeral 4.3.3, repitiendo la medición diez veces a la misma solución.
3. Luego se procedió a las lecturas en el espectrofotómetro HACH DR2700, a una longitud de onda de 540 nm.

Muestra:

1. En un Baker de 500 mL se recolectó 250 mL de agua potable extraída del grifo
2. Se pipeteó 10.0 ml de muestra y se transfirió a un tubo de reacción con tapón de rosca debidamente rotulado el procedimiento se repitió 10 veces.
3. Luego se agregó el contenido de un sobre ChromaVer 3 a cada tubo y se mezcló en esta parte se realizó una muestra a la vez.
4. Después de permitir un tiempo de reacción de 5 minutos se procedió a su lectura. En presencia de Cromo Hexavalente, aparecerá un color violeta.

El análisis para evaluar la repetibilidad del método se realizó calculando el porcentaje de recobro para luego calcular estadísticamente la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza ($IC_{(\mu)}$) (ver Anexo N° 16).

El criterio de aceptación consistió en:

- Coeficiente de variación: < 5 %

Para la precisión Intermedia se requirió de un análisis para determinar si existe una desigualdad significativa con respecto a las varianzas de las mediciones de muestra entre analistas manteniendo solamente las condiciones del día, instrumento y área de análisis. El estudio estadístico se realizó de acuerdo a las tablas N° 3 y tabla N° 4 pero además se evaluó la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza de las muestras ($IC_{(\mu)}$) las ecuaciones estadísticas que se pueden ver en el Anexo N° 16.

Tabla N° 3. Datos para el análisis de varianza- modelo matemático

	i (niveles del factor)				Dónde: A es el número de ocasiones
Variable:	A ₁	A ₂	A ₃	...A _n	
j (repeticiones)	A _{1,1}	A _{2,1}	A _{3,1}	...A _{n,1}	
	A _{1,2}	A _{2,1}	A _{3,2}	...A _{n,2}	
	ΣA ₁	ΣA ₂	ΣA ₃	ΣA _n	ΣT=ΣA ₁ +ΣA ₂ +ΣA ₃ +...ΣA _n
Media muestral	Y _{ij}		r=repeticiones totales		
α	Ocasiones				
ε	Error				

$$Y_{ij} = \tilde{x} + \alpha i + \varepsilon j$$

La tabla ANOVA se resume de la siguiente forma: ⁽³⁶⁾

Tabla N° 4. Análisis de varianza de la precisión intermedia

	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F _{cal}	F _(0.05)
αi	α-1	SC _{ai}	CM _{ai}		Tabla
Error	α(r-1)	SC _{εj}	CM _{εj}		
Total	αr-1	SCT	CMT		

El criterio se basó en un planteamiento de hipótesis y de esta forma se concluyó si el método era preciso.

- Análisis de varianza, asumiendo la prueba de hipótesis:

H₀: Las varianzas son iguales $sx^2_1 = sx^2_2$

H_a: Las varianzas son distintas $sx^2_1 \neq sx^2_2$

Se calcula el estadístico F así:

si $sx^2_1 > sx^2_2$ $F_{calc} = sx^2_1/sx^2_2$

Si F_{calc} es menor o igual a F de tabla se acepta H₀ y se rechaza H_a,

Si F_{calc} es mayor o igual a F de tabla se acepta H_a y se rechaza H₀.

(ver Anexo N° 12).

4.4.5.4 Límites. (20,37,38)

Para la medición de este parámetro se prepararon muestras fortificadas a la menor concentración aceptable medidos una vez cada uno además de mediciones de blancos que fueron tomados en el transcurso del estudio.

El procedimiento que se llevó a cabo se describe a continuación:

- Se prepararon diez soluciones partiendo de 0.005 mg/L a 0.009 mg/L, para la recopilación de los datos de los blancos se utilizarán las lecturas de todas las calibraciones a cero realizadas durante el estudio de validación la casca de preparación se puede ver en el Anexo N° 17.
- Se trató a cada una de estas soluciones según el tratamiento de muestra del numeral 4.3.3 por una sola vez para cada concentración.
- Luego se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro HACH DR 2700, a una longitud de onda de 540 nm.

El análisis estadístico para evaluar a las muestras que se fortificaron involucra el cálculo de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y los intervalos de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) esto con el apoyo de la estimación por mínimos cuadrados (ver formato de tabla y formulas en Anexo N° 18)

Para el resultado de las mediciones de los blancos se calculó la desviación estándar (S_b), pero para conocer cuál es el grado de confianza que puede tener el método a concentraciones bajas se aplicaron las ecuaciones de Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) (ver formula en Anexo 18)

Criterio de aceptación

- El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98 y el valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo de confianza de los valores de blanco de muestra o de los valores de los blancos de muestra fortificadas.

4.4.5.5 Incertidumbre. (39-42)

En la estimación de la incertidumbre se tomó en cuenta todos los efectos conocidos que influyeron directamente en el resultado. Estas incertidumbres se combinan para obtener una estimación del error que las mediciones pueden tener, el proceso que se siguió fue el siguiente (ver Anexo N°19).

- Especificar el mesurando: Identificar la función con el parámetro de la linealidad del método
- Identificar las fuentes de incertidumbre: Identificar con la función los factores involucrados
- Cuantificar las incertidumbres: agrupar las incertidumbres o evaluarlas por individual según sea conveniente cada una reducida a incertidumbre estándar. ^(43,44) En este parámetro solo se agrupará las incertidumbres de volumen (ver Anexo N° 20).
- Calcular la incertidumbre con la función de regresión lineal utilizando el valor de “y” ingresando el valor deseado de “x” en la ecuación.
- Cuantificar la incertidumbre de repetibilidad, se utilizan los resultados del parámetro de repetibilidad, en el cálculo de la desviación estándar.
- Reducir a las incertidumbres siguiendo los siguientes pasos:
 - 1.La desviación estándar de medición se divide el valor calculado entre dos.
 - 2.La incertidumbre de la resolución se reduce dividiéndolo entre la raíz cuadrada de tres.
 - 3.La incertidumbre de la repetibilidad se reduce dividiendo la desviación estándar calculada entre la raíz cuadrada del número de repeticiones realizadas.
- Calcular la incertidumbre combinada $u_c(y)$, utilizando el método de la raíz cuadrada de la suma de cuadrados.
- Calcular la incertidumbre expandida (U), se multiplica la incertidumbre combinada por el factor de cobertura $k=2$.
- Reportar la incertidumbre expandida, $y \text{ mg Cr}^{6+}/L \pm U$

4.4.6 Elementos para procesar la información

Los datos recopilados fueron procesados mediante cálculos estadísticos para poder interpretarlos, en este estudio se estableció que no se utilizara el programa de hoja de cálculo de Excel, siendo la única excepción la creación de gráficos. Como evidencia de este proceso se encuentran en anexos las formulas y la resolución de los cálculos que corresponden a cada parámetro que fue realizado por los analistas.

4.4.7 Informe de validación. ⁽¹⁶⁾

Con la presentación de este informe se da paso al cumplimiento del último requerimiento de la Guía, el alcance de este informe es plasmar lo que se ha logrado con la validación de manera que el Laboratorio de aguas de la Universidad de El Salvador cumpla con los programas, los requisitos y los estándares de certificación para los cuales está previsto en el análisis de Cromo Hexavalente en agua de consumo ver Anexo N° 21.

Específicamente las partes que conforman el informe de validación son las siguientes:

- Referencia del protocolo utilizado
- Resultados analíticos
- Resultados estadísticos
- Parámetros validados y criterios de aceptación
- Interpretación de resultados y/o conclusiones
- Cuadro resumen de los resultados obtenidos (parámetro, criterio, resultado y conclusión)
- Declaración de aptitud del método
- Datos crudos de la validación
- Autorización por o las personas asignadas por el laboratorio

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADO

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En base a que pueden existir diferentes métodos para el análisis de este metal, se elaboró una validación del método analítico de 1,5 -Difenilcarbohidrazida para la determinación de Cromo Hexavalente en agua potable. El control analítico se realizó mediante el seguimiento de los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, límites y estimación de incertidumbre en la medición.

El propósito de la verificación de los resultados de la práctica y el rendimiento de las características de desempeño del método que se detalla a continuación es cumplir con los requisitos, demostrar que es adaptable y es el indicado para las aplicaciones analíticas previstas.

5.1 Protocolo de validación

Se diseñó un protocolo de validación para un método normalizado de acuerdo a los requerimientos del Laboratorio de agua de la Universidad de El salvador y con base a los lineamientos de la Guía de Validación de Métodos Analíticos Fisicoquímicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA), en el cuadro N° 4 de este documento detalla el proceso a seguir, las características y criterios de desempeño de los parámetros determinados.

Cuadro N° 4. Protocolo de validación del método 1,5-Difenilcarbohidrazida

	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO DE ANALISIS DE 1,5-DIFENILCARBOHIDRAZIDA	Código:PCH06
		Fecha:17/03/2021
		Revisión #1
		Cambio #1
		Pág. N° 1 de 6
Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador		
<p>1. PROPOSITO</p> <p>Validar un método analítico sensible que permita la determinación cuantitativa exacta, precisa y reproducible de Cromo Hexavalente dentro del rango de 0.010 a 0.700 mg/L Cr⁶⁺ en agua potable, que sea apto a las condiciones espectrofotométricas con las que el laboratorio cuenta, realizar su respectivo análisis estadístico de los resultados obtenidos por el método analítico utilizado y cumplir con los criterios establecidos.</p> <p>Finalidad de la validación: Validar el método de la 1,5-difenilicarbohidracida para el Laboratorio de análisis de agua de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador</p> <p>Fecha de inicio: 17 de marzo de 2021 Fecha de finalización: julio de 2021</p>		

Cuadro N° 4. (Continuación)

2. ALCANCE

Desde la realización analítica hasta la documentación de la validación evidenciando su cumplimiento con su respectivo informe.

3. RESPONSABLES

Analistas responsables de la Validación: Meibelyn Guerra y Evelin Pineda
Responsable de Calidad: Licdo. Henry Hernández

4. PARAMETROS A ESTUDIAR

(de acuerdo a Guía Técnica de Validación de Métodos)

Parámetros de desempeño: Linealidad, Exactitud, Precisión, Límite de Detección, Límite de Cuantificación e Incertidumbre

5. MUESTRA (MATRICES)

Matriz: agua potable extraída del grifo.

6. EQUIPOS INVOLUCRADOS EN LA VALIDACION

Equipo/s: Espectrofotómetro visible Hach DR 2700

Puesta en uso: 27 de julio de 2009

Fecha de última verificación: junio de 2019

Referencia de registro de calibración: Libro de documentos y registros

7. DESCRIPCION DEL METODO ANALITICO

El método utilizado es aceptado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) y la Asociación Americana de Salud Pública APHA, como método estándar para el examen de agua y agua residuales llevando como nombre el método oficial 3500-Cr B. Método colorimétrico y adoptado por Hach Company como el método N° 8023, método de Difenilcarbohidrazida que para uso de la compañía se conoce como ChromaVer® 3 , el proveedor lo presenta como una almohada que contiene polvo seco y es el reactivo para Cromo. La prueba determina Cromo Hexavalente disuelto en agua.

Metodología: La medición se basa en una reacción de color entre el reactivo específico y el Cromo Hexavalente contenido en la muestra. La intensidad de color es proporcional a la concentración. El análisis se realizó en el Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Tipo de método analítico: espectrofotométrico

A. REACTIVO

- Reactivo ChromaVer 3 de Hach para la determinación de Cromo Hexavalente en agua.
N°: 1271099-LM Lote: 09018 Fecha de vencimiento: Oct-2021
- Agua ultra pura
N°: 36284123 Lote: LD0025 Fecha de vencimiento: Dic-2023

Cuadro N° 4. (Continuación)

B. ESTANDARES

Estándar de Cromo 1000 µg/mL Lote: HC99974679 Fecha de vencimiento: 2022/06/30

C. MATERIALES

- Tubos de reacción con tapón de rosca (tubos de ensayo)
- Celdas de vidrio de 50 mm, 20 mm y 10 mm
- Cronometro

D. CONDICIONES AMBIENTALES

Condiciones normales de temperatura y humedad relativa del laboratorio

E. MEDIDAS DE SEGURIDAD PARA EL USO DE REACTIVOS

- Uso de gabacha
- Gafas de seguridad
- Mascarilla antigases
- Guantes de Nitrilo

F. PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Preparación de la solución blanco (preparar antes de las lecturas o cuando se requiera)

1. Rotular un tubo de reacción con tapón de rosca como "blanco"
2. Llenar hasta la marca con 10.0 ml de agua ultra pura
3. Adicionar al tubo rotulado como blanco el contenido de un sobre ChromaVer 3 y mezclar
4. Permitir un tiempo de reacción de 5 minutos y proceder a su lectura.

G. PREPARACIÓN DE ESTANDARES Y MUESTRA

Preparación del Estándar.

1. Con una bureta de 10.0 mL tomar una alícuota de 2.5 mL del estándar de referencia de 1000 mg/L
2. Transferirla a un matraz volumétrico de 50 ml rotulado como st1,
3. Llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión.
4. Pipetear 10 ml del matraz volumétrico st1,
5. Transferirlo a un matraz volumétrico de 50 ml rotulado como solución madre,
6. Llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión, la solución tendrá una concentración final de 10 mg/L. De esta solución tomar las alícuotas con bureta de 10.0 mL, para preparar 50.0 mL de las soluciones requeridas.

H. Preparación de la Muestra

1. En un Baker de 500 mL recolectar 250 mL de agua potable extraída del grifo.
2. Pipetear 10.0 ml de muestra transferir a un tubo de reacción con tapón de rosca debidamente rotulados el procedimiento se repite 10 veces
3. Adicionar el contenido de un sobre ChromaVer 3 a cada tubo y mezclar realizar una muestra a la vez
4. Permitir un tiempo de reacción de 5 minutos y proceder a su lectura. En presencia de Cromo Hexavalente, aparecerá un color violeta.

Cuadro N° 4. (Continuación)

I. PRODCEDIMEINTO DE LECTURA EN EL EQUIPO

- Encender el equipo, dejando de 10 a 15 minutos sin usar para su estabilización
- Seleccionar el método 8023.
- Pipetear 10.0 mL de las muestras o estándares a los niveles de concentración requeridos para cada repetición y transferirla a un tubo de reacción con tapón.
- Adicionar el contenido de un sobre ChromaVer 3 a cada tubo y mezclar.
- permitir un tiempo de reacción de 5 minutos.
- Añadir la solución blanca en la celda correspondiente y limpiar.
- Colocar la celda en el compartimiento correspondiente.
- presionar el comando “cero”
- Se observará en pantalla el resultado directo como 0.000 mg/L.
- Añadir la solución estándar o muestra en la celda correspondiente y limpiar.
- Colocar la celda en el compartimiento correspondiente.
- presionar el comando “medición”
- Se observará en pantalla el resultado directo en mg/L de Cromo Hexavalente (Cr^{6+}).
- Anotar los resultados

J. CALCULOS

La lectura es directa, por lo tanto, no es necesario calcular el contenido de Cromo Hexavalente en la muestra.

8. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS A EVALUAR

LINEALIDAD

Verificación de rango de trabajo del KIT mediante curva de calibración.

Preparación del Estándar

Con una bureta de 10 mL tomar una alícuota de 2.5 mL del estándar de referencia o solución patrón de 1000 mg/L, transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como st1, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión. Pipetear 10 ml del matraz volumétrico st1, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como solución madre, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión.

Transferir a una bureta de 10 mL la solución madre, medir y verter los siguientes volúmenes: 0.5 mL, 1.5 mL, 2.5 mL y 3.5 mL, en matraces volumétricos de 50 mL rotulados respectivamente, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión las soluciones tendrán una concentración final de 0.1 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.7 mg/mL.

De la solución con concentración de 0.5 mg/L pipetear 1 mL y 5 mL, transferirlo a un balón volumétrico de 50 mL rotulados respectivamente, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión, las soluciones tendrán una concentración final de 0.01 mg/L y 0.05 mg/L.

Cuadro N° 4. (Continuación)

Procedimiento de lectura

Leer las 6 soluciones a una longitud de onda de 540 nm, una sola vez en el espectrofotómetro según el literal "1" del protocolo de validación.

Linealidad del método

Preparación del Estándar

Con una bureta de 10 mL tomar una alícuota de 2.5 mL del estándar de referencia o solución patrón de 1000 mg/L, transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como L1st1, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión. Pipetear por triplicado 10 ml del matraz volumétrico L1st1, transferir respectivamente cada alícuota a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como solución madre 1,2 y 3, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión.

Transferir a una bureta de 10 mL las soluciones madres una a una, medir y verter los siguientes volúmenes: 0.05 mL, 0.25 mL, 0.5 mL, 1.5 mL y 3.5 mL en matraces volumétricos de 50 mL rotulados respectivamente, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión las soluciones tendrán una concentración final de 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.3 mg/mL y 0.7 mg/L. Preparar 3 series de cada concentración.

Procedimiento de lectura

Leer las 15 soluciones a una longitud de onda de 540 nm, una sola vez en el espectrofotómetro según el literal "1" del protocolo de validación.

EXACTITUD

Preparación del Estándar

Con una bureta de 10 mL tomar una alícuota de 2.5 mL del estándar de referencia o solución patrón de 1000 mg/L, transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como E1st1, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión. Pipetear por triplicado 10 ml del matraz volumétrico E1st1, transferir respectivamente cada alícuota a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como solución madre 1,2 y 3, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión.

Transferir a una bureta de 10 mL las soluciones madres una a una, medir y verter los siguientes volúmenes: 0.15 mL, 0.25 mL y 0.5 mL, en matraces volumétricos de 50 mL rotulados respectivamente, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión las soluciones tendrán una concentración final de 0.03 mg/mL, 0.05 mg/mL y 0.1 mg/mL. Preparar 3 series de cada concentración.

Procedimiento de lectura

Leer las 9 soluciones a una longitud de onda de 540 nm, una sola vez en el espectrofotómetro según el apartado "1" del protocolo de validación.

Cuadro N° 4. (Continuación)

PRESICION**Preparación del Estándar**

Preparar un estándar a la concentración límite permitida en agua de consumo humano de la siguiente manera: con una bureta de 10 mL tomar una alícuota de 2.5 mL del estándar de referencia o solución patrón de 1000 mg/L, transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como P1st1, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión. Pipetear 10 ml del matraz volumétrico P1st1, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como solución madre, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión.

Transferir a una bureta de 10 mL la solución madre, verter 2.5 mL en matraces volumétricos de 50 mL rotulados como P1.1, P1.2... P1.10, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión.

Pipetear 5 mL de las soluciones P1.1, P1.2... P1.10, y transferir a matraces volumétricos de 50 mL rotulados como P1, P2... P10 las soluciones tendrán una concentración final de 0.05 mg/mL. Repetir el procedimiento 10 veces.

Preparación de la muestra

En un Baker de 500 mL recolectar 250 mL de agua potable extraída del grifo. Pipetear 10.0 ml de muestra, transferir a un tubo de reacción con tapón de rosca debidamente rotulados como M1, M2, ... M10, Adicionar el contenido de un sobre ChromaVer 3 a cada tubo y mezclar

Nota: realizar una muestra a la vez para permitir un tiempo de reacción de 5 minutos. El procedimiento se repite 10 veces. En presencia de Cromo Hexavalente, aparecerá un color violeta.

Procedimiento de lectura

Leer las soluciones de estándar (10) y muestras (10) a una longitud de onda de 540 nm, una sola vez en el espectrofotómetro según el apartado "I" del protocolo de validación.

LIMITES**Preparación del Estándar**

Con una bureta de 10 mL tomar una alícuota de 2.5 mL del estándar de referencia o solución patrón de 1000 mg/L, transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como L1st1, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión. Pipetear 10 ml del matraz volumétrico L1st1, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL rotulado como solución madre, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión.

Transferir a una bureta de 10 mL la solución madre, verter 2.5 mL en matraces volumétricos de 50 mL rotulados como L1.1 y L1.2, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión.

Cuadro N° 4. (Continuación)

Transferir a una bureta de 10 mL las soluciones L1.1 y L1.2 una a una, medir y verter los siguientes volúmenes: 0.5 mL, 0.6 mL, 0.7 mL, 0.8 mL y 0.9 mL en matraces volumétricos de 50 mL rotulados respectivamente, llevar a volumen con agua ultra pura y agitar por inversión las soluciones tendrán una concentración final de 0.005 mg/mL, 0.006 mg/mL, 0.07 mg/mL, 0.08 mg/mL y 0.09 mg/L. Preparar 2 series de cada concentración.

