

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO (3500-Fe D) DE LA
FENANTROLINA PARA DETERMINACION DE HIERRO TOTAL EN AGUA
POTABLE.**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
DIANA VIRGINIA GARCIA MENENDEZ
GUILLERMO ERNESTO MELGAR SANTIAGO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO 2011

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL:

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo.

ASESORAS DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS

FARMACEUTICOS, COSMETICOS Y VETERINARIOS:

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez.

MSc. Rocío Ruano de Sandoval.

DOCENTES DIRECTORES:

Lic. Henry Hernández Contreras.

Licda. Rosa Mirian Rivas Larín.

AGRADECIMIENTOS.

Primero a Dios Todopoderoso por haberme dado la sabiduría y la guía necesaria para poder terminar mi primer triunfo profesional.

Además agradezco a mis Padres por haber sido un pilar muy importante en la culminación de mi carrera profesional, ya que me apoyaron incondicionalmente y me impulsaron siempre a seguir hasta lograr finalmente con este trabajo de investigación mi primer éxito profesional. Asimismo agradezco a todas las personas que han estado siempre a mi lado en todo este proceso, ya que han sido parte muy importante en mi vida ayudándome con su apoyo y cariño ya que me dieron la fuerza necesaria para seguir adelante.

Agradecimientos a mis Docentes Directores por los conocimientos brindados y su guía, ya que fueron el timón de este barco para poder llegar a la meta de este trabajo de investigación.

A todos muchas gracias por su infinito amor.

Diana García

AGRADECIMIENTO.

Agradezco a Dios Todopoderoso, Creador de los cielos y la tierra por darme sabiduría e inteligencia, pues reconozco que de no ser por El no hubiese finalizado esta etapa de mi vida. Bien dicen las Santas Escrituras: Porque ha inclinado a mí su oído; por tanto le invocare en todos mis días. Clemente es Jehová, y justo; Sí, misericordioso es nuestro Dios.

A mi Madre de la cual siento mucho orgullo y dicha, que bendición ser su hijo, gracias por su amor incondicional; a mi Tía Roxana pues sin ser su hijo me ha tratado como si lo fuera, que Dios la bendiga, a mi Abuelo (Papá) y mi Tío Mario quienes han sido mis padres, dándome principios valores y carácter, haciendo de mi un hombre. Aunque usted no pueda leer estas líneas Papá, agradezco a Dios por darme la oportunidad de expresárselas en vida y como le dije lo Amo Papá.

Así también me siento dichoso por tener a una gran mujer por novia (Jacqueline) y si Dios me lo permite y Tu también en un futuro seas mi esposa.

Agradezco a mis asesores de tesis por su guía y esmero durante todo el proceso.

Finalmente, pero no menos importante a mi amiga y compañera de tesis Diana a quien más que una amiga considero una hermana. Y sin planearlo hemos terminado juntos esta etapa, que gusto de que sea a tu lado, que Dios te bendiga con su amor.

Guillermo Melgar

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xviii
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	23
3.1 Generalidades del agua potable	23
3.2 Definición de hierro	24
3.2.1 Determinación de hierro por medio del método espectrofotométrico (3500-Fe D) de la fenantrolina	24
3.3 Fundamentos de la espectroscopía ultravioleta-visible	25
3.3.1 Ley de Beer	26
3.4 Validación de métodos analíticos	27
3.5 Procedimientos de Operación Estándar (POE's)	29
3.5.1 Ventajas de los POE's	30
3.5.2 Contenido de los procedimientos de operación estándar	31
3.6 Documentación	31

3.6.1	Protocolo de validación	31
3.6.2	Informe de validación	32
3.7	Parámetros de desempeño	32
3.7.1	Exactitud	32
3.7.2	Precisión	33
3.7.3	Linealidad	34
3.7.4	Intervalo	35
3.7.5	Especificidad	35
3.7.6	Límite de detección	36
3.7.7	Límite de cuantificación	36
3.7.8	Robustez	37
Capítulo IV		
4.0	Diseño Metodológico	39
4.1	Tipo de estudio	39
4.2	Investigación bibliográfica	39
4.3	Parte experimental	34
4.3.1	Instrumental	40
4.3.2	Reactivos	40
4.3.3	Procedimiento hierro total	41
4.3.4	Protocolo de validación y registro de resultados para la determinación de hierro total en agua potable	42

4.3.5 Evaluación de los parámetros de desempeño del método	43
4.3.5.1 Exactitud	43
4.3.5.2 Precisión del método	44
4.3.5.3 Especificidad	
45	
4.3.5.4 Límite de cuantificación	46
4.3.5.5 Límite de detección	48
4.3.5.6 Linealidad	48
4.3.5.7 Intervalo	50
4.3.5.8 Robustez	50
4.4 Criterios de aceptación	51
Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de resultados	57
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	83
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	86
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Método Oficial de la APHA, Método de la Fenantrolina
2. Partes y funcionamiento del equipo espectrofotométrico Shimadzu UV 1800
3. Certificado de análisis del estándar de hierro
4. Procedimiento de Operación Estándar
5. Gráfica de linealidad del Método Espectrofotométrico (3500-Fe D)
6. Ejemplo de cascada de dilución para la preparación de solución estándar
7. Cálculos y resultados para el informe de validación
8. Tabla t-Student

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° Pág
1. Criterios de aceptación	53
2. Protocolo de Validación para Método Espectrofotométrico (3500-Fe D)	54
3. Informe de Validación para Método Espectrofotométrico (3500-Fe D)	75
4. Resumen de datos obtenidos para Método Espectrofotométrico (3500-Fe D)	82

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pág
1. Resultados de exactitud de hierro total en agua potable	58
2. Resultado de repetibilidad de hierro total en agua potable	61
3. Resultados de especificidad de hierro total en agua potable	62
4. Resultados del límite de cuantificación de hierro total en agua potable	63
5. Resultados de los blancos de hierro total en agua potable	65
6. Resultados del límite de detección de hierro total en agua potable	66
7. Resultados de la linealidad de hierro total en agua potable	67
8. Resultados de la comprobación de la linealidad de hierro total en agua potable	70
9. Resultados de la robustez para la determinación de hierro total en agua potable	73

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

APHA	American Public Health Asosiation.
r^2	Coeficiente de determinación.
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia.
CV	Coeficiente de variación.
$CV_{x/y}$	Coeficiente de variación de regresión.
S	Desviación estándar.
S_b	Desviación estándar de los blancos.
$S_{y/x}$	Desviación estándar de regresión.
d_i	Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética de la condición normal.
EPA	Environmental Protection agency (Agencia de Protección Ambiental de EE.UU).
IC(b_1)	Intervalo de confianza para la pendiente.
IC(β_0)	intervalo de confianza para la ordenada al origen.
IEC	International Electrotechnical Commission (Comisión Electrotécnica Internacional).
ISO	International Organization for Standadizacion (Organización Internacional para la Estandarización).
LC	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
\geq	Mayor o igual.
\bar{y}	Media aritmética
\leq	Menor o igual.
NSO	Norma Salvadoreña Obligatoria.
β_0	Ordenada al origen.

ppm	Partes por millón.
b₁	Pendiente.
R	Porcentaje de recuperación.
Σ	Sumatoria.
Σ_y	Sumatoria de datos obtenidos de los ensayos.
UV	Ultravioleta.