Preparación de la solución blanco (preparar antes de las lecturas)

Rotular un tubo de reacción con tapón de rosca como "blanco", llenar hasta la marca con 10.0 ml de agua ultra pura, añadir al tubo rotulado como blanco el contenido de un sobre ChromaVer 3 y mezclar. Permitir un tiempo de reacción de 5 minutos y proceder a su lectura.

Nota: para las lecturas de los blancos se utilizarán los resultados de todas las calibraciones a cero realizadas para el estudio de validación. (10 lecturas de agua ultra pura)

Procedimiento de lectura

Leer las soluciones de estándar (10) y de blancos (10) a una longitud de onda de 540 nm, una sola vez en el espectrofotómetro según el apartado "1" del protocolo de validación.

INCERTIDUMBRE

Procedimiento:

1. Especificar el mesurando

Declarar la "especificación del mensurando" de una forma concisa y sin ambigüedades de lo que se va a medir además expresarla de forma cuantitativa mediante un modelo matemático que relacione el valor del mensurando con los parámetros de los que depende.

2. Identificar las fuentes de incertidumbre

Reunir una lista exhaustiva de fuentes de incertidumbre relevantes algunas fuentes típicas a tomar en cuenta están: efectos instrumentales, pureza de reactivos, material volumétrico, recuperación del analito en una matriz, corrección del blanco, efectos del analista y los aleatorios.

3. Cuantificación de la incertidumbre

Para efectos de la práctica donde sea necesario elaborar una evaluación de la incertidumbre asociada a cada fuente individual para posteriormente combinarlas o determinar la contribución combinada de incertidumbre de los resultados de algunos o de todas las fuentes involucradas. En este paso tomar en cuenta una segunda evaluación que valore algunos componentes que no se han incluido.

- a) Concentración (mg/L) de Cromo Hexavalente medido en el instrumento a través de la curva de calibración. (individual)
- b) Incertidumbre de factor de dilución (contribución combinada)
- c) Incertidumbre del Estándar de referencia certificado (ERC) (individual y combinada)
- d) Combinación de las Fuentes De Incertidumbre (primera combinación)
- e) Incertidumbre por repetibilidad de la muestra (valoración de componente no incluido)

Cuadro N° 4. (Continuación)

<p>Nota: cada incertidumbre debe estar calculada de manera estándar por lo tanto evaluar si es una distribución es rectangular calcular con desviación estándar $\frac{S}{\sqrt{3}}$; si es una distribución triangular calcular con desviación estándar $\frac{S}{\sqrt{6}}$</p> <p>4. Calcular la incertidumbre combinada Después de estimar los componentes individuales o los grupos de componentes de la incertidumbre y de expresarlos como incertidumbres estándar, el siguiente paso es calcular la incertidumbre estándar combinada. Evaluar componentes que no se han incluido y calcular con un nivel de confianza de 95% y un factor de cobertura $k=2$ la incertidumbre expandida.</p> <p>9. CRITERIOS DE ACEPTACION</p>			
Parámetro de desempeño	Determinar	Reportar	Criterio de aceptación
Linealidad	Verificación de rango de trabajo del KIT mediante curva de calibración.	Graficar la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x)	Tendencia directamente proporcional con respecto a las concentraciones medidas
	<p>Calcular las estadísticas de regresión apropiadas</p> <p>Calcular y graficar los residuales (diferencia entre el valor observado "y" y el valor calculado de "y" pronosticado por la línea recta, para cada valor de "x"). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad o un cambio de varianza</p>	<p>Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica.</p> <p>Datos aleatorios en el gráfico de residuales</p> <p>Intervalo de trabajo: Pendiente, Intercepto, coeficiente de determinación.</p> <p>El intervalo de confianza del intercepto</p> <p>El intervalo de confianza de la pendiente</p> <p>Análisis de varianza</p>	<p>El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero</p> <p>El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad</p> <p>$r \geq 0.98$</p> <p>Residuales entre ± 1.5</p>

Cuadro N° 4. (Continuación)

Exactitud	Determinar el valor de Sesgo, error relativo porcentual o recuperación	Calcular el coeficiente de variación y el intervalo de confianza.	<p>Coeficiente de variación: <5 %</p> <p>El valor de la media debe incluirse en el intervalo</p> <p>Porcentaje de Recobro: 70 % - 110 %</p>
Precisión	<p>Repetibilidad</p> <p>Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido y determinar el ANOVA de los datos.</p>	Determina la repetibilidad como el coeficiente de variación porcentual	Coeficiente de variación: <5 %
	<p>Precisión intermedia</p> <p>Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido y determinar el ANOVA de los datos</p>	Coeficiente de variación porcentual y el análisis ANOVA de los datos	F _{cal} < F _{tab}
Limites	<p>Desviación estándar de la/s muestra/s de:</p> <p>a) Valores de blanco de muestra o</p> <p>b) Valores de los blancos de muestra fortificadas</p>	<p>Intervalo de trabajo: Pendiente, Intercepto, coeficiente de determinación.</p> <p>Calcular los límites de detección y cuantificación</p> <p>- Reportar Desviación estándar de la muestra (S) de:</p> <p>a) Valores de blanco de muestra o b) Valores de los blancos de muestra fortificadas</p>	<p>r ≥ 0.98</p> <p>El valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo</p>

Cuadro N° 4. (Continuación)

Incertidumbre	Especificar el mensurando Identificar las fuentes de incertidumbre Cuantificar los componentes de la incertidumbre (u) Calcular la incertidumbre estándar combinada (uc) Calcular la incertidumbre expandida (uexp)	Reportar la incertidumbre expandida con un factor de cobertura $k=2$ y un nivel de significancia del 95%.	Debe cumplir con la siguiente ecuación $y \text{ mg Cr}^{6+}/L \pm U$
<p>Fecha de Redacción: 02/2020</p> <p>Aprobado por: _____ Firma: _____</p> <p>Fecha de aprobación: 10/2022</p> <p>Aprobado por: _____ Firma: _____</p>			

El protocolo trató de enfatizar la parte analítica y las diferentes etapas del proceso de validación involucradas y de esta manera obtener resultados de alta calidad y un método confiable.

5.2 Evaluación de los parámetros de desempeño del método

El principal objetivo de esta investigación fue demostrar que el procedimiento analítico evaluado es apto para ser utilizado en el laboratorio en la identificación de Cromo Hexavalente en agua potable. La medición analítica fue llevada a cabo por medio del seguimiento de los parámetros de desempeño de linealidad, exactitud, precisión, límites y estimación de incertidumbre en la medición según lo que se especificó en el protocolo de validación.

5.2.1 Linealidad

5.2.1.1 Verificación de rango de trabajo del equipo mediante curva de calibración

En la verificación del rango de trabajo se prepararon 6 soluciones de concentración conocida, con la finalidad de comprobar que la cobertura del método es lo que rotulaba.

Para facilitar las diluciones se inició tomando una alícuota del estándar de referencia de 1000 ppm se preparó una solución concentrada o solución madre, que fue la base para realizar otra dilución de trabajo con la que al diluirla se obtuvieron las demás soluciones con menor concentración. Luego de su lectura dio lugar a la primera tabla de resultados (ver Tabla N° 18 en Anexo N° 22).

Al observar la respuesta del método fue el esperado verificando además del rango de trabajo, el sistema para provocar la reacción química y la respuesta del equipo. La medición de las concentraciones usando una longitud de onda de 540 nm fueron confiables sin presentar mayor diferencia en las distintas mediciones, por lo que en general el sistema se ajusta ya que hay una relación entre las variables, prueba de ello es el coeficiente de determinación $r^2 = 0.9997$ con una clasificación de grado de correlación dentro del valor esperado.

Para manifestar la relación de los datos obtenidos en la calibración del método analítico y la tendencia de la concentración de Cromo Hexavalente en una muestra, se presenta la siguiente gráfica (ver Figura N° 7).

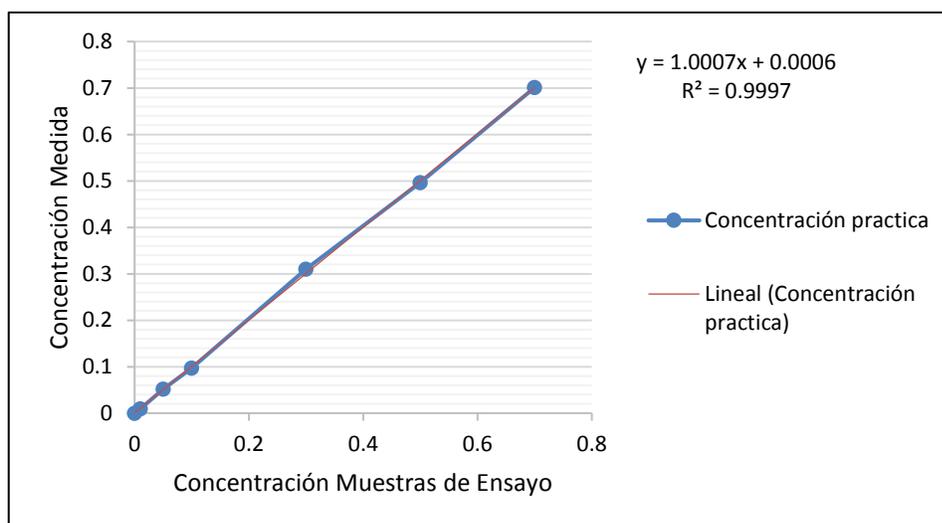


Figura N° 7. Gráfico de curva de calibración de verificación de rango de trabajo.

Al comparar la relación entre los valores de las magnitudes indicadas por el instrumento de medición y el material de referencia, se obtiene como resultado una tendencia positiva contra la de estándares de concentración conocida del mismo analito, por lo que, el kit es apto para su uso en la validación de este método.

5.2.1.2 Linealidad del método

La linealidad del método se demostró preparando a partir de la solución madre, 5 concentraciones distintas, la curva de calibrado se basó en el rango recomendado por las tablas de referencia AOAC en la guía de validación fisicoquímico de la OSA para la cuantificación del analito a nivel trazas ⁽³⁵⁾ las concentraciones fueron las siguientes 0.01 mg/L, 0.05 mg/L, 0.10 mg/L, 0.30 mg/L y 0.70 mg/L (2 %, 10 %, 20 %, 60 %, 140 %) cada uno de estos niveles se realizaron por triplicado, obteniendo un total de quince determinaciones más un blanco, se realizaron lecturas de cada solución a la longitud de 540nm, obteniéndose los resultados que se observan en la Tabla N° 19 en Anexo N° 22.

Al graficar los resultados obtenidos en la Figura N° 8 evaluamos la curva de calibración de la linealidad del método. Este ejercicio permitió evidenciar que el método analítico cuenta con la capacidad de obtener resultados en una dirección proporcional, es decir, la concentración o cantidad del analito en un rango definido mantiene un comportamiento lineal

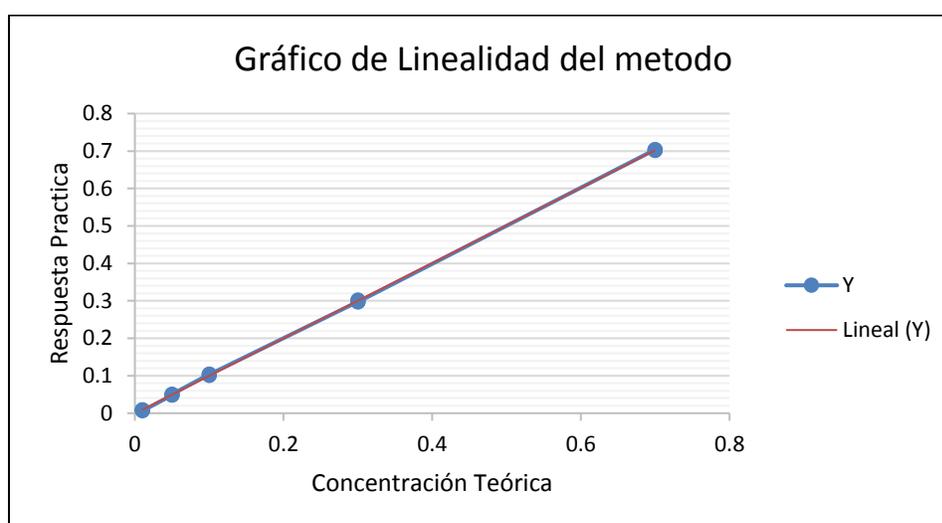


Figura N° 8. Curva de calibración en la determinación de Cromo Hexavalente.

Para verificar los datos se procedió a calcular estadísticamente el método de estimación por mínimos cuadrados, proporcionando los datos necesarios para obtener los resultados que se presentan en la Tabla N° 5 (ver cálculos y Tabla N° 24 en Anexo N° 23).

Tabla N° 5. Resumen estadístico de Linealidad

Prueba estadística	Resultado		
Pendiente (b_1)	1.00405		
Ordenada al origen (b_0)	-0.0007396		
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9999		
	1.004054	±	0.005376240
Intervalo de confianza de la pendiente ($IC(\beta_1)$)	Superior		0.998677760
	Inferior		1.009430240
	-0.0007396	±	0.001850913
Intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$)	Superior		-0.002590513
	Inferior		0.001111313
Coefficiente de variación de regresión (cv_{xy}),	1.05%		

El coeficiente de correlación da como resultado $r^2 = 0.9999$, el criterio por el que se requirió este cálculo especifica que debe ser mayor a 0.98 indicando una linealidad adecuada del método y una buena predicción a cerca de los resultados.

Con este análisis obtuvimos que el intervalo de confianza para la pendiente comprende la unidad por lo que es un criterio de aceptación conforme al resultado del método.

Por otra parte, el intervalo de confianza para la ordenada al origen de muestras a diferentes concentraciones incluye el cero y está en coordenadas de negativo a positivo determinando un intervalo aceptable por su análisis estadístico.

Al evaluar la linealidad del método el conjunto de datos obtenidos nos da a conocer que la dispersión de los resultados es aceptable esto con respecto al analito de interés debido a que el coeficiente de variación (1.05%) es menor al propuesto (5%).

La prueba de hipótesis usando t-student con 95% de confianza para la pendiente se obtuvo que t calculado fue igual a 310.18, si $t_{cal} \geq t_{tabla}$ ($310.18 \geq 2.160$) la hipótesis nula se rechaza en vista a que la pendiente es significativamente diferente de uno (1.0041).

Para el intercepto la prueba de hipótesis para t calculado es igual a -271.605, asumiendo que para la prueba de hipótesis si t de tabla $\geq t_{cal}$ ($-2.160 \geq -271.605$), se rechaza la hipótesis nula en este resultado se acepta debido a que el intercepto es diferente de cero significativamente (-0.0007).

En el análisis de varianza se elaboró la Tabla N° 6 donde se resume los resultados de los estadísticos quedando de la siguiente manera (ver calculo en Anexo N° 23).

Tabla N° 6. Análisis de varianza de la regresión lineal

	GI	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F_{cal}	$F_{(0.05)}$
Regresión	1	0.9783	0.9783	978.30	4.67
Error	15-2=13	0.0015	0.1×10^{-3}	n= 15	
Total	15-1=14	0.9798	0.07		

Al analizar los resultados en conjunto el ANOVA de los datos para una distribución F de Fisher al 95% para un grado de libertad y $n= 13$; partiendo de la hipótesis en el cual si F_{calc} es mayor o igual a F de tabla se acepta H_a y se rechaza H_o el criterio se acepta ($978.30 \geq 4.67$) mostrando un modelo lineal adecuado.

Un residual es la diferencia entre el valor observado y el valor estimado por la línea de regresión, es decir $Residuo = (Y_i - \hat{Y}_i)$ se puede ver en la Tabla N° 25 en el Anexo N° 23 el valor de los residuales.

Haciendo uso de los datos obtenidos en la Tabla N° 5 formamos una ecuación de regresión lineal con el objetivo de encontrar nuevas concentraciones ($y = 1.00405x - 0.0007396$). En la cual el valor de (x) se sustituye con los datos de las concentraciones medidas.

Estas nuevas concentraciones fueron utilizadas para analizar y nombrar con propiedad de que el modelo de regresión lineal en los errores de estimación es constante a lo largo de las observaciones, así si una varianza es constante nos permite disponer de que el modelo es más fiable.

Como se observa en la Figura N° 9 los residuales de la linealidad del método, presenta una distribución aleatoria y no refleja tendencias, demostrándose la ausencia de error sistemático por lo que el método es válido debido a que cumple con el supuesto del modelo lineal.

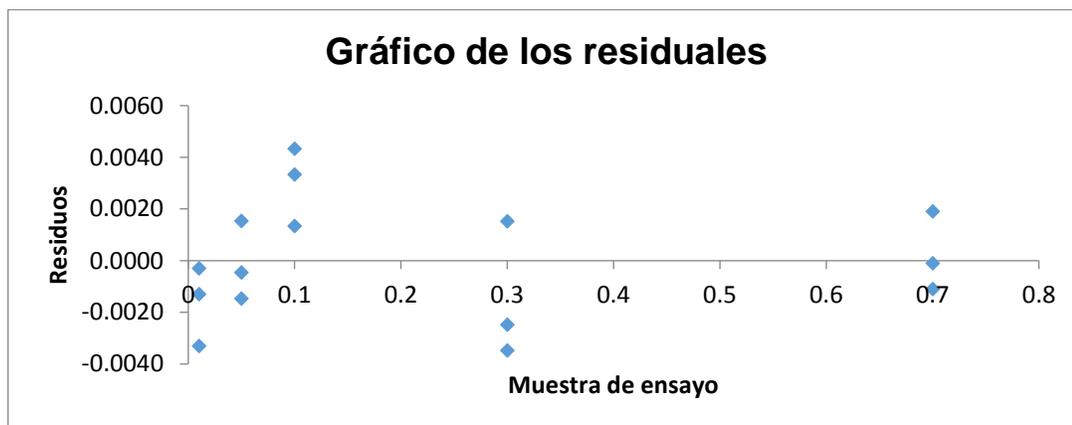


Figura N° 9. Análisis residual de la linealidad

5.2.2 Exactitud

La exactitud fue evaluada utilizando el material de referencia en este caso las soluciones de estándar de Cromo Hexavalente que mediante 3 réplicas en las concentraciones de: 0.010 mg/L, 0.050 mg/L y 0.100 mg/L (2%, 10% y 20%) obteniendo los resultados de la Tabla N° 20 en el Anexo N° 22.

Al procesar los resultados se demostró la cantidad recuperada de cada muestra utilizando el método de análisis, estos resultados se encuentran en la Tabla N° 26 en el Anexo N° 23. Al obtener los datos, se calculó estadísticamente los requerimientos necesarios para su análisis y darles cumplimiento a los criterios, en la Tabla N° 7 se muestran los resultados.

Tabla N° 7. Resultados estadísticos del parámetro de exactitud.

Prueba estadística	Resultado	
Media aritmética (\bar{X})	0.9814	
Desviación estándar (S)	0.0221	
Coeficiente de variación (CV)	2.25%	
	0.9814 ± 0.016987533	
Intervalo de confianza ($IC_{(\mu)}$)	Superior	0.998387533
	Inferior	0.964412467

En este resultado conocemos que para un análisis de intervalo de trabajo debe verse incluido un valor que figure entre el límite superior e inferior de los resultados, para la exactitud el intervalo incluye la media aritmética (0.9814) por lo que las mediciones se acercan al valor verdadero siendo exactos.

Para determinar la concentración o el grado de cercanía de los datos en torno a las concentraciones de adición conocida, se calculó la recuperación aparente ($R(\%)$) los resultados obtenidos junto a las ecuaciones utilizadas para su resolución se encuentran en la Tabla N° 27 del Anexo N° 23.

Al analizar la cercanía de los resultados al valor verdadero, se estimó además un componente común de error sistemático o sesgo dando como resultado -0.001, -0.001 y -0.002 y el error porcentual -3.33%, -2.0 y -2.0 lo cual es aceptable ya que en comparación con los valores aceptados como real las cantidades de sesgos negativos solo implica la existencia de valores bajos de la variable obtenidas experimentalmente, eso reafirma los datos obtenidos en el análisis debido que al evaluar el porcentaje de recuperación se obtuvo 96.67%, 98.0% y 98.0% dichos porcentajes que aunque no son precisos si son exactos encontrándose entre el rango de los porcentajes de recobro del criterio de aceptación (70%-110%) verificando de esta manera que el método es exacto.

5.2.3 Precisión

Esta característica de validación fue realizada con la preparación de 10 soluciones de estándar correspondiente a la concentración de 0.05 mg/L Cr^{6+} , además se analizaron 10 muestras en presencia de matriz en este caso agua de consumo humano, manteniendo las condiciones de: día, instrumento y laboratorio en la Tabla N° 21 en el Anexo N° 22 se puede observar la lectura de los resultados de estándares y muestras para evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia.

La estimación de la repetibilidad del método se realizó con el cálculo del porcentaje de recobro para medir la proporción de concordancia en respuesta al método, variación que se observa cuando el analista mide la misma parte muchas veces logrando la repetibilidad siempre que se conserven las mismas condiciones en la Tabla N° 28 en el anexo N° 23 se presenta los resultados.

Es importante para este parámetro tomar en cuenta que para la precisión intermedia los resultados de repetibilidad fueron utilizados como el analista 1.

Con los resultados del cálculo de porcentaje de recobro se plantearon estadísticos para conocer el coeficiente de variación y los intervalos de confianza en los niveles de concentración estudiados en la Tabla N° 8 se presentan los resultados (ver cálculos en Anexo N° 23).

Tabla N° 8. Resultados estadísticos del parámetro de precisión.

Prueba estadística	Resultado
Media aritmética (\bar{y})	27.26%
Desviación estándar (S)	2.82%
Coeficiente de variación (CV)	0.1%
	27.26% ± 2.017344675
Intervalo de confianza ($IC_{(\mu)}$)	Superior 29.28%
	Inferior 25.24%

El coeficiente de variación al ser menor que el criterio de aceptación (5%) nos indica que la dispersión es casi nula y como se puede ver la media de los resultados 27.26% se encuentra dentro del intervalo de trabajo que comprende del 25.24% al 29.28%, por lo que, el método es preciso.

Para la precisión intermedia es necesario estimar por un análisis de varianza para comprobar si existe un cambio significativo con respecto a las variables y las condiciones de análisis de este parámetro, previo a esto es necesario obtener datos de recuperación en la Tabla N° 29 del Anexo N° 23 se reflejan los resultados.

Con los datos obtenidos se inicia el análisis de Varianza (ANOVA) en la Tabla N° 9 se resume los resultados obtenidos para estudiar si no existe una diferencia significativa entre los dos grupos de mediciones a diferentes condiciones, el desarrollo de los cálculos se encuentra en el Anexo N° 23.

Tabla N° 9. Análisis de varianza de la precisión intermedia

	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F_{cal}	$F_{(0.05)}$
α_i	1	3.7845	3.7845	0.365239882	4.41
Error	2(10-1)=18	186.5103	10.36168333		
Total	19	190.2948	10.01551579		

Los resultados de la serie repetida de ensayos analíticos que se realizaron sobre 10 réplicas de una muestra de agua de consumo humano para precisión intermedia en la prueba de varianza evaluada por medio del estadístico de distribución F de Fisher-Snedecor resultó que para $F_{\text{calculado}} = 0.36$, es conforme según el criterio de aceptación donde $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ ($0.36 < 4.41$), por lo tanto, en el planteamiento de la hipótesis nula en el que las varianzas son iguales se acepta y se considera que el método es preciso bajo las condiciones a las que fue adaptado.

5.2.4 Límites

Para la determinación de la cantidad mínima y la cantidad máxima que puede cuantificar y detectar el método de análisis (rango de trabajo) para Cromo Hexavalente se elaboraron 10 muestras fortificadas a concentraciones conocidas en el rango de medición del reactivo con las siguientes concentraciones: 0.005 mg/L, 0.006 mg/L, 0.007 mg/L, 0.008 mg/L, 0.009 mg/L a partir de una solución 0.500 mg/L. Debemos recordar que este parámetro puede formar parte de la verificación para el método que se desea validar antes de ponerlo en uso, los resultados de las lecturas se encuentran en la Tabla N° 22 en el Anexo N° 22.

Para comprobar los datos se determinó el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza de la pendiente, con la estimación de mínimos cuadrados, a continuación, se presentan los resultados. La resolución estadística se encuentra en la Tabla N° 30 en el Anexo N° 23.

Tabla N° 10. Resumen estadístico de límites.

Prueba estadística	Resultado	
Pendiente (b_1)	0.9207	
Ordenada al origen (b_0)	-0.000052786	
Coeficiente de determinación (r^2)	0.9992	
	0.9207 ± 0.007504357	
Intervalo de confianza de la pendiente ($IC(\beta_1)$)	Superior	0.928204357
	Inferior	0.913195643

Las muestras fortificadas resultaron estar dentro de los parámetros esperados ya que para un coeficiente de determinación de 0.99 los datos son fiables presentando una nula variación en la medición. En cuanto al resultado del intervalo de confianza la pendiente obtenida en el estudio está dentro del intervalo del valor que se considera real por lo que el método es el más adecuado a utilizar.

La determinación del límite de detección y de cuantificación se realiza mediante el cálculo de la desviación estándar de las mediciones del blanco en la tabla N° 23 en el Anexo N° 22 se observan los resultados de estas mediciones y en la Tabla N° 11 los resultados. Los cálculos se realizaron conforme a la Tabla N° 31 en el Anexo N° 23.

Tabla N° 11. Resultados de límites de detección y de cuantificación.

Desviación estándar (S_b)	0.000675
Límite de detección (LD)	0.0024
Límite de cuantificación (LC)	0.007

En la determinación de límites se dio lectura a 10 blancos durante el desarrollo experimental para obtener mediante la ejecución estadística la desviación estándar encontrando que la menor cantidad donde la señal es distinguida de la del ruido es 0.002 mg/L y la concentración límite de cuantificación bajo las condiciones de trabajo del laboratorio fue 0.007 mg/L.

5.2.5 Incertidumbre

La incertidumbre es una forma de expresar que, para un mesurando y su resultado de medición, no hay un solo valor, sino un número con valores dispersos alrededor del resultado, que son provocados por las observaciones de datos.

Para calcular la incertidumbre de los resultados en la medición atribuidos al mesurando que en este caso son las concentraciones de Cromo Hexavalente Cr^{6+} en agua de consumo humano se siguió el procedimiento de la guía de estimación de incertidumbre (ver Anexo N° 19) partiendo de un modelo matemático que involucre los factores que intervienen en las mediciones (ver anexo N° 23), donde la sumatoria de todos estos conlleven a un solo valor que recopile la totalidad de las incertidumbres.

La primera fue la concentración (mg/L) de Cromo Hexavalente medido en el instrumento a través de la curva de calibración. El cálculo de esta incertidumbre se elaboró utilizando la ecuación de línea recta del parámetro de linealidad conformada por la pendiente y el intercepto ($y = 1.0041x - 0.0007$) dando como resultado 0.0015 (ver Anexo N° 23).

La segunda incertidumbre evaluada fue la del factor de dilución en total fueron 3 los que afectaron la medición a estos se incluyeron y se combinaron otras fuentes de incertidumbre, como lo fueron la incertidumbre del volumen de aforo de muestras y volumen de la alícuota y se representó a través de una ecuación (ver Anexo N° 23).

Al combinar las incertidumbres de volumen fue necesario conocer la incertidumbre debida al material volumétrico e identificar también las otras fuentes que afectan la medición, en este paso se tomó en cuenta los certificados de calibración. En la Tabla N° 32 del Anexo N° 23 se encuentran los datos y el modelo matemático utilizado para este cálculo.

Cada incertidumbre debida al material volumétrico se vio afectado además por 3 factores la repetibilidad, la calibración y la variabilidad de temperatura cada una fue evaluada por separado (ver ecuación en Anexo N° 23).

La incertidumbre de la repetibilidad fue determinada por cada instrumento que estuvo involucrado en la dilución del estándar de referencia. El cálculo se realizó como se puede observar en las Tablas de la N° 33 a la N° 35 en el Anexo N° 23. Para la incertidumbre de la calibración de los materiales volumétricos fue necesario conocer la incertidumbre expandida emitida por los proveedores o servicios de calibración, estos datos y la ecuación utilizada se encuentran en LA Tabla N° 36 del Anexo N° 23. La incertidumbre de la variabilidad de la temperatura también fue estudiada con una ecuación que involucra las temperaturas tanto al momento de la medición como la que refiere el material de medición (ver Anexo N° 23).

Luego del desarrollo de los cálculos para la estimación de las incertidumbres de los 3 factores de disolución, los resultados fueron 0.028, 0.007 y 0.283 (ver Tablas N° 37 y N° 38 en el Anexo N° 23).

La tercera y ultima incertidumbre involucrada fue la del estándar de referencia certificado (ERC); el material de referencia Chromium standard solution 1000 mg/L Cr contiene una incertidumbre asociada (incertidumbre expandida $U_{EXP} \pm 5.0$ mg/Kg ≈ 5.0 mg/L según proveedor) la cual fue trasformada en incertidumbre

estándar dio como resultado 2.5 mg/L, en su preparación para tener una solución a la concentración de 0.05 mg/L se realizaron 3 diluciones se planteó un modelo matemático y una fórmula el cual al resolverla se obtuvo una incertidumbre de 0.0002. (ver cálculos en Anexo N° 23).

El criterio para evaluar la incertidumbre consistía en la combinación de las fuentes de todos los contribuyentes una vez se conociera la incertidumbre estándar, pero en este punto debía considerarse incertidumbres que no fueron tomadas en cuenta en las categorías antes evaluadas siendo una la incertidumbre de la repetibilidad de la muestra, el cual para su cálculo se utilizaron los resultados del parámetro de precisión obteniendo como resultado la incertidumbre estándar de 1.461949×10^{-3} que multiplicada por la concentración de masa obtenida en las mediciones se obtuvo el resultado de 0.0154 el cual es el valor de la incertidumbre derivada de la concentración. (ver cálculo y Tabla N° 39 en Anexo N° 23)

En el cálculo de la incertidumbre combinada el resultado fue de 0.2845 pero este dato es una incertidumbre relativa es decir adimensional por lo que fue necesario multiplicarla por la incertidumbre derivada de la concentración por el cual se obtuvo que la incertidumbre combinada es igual a 0.0044 mg/L. Considerando un nivel de confianza de 95% y un factor de cobertura $k=2$, la incertidumbre de la medición es $\mu=0.0088$ mg/L, y finalmente se representa de la siguiente manera ⁽¹⁵⁾: $[Cr^{6+} = (0.0139 \pm 0.0088) \text{ mg/L}$

Para un mejor análisis sobre la contribución relativa de las fuentes de incertidumbre identificadas se representan los diferentes datos de las fuentes obteniendo la siguiente gráfica ver Figura N° 10.

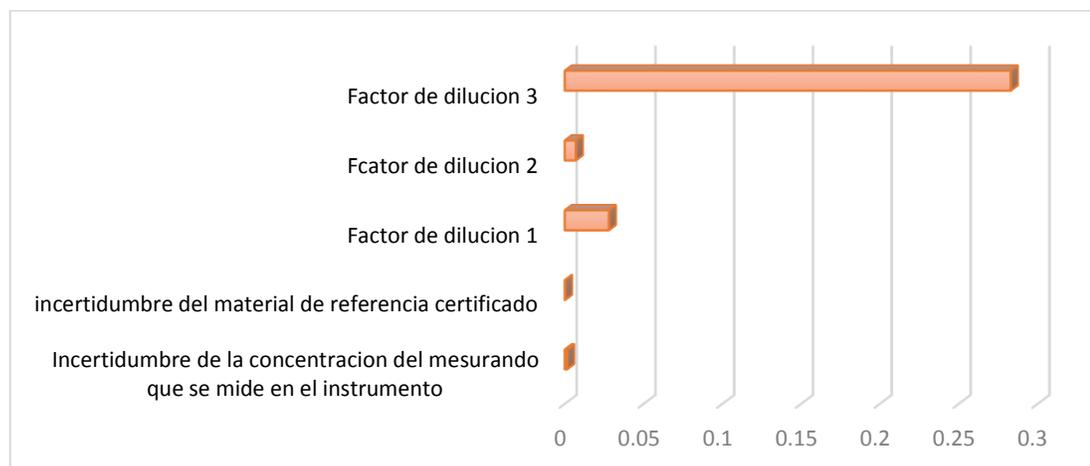


Figura N° 10. Contribución de incertidumbres en la medición

Al expresar la duda o incertidumbre que se tiene del resultado de medición para la metodología de Cromo Hexavalente se tomó en cuenta la guía Técnica sobre Trazabilidad e Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que emplea la técnica de Espectrofotometría de Ultravioleta-Visible y el modelo matemático, por lo que de acuerdo al método de regresión lineal resulto que la incertidumbre será de ± 0.0088 mg/L y donde según la Figura N° 10 la mayor contribución de incertidumbre a los resultados es debido al factor de disolución⁽⁴⁵⁾.

5.3 Informe de validación

Para finalizar se presenta el informe de los resultados obtenidos comparados con los criterios que rigen la aprobación del método de la 1,5-Difenilcarbohidrazida para la determinación de Cromo Hexavalente en agua potable.

Cuadro N°5. Informe de validación del método 1,5-Difenilcarbohidrazida

	INFORME DE VALIDACION DEL METODO DE ANALISIS DE 1,5-DIFENILCARBOHIDRAZIDA	Código: ICH06	
		Fecha: 13/10/2021	
		Revisión #1	
		Cambio #1	
		Pág. N° 1 de	
Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador			
Protocolo de Referencia: Validación del Método de Análisis de 1,5-Difenilcarbohidrazida Codigo: PCH06			
Estándar utilizado: Estándar de Cromo 1000 µg/mL Lote: HC99974679 Fecha de vencimiento: 2022/06/30 Ver certificado de análisis			
Resultados analíticos de los parámetros de validación			
Parámetro de desempeño	Resultados		
Linealidad	Verificación de rango de trabajo del equipo mediante curva de calibración		
	Medición Del rango declarado por el kit		
	Resultados:		
	Tubo	Concentración de Muestras	Concentración Medida
	Blanco	0.000	0.000
	1	0.010	0.009
	2	0.050	0.050
	3	0.100	0.098
	4	0.300	0.299
	5	*0.500	0.496
6	0.700	0.700	

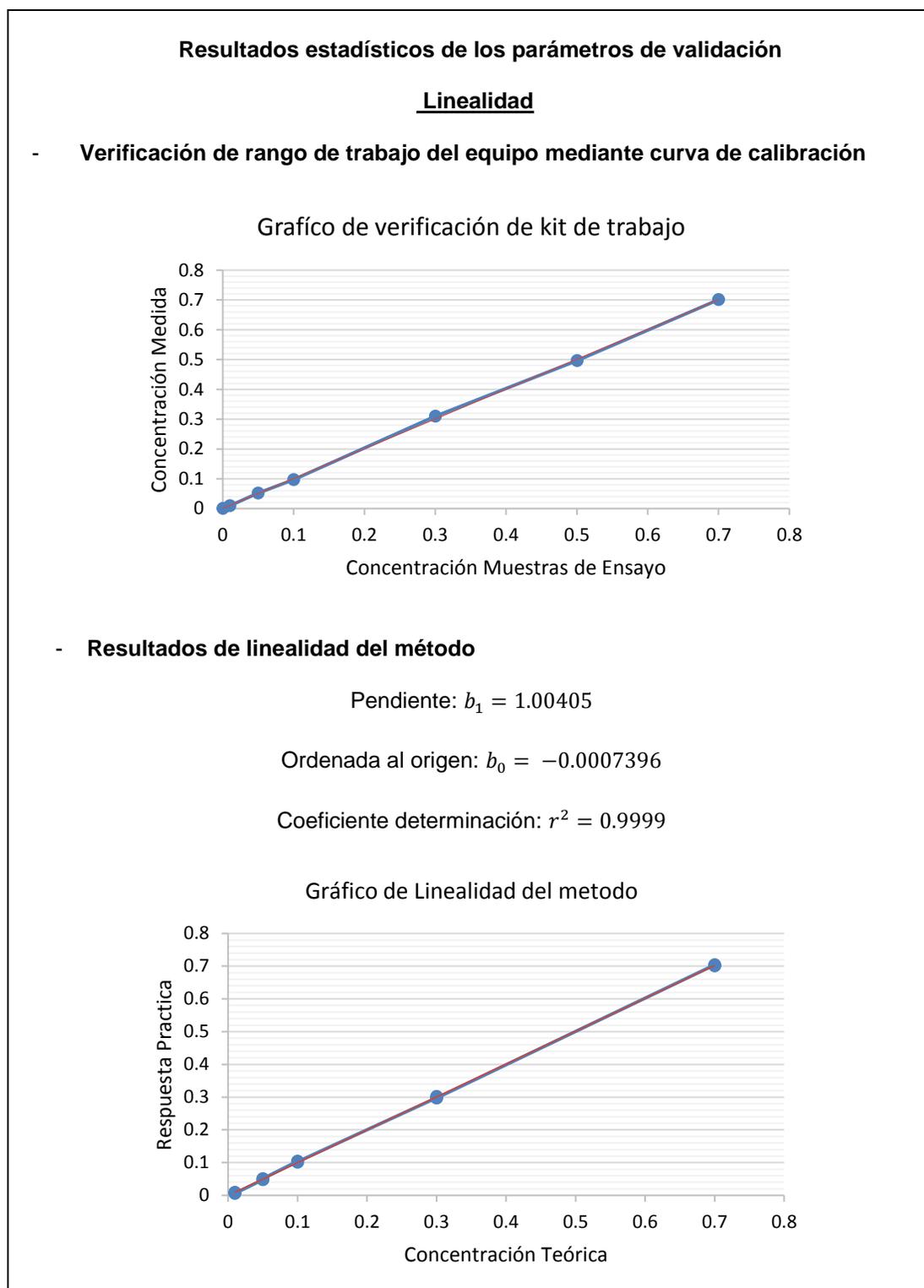
Cuadro N°5. (Continuación)

Linealidad continuación	Linealidad del método																																
	<p>Por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración de la solución de referencia</p> <p>Resultados:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Concentración teórica</th> <th>Respuesta Practica</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.01</td><td>0.009</td></tr> <tr><td>0.01</td><td>0.008</td></tr> <tr><td>0.01</td><td>0.006</td></tr> <tr><td>0.05</td><td>0.048</td></tr> <tr><td>0.05</td><td>0.049</td></tr> <tr><td>0.05</td><td>0.051</td></tr> <tr><td>0.10</td><td>0.104</td></tr> <tr><td>0.10</td><td>0.101</td></tr> <tr><td>0.10</td><td>0.103</td></tr> <tr><td>0.30</td><td>0.298</td></tr> <tr><td>0.30</td><td>0.302</td></tr> <tr><td>0.30</td><td>0.297</td></tr> <tr><td>0.70</td><td>0.704</td></tr> <tr><td>0.70</td><td>0.702</td></tr> <tr><td>0.70</td><td>0.701</td></tr> </tbody> </table>		Concentración teórica	Respuesta Practica	0.01	0.009	0.01	0.008	0.01	0.006	0.05	0.048	0.05	0.049	0.05	0.051	0.10	0.104	0.10	0.101	0.10	0.103	0.30	0.298	0.30	0.302	0.30	0.297	0.70	0.704	0.70	0.702	0.70
Concentración teórica	Respuesta Practica																																
0.01	0.009																																
0.01	0.008																																
0.01	0.006																																
0.05	0.048																																
0.05	0.049																																
0.05	0.051																																
0.10	0.104																																
0.10	0.101																																
0.10	0.103																																
0.30	0.298																																
0.30	0.302																																
0.30	0.297																																
0.70	0.704																																
0.70	0.702																																
0.70	0.701																																
Exactitud Como % de Recuperación.	<p>Un analista debe: Preparar tres (3) series de 3 muestras fortificadas es decir que a cada serie se le adiciona una cantidad conocida del analíto.</p> <p>1º serie</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Valor Blanco</th> <th>Adición ppm</th> <th>Valor 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>0.001</td><td>0.03</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>2</td><td>0.001</td><td>0.03</td><td>0.029</td></tr> <tr><td>3</td><td>0.001</td><td>0.03</td><td>0.029</td></tr> </tbody> </table>				Valor Blanco	Adición ppm	Valor 2	1	0.001	0.03	0.03	2	0.001	0.03	0.029	3	0.001	0.03	0.029														
		Valor Blanco	Adición ppm	Valor 2																													
	1	0.001	0.03	0.03																													
	2	0.001	0.03	0.029																													
	3	0.001	0.03	0.029																													
	<p>2º serie</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Valor Blanco</th> <th>Adición ppm</th> <th>Valor 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>0.001</td><td>0.05</td><td>0.051</td></tr> <tr><td>2</td><td>0.001</td><td>0.05</td><td>0.048</td></tr> <tr><td>3</td><td>0.001</td><td>0.05</td><td>0.049</td></tr> </tbody> </table>				Valor Blanco	Adición ppm	Valor 2	1	0.001	0.05	0.051	2	0.001	0.05	0.048	3	0.001	0.05	0.049														
		Valor Blanco	Adición ppm	Valor 2																													
	1	0.001	0.05	0.051																													
	2	0.001	0.05	0.048																													
	3	0.001	0.05	0.049																													
<p>3º serie</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Valor Blanco</th> <th>Adición ppm</th> <th>Valor 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>-0.001</td><td>0.1</td><td>0.097</td></tr> <tr><td>2</td><td>0.001</td><td>0.1</td><td>0.099</td></tr> <tr><td>3</td><td>0</td><td>0.1</td><td>0.098</td></tr> </tbody> </table>				Valor Blanco	Adición ppm	Valor 2	1	-0.001	0.1	0.097	2	0.001	0.1	0.099	3	0	0.1	0.098															
	Valor Blanco	Adición ppm	Valor 2																														
1	-0.001	0.1	0.097																														
2	0.001	0.1	0.099																														
3	0	0.1	0.098																														