RESUMEN

El presente trabajo muestra en detalle el proceso que se lleva a cabo en la validación del método analítico, específicamente el Método de la Fenantrolina en la determinación de hierro total en agua potable. Para lo cual se caracterizó el analito en estudio y se trabajó con el Método Oficial del Libro de Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales con número 3500-Fe D, el cual detalla todas las consideraciones y procedimientos a seguir para el desarrollo del método en un laboratorio de análisis. Así también este parámetro está normalizado en la Norma Salvadoreña Obligatoria (NSO 13.07.01:04) Agua, Agua Potable (1ª actualización).

En el desarrollo de esta validación por ser un método oficial se realizaron los siguientes parámetros: exactitud, precisión, especificidad, límite de cuantificación, límite de detección, linealidad, intervalo y robustez. Para cada uno de estos parámetros se muestra el cumplimiento de su criterio de aceptación en la determinación de la impureza en estudio. Los resultados obtenidos de la parte experimental fueron los siguientes: una exactitud con un CV 58.27%, precisión en términos de repetibilidad con un CV 7.11%, especificidad con un resultado que se debió únicamente al analito en estudio, límite de cuantificación y límite de detección con un r^2 0.998983, linealidad con

r^2 0.999995 y un $CV_{x/y}$ 0.26%, además de un intervalo de confianza que comprende de 0.1 a 2.0 mg/L de hierro y una diferencia absoluta de la media aritmética de 0.2 a temperatura baja y 0.007 a temperatura alta lo que comprueba la robustez del método. Llevándose acabo dichos parámetros bajo las condiciones del Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Basándose en los resultados obtenidos se puede decir, que el Método Espectrofotométrico (3500-Fe D) de la Fenantrolina para la determinación de hierro total en agua potable es confiable y seguro, por lo que puede utilizarse en actividades de proyección social de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador; ya que es un método práctico, de bajo costo, o puede ser utilizado como un recurso didáctico.

CAPITULO I
INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

El análisis de agua es de gran importancia, pues a través de él es posible conocer si ésta es apta para consumo humano, para lo cual debe estar exenta de organismos capaces de causar enfermedades y elementos o sustancias que pueden producir efectos fisiológicos perjudiciales. Para realizar dichos análisis, es necesario utilizar métodos analíticos, por medio de los cuales puedan determinarse si se esta dando cumplimiento a valores especificados por normativas nacionales o internacionales.

Para obtener resultados que sean lo suficientemente confiables, se necesita implementar sistemas de aseguramiento de calidad, los cuales pueden lograrse mediante el empleo de métodos analíticos validados.

Validar un método analítico no es más que la realización de una serie de pruebas adecuadas y documentadas; que permitan dar cumplimiento a las especificaciones y atributos de calidad, demostrando éstos que el método es apropiado para los propósitos requeridos.

El presente trabajo pretende realizar la validación del método analítico para la medición de hierro total en agua potable; por el Método Espectrofotométrico de la Fenantrolina, Método Oficial del libro Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales con número 3500-Fe D. El hierro total es un parámetro, normalizado por la Norma Salvadoreña Obligatoria (NSO 13.07.01:04) Agua, Agua Potable (1ª actualización); los análisis se realizarán en el Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, durante los meses de Octubre a Noviembre

de 2010. Período en el cual se espera obtener evidencia experimental y documental, del cumplimiento de los parámetros de desempeño del Método Espectrofotométrico de la Fenantrolina.

Para validar este método que es oficial, se han seleccionado los siguientes parámetros: exactitud, precisión (repetibilidad), especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo y robustez. El desarrollo de estos parámetros se realizó con estándar de hierro trazable al nist. (ver anexo N° 3). Mediante esta validación se pretende determinar hierro total en agua potable, aumentar la confiabilidad de los resultados obtenidos y a la vez tener la opción de que sea un método a considerar por en el Laboratorio Físicoquímico de Aguas, para futuras determinaciones.

CAPITULO II

OBJETIVOS.

2.0. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el Método Espectrofotométrico (3500-Fe D) de la Fenantrolina para la determinación de hierro total en agua potable.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1** Elaborar una propuesta de protocolo de validación para la determinación de hierro total en agua potable estableciendo el cumplimiento de los parámetros de desempeño.

- 2.2.2** Desarrollar los procedimientos de operación de los parámetros de desempeño: Exactitud, precisión (repetibilidad), especificidad, límite de cuantificación, límite de detección, linealidad, rango; aplicando el método de estudio y estableciendo los criterios de aceptación.

- 2.2.3** Definir factores que puedan influir en el Método y afectar los resultados tanto cuantitativamente como cualitativamente, mediante el estudio conocido como Robustez.

- 2.2.4** Interpretar los resultados obtenidos en cada parámetro de estudio, por medio de técnicas estadísticas para establecer si cumplen con los criterios de aceptación.

- 2.2.5** Elaborar el reporte de validación según los resultados obtenidos.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0. MARCO TEORICO

3.1 Generalidades del agua potable. (7)

Se denomina agua potable o agua de consumo humano al agua bebible en el sentido que puede ser consumida por personas y animales sin riesgo de contraer enfermedades. El término se aplica al agua que ha sido tratada para su consumo humano según las normas de calidad especificadas por las autoridades locales e internacionales.

En la Unión Europea la normativa 98/83/EU establece valores máximos y mínimos para el contenido en minerales, diferentes iones como cloruros, nitratos, nitritos, amonio, calcio, magnesio, fosfato, arsénico, etc., además de los gérmenes patógenos. Los controles sobre el agua potable suelen ser más severos que los controles aplicados sobre las aguas minerales embotelladas.

Las causas de la no potabilidad son:

- Bacterias
- Virus.
- Minerales (en forma de partículas o disueltos)
- Productos tóxicos
- Depósitos o partículas en suspensión.

Tomando en consideración que las causas de no potabilización involucran parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos; haciendo énfasis en el aspecto fisicoquímico, puede decirse que las fuentes de contaminación de agua son producidas en su mayoría por desechos

industriales de distintas áreas, como pueden ser: textil, agrícola, química, minera, etc. Incorporando sustancias y elementos que son altamente perjudiciales a la salud en cantidades que se encuentren arriba de los valores permitidos por la NSO 13.07.01:04; entre estos elementos se encuentran los metales: arsénico, cadmio, cianuro, cromo, manganeso, mercurio, plomo, hierro entre otros.

3.2 Definición de hierro. ⁽⁸⁾

El hierro es uno de los contaminantes que con más frecuencia se encuentra en el agua potable. La agencia de la protección del medio ambiente (EPA) refiere al hierro como contaminante secundario. Esto significa que el EPA ha fijado que el hierro es una consideración estética más bien que una consideración de la salud. Según la EPA si usted tiene hierro en un exceso de 0.3 miligramo por litro en agua potable, probablemente será notorio el color salobre, el sedimento oxidado, el sabor amargo o metálico, las manchas marrón-verdes, bebidas descoloradas. Cuando el hierro viene en contacto con oxígeno, cambia a un compuesto rojizo que pueda descolorar los accesorios de cuarto de baño y el lavadero. Ocurre naturalmente de la roca o puede ser introducido por los materiales de plomería. En este tiempo, no hay efectos perjudiciales hacia la salud conocidos, a causa de la cantidad hierro elevada en el agua potable.

Existen varios métodos para el análisis de hierro total entre ellos:

3.2.1 La determinación de por medio del Método Espectrofotométrico (3500-Fe D) de Fenantrolina. ⁽¹⁾

El Método de Fenantrolina consiste en dar un tratamiento a la muestra el cual reduce al hierro a estado ferroso, por ebullición con ácido clorhídrico

e hidroxilamina y se trata con 1,10-fenantrolina, hasta obtener un pH entre 3.2 a 3.3 dando la formación de un complejo rojo-naranja, siendo este un quelato de tres moléculas de fenantrolina por cada átomo de hierro ferroso; la solución coloreada obedece a la ley de Beer.