Cuadro N°5. (Continuación)

Precisión como Repetibilidad y Precisión Intermedia	Al menos 10 réplicas de una muestra de agua de consumo humano			
	Resultados:			
		Analista 1	Analista 2	
	1	0.015	0.015	
	2	0.014	0.015	
	3	0.013	0.015	
	4	0.016	0.015	
	5	0.015	0.013	
	6	0.015	0.012	
	7	0.015	0.014	
	8	0.012	0.016	
	9	0.011	0.013	
10	0.013	0.011		
Repetibilidad del método	Concentración teórica del estándar preparado a partir de: 0.50 mg/L de Cr ⁶⁺			
	Resultados:			
	N°	Concentración	N°	Concentración
	1	0.049	6	0.051
	2	0.049	7	0.051
	3	0.051	8	0.048
	4	0.048	9	0.049
5	0.049	10	0.050	
Limites	A partir de la solución 0.5 mg/mL se preparó por triplicado las concentraciones.			
	Resultados:			
	N°	Concentración Teórica	Concentración Recuperada	
	1	0.005	0	
	2	0.005	0	
	3	0.006	0.0067	
	4	0.006	0.0067	
	5	0.007	0.0077	
	6	0.007	0.0077	
	7	0.008	0.0087	
	8	0.008	0.0077	
9	0.009	0.0097		
10	0.009	0.0097		

Cuadro N°5. (Continuación)



Cuadro N°5. (Continuación)

Prueba de hipótesis					
Análisis de varianza de la regresión lineal					
	GI	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F _{cal}	F _(0.05)
Regresión	1	0.9783	0.9783	978.30	4.67
Error	15-2=13	0.0015	0.1×10^{-3}	n= 15	
Total	15-1=14	0.9798	0.07		
<p>H₀: El modelo lineal no es adecuado H_a: El modelo lineal es adecuado Se rechaza H₀, si F_{calc} es mayor o igual a F de tabla y se acepta H_a ($978.30 \geq 4.67$)</p>					
4.4.7.1.1 Análisis residual de la linealidad del sistema					
Crterios de aceptación					
Parámetro	Criterio	Resultado	Conformidad		
Linealidad	El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad	$IC(b_1) = 1.00405 \pm 0.005376240$	Conforme		
	El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero	$IC(b_0) = -0.0007396 \pm 0.001850913$			
	$r \geq 0.98$	$r^2 = 0.9999$			
	Residuales entre ± 1.5	Máximo = 0.0043 Mínimo = -0.0035			

Cuadro N°5. (Continuación)

<u>Exactitud</u>					
Media aritmética: $\bar{X} = 0.9814 = 98.14\%$					
Desviación estándar: $S = 0.0221$					
Coeficiente de variación: $CV = 2.25\%$					
Intervalo de confianza: $IC(\mu) = 0.9814 \pm 0.016987533$					
Cálculo de cantidad recuperada a partir de una concentración conocida.					
Adición ppm (mg/L) X_{ref}	Concentraciones experimentales	Promedio (\bar{X})	Sesgo b $\bar{X} - X_{ref}$	Error relativo porcentual $b(\%)$ $\frac{\bar{X} - X_{ref}}{X_{ref}} * 100$	Recuperación aparente $R(\%)$ $\frac{\bar{X}}{X_{ref}} * 100$
0.03	0.03	0.029	-0.001	-3.33	96.67%
0.03	0.029				
0.03	0.029				
0.05	0.051	0.049	-0.0010	-2.00	98.0%
0.05	0.048				
0.05	0.049				
0.1	0.097	0.098	-0.002	-2.0	98.0%
0.1	0.099				
0.1	0.098				
<u>Criterios de aceptación</u>					
Parámetro	Criterio	Resultado	Conformidad		
Exactitud	Coeficiente de variación: <5 % El valor de la media debe incluirse en el intervalo Porcentaje de Recobro: 70 % - 110 %	$CV = 2.25\%$ $IC(\mu) = 0.9814 \pm 0.016987533$: $\bar{X} = 0.9814 = 98.14\%$	Conforme		

Cuadro N°5. (Continuación)

<u>Precisión</u>					
<u>Repetibilidad</u>					
Media aritmética: $y = 27.26\%$					
Desviación estándar: $S = 2.82\%$					
Coeficiente de variación: $CV = 0.1\%$					
Intervalo de confianza: $IC(\mu) = 27.26\% \pm 2.017344675$					
		Superior	29.28%		
		Inferior	25.24%		
<u>Precisión Intermedia</u>					
<u>Prueba de hipótesis</u>					
Análisis de varianza de la Precisión Intermedia					
	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F_{cal}	F_(0.05)
<i>ai</i>	1	3.7845	3.7845	0.365239882	4.41
Error	2(10-1)=18	186.5103	10.36168333		
Total	19	190.2948	10.01551579		
H ₀ : Las varianzas son iguales $sx^2_1 = sx^2_2$					
H _a : Las varianzas son distintas $sx^2_1 \neq sx^2_2$					
Si F _{calc} es menor o igual a F de tabla se acepta H ₀ y se rechaza H _a , F _{calc} < F _{tab}					
<u>Criterios de aceptación</u>					
Parámetro	Criterio	Resultado			Conformidad
Repetibilidad	Coeficiente de variación: <5 %	$CV = 0.1\%$			Conforme
Precisión intermedia	F _{cal} < F _{tab}	(0.365 < 4.41)			Conforme

Cuadro N°5. (Continuación)

<u>Limites</u>			
Pendiente: $b_1 = 0.9207$			
Ordenada al origen: $b_0 = -0.000052786$			
Coeficiente de determinación: $r^2 = 0.9992$			
Intervalo de confianza para la pendiente			
$C(\beta_1) = 0.9207 \pm 0.007504357$			
Inferior		0.913195643	
Superior		0.928204357	
Desviación estándar: $S_b = 0.000675$			
Límite de detección			
$LD = \frac{3.3 \times 0.000675}{0.9207} = 0.0024$			
Límite de cuantificación			
$LC = \frac{10 \times 0.000675}{0.9207} = 0.007$			
<u>Criterios de aceptación</u>			
Parámetro	Criterio	Resultado	Conformidad
Limites	$r \geq 0.98$	$r^2 = 0.9992$	Conforme
	El valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo	$C(\beta_1) = 0.9207 \pm 0.007504357$	

Cuadro N°5. (Continuación)

Incertidumbre

La incertidumbre combinada:

$$U_{combinada} = \sqrt{(0.0015)^2 + (0.0002)^2 + (0.028)^2 + (0.007)^2 + (0.283)^2} = 0.2845$$

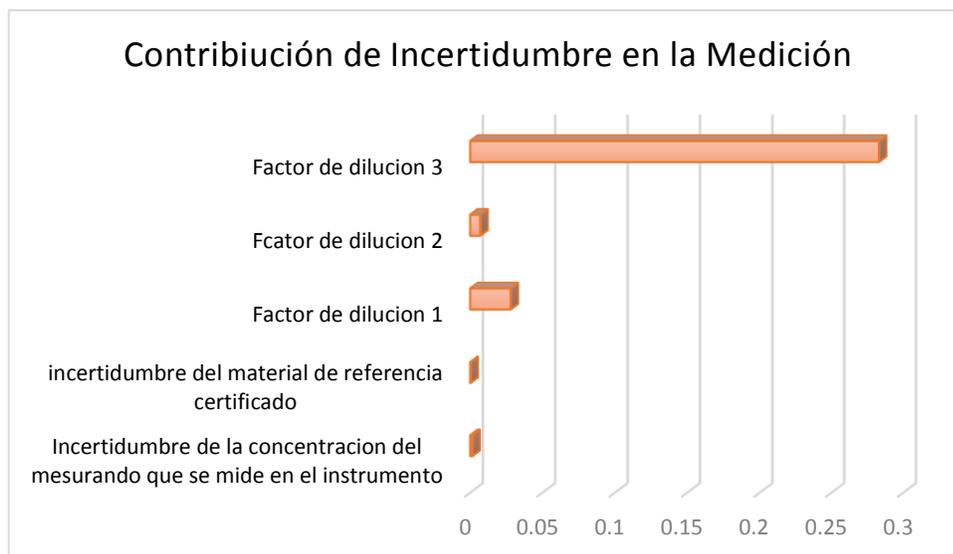
Considerando un nivel de confianza de 95% y un factor de cobertura $k=2$ se calcula la incertidumbre expandida de este método obtenido lo siguiente:

$$U_{exp} = U_I * k$$

$$U_{exp} = 0.0044 \text{ mg/L} * 2 = 0.0088 \text{ mg}$$

La expresión que representa la incertidumbre de la medición es la siguiente:

$$[]Cr^{6+} = (0.0139 \pm 0.0088) \text{ mg/L}$$

**Criterios de aceptación**

Parámetro	Criterio	Resultado	Conformidad
Incertidumbre	Debe cumplir con la siguiente ecuación $y \text{ mg } Cr^{6+}/L \pm U$	$[]Cr^{6+} = (0.0139 \pm 0.0088) \text{ mg/L}$	Conforme

Cuadro N°5. (Continuación)

Cuadro resumen de los resultados obtenidos			
Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado	Declaración de conformidad
Linealidad	Tendencia directamente proporcional con respecto a las concentraciones medidas	Lineal	Conforme
	El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero $r \geq 0.98$ Residuales entre ± 1.5	$IC(b_1) = 1.00405 \pm 0.005376240$ $IC(b_0) = -0.0007396 \pm 0.001850913$ $r^2 = 0.9999$ Máximo = 0.0043 Mínimo = -0.0035	
Exactitud	Coeficiente de variación: <5 % El valor de la media debe incluirse en el intervalo Porcentaje de Recobro: 70 % - 110 %	$CV = 2.25\%$ $IC(\mu) = 0.9814 \pm 0.016987533$: $\bar{X} = 0.9814 = 98.14\%$	Conforme
Repetibilidad	Coeficiente de variación: <5 %	$CV = 0.1\%$	Conforme
Precisión intermedia	$F_{cal} < F_{tab}$	(0.365 < 4.41)	Conforme
Limites	$r \geq 0.98$ El valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo	$r^2 = 0.9992$ $C(\beta_1) = 0.9207 \pm 0.007504357$	Conforme
Incertidumbre	Debe cumplir con la siguiente ecuación $y \text{ mg } Cr^{6+} / L \pm U$	$[]Cr^{6+} = (0.0139 \pm 0.0088) \text{ mg/L}$	Conforme

Cuadro N°5. (Continuación)

<p>Conclusiones</p> <p>Los resultados obtenidos en esta validación confirman que el método de la 1, 5 Difenilcarbohidrazida es apto para la determinación de Cr^{6+} en agua de consumo humano y puede ser de uso rutinario ya que cumplió con los parámetros mínimos de validación propuestos en la metodología y se puede garantizar la confiabilidad en los resultados.</p> <p>Declaración de Aptitud del Método: Validado</p> <p>Fecha de elaboración del informe: 10/2022</p> <p>Analistas responsables: Meibelyn Magdalena Guerra Lara (Analista 1) Evelin Veronica Pineda Merino (Analista 2)</p>

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los resultados de los parámetros evaluados mostraron ser exactos, precisos y lineales, lo que contribuye garantizar la confiabilidad del método.
2. Se demostró que el método es específico y robusto incluso cuando es desarrollado por diferentes analistas, por lo que es idóneo para su uso.
3. Las concentraciones medidas espectrofotométricamente en el rango de 0.010 a 0.700 mg/L presentan una respuesta conforme a la formación del complejo 1,5-Difenilcarbohidrazona.
4. La incertidumbre proporcionada por el factor de dilución es el que más predomina y aporta al cálculo de la incertidumbre combinada, pero no afecta la fiabilidad de los resultados.
5. La incertidumbre de medición de $\pm 0.0088 \text{ mg/L}$, determinó el nivel de confianza que contendrán los resultados luego de su análisis.
6. Se validó el método analítico para la determinación de la concentración de Cromo Hexavalente en agua y se demostró que es apto para el propósito indicado ya que cumple con los criterios establecidos.
7. El informe de validación respalda las técnicas realizadas en el laboratorio garantizando la calidad, la seguridad y confiabilidad del método.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

Al Laboratorio de Aguas en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

1. Establecer un periodo en el que se realice un seguimiento del estado validado del método para asegurar que no existan cambios que lo afecten de manera directa.
2. Tener en cuenta que la incertidumbre a la medición aumenta al realizar diluciones por lo que se sugiere estudiar las diferentes alternativas en la que se pueda preparar una solución de manera más directa.
3. Realizar la validación de más métodos analíticos para garantizar la calidad de los resultados y cumplir con los requerimientos de las entidades reguladoras.
4. Capacitar al usuario del método analítico con el propósito de mitigar errores en su aplicación.
5. Instar a las autoridades a promover y realizar investigaciones de este carácter ya que es altamente aplicable a los marcos regulatorios, no solo en el Laboratorio de Aguas, sino también a nivel de industrias Farmacéuticas creando la experiencia y las habilidades que necesitarán los futuros profesionales.

BIBLIOGRAFIA

1. Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1., Recomendaciones. Vol. 1 [Internet]. apps.who.int. 1995 [citado el 18 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37736>
2. Chromium, Hexavalent. DOC316.53.01033. USEPA1 1,5-Diphenylcarbohydrazide Method2. Method 8023, 0.010 to 0.700 mg/L Cr⁶⁺ (spectrophotometers). [Internet]. www.hach.com. 2019 [consultado el 19 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://www.hach.com/asset-get.download-en.jsa?id=7639983704>
3. Guertin J, Jacobs JA, Avakian CP, Independent Environmental Technical Evaluation Group. Chromium (VI) handbook. Boca Raton, Fla.: Crc Press; 2005.
4. Roig Marino B. Evaluación de las tecnologías de tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con Cromo. upcommons.upcedu [Internet]. 1 de junio de 2006 [consultado el 20 de octubre de 2019]; Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/3153>
5. Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 13.07.01:08 Agua, Agua Potable. [Internet]. usam.salud.gob.sv. 12 de junio de 2009 [consultado 20 de octubre 2019]. Disponible en: http://usam.salud.gob.sv/archivos/pdf/normas/NORMA_AGUA_POTABLE_2_a.pdf
6. Reglamento Técnico Salvadoreño, RTS 13.02.01:14 Agua. Agua de consumo humano. Requisitos de calidad e inocuidad [Internet]. <http://asp.salud.gob.sv>. 4 de abril de 2018 [consultado 21 de octubre 2019]. Disponible en: http://asp.salud.gob.sv/regulacion/pdf/reglamento/rt_s_calidad_e_inocuidad_del_agua_para_consumo_humano_v1.pdf
7. Vo-Dinh T, G. Gauglitz, Günter Gauglitz. Handbook of Spectroscopy. 2003.
8. Milán F. Métodos espectroscópicos UV visible para análisis molecular y elemental. 2016.
9. Wiki Targeted (Entertainment). Espectro electromagnético [Internet]. Ingeniería Topográfica y Fotogramétrica Wiki. 2017 [consultado 22 de octubre de 2019]. Disponible en: https://ingenieriatopografica.fandom.com/es/wiki/Espectro_electromagn%C3%A9tico

10. Harris DC, Vicente Berenguer Navarro. Análisis químico cuantitativo. Barcelona: Revert, 2007.
11. Biofísicoquímica de Metaloproteínas [Internet]. Argentina: Universidad Nacional del Litoral; pág. 9–10. [consultado 22 de octubre de 2019]. Disponible en: https://fcb.web1.unl.edu.ar/dfbioq/files/Optativas/Teora_5_Espectroscopa_absorcin_UV-Vis.pdf
12. Manual de usuario Espectrofotómetro Visible HACH DR 2700, [Internet]. <https://www.hach.com>. Hach Company; 2013 [consultado 23 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.hach.com › asset-get.download.jsa>
13. Análisis de aguas -determinación de Cromo Hexavalente en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas -método de prueba (cancela a la NMX-AA-044-1981) Waters analisis -determination of hexavalent chromium in natural, drinking, wastewaters and wastewaters treated -test method o introducción [Internet]. <http://legismex.mty.itesm.mx>. México; 2001 [consultado 27 de octubre 2019]. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa044-01.pdf>
14. Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, American Public Health Association, American Water Works Association, et al. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 2012. Washington, Dc: American Public Health Assn; 2012.
15. González Dorantes BC. Validación y comparación de dos métodos analíticos por espectrofotometría visible para determinar boro en suelos. [Internet] [Trabajo de graduación]. [Universidad de San Carlos de Guatemala]; 2016 [consultado 05 de noviembre de 2019]. pág. 99–106. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/4823/1/Brenda%20Carolina%20Gonz%C3%A1lez%20Dorantes.pdf>
16. G 9.6 Validación de Métodos Analíticos Físicoquímicos [Internet]. <http://www.osa.gob.sv>. Organismo Salvadoreño de Acreditación.; 2017 [consultado 06 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://www.osa.gob.sv/descarga/validacion-de-metodos-analiticos-fisicoquimicos/>

17. Rodríguez SC. Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. Tumbaga [Internet]. 2012 [Consultado 06 de noviembre de 2019]; 1(7):9. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4550292>
18. Castillo Aguilar, Beatriz, González Hernández, Rolando. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Revista Cubana de Farmacia [Internet]. 1996 [consultado 06 de noviembre de 2019];30(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009
19. Danzer K, Currie L. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). Pure and Applied Chemistry. 1998;70(4): 993-1014. <https://doi.org/10.1351/pac199870040993>
20. García Menéndez DV, Melgar Santiago GE. Validación del método espectrofotométrico (3500-Fe D) de la fenantrolina para determinación de hierro total en agua potable. [Internet]. ri.ues.edu.sv. 2011 [consultado 22 de agosto 2019]. Disponible en: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/492/>
21. Quality and Process Improvement [Internet]. support.minitab.com. 2019 [consultado 10 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/quality-and-process-improvement/measurement-system-analysis/>
22. Boqué R. El límite de detección de un método analítico [Internet]. [consultado 10 de noviembre de 2019] Disponible en: <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/lod.pdf>
23. Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean la técnica de espectrofotometría de ultravioleta-visible [Internet]. <https://www.ema.org.mx>. 2014 [consultado el 10 de noviembre de 2019]. Disponible en: https://www.ema.org.mx/descargas_portalV2/guias_tecnicas/Guias_Tecnicas_CALIBRACION/CALIBRACION_Espectrofotometros_UV.pdf

24. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. [Internet]. <http://www.qualitat.cc>. 2008 [consultado el 15 de noviembre 2019]. Disponible en: http://www.qualitat.cc/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/CE_NAM.EMA.Validacion-verificacion.pdf
25. Delgado O. Cómo evaluar la incertidumbre de medición sin necesidad de ser un experto en matemáticas [Internet]. SGC-Lab. 2019 [consultado el 19 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://sgc-lab.com/guia-para-estimar-la-incertidumbre-de-la-medicion-hecha-para-personas-normales/>
26. Guía CG 4 Eurachem / CITAC: Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas. [Internet]. <https://www.citac.cc>. S L R Ellison (LGC, UK) A Williams (UK); 2012 [consultado el 03 de diciembre 2019]. Disponible en: <https://www.citac.cc/QUAM2012P1ES.pdf>
27. Hechavarría-Hernández A, Arada-Pérez M de los Á. Estimación de la incertidumbre de la medición en análisis químico, un caso de estudio. Revista Cubana de Química [Internet]. 01 de abril de 2017[consultado el 07 de diciembre de 2019];29(1):54–72. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000100005
28. R Dap, M GC. Estimación de la incertidumbre asociada a la determinación de aluminio, silicio, vanadio y sodio en “fuel oil” por espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). Tecnociencia [Internet]. 05de enero 2019[consultado el 07 de diciembre de 2019]; 24(1):111–28. Disponible en: <https://revistas.up.ac.pa/index.php/tecnociencia/article/view/2578>
29. 3500-Cr CHROMIUM [Internet]. <https://www.standardmethods.org>. 2020 [consultado el 01 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.053>
30. Marron Daza GA, Rodriguez Peña JL. Validación del método analítico para análisis de disolución y contenido de clorhidrato de cetirizina en capsulas blandas por Cromatografía líquida de alta resolución. [Internet] [Tesis]. [Universidad Nacional de San Agustín]; 2018 [consultado el 20 de octubre 2020]. pág. 40–111. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6140/QUmadaga.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