3.3 Fundamentos de la espectroscopía ultravioleta-visible. ⁽⁹⁾

El principio de la espectroscopía ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. La longitud de onda comprende entre 160 y 780 nm.

La absorción de radiación UV-visible por una especie se da en 2 etapas:

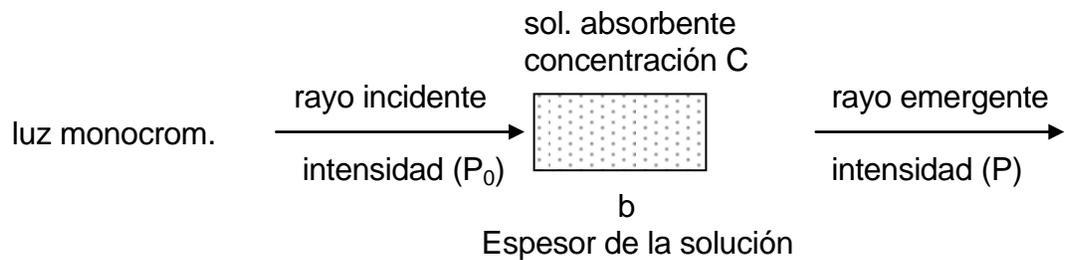
- Excitación electrónica
- Relajación. Puede ser por:
 - Emisión de calor
 - Reacción fotoquímica
 - Emisión de fluorescencia / fosforescencia

Las bandas que aparecen en un espectro UV-visible son anchas, ya que se superponen transiciones vibracionales y electrónicas.

La excitación corresponde a los electrones de enlace, por ello los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces. Por este motivo la espectroscopía UV-visible es válida para identificar grupos funcionales en una molécula.

3.3.1 Ley de Beer. ⁽⁴⁾

Cuando un rayo de luz monocromático pasa a través de un medio absorbente, su intensidad disminuye exponencialmente a medida que aumenta la concentración de la sustancia absorbente en el medio.



La ecuación que expresa esta ley es la siguiente:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abC$$

Donde:

A: absorbancia

a: absortividad

C: concentración.

b: longitud de la trayectoria de la radiación.

De acuerdo con esta ley, la absorbancia (a) está relacionada linealmente con la concentración (c) de las especies absorbentes y con la longitud de la trayectoria de la radiación (b) en el medio absorbente.

La absorbancia es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra y la absortividad es la medida de la cantidad de luz absorbida por una solución. Dado que la absorbancia es una cantidad

adimensional, la absorptividad debe tener unidades que cancelen las unidades de b y c , por ejemplo, si " c " tiene unidades de gramos por litro (g L^{-1}) y b esta en centímetros (cm), la absorptividad tiene unidades de litros por gramo por centímetros ($\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Cuando la concentración se expresa en mol por litro (mol L) y b en centímetros, la constante de proporcionalidad se denomina absorptividad molar y se expresa con el símbolo ϵ . Por tanto, $A = \epsilon bc$. Donde ϵ tiene unidades de litro por mol centímetro ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

3.4 Validación de métodos analíticos.⁽⁶⁾

Frecuentemente, los laboratorios tanto del sector químico, industrial, farmacéutico y ambiental manifiestan la necesidad de implementar sistemas que puedan asegurar la calidad establecidas bajo normas internacionales, con el propósito de lograr los niveles mas elevados de confiabilidad, tanto en materiales, equipos, metodologías y en la calidad de los datos que se generan a partir de ellos. ⁽⁶⁾

Uno de los elementos primordiales que proveen calidad a los laboratorios es el empleo de métodos analíticos validados. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra por estudios de laboratorios que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito. Por lo que la validación de métodos analíticos según la Norma Salvadoreña ISO/IEC17025:2005 contiene los requisitos generales para la competencia de laboratorios de prueba y calibración.

Ya que la validación es establecida por medios de estudios experimentales, que demuestran científicamente que el procedimiento analítico posee las características de desempeño adecuadas, para dar cumplimiento a los requerimientos de las aplicaciones analíticas adecuadas.

En función de la aplicación analítica de un método los parámetros de desempeño a estudiar pueden ser ⁽³⁾:

- Precisión/adecuabilidad del sistema
- Linealidad del sistema
- Especificidad*
- Exactitud* y repetibilidad*
- Linealidad del método*
- Precisión del método* o precisión intermedia
- Estabilidad analítica de la muestra
- Límite de detección*
- Límite de cuantificación*
- Robustez*
- Tolerancia.

Nota: Se determinaran los parámetros de desempeño señalados con asterisco; Esperando dar de esta manera cumplimiento a los requisitos establecidos por la norma salvadoreña ISO/IEC 17025:2005.

3.5 Procedimientos de Operación Estándar (POE´s)

Los Procedimientos de Operación Estándar (POE´s) son procedimientos escritos y aprobados según normas de correcta elaboración y control de calidad que describen, de forma específica, las actividades que se llevan a cabo; por lo que llegan a ser una guía en el momento de una operación, ya que provee instrucciones detalladas por escrito que especifican la manera de cómo debe efectuarse una prueba o procedimiento administrativo o cómo operar, mantener y calibrar un equipo.

El original de la versión de un POE´s se conserva en un archivo central, y se distribuye copias del mismo a los puntos donde se efectúa el procedimiento.

Una de las características invaluable de la aplicación de los POES, es la posibilidad de responder inmediatamente frente a fallas en la calidad de los productos o procedimiento analítico. Sin olvidar que un buen procedimiento, tiende a minimizar la aparición de tales fallas.

Entonces, más allá de la obligatoriedad de los POES, es indispensable entender que el uso de estas operaciones que es parte integrante de los procesos de fabricación y que, por ello son complementarios de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

3.5.1 Ventajas de los POE´s

La planificación, estructuración y desarrollo de las actividades de un laboratorio utilizando POE´s, presenta numerosas ventajas, como las que se mencionan a continuación:

- Mejora la organización y ejecución de las actividades.
- Facilita el trabajo al personal, tanto de carácter técnico como administrativo.
- Facilita el entrenamiento de nuevo personal.
- Proporciona uniformidad en la utilización de los equipos, de toma de muestras y de análisis, reduciendo las posibilidades de error.
- Facilita delegar funciones.
- Garantiza el registro de los datos primarios.
- Proporciona datos comparativos entre sí, tanto dentro del propio laboratorio como con otros laboratorios, a lo largo del tiempo.

3.5.2 Contenido de los procedimientos de operación estándar

En un procedimiento pueden figurar, como mínimo, los siguientes apartados:

- Título: Establece la acción que se pretende ejecutar.
- Objetivo: Explica clara y brevemente el objetivo del procedimiento.
- Alcance: Establece el lugar para cumplir el procedimiento.
- Principio: Establece el fundamento de un método. (Este apartado se utilizará cuando fuese necesario y aplique.)
- Equipo, materiales y reactivos a utilizar: Se dará un detalle específico de cada uno.
- Responsabilidades: Determina el personal que es idóneo para el cumplimiento del proceso de operación.
- Desarrollo: Es la descripción detallada del procedimiento.

- Referencia: Especifica el material bibliográfico del cual fundamenta el proceso.

3.6 Documentación. ⁽⁵⁾

3.6.1 Protocolo de validación

Cuando se realiza la validación de un método analítico es necesario contar con la documentación que sea capaz de evidenciar un objetivo, definición del sistema a validar, identificación de los parámetros, diseño del plan experimental y criterios de aceptación. Este debe ser específico para determinado método; debiendo ir firmado y fechado por las personas responsables de la validación y aprobación del mismo.