31. Guía U, Inglesa S, Española P.P. Morillas y colaboradores. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos [Internet]. 2016. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
32. Severiche Sierra CA, González García H. Verificación analítica para las determinaciones de Cromo Hexavalente en aguas por espectrofotometría | Ingenierías USBMed. Revistas usb educo [Internet]. 30 de junio 2013 [consultado el 20 de diciembre de 2019];4(1):22–26. Disponible en: <https://revistas.usb.edu.co/index.php/IngUSBmed/article/view/279>
33. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos” [Internet]. <http://www.ispch.cl>. 2010 [consultado el 25 de marzo de 2022]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf
34. Trujillo AFO, Cajigas MEM. Validación de un método para el análisis de color real en agua. Revista de la Facultad de Ciencias [Internet]. 01 de enero de 2018 [consultado el 25 de marzo de 2022];7(1):143–55. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rfc/article/view/68086>
35. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos [Internet]. <https://www.unodc.org>. 2010 [consultado el 25 de marzo de 2022]. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR4_1_Ebook_S.pdf
36. López Bautista EA, González Ramírez BH. DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS [Internet]. Guatemala; 2016 [consultado el 08 de diciembre de 2021]. Disponible en: http://cete.fausac.gt/wp-content/uploads/2020/11/Diseno_y_Analisis_de_Experimentos_2016a.pdf
37. Delgado O. Cómo evaluar el límite de detección y el límite de cuantificación en el laboratorio [Internet]. SGC-Lab. 2019 [consultado el 19 de enero de 2022]. Disponible en: <https://sgc-lab.com/limite-deteccion-y-cuantificacion/>

38. Pacheco Villegas EJ, Torres Julio MB. Validación de un método analítico para la determinación de hierro (Fe) total y manganeso (Mn) en agua potable, natural y residual por espectroscopia de absorción atómica. Repositorio uni Córdoba educo [Internet]. 18 de junio de 2020 [consultado 25 de marzo de 2022]; Disponible en: <https://repositorio.unicordoba.educo/handle/ucordoba/2999>
39. Herrera M. J. Validación y estimación de incertidumbre de un método analítico para cuantificar hierro total por el método colorimétrico de la fenantrolina en agua potable y natural. Revista Científica de FAREM-Estelí. 08 de julio de 2020;(34):154–68.
40. Hogan R. How to Report Uncertainty in Measurement [Internet]. isobudgets. 2018 [consultado 12 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.isobudgets.com/how-to-report-uncertainty-in-measurement/>
41. Rossi L. Incertidumbre de la Medición: Teoría y Práctica (1 ra Edición) Maracay -Estado Aragua -febrero 2001. www.academiaedu [Internet]. 2001 [consultado el 19 de mayo de 2022]; Disponible en: https://www.academia.edu/37156543/Incertidumbre_de_la_Medici%C3%B3n_Teor%C3%ADa_y_Pr%C3%A1ctica_1_ra_Edici%C3%B3n_Maracay_estado_Aragua_Febrero_2001
42. MI J, Weitzel, Meija J, Leblond D, Walfish S. Estímulo al proceso de revisión incertidumbre en la medición para la industria farmacéutica [Internet]. 2017 [consultado el 25 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/resources/pf441nov12017.pdf>
43. Morales-Ramírez Á de J, Rángel-Salinas E, Ramírez-López A, Dorantes-Rosales HJ. Metodología Para El Cálculo De La Incertidumbre En La Determinación De Cobre Por Espectroscopia De Absorción Atómica. Avances en Ciencias e Ingeniería [Internet]. 2012 [consultado el 20 de marzo de 2022];3(4):143–55. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323627688013>
44. Pilar Fernández HR. Estimación de incertidumbre para medición de Zn por espectrofotometría de absorción atómica-flama. Simposio de Metrología [Internet]. 2006 [consultado el 25 de marzo de 2022]; Disponible en: <https://www.cenam.mx/memsimp06/Trabajos%20Aceptados%20para%20CD/Octubre%2027/Bloque%20E/E2-QUIMICA%20IV-Incertidumbre/E2-3.pdf>

45. Pérez Navarro M, Rodríguez Hernández Y, Suárez Pérez Y. Validación del método por espectrofotometría ultravioleta para control de calidad de clorhidrato de ciprofloxacina en tabletas Ciprecu. Revista Cubana de Farmacia [Internet]. 01 de junio de 2014 [consultado el 11 de junio de 2022];48(2):199–212. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152014000200005

GLOSARIO ⁽¹⁶⁾

Analito: Especie química que se analiza.

Adecuación al propósito: Grado al cual los datos producidos por un proceso de medición permiten a un Usuario tomar decisiones técnica y administrativamente correctas para un Propósito establecido.

Blanco: puede ser un blanco de reactivo o un blanco muestra problema que contenga todos los ingredientes de la muestra excepto los analitos

Coeficiente de variación: es la desviación estándar expresada en función de la media. Normalmente se expresa en porcentaje.

Control de calidad interno: Serie de procedimientos asumidos por el personal de un laboratorio para el continuo seguimiento de las operaciones y de los resultados de las mediciones con el fin de decidir si los resultados son lo suficientemente confiables como para ser emitidos.

Especificidad: Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al análisis de interés y no a otros componentes de la muestra.

Exactitud de una medición: Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.

Desviación estándar: estadístico básico indicativo de la dispersión o variabilidad de los resultados.

Intervalo (rango): concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferiores del analito (incluyendo estas), para las cuales se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Incertidumbre de medida: Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza.

Intervalo de confianza: Intervalo en torno al valor estimado que contiene el valor real con una probabilidad determinada.

Intervalo de trabajo: Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el Límite de Cuantificación, el extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.

Intervalo lineal: Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

Límite de detección: El menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable o La menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Límite de cuantificación: La menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptable bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Linealidad: Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

Material de referencia (MR): Material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos como para ser utilizados en la calibración de aparatos, en la evaluación de un método de medición o para asignar valores a otros materiales.

Material de referencia certificado (MRC): Material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.

Método analítico: descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Mensurando: Magnitud que se desea medir

Métodos no normalizados: Método que no aparece en la literatura oficial reconocida.

Muestra: Parte representativa de la materia muestra del análisis.

Parámetros de desempeño: parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.

Precisión: Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas.

Precisión intermedia: La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio en: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo, etc.

Protocolo de Validación: Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistentes.

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

Repetibilidad: precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.

Reproducibilidad: precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos.

Revalidación: La revalidación de un método analítico consiste en repetir de forma total o parcial su validación, ya sea debido a modificaciones en el método, equipos, en la muestra a analizar, etc. para garantizar la obtención de resultados fiables.

Robustez: La “robustez” de un procedimiento analítico es "una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal”.

Selectividad: Describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

Sensibilidad: El cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo.

Sesgo: Desviación consistente de valores medidos a partir del valor verdadero, originada por errores sistemáticos durante un procedimiento.

Validación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

Validación de un Método:

1. El proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden modificar esas características y hasta qué punto. ¿Qué analitos puede determinar el método, en qué matrices, en presencia de qué interferencias? ¿En esas condiciones, qué niveles de precisión y de exactitud pueden alcanzarse?

2. El proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico particular. Es aplicable cuando el método se está desarrollando con un propósito específico. En química analítica otro uso comúnmente encontrado del término de validación es en el contexto de instrumentación. La Validación de Instrumentos se usa para describir el proceso de establecer que un instrumento en un momento dado es capaz de desempeñarse de acuerdo a la especificación diseñada. Estos procesos podrán alcanzarse, por ejemplo, mediante calibraciones o verificaciones de desempeño.

Verificación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

Valor verdadero convencional (de una magnitud): Valor atribuido a una magnitud particular y aceptado, algunas veces por convención, por tener una incertidumbre apropiada para un propósito dado.

ANEXOS

ANEXO N° 1

ESPECTROFOTÓMETRO HACH DR 2700

Tabla N°12. Especificaciones técnicas del espectrofotómetro HACH DR 2700⁽³⁾

Especificaciones de funcionamiento	
Modo operativo	Transmitancia (%), absorbancia y concentración
Fuente de luz	Lámpara de (filamento de) tungsteno en atmósfera gaseosa (visible)
Rango de longitud de onda	400–900 nm
Precisión de longitud de onda	± 1.5 nm
Reproducibilidad de longitud de onda	< 0.1 nm
Resolución de longitud de onda	1 nm
Calibración de longitud de onda	Automática
Selección de longitud de onda	Automática, mediante selección de un método
Ancho de banda espectral	< 8 nm
Rango de medida fotométrico	± 3.0 Abs en el rango de longitud de onda 400–900 nm
Precisión fotométrica	5 mAbs a 0.0–0.5 Abs 1% a 0.50–2.0 Abs
Linealidad fotométrica	< 0.5%–2 Abs < = 1% a > 2 Abs con vidrio neutro a 546 nm
Luz difusa	< 0,1% T a 500 nm con filtro OG570/3
Almacenamiento de datos	500 valores medidos (resultado, fecha, hora, ID de la muestra, ID del usuario)
Programas del usuario	50
Especificaciones físicas y ambientales	
Anchura	220 mm (8.6 pulgadas)
Altura	135 mm (5.3 pulgadas)
Profundidad	330 mm (12.9 pulgadas)
Peso	4.06 kg (8.95 lbs) sin batería 4.38 kg (9.66 lbs) con batería
Condiciones de funcionamiento	10–40 °C (50–104 °F), 80% humedad relativa máxima (sin condensación)
Condiciones de almacenamiento	–40–60 °C (–40–140 °F), 80% humedad relativa máxima (sin condensación)
Especificaciones técnicas adicionales	
Conexión a la red	15 VDC / 30VA Cargador: (100–240 V/50–60 Hz) Batería, recargable de litio, 11.1 V, 4.4 Ah
Interfaces	Utilice únicamente cable blindado de una longitud máx. de 3 m. 1 x USB tipo A 1 x USB tipo B
Estanco al agua según	IP 41 con la tapa cerrada IP 42 con la cubierta protectora colocada en su sitio
Clase de protección	Clase de protección II

ANEXO N° 2

ESQUEMA DEL EQUIPO HACH DR 2700

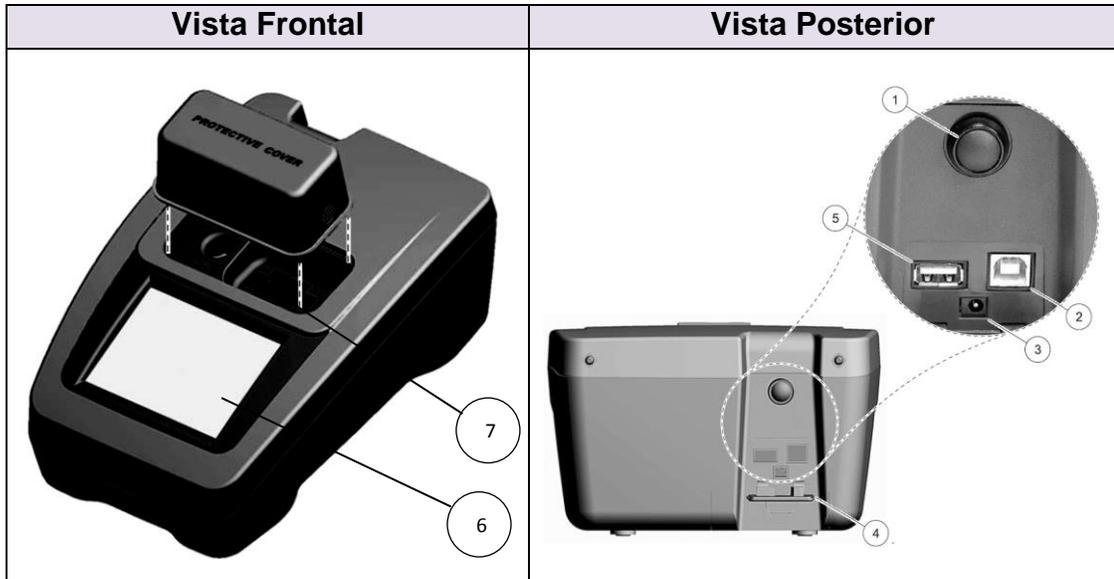


Figura N° 11. Representación gráfica del espectrofotómetro Hach DR2700 y sus elementos de control ⁽³⁾

Descripción de los elementos de control

1. Interruptor de encendido/apagado
2. USB Tipo B
3. Enchufe a la red
4. Protección
5. USB Tipo A
6. Pantalla de control táctil
7. Compartimiento de celdas

ANEXO N° 3
FOTOGRAFIAS DE REALIZACION DE LA VALIDACION



Figura N°12. Fotografías de la determinación de los parámetros de validación para el método analítico en el Laboratorio de Aguas de la Universidad de El Salvador.

ANEXO N° 4

MATERIALES, EQUIPO Y REACTIVOS

Cristalería calibrada y certificada

- 35 balones volumétricos de 50.0 mL serie 01
- 3 bureta de 10 mL serie 01
- 1 pipeta volumétrica de 1.0 mL serie 01
- 1 Beaker de 500 mL
- 1 pipeta volumétrica de 5.0 mL serie 01
- 2 Beaker de 100 mL
-

Equipo

- Espectrofotómetro Hach DR 2700
- Celda de muestra de 10 mL
- Soporte metálico

Reactivos

Estándar utilizado

- Chromium standard solution 1000 mg/L

Reactivo utilizado

- ChromaVer® 3 Chromium Reagent Powder Pillows, 5 or 10 mL
- Agua destilada

ANEXO N° 5

**REQUERIMIENTOS DE LA GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS
ANALÍTICOS (OSA) PARA ESTABLECER UN PROTOCOLO**

7.1.1 Establecer un protocolo de validación.

El protocolo debe ser fechado y firmado por los responsables de la validación o persona designada por el laboratorio y debe incluir como mínimo lo siguiente:

A. IDENTIFICACION.

Se deberá de identificar de acuerdo al control interno de documentos definido por el laboratorio.

B. OBJETIVO.

Definir la finalidad del protocolo de validación. (Ej. Definir los parámetros a validar, las actividades necesarias para la realización de la validación del método XXX-YY-ZZ para la evaluación del analito EE por la técnica CFG)

C. ALCANCE.

Delimitación de tipo de muestra, matriz, analito, rango de concentración, técnica analítica.

Nota: Para muestras de alimento se deberá de utilizar la clasificación establecida en el RTCA 67.04.54:10 Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos alimentarios, para la definición de Matriz y número de muestras a validar según lo detallado en el apartado 7 "Sistema de Clasificación de los alimentos" de dicho reglamento, se dará por válido el alcance de la validación de acuerdo a lo siguiente:

1- Categoría de alimento:

Al demostrar la Aptitud del método a través de la validación de al menos el 50% del total de sub categorías y de cada una de ellas 2 tipos de alimentos. (Si la subcategoría lo permite).

Ejemplo:

Para dar por aceptada la categoría de alimento 02.0 Grasas y aceites y emulsiones grasas, se deberá de realizar la validación de al menos el 50% de las sub categorías que para el ejemplo siguiente correspondería a 2 subcategorías. Si elegimos la subcategoría 02.1 y 02.2 tendremos que realizar a validación de al menos 2 tipos de alimentos de cada una., se podría seleccionar la validación de: Aceite de mantequilla, Grasas y aceites vegetales, Mantequilla y mantequilla concentrada y Margarina y productos similares. Al realizar éstas 4 validaciones, se daría por válida la categoría 02.0.

02.0 Grasas y aceites y emulsiones grasas

02.1 Grasas y aceites prácticamente exentos de agua

02.1.1 Aceite de mantequilla (manteca), leche de grasa anhidra "ghee"

02.1.2 Grasas y aceites vegetales

02.1.3 Manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal

02.1.4 Mezcla de aceites y/o grasas de origen animal y vegetal.

02.2 Emulsiones grasas, principalmente del tipo agua en aceite

02.2.1 Emulsiones con 80 por ciento de grasa como mínimo

02.2.1.1 Mantequilla y mantequilla concentrada

02.2.1.2 Margarina y productos similares

02.2.1.3 Mezclas de mantequilla y margarina

02.2.2 Emulsiones con menos del 80 por ciento de grasa

02.3 Emulsiones grasas principalmente del tipo agua en aceite incluido los productos a base de emulsiones grasas mezclados y/o aromatizados

02.4 Postres a base de grasas, excluidos los postres lácteos de la categoría de alimentos 01.7

2- Subcategoría de alimento:

Al demostrar la Aptitud del método a través de la validación de al menos 2 tipos de alimentos (si la subcategoría lo permite).

3- Un alimento en específico. Al demostrar la Aptitud del método a través de la validación para ese alimento.

Nota: Para cualquier otro tipo de muestra, el OSA evaluará la aceptación de un grupo o categoría de matriz para establecer un alcance siempre y cuando se validen al menos 2 tipos de muestras para ese grupo o categoría, siempre que sea posible y basado en la normativa o a la bibliografía presentada por el laboratorio.

Para los casos en los que no existen Categorías o Sub categorías, el alcance estará definido por el tipo específico de muestra que se valida.

D. RESPONSABLES

Equipo de validación: Definir e identificar con Nombre los analistas que realizan la validación, persona(s) que revisa(n) el informe de validación, persona(s) que autorizan el informe de validación.

E. PARAMETROS A ESTUDIAR Y LOS CORRESPONDIENTES CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Establecer los parámetros a validar y su criterio de aceptación de acuerdo al tipo de referencia utilizada.

F. MUESTRAS (MATRICES).

Se definirán los tipos de muestra, identificación.

G. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA INVOLUCRADOS EN LA VALIDACION

Detallar los equipos involucrados en la validación así como la codificación interna que se ha asignado a cada uno. En cuanto a los reactivos y materiales de referencia utilizados, detallar lote, fecha de vencimiento y proveedor del mismo.

H. REFERENCIA DEL METODO ANALITICO A VALIDAR

Detallar el nombre, versión, edición, año y cualquier otra información pertinente de las referencias utilizadas, que permita identificar el método a validar.

I. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS A EVALUAR

Detallar claramente los parámetros que se han definido para realizar la validación así como un detalle del procedimiento a seguir para la estimación de cada uno, en el cual incluyan como mínimo detalle de las pesadas a realizar, diluciones, análisis estadístico a aplicar y detalle del proceso a seguir para su determinación y los criterios de aceptación.

7.1.2 Realización de la validación.

Una vez se ha aprobado el protocolo se procede a hacer la validación de acuerdo a lo planificado.

Aquí se incluye el proceso de cálculo estadístico de los distintos parámetros evaluados.

Se detalla a continuación, los parámetros estadísticos que pueden realizarse en una validación.

El laboratorio deberá demostrar la validación correspondiente de su alcance según lo detallado en el numeral 7.1.1 c) Alcance de ésta Guía.

a) Selectividad / Especificidad.

Procedimiento de determinación de la selectividad.

En el estudio de la selectividad, como norma general se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas, excipientes (matriz o placebo), y dependiendo del tipo de muestra, tipo de técnica analítica, instrumento de medición. Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias y/o elementos y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.

La selectividad de un procedimiento debe ser establecida para métodos desarrollados internamente en el laboratorio, métodos adaptados de la literatura científica y métodos publicados por organismos de estandarización utilizados fuera del alcance especificado en el método estándar. Cuando los métodos publicados por organismos de normalización son aplicados dentro de su alcance, la selectividad usualmente habrá sido estudiada como parte del proceso de normalización.