El esquema de un protocolo de validación puede incluir los puntos siguientes:

- Objetivo: finalidad de la validación.
- Responsables: relación de las personas que llevan a cabo la validación y de las que la aprobarán.
- Parámetros a estudiar: los parámetros se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.
- Muestra(s): el muestreo se realizará de acuerdo con procedimientos escritos, en los cuales se indicarán los sistemas de identificación y tratamiento previo de las muestras.
- Equipo(s): se han de identificar los equipos implicados en el proceso de validación y comprobar que están convenientemente calificados, reflejando esto en el informe de validación.

- Métodos analíticos: existirían métodos que describen el procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnicas y cálculos.
- Criterios de aceptación: se establecerán para cada uno de los parámetros y estarán basados en las necesidades o la finalidad del método y en la información recogida en la fase de desarrollo del procedimiento analítico.
- Registro de resultados: este incluirá el número de muestras, fecha del análisis, así como también el analista que realizará el parámetro, absorbancia correspondiente al número de muestra en estudio y la concentración de muestra de la misma.

3.6.2 Informe de validación

El contenido del informe de validación debe abarcar los siguientes datos: título, resultados, análisis de resultados, cuadro comparativo con criterios de aceptación, conclusiones.

3.7 Parámetros de desempeño. ⁽⁵⁾

3.7.1 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

No debe confundirse la exactitud y precisión. Pues la precisión esta relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que esta el valor verdadero. Para que un método sea exacto requiere de un cierto grado de precisión.

Para definición de exactitud surge el principal problema de cual es el valor aceptado como verdadero de un determinado analito; el valor verdadero en muchos casos se desconoce, pero cuando se disponen de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como verdadero, por lo que la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón.

La exactitud experimentalmente se establece a través del rango especificado en el procedimiento analítico, pudiendo ser evaluado con un mínimo de tres niveles de concentración cada uno por triplicado y debiendo ser reportado su resultado como porcentaje de recobro de la cantidad del estándar de referencia o por la diferencia entre el porcentaje promedio del ensayo y el valor aceptado como verdadero.

3.6.2 Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas y tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo de estudiar la precisión en un método es conocer la variabilidad que pudiera haber en el mismo, esta variabilidad pudiera deberse a errores inherentes al método de ensayo, entre los factores que influyen en las causas de error sobre los resultados podemos tener: error del analista, error del equipo o instrumental, error causado por reactivos, etc. De aquí la importancia de estudiar este parámetro. En la precisión se puede considerar tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad.

Repetibilidad: estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y en un periodo de corto.

Precisión intermedia: estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes y en un mismo día.

La precisión del método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas de igual manera que la repetibilidad.

La reproducibilidad estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

La precisión se determina con el cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, y se expresa dando el valor medio obtenido junto con el mas-menos de la variabilidad de los resultados.

3.6.3 Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación, para lo cual se espera obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales del analito en muestra. Por lo que se evalúa tanto por inspección visual de un gráfico respuesta analítica vrs concentración del analito, como también por métodos estadísticos como: regresión lineal, coeficiente de

determinación, intervalo de confianza de la pendiente, intervalo de confianza de la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión.

3.6.4 Intervalo

Se define como intervalo la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y la linealidad del método descrito.

El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de las pruebas, obtenidos mediante el método analítico.

3.6.5 Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método analítico para medir o cuantificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra. Puesto que es muy difícil declarar que no exista interferencia en la determinación de un analito, pues existe la posibilidad de encontrar alguna sustancia, desconocida, que interfiera.

En este estudio, como norma general, se comparan los resultados de los análisis de muestras con o sin analito en presencia o ausencia de impurezas. Y los resultados del estudio se vinculan principalmente al origen de la muestra, su preparación y las condiciones instrumentales, por lo que cualquier cambio en estos factores supone reconsiderar el estudio antes realizado.

3.6.6 Límite de detección. ⁽³⁾ ⁽⁵⁾

Se entiende por límite de detección a la mínima cantidad de analito en la muestra, que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales.

Este término no debe confundirse ni asociarse con el de sensibilidad, puesto que este método de análisis se utiliza para discriminar pequeñas concentraciones o masas de analitos.

Lo que se pretende alcanzar con el límite de detección es que el método es realmente capaz de detectar la concentración límite, por medio de una señal que se medirá con certeza, pudiendo detectar su presencia sin incurrir en falsos positivos.

La concentración del analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco. Para siete replicas de la muestra, la media debe ser 3,14s veces superior al blanco.

3.6.7 Límite de cuantificación. ⁽³⁾ ⁽⁵⁾

Se entenderá por límite de cuantificación la mínima cantidad de analito presente en la muestra, que se puede cuantificar, bajo condiciones descritas, con una adecuada precisión y exactitud.

El valor límite cuantitativo es únicamente indicativo y normalmente no debe usarse para tomar decisiones.

3.6.8 Robustez

La robustez de un método analítico es la medida de sus capacidades para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando fiabilidad durante el empleo en rutina. Este estudio surgió con el fin de resolver problemas que se planteaban en la transferencia de métodos analíticos entre laboratorios surgiendo este con el fin de identificar los factores potencialmente crítico, surgiendo la necesidad de evaluar las fuentes de variaciones del método en análisis.

Se recomienda llevar acabo la robustez en el desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, pues puede caerse en el error de validar un método que sea poco robusto, incurriendo malos resultados y pérdida de tiempo y dinero, por lo que es recomendable de realizar un estudio de robustez donde los márgenes en los que el método es robusto puedan estos incluirse como parte final del método, dotándolo así de una cierta flexibilidad.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

El estudio que se realizó es de tipo experimental, transversal y prospectivo. Experimental pues se realizaron ensayos en el Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador; Transversal, debido a que la investigación se realizó en un tiempo determinado, comprendido entre junio-octubre del presente año, e interesa estudiar el problema en el presente y prospectivo ya que a medida se desarrollaba la validación del método se cumplía con cada objetivo del estudio, además, este trabajo podrá tener aplicación en el futuro.

4.2 Investigación bibliográfica

Para la elaboración del presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica en:

- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Universidad Alberto Masferrer.
- Documentación electrónica.

4.3 Parte experimental. ⁽¹⁾

Se realizaron los análisis en el Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador, implementando la metodología recomendada por el libro oficial Métodos

Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Edición 17ª. Capítulo 3500-Fe D: Método de Fenantrolina.

Los análisis se realizaron con soluciones estándar de hierro, a concentraciones que serán especificadas en el procedimiento de cada uno de los parámetros de desempeño que se desarrollaron. Cabe mencionar que si se deseara ensayar con muestras de agua potable, es necesario llevar simultáneamente un estándar control de hierro, para la verificación de los resultados obtenidos. (Ver anexo N° 4)

4.3.1 Instrumental ⁽¹⁾

a) Equipo:

Espectrofotómetro Shimadzu UV 1800, para utilizarlo a una longitud de onda de 510 nm, que proporciona un trayecto luminoso de 1 cm o más largo, (ver anexo N° 3).

Balanza Adventurer OHAUS (Analítica) y balanza Mettler NT4800 Delta Ranger (Semianalítica)

b) Materiales de vidrio, lavados con ácido: Lávese todo el material de vidrio con ácido clorhídrico concentrado (HCl) y enjuáguese con agua destilada antes de utilizarlo, con objeto de eliminar depósitos de óxido de hierro.

Materiales de vidrio: Clase "A".

4.3.2 Reactivos ⁽¹⁾

Se utilizaron reactivos bajos en hierro. Para preparar las soluciones patrón y soluciones reactivos, se empleó agua destilada que fue previamente analizada, encontrándose en ella una concentración de 0.01ppm de hierro. Almacénense los reactivos en botellas con tapón de vidrio.

Las soluciones de HCl y acetato de amonio son estables indefinidamente si están herméticamente tapadas. Las soluciones de hidroxilamina, de fenantrolina son estables durante varios meses.

- a) Ácido clorhídrico, HCl concentrado con menos de 0.00005 por 100 de hierro.
- b) Solución de hidroxilamina: disuélvase 10 g de $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ EN 100 mL de agua.
- c) Solución tampón de acetato de amonio: disuélvase 250 g de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ en 150 mL de agua. Añádanse 700 mL ácido acético concentrado (glacial). Como incluso el $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ de buena calidad contiene una cantidad significativa de hierro, prepárense nuevos patrones de referencia con cada preparación del tampón.
- d) Solución de acetato de sodio: disuélvase 200 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 800 mL de agua.
- e) Solución de fenantrolina: disuélvase 100 mg de monohidrato de 1,10-fenantrolina, $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en 100 mL de agua por agitación y calentamiento a 80 °C, no hervir. Descártese la solución si se oscurece. El calentamiento es innecesario si se añaden al agua dos gotas de HCl concentrado. (Nota: un mililitro de este reactivo es suficiente para no más de 100 µg Fe).
- f) Soluciones de hierro patrón: se prepara a partir de un estándar de hierro, a una concentración de 1000µg/mL de hierro, con número de lote H50597 y fecha de vencimiento 31 de Diciembre de 2011. (Ver anexo N° 1)

4.3.3 Procedimiento ⁽¹⁾

Hierro total:

- a) Mézclase cuidadosamente la solución estándar y mézclense 50.0 mL en un erlenmeyer de 125 mL. Si este volumen de muestra contiene más de

200 µg de hierro, utilícese una porción más pequeña medida con precisión y dilúyase hasta 50.0 mL.

- b)** Añádase 2 mL de HCl concentrado y 1 mL de solución $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (solución de hidroxilamina).
- c)** Añádase unas cuantas perlas de ebullición y caliéntese hasta ebullición. Para asegurar la disolución de todo el hierro, continúese la ebullición hasta que el volumen se reduzca entre 15 y 20 mL, (si la muestra ha sido sometida a combustión seca, disuélvase el residuo en 2mL de HCL concentrado y 5 mL de agua. Verificar el tiempo al que se llega esta condición).
- d)** Enfríese hasta temperatura ambiente y pásese a un matraz volumétrico de 50.0 o 100.0 mL.
- e)** Añádase 10 mL de solución tampón de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (acetato de amonio) y 4 mL de solución fenantrolina y dilúyase con agua hasta la señal.
- f)** Homogenizar la solución cuidadosamente y déjese al menos durante 10 a 15 minutos para que se desarrolle el color al máximo.
- g)** Realizar las lecturas de la muestra a 510 nm, en el espectrofotómetro Shimadzu UV 1800.

4.3.4 Protocolo de validación y registro de resultados para la determinación de hierro total en agua potable.

El protocolo de validación se hizo en base a los parámetros de desempeño a estudiar, donde se documentará el resultado obtenido del desarrollo de cada parámetro en estudio y poder verificar si cumple con el criterio de aceptación correspondiente. Además se contará con un formato de registro de resultados con el fin de evidenciar por cada parámetro todos los análisis realizados. (Cuadro N°2).

4.3.5 Evaluación de los parámetros de desempeño del método. (5)

4.3.5.1 Exactitud

La exactitud del método se demostró analizando tres niveles de concentración de soluciones estándar de hierro, con concentraciones de 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL y 1.0 mg/mL, cada uno de estos por triplicado, realizando así nueve determinaciones en total.

Procedimiento:

- a) Se Preparó una solución estándar a una concentración de 1.0 mg/mL de hierro y partiendo de ésta se prepararon dos diluciones de 0.5 mg/mL de hierro y 0.2 mg/mL.
- b) Se realizó a cada una de estas soluciones el tratamiento de muestra según procedimiento de hierro total, por triplicado para cada concentración.
- c) Se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, a una longitud de onda de 510 nm.
- d) Se calculó el coeficiente de variación e intervalo de confianza utilizando las formulas siguientes:

Media Aritmética

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

Desviación estándar

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

Coeficiente de variación

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

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC_{(\mu)} = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

4.3.4.2 Precisión del método

– Repetibilidad

Se realizó con la preparación de una solución estándar correspondiente a 0.30 mg/mL de hierro), esta se analizó por sextuplicado, manteniendo las condiciones de: día, analista, instrumento y laboratorio. La estimación de la repetibilidad del método se realizó con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza de cada nivel de concentración estudiada.

Procedimiento:

- a) Se preparó una solución estándar a una concentración de 0.30 mg/mL de hierro.
- b) Se realizó a esta solución el tratamiento de muestra según procedimiento de hierro total, éste se hizo por sextuplicado.
- c) Se hicieron lecturas en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, a una longitud de onda de 510 nm.
- d) Se calculó el coeficiente de variación e intervalo de confianza utilizando las formulas siguientes:

Media aritmética.

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

Desviación estándar

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

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC_{(\mu)} = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

4.3.4.3 Especificidad

Con la especificidad se pretendió demostrar que el método es capaz de identificar de forma inequívoca al analito, para lo cual se prepararon dos soluciones de hierro al 100% y a una de estas se le adicióno plomo como contaminante a una concentración de 0.01 mg/L (valor máximo permisible según NSO 13.07.01.04). Luego se procedió a analizarlas según el método de hierro total, para leer ambas soluciones a 510 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV 1800, esperando obtener un valor de absorbancia igual para ambas soluciones.

El Método Oficial de Fenantrolina determinado por el APHA enlista sustancias que pueden ser interferentes, como son: oxidantes fuertes, cianuro, nitrito, fosfatos, bismuto, cadmio, mercurio, molibdato y plata. Pero de igual manera hace referencia que con un exceso de hidroxilamina dichos interferentes son eliminados, por lo que en la evaluación de este parámetro se utilizará plomo para comprobar la especificidad del método, ya que los compuestos antes mencionados ya no son interferentes, pues se eliminan durante el desarrollo del método. Por lo que se espera como resultado de este parámetro únicamente la respuesta del analito en estudio el cuál será el hierro.

4.3.2.4 Limite de cuantificación. (3)

Para este procedimiento se prepararon cuatro concentraciones obtenidas por dilución a partir de una solución 0.2 mg/mL de hierro; simultáneamente se prepararon cinco blancos. Luego se calculó el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza de la pendiente y para los blancos se calculó la desviación estándar.

Procedimiento:

- a) Se prepararon cinco soluciones con las siguientes concentraciones: 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.002 mg/mL, 0.005 mg/mL de hierro.
- b) Se realizó a cada una de estas soluciones el tratamiento de muestra según procedimiento para la determinación de hierro total, por triplicado para cada concentración.
- c) Se hicieron lecturas en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, a una longitud de onda de 510 nm.
- d) Se calculó el límite de cuantificación. Utilizando las siguientes ecuaciones:

Pendiente

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

Coeficiente de determinación

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

Intervalo de confianza para la pendiente

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

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

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

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

Para los blancos se calculó la desviación estándar (Sb) de estos, por la siguiente ecuación:

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

Límite de cuantificación

$$LC = \frac{10 * S_b}{b_1}$$

Donde:

LC= límite de cuantificación.