Generalmente, la selectividad de un método se investiga estudiando su habilidad de medir el analito de interés en muestras a la cuales se le agregaron intencionalmente interferencias específicas (aquellas que se considere probable de encontrar en las muestras). En aquellos casos donde no esté claro si las interferencias ya están presentes o no, la selectividad del método puede ser investigada estudiando su habilidad de medir el analito comparado con otros métodos independientes. Se detallan a continuación ejemplos de la determinación de la selectividad:

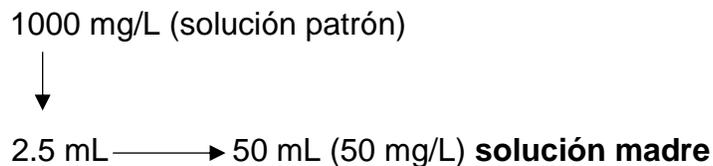
ANEXO N° 6

CASCADA DE DILUCION DEL ESTANDAR DE REFERENCIA

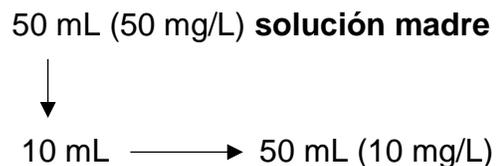
Preparar una solución madre de 50.0 mg/L, se calculó la alícuota por medio de la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$, donde la alícuota a tomar (V_1) se calculó de la siguiente manera:

$$V_1 = C_2V_2/C_1 = (50.0 \text{ mg/L}) (50.0 \text{ mL}) / 1000 \text{ mg/L} = 2.5 \text{ mL}$$

Se midió una alícuota de 2.5 mL de estándar con Bureta de 10.0 mL, se transfirió a un matraz volumétrico clase A de 50.0 mL y se lleva a volumen con agua ultra pura, el diagrama de la dilución es el siguiente:



A partir de la solución de 50 mg/L de Cr^{6+} se preparó una solución de 10.0 mg/L, se tomó una alícuota de 10.0 mL con pipeta volumétrica y se transfirió a un matraz volumétrico de 50.0 mL; llevando a volumen con agua ultra pura, el diagrama de la dilución es el siguiente:



ANEXO N° 7

ESQUEMA DE VERIFICACIÓN DE RANGO DE TRABAJO DEL KIT MEDIANTE CURVA DE CALIBRACIÓN

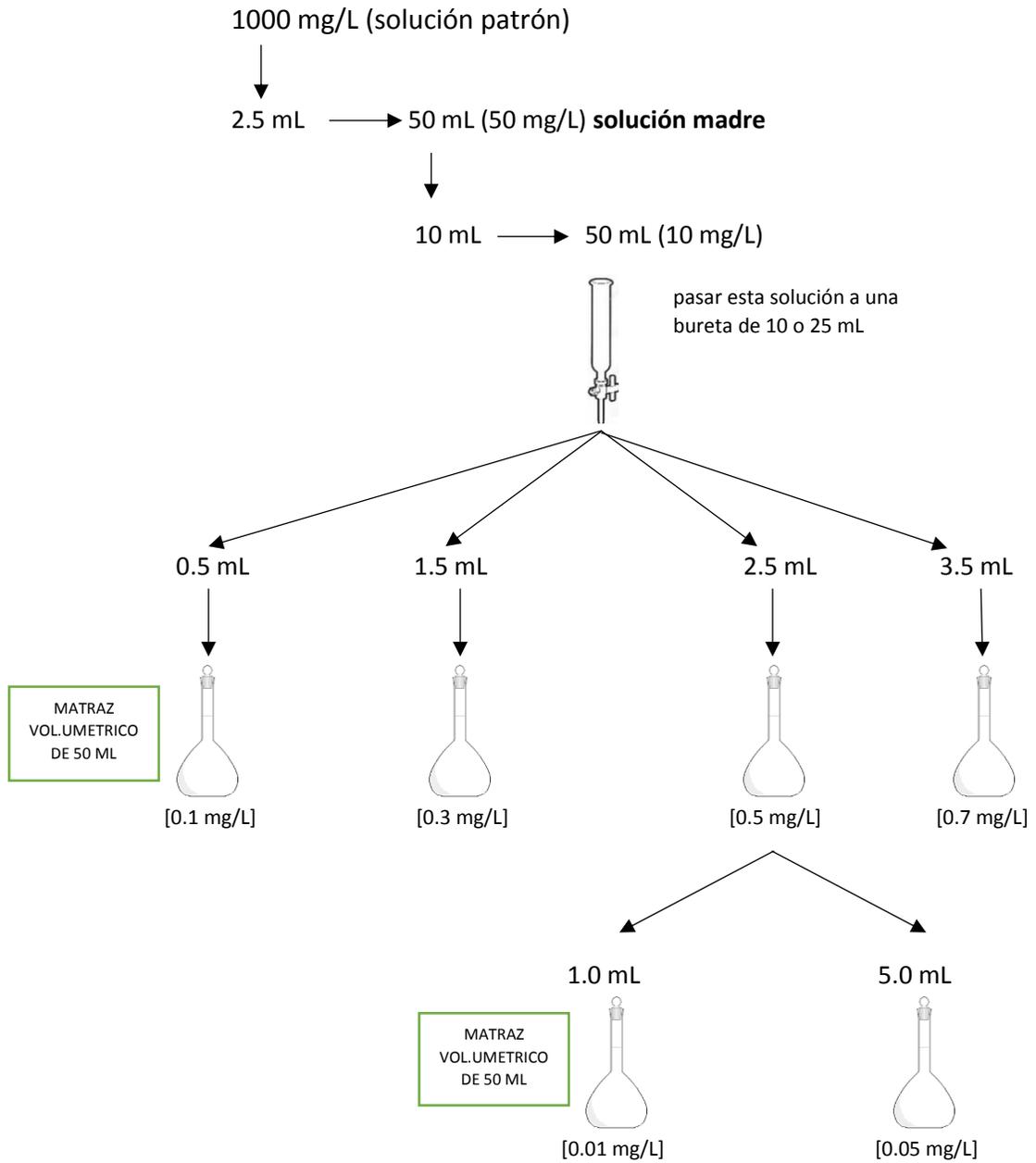


Figura N° 14. Preparación de solución madre y soluciones de verificación de rango

ANEXO N° 8

GUÍA PARA CONSIDERAR LOS NIVELES DEL INTERVALO LINEAL

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
G 9.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS FÍSICOQUÍMICOS
VERSIÓN 2 APROBADO 2017/05/23



ANEXO 3: Tablas de referencia AOAC

Guía para considerar los niveles del Intervalo lineal

Categoría	Tipo de prueba	Intervalo recomendado
1	Cuantificación de analito	80 % - 120% del valor de la especificación
2	Cuantificación del analito a nivel trazas	0 %- 150% del valor de la especificación

Criterios de aceptación para Porcentaje de Recobro

Concentración del Analito	Intervalo
100%	98 % - 101 %
10%	95 % - 102 %
1%	92 % - 105 %
0.1%	90 % - 108 %
0.01 %	85 % - 110 %

Concentración del Analito	Intervalo
$\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)	80 % - 110 %
$\geq 10 < 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)	70 % - 110 %
$\geq 1 < 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)	60 % - 120 %
$\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)	50 % - 120 %

ANEXO N° 9

ESQUEMA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

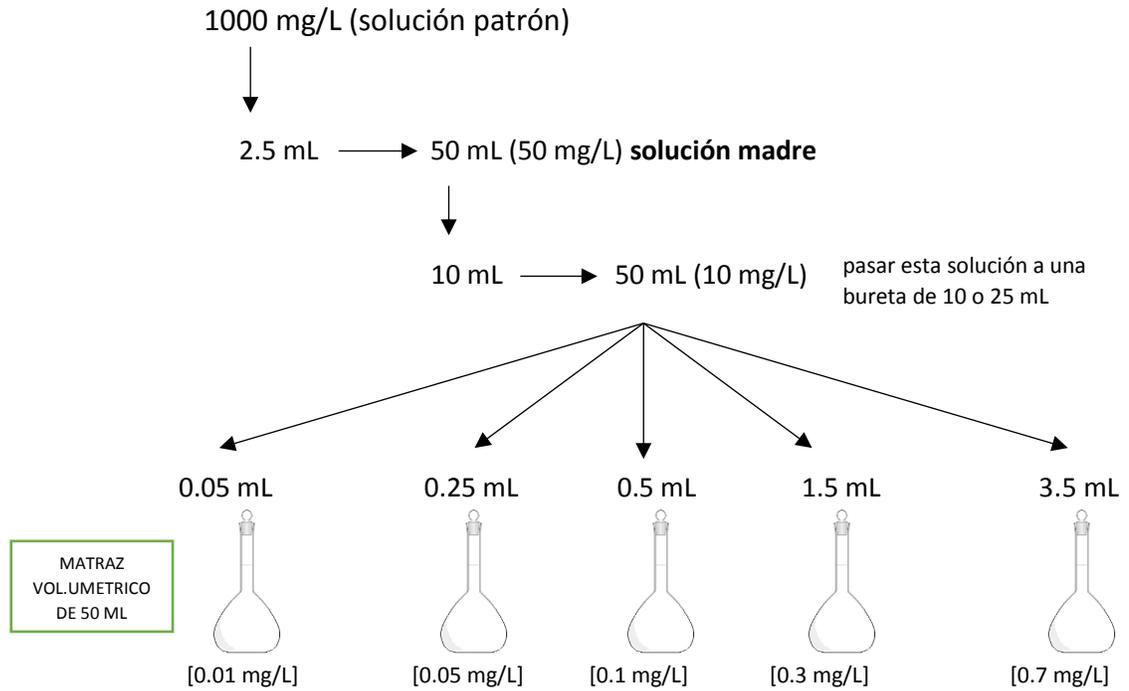


Figura N° 16. Preparación de diluciones para la linealidad del método.

ANEXO N° 10

**FORMULAS Y FORMATOS DE TABLA PARA EL PARÁMETRO DE
LINEALIDAD**

La pendiente (b_1)

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen (b_0)

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza de la pendiente ($IC_{(\beta_1)}$)

$$Sb_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} Sb_1$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC_{(\beta_0)}$)

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$
$$Sb_0 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

El coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$).

$$CV_{y/x} = \frac{S_y}{\bar{y}} * 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Tabla N° 13. Formato de tabla para el cálculo de estimación por mínimos cuadrados para la linealidad.

N°	Muestras de Ensayo (X)	Concentración Medida (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.01				
2	0.01				
3	0.01				
4	0.05				
5	0.05				
6	0.05				
7	0.1				
8	0.1				
9	0.1				
10	0.3				
11	0.3				
12	0.3				
13	0.7				
14	0.7				
15	0.7				
Sumatoria					
a					

Fórmulas para el análisis de varianza (Tabla N° 2)

Suma de cuadrados total (SCT)

$$SCT = \sum y^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

Suma de cuadrados de la regresión (SC_{erg})

$$SC_{erg} = b \left[\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n} \right]$$

Suma de cuadrados del error (SC_{err})

$$SC_{err} = SCT - SC_{erg}$$

Cuadrados medios de la regresión (CM_{reg})

$$CM_{reg} = \frac{SC_{reg}}{gl}$$

Cuadrados medios del error (CM_{err})

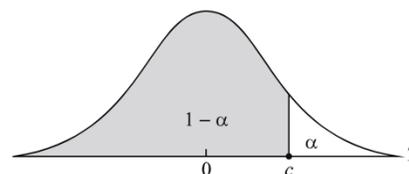
$$CM_{err} = \frac{SC_{err}}{gl}$$

Cuadrados medios total (CMT)

$$CMT = \frac{SCT}{gl}$$

ANEXO N° 11 DISTRIBUCION t-Student

La tabla da áreas $1 - \alpha$ y valores $c = t_{1-\alpha, r}$,
donde, $P[T \leq c] = 1 - \alpha$, y donde T tiene
distribución t-Student con r grados de libertad.

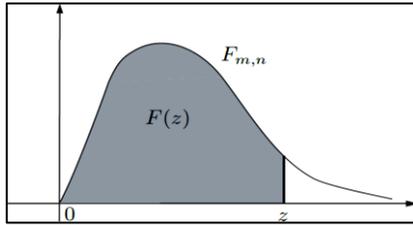


r	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

Figura N° 17. Prueba de distribución t-student de dos colas.

ANEXO N° 12

DISTRIBUCION F DE FISHER AL 95%



m n	$F_{0.95}(z)$																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	40	60	120	∞
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.55	1.55	1.43	1.35	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

Figura N° 18. Prueba de distribución F de Fisher al 95%

ANEXO N° 13

ESQUEMA DE PREPARACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO

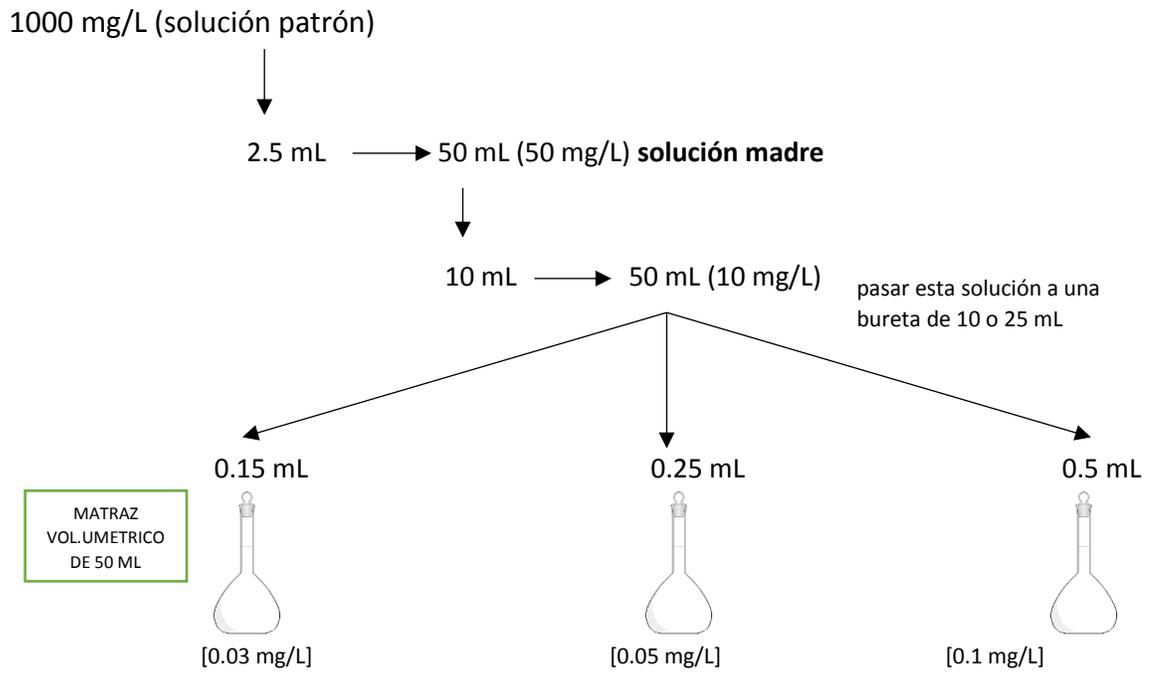


Figura N° 19. Preparación de muestras fortificadas para la exactitud

ANEXO N° 14

FORMULAS Y FORMATOS DE TABLA PARA EL PARÁMETRO DE EXACTITUD DEL METODO

Tabla N° 14. Formato para el cálculo de cantidad recuperada.

N° de replicas	Adición ppm (mg/L)(a)	Concentraciones experimentales(x)	Recuperado (y) $\frac{x}{a} = y$	y ²
1	0.03			
2	0.03			
3	0.03			
4	0.05			
5	0.05			
6	0.05			
7	0.1			
8	0.1			
9	0.1			
n=9	Sumatoria		ΣY=	ΣY ² =

Media aritmética:

$$\tilde{x} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coficiente de variación:

$$CV = \frac{s}{\tilde{x}} * 100$$

Intervalo de confianza:

$$IC_{(\mu)} = \tilde{x} \pm t_{0.975 \ n-1} * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Fórmulas para el cálculo de porcentaje de recuperación aparente

Sesgo

$$b = \tilde{X} - X_{ref}$$

Error relativo porcentual

$$b(\%) = \frac{\tilde{X} - X_{ref}}{X_{ref}} * 100$$

Recuperación aparente.

$$R(\%) = \frac{\tilde{X}}{X_{ref}} * 100$$

En donde:

\tilde{X} = valor medio

X_{ref} = valor de referencia

ANEXO N° 15

ESQUEMA DE DILUCIÓN PARA LA PRECISIÓN DEL MÉTODO

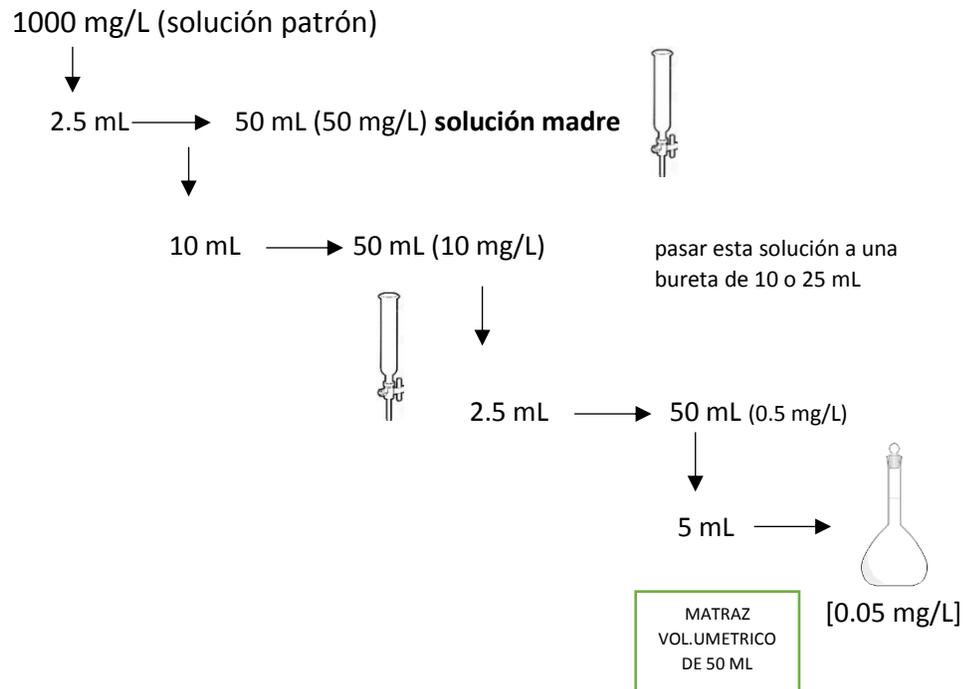


Figura N° 20. Preparación de estándar para la precisión del método

ANEXO N° 16

FORMULAS Y FORMATOS DE TABLA PARA EL PARÁMETRO DE PRECISION DEL METODO

Media aritmética:

$$y = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{y} \times 100$$

Intervalo de confianza:

$$IC_{(\mu)} = y \pm t_{0,975 \ n-1} \times \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Tabla N° 15. Tabla de cálculo de porcentaje de recobro para repetibilidad

Repetibilidad					
	Concentració n		Concentración	Porcentaje de Recobro obtenido $\frac{mx}{st} \times 100$	γ^2
Estándar 1		Muestra 1			
Estándar 2		Muestra 2			
Estándar 3		Muestra 3			
Estándar 4		Muestra 4			
Estándar 5		Muestra 5			
Estándar 6		Muestra 6			
Estándar 7		Muestra 7			
Estándar 8		Muestra 8			
Estándar 9		Muestra 9			
Estándar 10		Muestra 10			
Sumatoria					

Fórmulas para el análisis de varianza de la precisión intermedia (Tabla N° 4)

Suma de cuadrados total (SCT)

$$SCT = \sum_{i=1}^{\alpha} \sum_{ji}^{\alpha} (y_{ij})^2 - \frac{(\sum T)^2}{\alpha r}$$

Suma de cuadrados de las ocasiones ($SC_{\alpha i}$)

$$SC_{\alpha i} = \frac{(\sum A_1)^2}{r} - \frac{(\sum T)^2}{\alpha r}$$

Suma de cuadrados del error ($SC_{\varepsilon j}$)

$$SC_{\varepsilon j} = \sum_{i=1}^{\alpha} \sum_{ji}^{\alpha} (y_{ij})^2 - \left[\frac{\sum A_1^2 + \sum A_2^2 + \sum A_3^2 + \dots + \sum A_n^2}{r} \right]$$

Cuadrados medios de las ocasiones ($CM_{\alpha i}$)

$$CM_{\alpha i} = \frac{SC_{\alpha i}}{gl}$$

Cuadrados medios del error ($CM_{\varepsilon j}$)

$$CM_{\varepsilon j} = \frac{SC_{\varepsilon j}}{gl}$$

Cuadrados medios total (CMT)

$$CMT = \frac{SCT}{gl}$$

F calculado

$$F_{calc} = \frac{CM_{\alpha i}}{CM_{\varepsilon j}}$$

ANEXO N° 17
ESQUEMA DE PREPARACIÓN DE LÍMITES

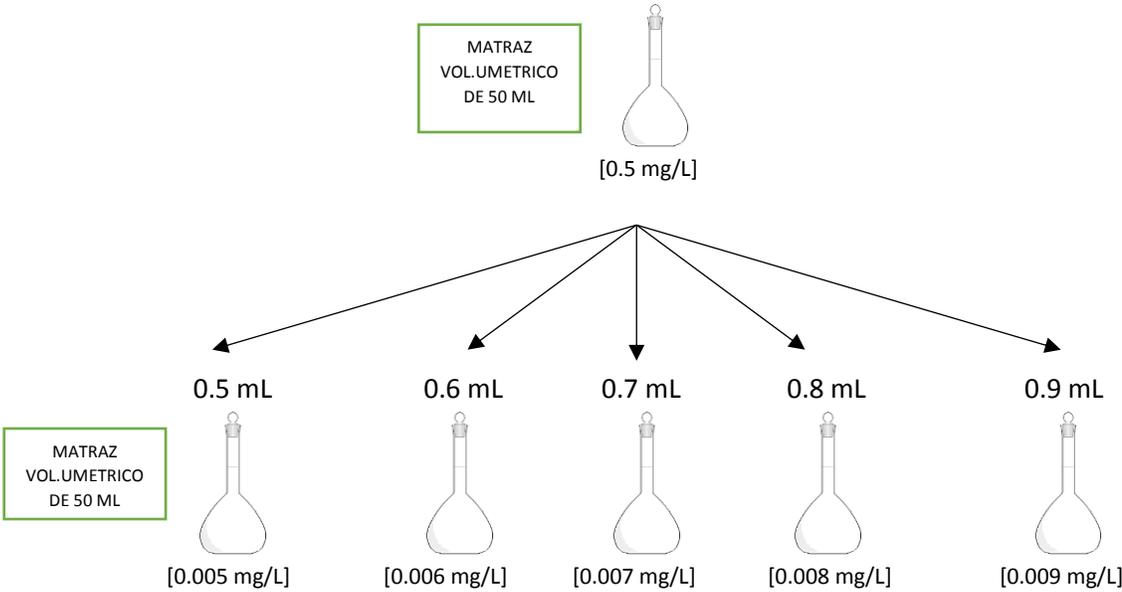


Figura N° 21. Preparación de muestras fortificadas para límites.

ANEXO N° 18

FORMULAS Y FORMATOS DE TABLA PARA EL PARÁMETRO DE LÍMITES

Pendiente (b_1)

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen (b_0)

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)^2)}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$)

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

Tabla N° 16. Tabla para cálculo de mínimos cuadrados para muestras fortificadas

N°	Concentración Teórica	Concentración Recuperada (X)	Respuesta Practica (Y)	XY	X ²	Y ²
1	0.005					
2	0.005					
3	0.006					
4	0.006					
5	0.007					
6	0.007					
7	0.008					
8	0.008					
9	0.009					
10	0.009					
Sumatoria						

Ecuaciones para análisis de blancos

Desviación estándar (S_b)

$$S_b = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Límite de detección

$$LD = \frac{3.3xS_b}{b_1}$$

Límite de cuantificación

$$LC = \frac{10xS_b}{b_1}$$

ANEXO N° 19
PROCESO DE ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE GUÍA CG 4 EURACHEM /
CITAC

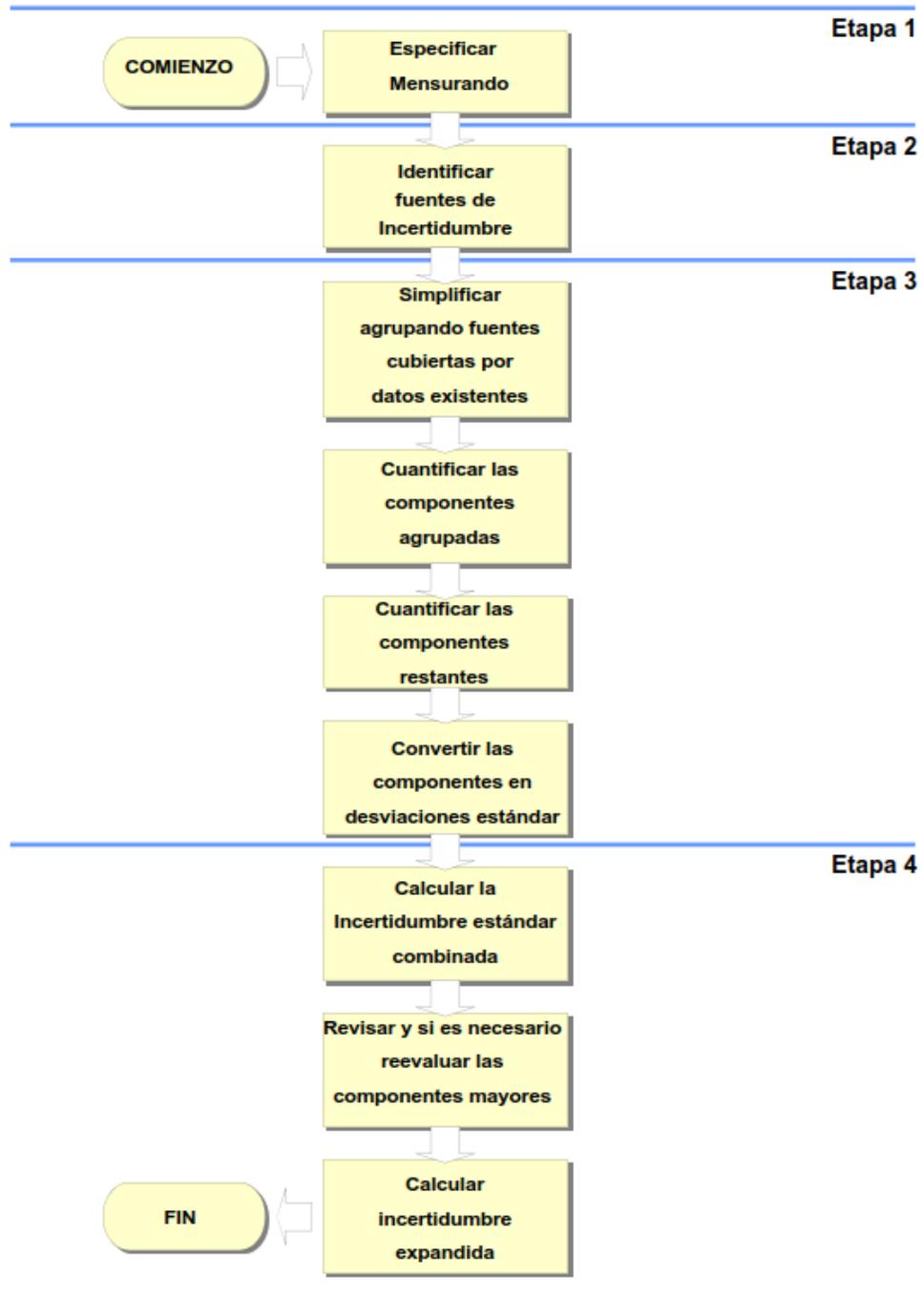


Figura N° 22. Procedimiento para estimación de incertidumbre. (26)

ANEXO N° 20

FORMULAS Y FORMATOS DE TABLA PARA EL PARÁMETRO DE ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE

Tabla N° 17. Formato para el cálculo de incertidumbre de volumen

Volumen	Magnitud	Unidades	U=Incertidumbre
50	Repetibilidad	mL	U_{REP}
	Calibración	mL	$u_{calib} = \frac{\text{Certificado de calibración}}{\sqrt{6}}$
	Variación V por T	mL	U_{temp}
	u_v	mL	$u_{(v)} = \sqrt{((U_{REP})^2 + U_{Calib}^2 + U_{temp}^2)}$
10	Repetibilidad	mL	U_{REP}
	Calibración	mL	$u_{calib} = \frac{\text{Certificado de calibración}}{\sqrt{6}}$
	Variación V por T	mL	U_{temp}
	u_v	mL	$u_{(v)} = \sqrt{((U_{REP})^2 + U_{Calib}^2 + U_{temp}^2)}$
10	Repetibilidad	mL	U_{REP}
	Calibración	mL	$u_{calib} = \frac{\text{Certificado de calibración}}{\sqrt{6}}$
	Variación V por T	mL	$U_{temp} = 0$
	u_v	mL	$u_{(v)} = \sqrt{((U_{REP})^2 + U_{Calib}^2 + U_{temp}^2)}$

ANEXO N° 21

REQUERIMIENTOS DE LA GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (OSA) PARA ESTABLECER UN INFORME

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
G 9.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS FÍSICOQUÍMICOS
VERSIÓN 2 APROBADO 2017/05/23



Tener en cuenta que, sujetos a consideración adicional de los efectos fuera del alcance de un estudio colaborativo, la desviación estándar de reproducibilidad configura una estimación de trabajo de la incertidumbre típica combinada siempre que el sesgo del laboratorio, medido en los materiales aplicables, es pequeño con respecto a la desviación estándar de la reproducibilidad, la repetibilidad interna es comparable con la repetibilidad del método estándar, y la precisión intermedia del laboratorio no es mayor que la desviación estándar de la reproducibilidad publicada.

Se realizará conforme a lo detallado a continuación:

Muestra	Repeticiones	Calcular /determinar	Comentarios
No Aplica	Utilizar la información obtenida en el proceso de confirmación o validación interna	a) Especificar el mensurando b) Identificar las fuentes de incertidumbre c) Cuantificar los componentes de la incertidumbre (u) d) Calcular la incertidumbre estándar combinada (u_c) e) Calcular la incertidumbre expandida (u_{exp})	Reportar la incertidumbre expandida con un factor de cobertura $k=2$ y un nivel de significancia del 95%.

7.1.3 Elaboración del informe

El **informe de validación** contendrá la Información suficiente para poder concluir acerca de la validación que se ha desarrollado.

Debe incluir:

- Hacer referencia al protocolo utilizado
- Parámetros validados y criterios de aceptación
- Resultados Analíticos
- Resultados Estadísticos
- Interpretación de resultados y/o conclusiones
- Cuadro resumen de los resultados obtenidos (parámetro, criterio, resultado y conclusión)
- Declaración de Aptitud del Método
- Datos crudos de la validación

Además será autorizado por o las personas asignadas por el laboratorio.

8. Vigencia

Este documento entra en vigencia a partir del 09 de Octubre de 2018.

FIN DEL PROCEDIMIENTO

Figura N° 23. Requerimiento de guía de validación OSA para elaborar el informe ⁽¹⁶⁾

ANEXO N° 22

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EVALUACION DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO DE LINEALIDAD (VERIFICACION DEL RANGO DE TRABAJO), EXACTITUD, PRECISIÓN, LIMITES E INCERTIDUMBRE

Verificación del rango de trabajo

Tabla N° 18. Resultados de verificación de rango de trabajo para la determinación de Cromo Hexavalente.

Tubo	Concentración de Muestras	Concentración Medida
Blanco	0.000	0.000
1	0.010	0.009
2	0.050	0.050
3	0.100	0.098
4	0.300	0.299
5	*0.500	0.496
6	0.700	0.700

Linealidad

Tabla N° 19. Resultados de lectura para evaluación de la linealidad del Método.

Concentración teórica	Respuesta Practica
0.01	0.009
0.01	0.008
0.01	0.006
0.05	0.048
0.05	0.049
0.05	0.051
0.10	0.104
0.10	0.101
0.10	0.103
0.30	0.298
0.30	0.302
0.30	0.297
0.70	0.704
0.70	0.702
0.70	0.701

Exactitud

Tabla N° 20. Resultados prueba de exactitud

Series	1° serie 0.03 mg/L	2° serie 0.05 mg/L	3° serie 0.1 mg/L
Concentraciones encontradas	0.03	0.051	0.097
	0.029	0.048	0.099
	0.029	0.049	0.098

Precisión

Tabla N° 21. Resultados de lectura de estándares para evaluar repetibilidad y precisión intermedia.

	Concentración	Analista 1		Analista 2	
			Concentración		Concentración
Estándar 1	0.049	Muestra 1	0.015	Muestra 1	0.015
Estándar 2	0.049	Muestra 2	0.014	Muestra 2	0.015
Estándar 3	0.051	Muestra 3	0.013	Muestra 3	0.015
Estándar 4	0.048	Muestra 4	0.016	Muestra 4	0.015
Estándar 5	0.049	Muestra 5	0.015	Muestra 5	0.013
Estándar 6	0.051	Muestra 6	0.015	Muestra 6	0.012
Estándar 7	0.051	Muestra 7	0.015	Muestra 7	0.014
Estándar 8	0.048	Muestra 8	0.012	Muestra 8	0.016
Estándar 9	0.049	Muestra 9	0.011	Muestra 9	0.013
Estándar 10	0.050	Muestra 10	0.013	Muestra 10	0.011

Limites

Tabla N° 22. Tabla de resultados de muestras fortificadas

N°	Concentración Teórica	Concentración Recuperada (X)
1	0.005	0
2	0.005	0
3	0.006	0.0067
4	0.006	0.0067
5	0.007	0.0077
6	0.007	0.0077
7	0.008	0.0087
8	0.008	0.0077
9	0.009	0.0097
10	0.009	0.0097

Tabla N° 23. Resultados para el cálculo de límite de cuantificación y límite de detección en base a lectura del blanco.

N°	Resultados de lectura de blanco
1	0.001
2	0.001
3	0.001
4	0.001
5	0.001
6	0.001
7	-0.001
8	0.001
9	0
10	0.001

ANEXO N° 23

**CALCULOS PARA ANALISIS DE RESULTADOS DE LOS PARAMETROS DE
DESEMPEÑO ANALÍTICO DE LINEALIDAD, EXACTITUD, PRECISIÓN,
LIMITES E INCERTIDUMBRE**

Linealidad

Tabla N° 24. Tabla de estimación por mínimos cuadrados para la linealidad

N°	Muestras de Ensayo (X)	Concentración Medida (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.01	0.009	0.0001	0.000081	0.00009
2	0.01	0.008	0.0001	0.000064	0.00008
3	0.01	0.006	0.0001	0.000036	0.00006
4	0.05	0.048	0.0025	0.002304	0.0024
5	0.05	0.049	0.0025	0.002401	0.00245
6	0.05	0.051	0.0025	0.002601	0.00255
7	0.1	0.104	0.01	0.010816	0.0104
8	0.1	0.101	0.01	0.010201	0.0101
9	0.1	0.103	0.01	0.010609	0.0103
10	0.3	0.298	0.09	0.088804	0.0894
11	0.3	0.302	0.09	0.091204	0.0906
12	0.3	0.297	0.09	0.088209	0.0891
13	0.7	0.704	0.49	0.495616	0.4928
14	0.7	0.702	0.49	0.492804	0.4914
15	0.7	0.701	0.49	0.491401	0.4907
Sumatoria	3.48	3.483	1.7778	1.787151	1.78243

Resolución estadística para Tabla N° 5

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b_1 = \frac{15(1.78243) - (3.48 * 3.483)}{(15 * 1.7778) - (3.48)^2} = 1.00405$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

$$b_0 = \frac{3.483 - (1.00405 * 3.48)}{15} = -0.0007396$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

$$r^2 = \frac{(15(1.78243) - (3.48)(3.483))^2}{(15(1.7778) - (3.48)^2)(15(1.787151) - (3.483)^2)} = 0.9999$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$\sqrt{\frac{1.787151 - (1.00405 * 1.78243) - (-0.0007396 * 3.483)}{15 - 2}} = 0.002452$$

$$S_{b_1} = 0.002452 \sqrt{\frac{1}{1.7778 - \frac{(3.48)^2}{15}}} = 0.002489$$

$$IC(b_1) = 1.00405 \pm (2.160 * 0.002489) \text{ (ver Anexo N° 11)}$$

intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$Sb_0 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$\bar{x} = \frac{3.48}{15} = 0.232$$

$$Sb_0 = 0.002452 \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{(0.232)^2}{1.7778 - \frac{(3.48)^2}{15}}} = 0.000856904$$

$$IC(b_0) = -0.0007396 \pm (2.160 * 0.000856904) \text{ (ver Anexo N° 11)}$$

Coefficiente de variación de la regresión Lineal

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{3.483}{15} = 0.2322$$

$$CV_{y/x} = \frac{0.002452}{0.2322} * 100 = 1.05\%$$

Prueba de hipótesis con una prueba de *t* student de dos colas para la pendiente

$$t_{calc} = \frac{b_1 - \tilde{x}}{Sb_1} \quad t_{(0.025)_{(2)}} \text{ gl}$$

$$t_{calc} = \frac{1.00405 - 0.232}{0.002489} = 310.18$$

Prueba de hipótesis con una prueba de $t_{student}$ de dos colas para el intercepto

$$t_{calc} = \frac{b_0 - \bar{x}}{sb_0} \quad t(0.025)(2) gl$$

$$t_{calc} = \frac{-0.0007396 - 0.232}{0.000856904} = -271.605$$

Resolución estadística para análisis de varianza de la regresión lineal Tabla N° 6

$$SCT = \sum y^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$SCT = 1.787151 - \frac{(3.48)^2}{15} = 0.9798$$

$$SC_{erg} = b \left[\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n} \right]$$

$$SC_{erg} = 1.00405 \left[1.78243 - \frac{(3.48)(3.483)}{15} \right] = 0.9783$$

$$SC_{err} = SCT - SC_{erg}$$

$$SC_{err} = 0.9798 - 0.9783 = 0.0015$$

$$CM_{reg} = \frac{SC_{reg}}{gl}$$

$$CM_{reg} = \frac{0.9783}{1} = 0.9783$$

$$CM_{err} = \frac{SC_{err}}{gl}$$

$$CM_{err} = \frac{0.0015}{13} = 0.1 \times 10^{-3}$$

$$CMT = \frac{SCT}{gl}$$

$$CMT = \frac{0.9783}{14} = 0.0699$$

$$F_{calc} = \frac{0.9783}{0.1 \times 10^{-3}} = 978.30$$

Análisis de residuales

Tabla N° 25. Datos de residuales según la ecuación de la recta por mínimos cuadrados.

Muestras de Ensayo(x)	Pronostico para \hat{Y}_i	Concentraciones Respuestas Y_i	Residuo
0.01	0.0093	0.0090	-0.0003
0.01	0.0093	0.0080	-0.0013
0.01	0.0093	0.0060	-0.0033
0.05	0.0495	0.0480	-0.0015
0.05	0.0495	0.0490	-0.0005
0.05	0.0495	0.0510	0.0015
0.1	0.0997	0.1040	0.0043
0.1	0.0997	0.1010	0.0013
0.1	0.0997	0.1030	0.0033
0.3	0.3005	0.2980	-0.0025
0.3	0.3005	0.3020	0.0015
0.3	0.3005	0.2970	-0.0035
0.7	0.7021	0.7040	0.0019
0.7	0.7021	0.7020	-0.0001
0.7	0.7021	0.7010	-0.0011

Exactitud

Tabla N° 26. Cálculo de cantidad recuperada por medio del método de análisis establecido.

N° de replicas	Adición ppm (mg/L)(a)	Concentraciones experimentales(x)	Recuperado (y) $\frac{x}{a} = y$	y^2
1	0.03	0.03	1.000	1.000
2	0.03	0.029	0.967	0.934
3	0.03	0.029	0.967	0.934
4	0.05	0.051	1.020	1.040
5	0.05	0.048	0.960	0.922
6	0.05	0.049	0.980	0.960
7	0.1	0.097	0.970	0.941
8	0.1	0.099	0.990	0.980
9	0.1	0.098	0.980	0.960
n=9	Sumatoria		$\Sigma Y=8.833$	$\Sigma Y^2= 8.673$

Resolución estadística de Tabla N° 7

Media aritmética:

$$\bar{X} = \frac{\Sigma y}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{8.833}{9} = 0.9814$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

$$S = \sqrt{\frac{9(8.673) - (8.833)^2}{9(8)}} = 0.0221$$

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

$$CV = \frac{0.0221}{0.9814} * 100 = 2.25\%$$

Intervalo de confianza:

$$IC_{(\mu)} = \bar{x} \pm t_{0.975 \ n-1} * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$IC_{(\mu)} = 0.9814 \pm (2.306 * 0.007366667) \text{ (ver Anexo N° 11)}$$

Tabla N° 27. Cálculo de cantidad recuperada a partir de una concentración conocida.