S_b= desviación estándar de los blancos.

b₁= pendiente

4.3.2.5 Limite de detección. ⁽³⁾

Se determinó preparando tres niveles de concentración, los cuales fueron valores menores que el límite cuantificable, simultáneamente se prepararon cinco blancos.

Para establecer este parámetro se procedió al cálculo de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), mediante la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3xS_b}{b_1}$$

Para los blancos se calculó la desviación estándar (S_b) de estos, por la siguiente ecuación:

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

4.3.2.6 Linealidad

Se hizo analizando cinco soluciones estándar de hierro por triplicado con concentraciones de 0.20, 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00 mg/mL de hierro, de esta manera se pudo elaborar la curva de calibración concentración vrs absorbancia. Además se utilizó el método de estimación por mínimos cuadrados para calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), coeficiente de determinación (r^2), intervalo de confianza de la pendiente ($IC(\beta_1)$), intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{x/y}$).

Procedimiento:

- a) Se preparó una muestra a concentración de 2.0 mg/mL de hierro y partiendo de esta se prepararon cuatro diluciones de 1.5 mg/mL , 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.2 mg/mL de hierro.
- b) Se realizaron a cada una de estas soluciones el tratamiento de muestra según procedimiento para la determinación de hierro total, por triplicado para cada concentración.
- c) Se hicieron lecturas en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, a una longitud de onda de 510 nm.
- d) Se calculó la pendiente, ordenada al origen, coeficiente de determinación, intervalo de confianza de la pendiente, intervalo de confianza para la ordenada al origen y coeficiente de variación de regresión, utilizando las fórmulas siguientes:

Pendiente

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

Ordenada al origen

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

Coeficiente de determinación

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

Intervalo de confianza para la pendiente

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

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

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975, n-2} S_{b1}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975, n-2} S_{b0}$$

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

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

Coefficiente de variación de regresión

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

4.3.2.7 Intervalo (rango)

Este parámetro se estableció mediante el valor máximo cuantificable obtenido en la linealidad y el valor mínimo obtenido en el límite de cuantificación, tomando en cuenta que estos no deben presentar una desviación de la ley de Beer.

4.3.2.8 Robustez

Se establecieron los factores propios del método los cuales se consideran críticos, estos fueron: temperatura (baja, normal y alta) y humedad. La temperatura baja se trabajó a 16.3°C y humedad de 62%, la temperatura normal fué de 20.9°C y humedad de 38%, la temperatura alta de 31.1°C y 35% de humedad; la evaluación de este parámetro se

realizó con dos repeticiones de una solución estándar de hierro con concentración de 0.20 mg/mL de para cada temperatura y humedad especificados.

Se procedió a calcular la media aritmética de las condiciones ambientes y condiciones controladas, luego se calculó la diferencia absoluta de cada condición respecto a condición normal. Las fórmulas que se utilizaron son las siguientes:

Media aritmética a temperatura ambiente

$$\bar{y}_o = \frac{\sum y_o}{n_o}$$

n_o = número de mediciones a temperatura ambiente.

y_o = temperatura a condición normal.

Media aritmética para el análisis de temperatura controladas

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

n_i = numero de mediciones a temperatura controlada.

y_i = temperatura a condiciones controladas.

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética de la condición normal.

$$d_i = y_i - y_o$$

4.4 Criterios de aceptación

Son los criterios que se establecen para cada parámetro de desempeño, con el fin de evaluar los resultados del estudio, estos criterios deben de

mantenerse a lo largo de toda la validación y cualquier cambio debe de ser justificado.

A continuación se presentan los criterios de aceptación para cada parámetro en estudio. (Cuadro N°1)

CUADRO N°1 CRITERIOS DE ACEPTACION

Parámetros	Criterios de Aceptación	Referencia
Exactitud	El coeficiente de variación: Comprende de 50-120% para impurezas. El valor de la media poblacional (\bar{y}) debe incluirse dentro del intervalo.	Ortega Aguirre L. y Otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona España.(5)
Precisión (Repetibilidad) ₍₅₎	El coeficiente de variación para soluciones menores a 1 ppm debe ser $\leq 11\%$ El valor de la media poblacional (\bar{y}) debe incluirse dentro del intervalo.	Ortega Aguirre L. y Otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona España.(5)
Especificidad	La respuesta del método debe ser debida únicamente al analito	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación de Métodos Analíticos México. AC. Edición 2002. Volumen único.(3)
Límite de cuantificación	$r^2 \geq 0.98$ El IC(β_1), no debe incluir el cero	Ortega Aguirre L. y Otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona España.(5)
Límite de Detección	$r^2 \geq 0.98$ El IC(β_1), no debe incluir el cero	Ortega Aguirre L. y Otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona España.(5)
Linealidad del Método	Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $r^2 \geq 0.98$ El IC(β_1), el valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo. El IC(β_0), el valor de la ordenada debe incluir el intervalo. El CV _{y/x} , no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico.	Ortega Aguirre L. y Otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona España.(5)
Intervalo	Debe incluir la concentración inferior y superior del analito, con adecuada precisión, exactitud y linealidad.	Ortega Aguirre L. y Otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona España.(5) Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación de Métodos Analíticos México. AC. Edición 2002. Volumen único.(3)
Robustez	$ di \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos.	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación de Métodos Analíticos México. AC. Edición 2002. Volumen único.

**CUADRO N°2 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA METODO
ESPECTROFOTOMETRICO (3500Fe-D)**

LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS			
TITULO: Protocolo para determinar parámetros de desempeño en el método analítico espectrofotométrico (3500-Fe D) de fenantrolina, para la determinación de hierro total en agua potable.			
Estándar (Ver anexo N° 3)			
Nombre	Concentración	Lote	vencimiento
Hierro en ácido Nítrico 5%	1000 ug/mL	H50597	31/12/2011
Equipos			
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Balanza Analítica Adventurer	OHAUS	27/09/2010	
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Espectrofotómetro Shimadzu	UV 1800	14/10/2009	
Fecha de emisión	Fecha de revisión	Fecha de aprobación	Página N°:
15-10-2010	16-10-2010	18-10-2010	1/6
<p>OBJETIVO. Demostrar mediante este documento que el método analítico espectrofotométrico para la determinación de hierro total en agua potable, cumple con los requerimientos de: exactitud, precisión (repetibilidad), especificidad, límite de cuantificación, límite de detección, linealidad, robustez, intervalo.</p> <p>ALCANCE. Método de análisis que se utiliza para determinar Hierro total en agua potable en concentraciones de 0.1 mg/mL a 2.0 mg/mL utilizando el Espectrofotómetro Shimadzu UV 1800</p> <p>MATERIALES Erlenmeyer 125 mL Balón volumétrico 50.0 mL Pipeta volumétrica 50.0 mL Pipeta volumétrica 10.0 mL Pipeta volumétrica 4.0 mL Pipeta volumétrica 2.0 mL Pipeta volumétrica 1.0 mL</p> <p>REACTIVOS (ver anexo N°1) Ácido clorhídrico concentrado Solución de hidroxilamina Solución tampón de acetato de amonio Solución de fenantrolina Solución de hierro de reserva Solución de hierro patrón</p>			

LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS			
TITULO: Protocolo para determinar parámetros de desempeño en el método analítico espectrofotométrico (3500-Fe D) de fenantrolina, para la determinación de hierro total en agua potable.			
Estándar			
Nombre	Concentración	Lote	vencimiento
Hierro en ácido Nítrico 5%	1000 ug/mL	H50597	31/12/2011
Equipos			
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Balanza Analítica Adventurer	OHAUS	27/09/2010	
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Espectrofotometro Shimadzu	UV 1800	14/10/2009	
Fecha de emisión	Fecha de revisión	Fecha de aprobación	Pagina N°:
15-10-2010	16-10-2010	18-10-2010	2/6
PARAMETROS DE DESEMPEÑO.			
Para validar el método se estudiaron el siguiente parámetro:			
Exactitud			
Precisión (Repetibilidad)			
Especificidad			
Limite de cuantificación			
Limite de detección			
Linealidad			
Intervalo			
Robustez			
RESULTADOS			
Resultados			
Parámetro	Criterio de Aceptación		
Conforme	No conforme		
BIBLIOGRAFIA			
1 Ortega Aguirre L. y Otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona España. Páginas 33-36, 46-47, 54-58, 68-70,75-77 y 85.			
2 López Luz M. 2009. Determinación de Parámetros de Desempeño en Métodos Analíticos Espectrofotométricos Especificos para Cuantificar Fósforo y Potasio en Suelos Utilizados para Cultivos de Café. Licenciatura en Química y Farmacia. San salvador El salvador. Universidad de El Salvador. Página 27.			

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Se elaboró una propuesta de validación para determinación de hierro total en agua potable, donde se puede observar el desarrollo y cumplimiento de los parámetros de desempeño, obteniéndose resultados los cuales se interpretaron en cada parámetro en estudio valiéndose de técnicas estadísticas para establecer el cumplimiento de las mismas. (Ver cuadro N°2).

Se desarrollaron los procedimientos de operación de los parámetros de desempeño: exactitud, precisión (repetibilidad), especificidad, límite de cuantificación, límite de detección, linealidad e intervalo; aplicando a cada uno de éstos el método de estudio 3500Fe-D, y evaluados con sus respectivos criterios de aceptación por medio de técnicas estadísticas. A continuación se presenta el desarrollo de cada parámetro estudiado:

5.1 Determinación de la exactitud del método espectrofotométrico (3500-Fe D)

La exactitud del método se realizó de la siguiente manera: un analista preparó una serie de nueve muestras, adicionándole a cada serie una cantidad conocida de hierro (0.2, 0.5, 1.0 mg/L), para poder obtener tres concentraciones diferentes.

Se calculó la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para la media poblacional, utilizando las siguientes formulas:

Media Aritmética

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

Desviación estándar

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

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC_{(\mu)} = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

TABLA N°1 RESULTADOS DE EXACTITUD DE HIERRO TOTAL EN AGUA POTABLE

N° REPLICA	Concentración Original (ppm)	Concentración Obtenida ppm (X)	Propiedad medida Absorbancia (Y)	Y ²
1	0.2	0.282	0.061	3.721x10 ⁻³
2	0.5	0.485	0.101	10.201x10 ⁻³
3	1.0	1.095	0.219	47.961x10 ⁻³
4	0.2	0.259	0.057	3.249x10 ⁻³
5	0.5	0.492	0.102	10.404x10 ⁻³
6	1.0	1.125	0.225	50.625x10 ⁻³
7	0.2	0.254	0.056	3.136x10 ⁻³
8	0.5	0.486	0.101	10.201x10 ⁻³
9	1.0	1.133	0.226	51.076x10 ⁻³
			ΣY=1.148	ΣY²=0.190574

La tabla N°1 muestra los resultados de tres niveles de concentración, cada una por triplicado, de las muestras en estudio, en el mismo día con el mismo analista e instrumento.

Se muestra el promedio aritmético (\bar{y}), Desviación Estándar (S), Coeficiente de Variación (CV), así como el intervalo de confianza para la media poblacional (IC(μ)).

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

-Media Aritmética:

$$y = \frac{1.148}{9} = 0.1275$$

-Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{9(0.190574) - (1.148)^2}{9(9-1)}} = 0.0743$$

-Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{0.0743}{0.1275} * 100 = 58.27\%$$

-Intervalo de Confianza (ver anexo N° 8).

El valor de tabla de la distribución t de Student, se determina para un t de 0.975, n-1 grados de libertad, siendo “n” el numero de replicas.

Ejemplo: n = 9 para n-1, corresponde a 9-1 = 8 y para ocho grados de libertad el de t de Student de tabla es de 2.306.

$$IC_{(\mu)} = 0.1275 \pm 2.306 \frac{0.0743}{9} = 0.0698, 0.1841$$

El valor obtenido del Coeficiente de Variación es aceptable debido a que se encuentra dentro del rango establecido del 50 al 120% para métodos que determinan impurezas; demostrando que no existe una apreciable variabilidad en los datos. Además al determinar el Intervalo de Confianza

puedo observarse que la media poblacional se encontró dentro del intervalo calculado.

5.2 Determinación de la Precisión del Método (Repetibilidad) Espectrofotométrico (3500-Fe D)

La evaluación de la repetibilidad se realizó por un analista, el mismo día y mismo instrumento preparando un sextuplicado de la concentración de 0.30 mg/L. Mediante el cálculo de la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza de la media poblacional, utilizando las siguientes formulas:

Media Aritmética

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

Desviación estándar

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

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC_{(\mu)} = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

TABLA N°2 RESULTADOS DE REPETIBILIDAD DE HIERRO TOTAL EN AGUA POTABLE

N° REPLICAS	Concentración Original (ppm)	Concentración Obtenida ppm (X)	Propiedad medida Absorbancia (Y)	Y ²
1	0.3	0.267	0.058	3.364x10 ⁻³
2	0.3	0.320	0.069	4.761x10 ⁻³
3	0.3	0.278	0.061	3.721x10 ⁻³
4	0.3	0.250	0.055	3.025x10 ⁻³
5	0.3	0.260	0.057	3.249x10 ⁻³
6	0.3	0.298	0.063	3.969x10 ⁻³
			$\Sigma Y=0.363$	$\Sigma Y^2=0.022089$

La tabla N°2 muestra los resultados de un nivel de concentración, por sextuplicado, de la muestra en estudio.

Se muestra el promedio aritmético (\bar{y}), Desviación Estándar (S), Coeficiente de Variación (CV), intervalo de confianza de la media poblacional (IC_(μ))

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

-Media Aritmética:

$$\bar{y} = \frac{0.363}{6} = 0.0605$$

-Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{6(0.022089) - (0.363)^2}{6(6-1)}} = 0.0043$$

-Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{0.0043}{0.0605} * 100 = 7.11\%$$

-Intervalo de Confianza

$$IC_{(\mu)} = 0.06005 \pm 2.306 \frac{0.0043}{6} = 0.0564, 0.0645$$

El valor obtenido con el Coeficiente de Variación es un valor aceptable puesto que es un valor menor de 11% el cual es un valor propuesto de la concentración en función de la concentración del analito, para el análisis de impurezas ⁽⁵⁾. La media poblacional se encontró dentro del intervalo de confianza por lo que se considera un valor que cumple con los requerimientos establecidos

5.3 Determinación de la especificidad del Método Espectrofotométrico (3500-Fe D)

Para la determinación de la especificidad se selecciono una sustancia la cual se considera un contaminante del agua y que suele encontrarse con frecuencia. Se prepararon dos muestras a concentración de 0.2 mg/L de hierro y se contaminó una de ellas con plomo a 0.01mg/L.

Mostrándose en el Tabla N°3 los resultados obtenidos

Nº REPLICA	Concentración Original ppm	Concentración de muestra ppm (X)	Propiedad medida Absorbancia (Y)
1 (contaminada)	0.2	0.255	0.056
2 (Normal)	0.2	0.263	0.057

La respuesta analítica se debe únicamente al analito en estudio, ya que se puede comprobar esto debido a que las absorbancias obtenidas no variaron significativamente, comparados con los otros parámetros en los que se utilizo la concentración de 0.2 mg/L de hierro.