Adición ppm (mg/L) X_{ref}	Concentraciones experimentales	Promedio (\bar{X})	Sesgo b $\bar{X} - X_{ref}$	Error relativo porcentual $b(\%)$ $\frac{\bar{X} - X_{ref}}{X_{ref}} * 100$	Recuperación aparente $R(\%)$ $\frac{\bar{X}}{X_{ref}} * 100$
0.03	0.03	0.029	-0.001	-3.33	96.67%
0.03	0.029				
0.03	0.029				
0.05	0.051	0.049	-0.0010	-2.00	98.0%
0.05	0.048				
0.05	0.049				
0.1	0.097	0.098	-0.002	-2.0	98.0%
0.1	0.099				
0.1	0.098				

Precisión

Repetibilidad

Tabla N° 28. Porcentaje de recobro para repetibilidad

Repetibilidad					
	Concentración		Concentración	Porcentaje de Recobro obtenido $\frac{mx}{st} \times 100$	Y ²
Estándar 1	0.049	Muestra 1	0.015	30.61%	936.97%
Estándar 2	0.049	Muestra 2	0.014	28.57%	816.24%
Estándar 3	0.051	Muestra 3	0.013	25.49%	649.74%
Estándar 4	0.048	Muestra 4	0.012	25.00%	625.00%
Estándar 5	0.049	Muestra 5	0.015	30.61%	936.97%
Estándar 6	0.051	Muestra 6	0.015	29.41%	864.95%
Estándar 7	0.051	Muestra 7	0.015	29.41%	864.95%
Estándar 8	0.048	Muestra 8	0.012	25.00%	625.00%
Estándar 9	0.049	Muestra 9	0.011	22.45%	504.00%
Estándar 10	0.050	Muestra 10	0.013	26.00%	676.00%
Sumatoria				272.55%	7499.83%

Resolución estadística de Tabla N° 8

Media aritmética:

$$y = \frac{\sum y}{n}$$

$$y = \frac{272.55\%}{10} = 27.26\%$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$$S = \sqrt{\frac{10(7499.83\%) - (272.55\%)^2}{10(10-1)}} = 2.82\%$$

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{s}{y}$$

$$CV = \frac{2.82\%}{27.26\%} = 0.1\%$$

Intervalo de confianza:

$$IC_{(\mu)} = y \pm t_{0.975 \ n-1} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$IC_{(\mu)} = 27.26\% \pm (2.2622 * 0.8917623) \text{ (ver Anexo N° 11)}$$

Precisión intermedia

Tabla N° 29. Datos para el análisis de varianza- modelo matemático

i (Analistas=2)			$Y_{ij} = \tilde{x} + ai + \varepsilon_j$ <p>Dónde: A es el número de ocasiones</p>
Variable	A ₁	A ₂	
j (repeticiones=10)			
Muestra 1	30.61%	30.61%	
Muestra 2	28.57%	30.61%	
Muestra 3	25.49%	29.41%	
Muestra 4	25.00%	31.25%	
Muestra 5	30.61%	26.53%	
Muestra 6	29.41%	23.53%	
Muestra 7	29.41%	27.45%	
Muestra 8	25.00%	33.33%	
Muestra 9	22.45%	26.53%	
Muestra 10	26.00%	22.00%	
Y _i	272.55	281.25	ΣT=553.8
Media muestral		27.69	
α		2	
ε		18	

Resolución estadística para el análisis de varianza de la precisión intermedia
 Tabla N° 9

$$SCT = \sum_{i=1}^{\alpha} \sum_{ji}^{\alpha} (y_{ij})^2 - \frac{(\sum T)^2}{\alpha r}$$

$$SCT = 30.61^2 + 28.57^2 \dots + 22.0^2 - \frac{553.8^2}{20} = 190.2948$$

$$SC_{\alpha i} = \frac{(\sum A_1)^2}{r} - \frac{(\sum T)^2}{\alpha r}$$

$$SC_{\alpha i} = \frac{272.55^2 + 281.25^2}{10} - \frac{553.8^2}{20} = 3.7845$$

$$SC_{\varepsilon j} = \sum_{i=1}^{\alpha} \sum_{ji}^{\alpha} (y_{ij})^2 - \left[\frac{\sum A_1^2 + \sum A_2^2 + \sum A_3^2 + \dots + \sum A_n^2}{r} \right]$$

$$SC_{\varepsilon j} = 30.61^2 + 28.57^2 \dots + 22.0^2 - \left(\frac{272.55^2 + 281.25^2}{10} \right) = 186.5103$$

$$CM_{\alpha i} = \frac{SC_{\alpha i}}{gl}$$

$$CM_{\alpha i} = \frac{3.7845}{1} = 3.7845$$

$$CM_{\varepsilon j} = \frac{SC_{\varepsilon j}}{gl}$$

$$CM_{\varepsilon j} = \frac{186.5103}{18} = 10.36168333$$

$$CMT = \frac{SCT}{gl}$$

$$CMT = \frac{190.2948}{19} = 10.01551579$$

$$F_{calc} = \frac{CM_{ai}}{CM_{\epsilon j}}$$

$$F_{calc} = \frac{3.7845}{10.36168333} = 0.365239882$$

Limites

Tabla N° 30. Tabla de cálculo de mínimos cuadrados para muestras fortificadas

N°	Concentración Teórica	Concentración Recuperada (X)	Respuesta Practica (Y)	XY	X ²	Y ²
1	0.005	0	0	0	0	0
2	0.005	0	0	0	0	0
3	0.006	0.0067	0.006	4.02745E-05	4.50565E-05	0.000036
4	0.006	0.0067	0.006	4.02745E-05	4.50565E-05	0.000036
5	0.007	0.0077	0.007	5.39587E-05	5.94191E-05	0.000049
6	0.007	0.0077	0.007	5.39587E-05	5.94191E-05	0.000049
7	0.008	0.0087	0.008	6.96348E-05	7.57657E-05	0.000064
8	0.008	0.0077	0.007	5.39587E-05	5.94191E-05	0.000049
9	0.009	0.0097	0.009	8.73028E-05	9.40961E-05	0.000081
10	0.009	0.0097	0.009	8.73028E-05	9.40961E-05	0.000081
Sumatoria		0.064655	0.059	0.0004867	0.000532328	0.000445

Resolución estadística para Tabla N° 10

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b_1 = \frac{(10 \times 0.0004867) - (0.064655 * 0.059)}{(10 \times 0.000532328) - (0.064655)^2} = 0.9207$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

$$b_0 = \frac{0.059 - (0.9207 \times 0.064655)}{10} = -0.000052786$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

$$r^2 = \frac{((10 \times 0.0004867) - (0.064655)(0.059))^2}{((10 \times 0.000532328) - (0.064655)^2) \times (10(0.000445) - (0.059)^2)} = 0.9992$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{0.000445 - (0.9207 \times 0.0004867) - (-0.000052786 \times 0.059)}{8}} = 0.034792 \times 10^{-3}$$

$$Sb_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$Sb_1 = 0.034792 \times 10^{-3} \sqrt{\frac{1}{0.000532328 - \frac{(0.064655)^2}{10}}} = 0.003254275$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$C(\beta_1) = 0.9207 \pm (2.306 \times 0.003254275) \text{ (ver Anexo N°11)}$$

Tabla N° 31. Cálculo para límite de cuantificación y límite de detección en base a lectura del blanco.

N°	Resultados de lectura de blanco	y^2
1	0.001	0.000001
2	0.001	0.000001
3	0.001	0.000001
4	0.001	0.000001
5	0.001	0.000001
6	0.001	0.000001
7	-0.001	0.000001
8	0.001	0.000001
9	0	0
10	0.001	0.000001
Sumatoria	0.007	0.000009

Resolución estadística para Tabla N° 11

Desviación estándar

$$S_b = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{(10 \times 0.000009) - (0.007)^2}{10(10-1)}} = 0.000675$$

Límite de detección

$$LD = \frac{3.3 \times S_b}{b_1}$$

$$LD = \frac{3.3 \times 0.000675}{0.9207} = 0.0024$$

Límite de cuantificación

$$LC = \frac{10xS_b}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 \times 0.000675}{0.9207} = 0.007$$

Incertidumbre

Modelo Matemático:

$$[]_{Cr^{6+}} = []_{Cr^{6+}} \times f_d$$

Incertidumbre debido a la curva de calibración

$$U_{[]_{Cr^{6+}}} = \frac{S}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{y})^2}{sxx}}$$

Ecuación de regresión lineal del parámetro de linealidad

$$y = 1.0041x - 0.0007$$

$$U_{[]_{Cr^{6+}}} = \frac{0.0023}{1.0041} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{15} + \frac{(0.05 - 0.2322)^2}{0.97044}} = \mathbf{0.0015}$$

Incertidumbre de factor de dilución

$$f_d = \frac{v_1}{v_2}$$

$$\frac{U_{f_d1}}{f_d1} = \sqrt{\left(\frac{U_{v1}}{v_1}\right)^2 + \left(\frac{U_{v2}}{v_2}\right)^2}$$

Tabla N° 32. Tabla de datos de disolución para el cálculo de incertidumbre

FD1 = 50 mg/L		FD1 = 10 mg/L		FD1 = 0.05 mg/L	
v1	2.5 mL	v1	10 mL	v1	0.25 mL
v2	50 mL	v2	50 mL	v2	50 mL
c1	1000 mg/L	c1	50 mg/L	c1	10 mg/L
c2	50mg/L	c2	10 mg/L	c2	0.05 mg/L

Incertidumbre de volumen

$$u_v = \sqrt{(u_{rep})^2 + (u_{calib})^2 + (u_{temp})^2}$$

Incertidumbre de repetibilidad del material volumétrico.

$$u_{rep} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Tabla N° 33. Cálculo de incertidumbre de repetibilidad para frasco volumétrico de 50 mL

Gramos	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
50.0005	0.00211	4.4521E-06
50.0001	0.00171	2.9241E-06
50.0003	0.00191	3.6481E-06
50.0009	0.00251	6.3001E-06
50.0000	0.00161	2.5921E-06
49.9899	-0.00849	7.20801E-05
50.0015	0.00311	9.6721E-06
49.998	0.00141	1.9881E-06
50.0012	0.00281	7.8961E-06
49.9897	-0.00869	7.55161E-05

$$\bar{x} = 49.99839$$

$$\sum(x_i - \bar{x})^2 = 0.000187069$$

$$s = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

$$s = \frac{\sqrt{0.000187069}}{10 - 1}$$

$$s = 0.001519702$$

$$u_{Rep.V50} = \frac{0.001519702}{\sqrt{10}} = 0.00048$$

Tabla N° 34. Cálculo de incertidumbre de repetibilidad para Bureta de 10 mL

Gramos	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
10.0030	0.0030	8.9401E-06
10.0010	0.0010	9.801E-07
10.0002	0.0002	3.61E-08
10.0003	0.0003	8.41E-08
10.0000	0.0000	1E-10
10.0045	0.0045	2.01601E-05
9.9997	-0.0003	9.61E-08
10.0020	0.0020	3.9601E-06
9.9899	-0.0101	0.000102212
9.9995	-0.0005	2.601E-07

$$\bar{x} = 10.0000$$

$$\sum(x_i - \bar{x})^2 = 0.000136729$$

$$S = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

$$S = \frac{\sqrt{0.000136729}}{10 - 1}$$

$$S = 0.001299235$$

$$u_{Rep.B10} = \frac{0.001299235}{\sqrt{10}} = 0.00041$$

Tabla N° 35. Cálculo de incertidumbre de repetibilidad para pipeta de 10 mL

Gramos	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
10.0030	0.00388000	1.50544E-05
10.0010	0.00188000	3.5344E-06
9.9980	-0.00112000	1.2544E-06
10.0003	0.00118000	1.3924E-06
10.0002	0.00108000	1.1664E-06
10.0010	0.00188000	3.5344E-06
9.9899	-0.00922000	8.50084E-05
10.0020	0.00288000	8.2944E-06
9.9958	-0.00332000	1.10224E-05
10.0000	0.00088000	7.744E-07

$$\bar{x} = 9.9991$$

$$\sum(x_i - \bar{x})^2 = 0.000131036$$

$$S = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

$$S = \frac{\sqrt{0.000131036}}{10 - 1}$$

$$S = 0.001271900$$

$$u_{Rep.P10} = \frac{0.001271900}{\sqrt{10}} = 0.00040$$

Incertidumbre de calibración del material volumétrico

$$u_{calib} = \frac{\text{Certificado calibración}}{k}$$

Tabla N° 36. Datos de incertidumbre de material volumétrico.

Cristalería	Incertidumbre
Frasco volumétrico de 50 mL	± 0.13 mL
Bureta de 10 mL	± 0.03 mL
y Pipeta de 10 mL	± 0.02 mL

Incertidumbre de la variabilidad de temperatura del material volumétrico.

-

$$u_{temp} = \frac{[(T - T_{20}) CO_{exp_{termica}} \times V]}{\sqrt{3}}$$

Tabla de recopilación de incertidumbres de volumen

Tabla N° 37. Resultados del cálculo de incertidumbre de volumen

Volumen	Magnitud	Unidades	U=Incertidumbre
50	Repetibilidad	mL	$U_{REP} = 0.00048$
	Calibración	mL	$u_{calib} = \frac{0.13}{\sqrt{6}} = 0.0531$
	Variación V por T	mL	$U_{temp} = 0$
	u_v	mL	$u_{(v)} = \sqrt{((0.00048)^2 + 0^2 + 0.0531^2)} = 0.05$
10	Repetibilidad	mL	$U_{REP} = 0.00041$
	Calibración	mL	$u_{calib} = \frac{0.03}{\sqrt{6}} = 0.01225$
	Variación V por T	mL	$U_{temp} = 0$
	u_v	mL	$u_{(v)} = \sqrt{((0.00041)^2 + 0^2 + 0.01225^2)} = 0.01$
10	Repetibilidad	mL	$U_{REP} = 0.00040$
	Calibración	mL	$u_{calib} = \frac{0.02}{\sqrt{6}} = 0.01155$
	Variación V por T	mL	$U_{temp} = 0$
	u_v	mL	$u_{(v)} = \sqrt{((0.00040)^2 + 0^2 + 0.01155^2)} = 0.01$

Tabla N° 38. Resultados del cálculo de incertidumbre de dilución.

<i>FD1 = 20</i>	<i>FD2 = 5</i>	<i>FD3 = 200</i>
$\frac{U_{fd1}}{f_{d1}} = \sqrt{\left(\frac{U_{v1}}{v_1}\right)^2 + \left(\frac{U_{v2}}{v_2}\right)^2}$	$\frac{U_{fd2}}{f_{d2}} = \sqrt{\left(\frac{U_{v1}}{v_1}\right)^2 + \left(\frac{U_{v2}}{v_2}\right)^2}$	$\frac{U_{fd3}}{f_{d3}} = \sqrt{\left(\frac{U_{v1}}{v_1}\right)^2 + \left(\frac{U_{v2}}{v_2}\right)^2}$
$\frac{U_{fd1}}{f_{d1}} = \sqrt{\left(\frac{0.01}{10}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{50}\right)^2}$	$\frac{U_{fd2}}{f_{d2}} = \sqrt{\left(\frac{0.01}{10}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{50}\right)^2}$	$\frac{U_{fd3}}{f_{d3}} = \sqrt{\left(\frac{0.01}{10}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{50}\right)^2}$
$U_{fd1} = 0.028$	$U_{fd2} = 0.007$	$U_{fd3} = 0.283$

Incertidumbre del Estándar de referencia certificado (ERC)

$$u_{ERC} = \frac{U_{EXP}}{k} = \frac{U_{EXP}}{2}$$

$$u_{ERC} = \frac{5 \text{ mg/L}}{2} = 2.5 \text{ mg/L}$$

incertidumbres de las diluciones del estándar de referencia.

Modelo matemático a seguir:

$$conc_{diluERC} = conc_{ERC} * FD1 * FD2 * FD3$$

La estimación seguirá la siguiente formula:

$$\frac{U_{diluERC}}{conc_{diluERC}} = \sqrt{\left(\frac{U_{ERC}}{conc_{ERC}}\right)^2 + \left(\frac{U_{Fd1}}{f_{d1}}\right)^2 + \left(\frac{U_{fd2}}{f_{d2}}\right)^2 + \left(\frac{U_{fd3}}{f_{d3}}\right)^2}$$

$$\frac{U_{diluERC}}{0.05 \text{ mg/L}} = \sqrt{\left(\frac{2.5 \text{ mg/L}}{1000 \text{ mg/L}}\right)^2 + \left(\frac{0.028}{20}\right)^2 + \left(\frac{0.007}{5}\right)^2 + \left(\frac{0.283}{200}\right)^2} = 0.0002$$

Incertidumbre por repetibilidad de la muestra

Tabla N° 39. Representación de datos para el cálculo de incertidumbre de repetibilidad

	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
0.015	0.0011	0.00000121
0.014	0.014	0.000196
0.013	0.013	0.000169
0.016	0.016	0.000256
0.015	0.015	0.000225
0.015	0.015	0.000225
0.015	0.015	0.000225
0.012	0.012	0.000144
0.011	0.011	0.000121
0.013	0.013	0.000169

$$\bar{x} = 0.0139$$

$$\sum(x_i - \bar{x})^2 = 0.00173121$$

$$S = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

$$S = \frac{\sqrt{0.00173121}}{10 - 1}$$

$$S = 4.62309 \times 10^{-3}$$

$$u_{Rep.MX} = \frac{4.62309 \times 10^{-3}}{\sqrt{10}} = 1.461949 \times 10^{-3}$$

El resultado con los datos necesarios para la expresión es el siguiente:

$$conc_i = [Cr^{6+}] + \beta$$

$$conc_i = 0.0139 \text{ mg/L} + 1.461949 \times 10^{-3} = 0.0154$$

Incertidumbre combinada

$$U_{combinada} = \sqrt{(U_{[Cr^{6+}]})^2 + (U_{dilERC})^2 + (U_{Fd1})^2 + (U_{fd2})^2 + (U_{fd3})^2}$$

$$U_{combinada} = \sqrt{(0.0015)^2 + (0.0002)^2 + (0.028)^2 + (0.007)^2 + (0.283)^2} = 0.2845$$

ANEXO N° 24
INCERTIDUMBRE DEL ESTÁNDAR DE REFERENCIA CERTIFICADO
(ERC)

Certipur®



Certificate of Analysis – Certified Reference Material

Chromium standard solution 1000 mg/l Cr



Product no.: 1.19779.0500
Lot no.: HC99974679
Description of CRM: Chromium standard solution 1000 mg/l Cr
Expiry date: 2022/06/30
Storage: +15°C to +25°C tightly closed in the original container
Composition: Cr(NO₃)₃ in HNO₃ Suprapur® 0,5 mol/l

Analyte	Certified value as mass fraction	Associated uncertainty, $U=k \cdot u$ ($k=2$) as mass fraction
Cr	985 mg/kg	± 5 mg/kg

Metrological traceability: Directly traceable to NIST SRM 3112a, lot 170630
Measurement method: Inductively coupled plasma optical emission spectrometry ICP-OES
Intended use: This reference material is intended for use as a calibration standard for atomic absorption spectrometry, spectrophotometry and other analytical techniques.
Instructions for handling and correct use: Shake well before use and never pipet directly from the original container. See Details for correct use on page 2.
Health and safety information: Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
Accreditation: Merck KGaA, Darmstadt, Germany is accredited by the German accreditation authority DAkkS as registered reference material producer D-RM-15185-01-00 in accordance with ISO Guide 34 and registered calibration laboratory D-K-15185-01-00 according to DIN EN ISO/IEC 17025.
Certificate issue date: 2019/08/19



ISO Guide 34



ISO/IEC 17025

A. Yildirim

Dipl.-Ing. Ayfer Yildirim (QC Laboratory Manager)

Figura N° 24. Certificado del estándar de referencia (ERC)

Details on correct use:

The user should be aware of the additional effect of transpiration losses of solvent through the container walls of the unopened bottle. The effect leads to an increase of the mass fraction in the range of 0.012 mg/kg per month. It is the responsibility of the user to account for this effect by correction of the certified value by

$$w(t) = 0.012 \cdot t + w(t_0)$$

$w(t)$ = element mass fraction after storage time in months

t = storage in months of the unopened bottle

$w(t_0)$ = element mass fraction at the time of certification

Certification process details:

Certipur® AAS single element standards are prepared gravimetrically from high purity raw materials in either high purity acids or high purity bases Suprapur® and diluted with filtered (0,22µm) high purity water (18MΩ). All balances are regularly calibrated with analytical weight sets traceable to primary weights by PTB (Physikalisch Technische Bundesanstalt). The density of each batch is measured in g/cm³ at 20°C and is used to calculate the concentration in mg/l.

Characterisation of Certipur® AAS single element standards is carried out by the accredited quality control (QC) laboratory at Merck KGaA, Darmstadt, Germany according to DIN EN ISO / IEC 17025 by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP – OES).

Homogeneity and stability studies are performed with the material according to the requirements of ISO Guide 34 and ISO Guide 35.

Associated uncertainty:

The associated uncertainty U_{CRM} reported with the certified values is calculated as combined expanded uncertainty $U_{CRM} = k \cdot u_{CRM}$ in accordance with GUM and EA-4/02, with $k=2$ as the coverage factor for a 95% coverage probability.

The combined uncertainty u_{CRM} is derived from combination of the squared uncertainty contributions:

$$u_{CRM} = \sqrt{u^2_{\text{Characterisation}} + u^2_{\text{Homogeneity}} + u^2_{\text{Stability}}}$$

$u_{\text{characterisation}}$:	is the uncertainty in accordance with DIN EN ISO/IEC 17025 which includes the contributions of the primary reference material and the measuring system.
$u_{\text{homogeneity}}$:	is the between-bottle variation in accordance with ISO Guide 34. The assessment of homogeneity is performed by analysis of a representative number of systematically chosen sample units.
$u_{\text{stability}}$:	is the uncertainty obtained from short-term and long-term stability in accordance with ISO Guide 34. The stability studies are the basis for the quantification of the expiry date of this elemental standard for the unopened bottle.

Informative values:

The density of the elemental standard solution is 1.0150 g/cm³ at 20°C and is used to calculate the concentration 1000 mg/l.

For more detailed information please read the certification report on www.merckmillipore.com

Certificate of analysis revision history:

Certificate version	Date	Reason for version
01	2019/08/19	Initial version