5.4 Determinación del Límite de Cuantificación del Método Espectrofotométrico (3500-Fe D)

Se realizó el límite de cuantificación utilizando muestras con concentraciones de: 0.2, 0.1, 0.05, 0.002, 0.005 mg/L de hierro, simultáneamente se utilizaron cinco blancos para cada determinación.

TABLA N°4 RESULTADOS DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL (3500-FE D)

N° REPL ICAS	Concentración real	Concentración Obtenida (X) ppm	Propiedad medida Absorbancia (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.2	0.206	0.047	42.436x10 ⁻³	2.209x10 ⁻³	9.3741124x10 ⁻³
2	0.1	0.137	0.033	18.769x10 ⁻³	1.089x10 ⁻³	2.0439441x10 ⁻³
3	0.05	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00
4	0.02	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00
5	0.005	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00
		$\sum X = 0.343$	$\sum Y = 0.08$	$\sum X^2 = 0.061205$	$\sum Y^2 = 3.298 \times 10^{-3}$	$\sum XY = 0.014303$

Con los datos obtenidos por las partes por millón de la tabla N° 4 para determinar hierro total se calculo la pendiente (b₁), coeficiente de determinación (r²).

Pendiente

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

Coeficiente de determinación

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

Intervalo de confianza para la pendiente

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

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

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

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Pendiente

$$b_1 = \frac{5(0.014203) - (0.343)(0.08)}{5(0.061205) - (0.343)^2} = 0.231319$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(5(0.014203) - (0.343)(0.08))^2}{(5(0.061205) - (0.343))(5(3.298 \times 10^{-3}) - (0.08)^2)} = 0.998983$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{3.298 \times 10^{-3} - (0.231319)(0.014203) - (1.314976 \times 10^{-4})(0.08)}{5-2}} = 0.000828$$

$$S_{b_1} = 0.000828 \sqrt{\frac{1}{0.061205 - \frac{(0.343)^2}{5}}} = 0.004265$$

$$IC(\beta_1) = 0.231319 \pm (3.182 \times 0.004265) = 0.217747, 0.244890$$

TABLA N°5 RESULTADO DE LOS BLANCOS DE HIERRO TOTAL

Blanco N°	Propiedad medida Absorbancia (Y)	Y ²
1	0.001	1x10 ⁻⁶
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
	$\sum Y = 1 \times 10^{-3}$	$\sum Y^2 = 1 \times 10^{-6}$

Para los blancos se calculo la desviación estándar (Sb) de estos, por la siguiente ecuación:

$$S_b = \sqrt{\frac{5(1 \times 10^{-6}) - (1 \times 10^{-3})^2}{5 - (5 - 1)}} = 0.00447$$

Limite de cuantificación

$$LC = \frac{10 * 0.00447}{0.231319} = 0.019324$$

En el límite de cuantificación se comprobó de forma práctica a través del Espectrofotómetro Shimadzu UV 1800, que el equipo es capaz de cuantificar hasta 0.1mg/L; con la ayuda de cálculos estadísticos se determino un valor de 0.01mg/L para la determinación de hierro total. Además el valor de la pendiente se encuentra dentro del intervalo de confianza de la misma y el coeficiente de determinación es mayor de 0.98.

5.5 Determinación del Límite de Detección del Método Espectrofotométrico (3500-Fe D)

Se realizó preparando tres niveles de concentración de hierro, los cuales fueron menores de 0.1mg/L (Que es el límite inferior cuantificable por el equipo Shimadzu UV1800), siendo estas 0.05, 0.002, 0.005 mg/L; preparándose simultáneamente cinco blancos

TABLA N°6 RESULTADOS DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL (3500-FE D)

N° REPLICAS	Concentración real	Concentración Obtenida (X) ppm	Propiedad medida Absorbancia (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.05	-0.047	-0.002	0.00	0.00	0.00
2	0.02	0.001	0.007	0.00	0.00	0.00
3	0.005	-0.062	-0.005	0.00	0.00	0.00
		Σ_x =0.00	Σ_y=0.000	Σ_x²=0.00	Σ_y²=0.00	Σ_{xy}=0.00

Debido a que se obtuvieron respuesta analíticas no confiables, se realizó el cálculo del límite de detección de manera teórico, mediante siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3 \cdot x \cdot 0.000447}{0.231319} = 0.005797$$

Los valores de Sb_1 y de b_1 fueron tomados de los datos del límite cuantificable, si se observa el valor teórico detectable es similar a la última concertación leída por el quipo.

Demostrando que el equipo es capaz de emitir una señal a esta concentración.

5.6 Determinación de la Linealidad del Método Espectrofotométrico (3500-Fe D)

La linealidad del método se realizó de la siguiente manera, Primero, se procedió a la elaboración de la curva de calibración, para lo cual fue necesaria la preparación de cinco soluciones estándar a concentraciones de: 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L de hierro, en el siguiente cuadro se muestran los valores obtenidos al determinar la curva de calibración:

TABLA N°7 RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL (3500-FE D)

N° REPLICAS	Concentración real	Propiedad medida Absorbancia (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.2	0.052	0.04	2.704x10 ⁻³	0.0104
2	0.5	0.105	0.25	11.025x10 ⁻³	0.0525
3	1.0	0.194	1.00	37.636x10 ⁻³	0.1940
4	1.5	0.303	2.250	91.809x10 ⁻³	0.4545
5	2.0	0.392	4.000	153.664x10 ⁻³	0.7840
	$\sum_x=5.2$	$\sum_y=1.046$	$\sum_x^2=7.54$	$\sum_y^2=0.296838$	$\sum_{xy}=1.4954$

Con los datos obtenidos se procedió al cálculo de la curva de calibración concentración vrs absorbancia. Además se utilizó el método de estimación por mínimos cuadrados para calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), coeficiente de determinación (r^2), intervalo de confianza de la pendiente ($IC(\beta_1)$), intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión (CV_{xy}).

Pendiente

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

Ordenada al origen

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

Coefficiente de determinación

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

Intervalo de confianza para la pendiente

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

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

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

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$$

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

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

Coeficiente de variación de regresión

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

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Pendiente

$$b_1 = \frac{5(1.4954) - (5.2)(1.046)}{5(7.54) - (5.2)^2} = 0.191163$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(5(1.4954) - (5.2)(1.046))^2}{(5(7.54) - (5.2)^2)(5(0.296838) - (1.064)^2)} = 0.998662$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{0.296838 - (0.0191163)(1.4954) - (0.0010390)(1.046)}{5 - 2}} = 0.005913$$

$$Sb_1 = .0005913 \sqrt{\frac{1}{7.54 - \frac{(5.2)^2}{5}}} = 0.684867$$

$$IC(\beta_1) = 0.191163 \pm (3.182 \times 0.004049) = 0.178279, 0.204046$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$\bar{x} = \frac{5.2}{5}$$

$$Sb_0 = 0.005913 \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{(1.04)^2}{7.54 - \frac{(5.2)^2}{5}}} = 0.004972$$

$$IC(\beta_0) = 0.010390 \pm (3.182 \times 0.004972) = -0.005430, 0.026210$$

Coefficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \frac{0.005913}{0.2092} \times 100 = 2.82\%$$

De esta forma se pudo comprobar que la curva de calibración posee las características adecuadas, puesto que se da cumplimiento estadístico en el valor de:

La pendiente con su respectivo intervalo, estando comprendido el valor de pendiente en el intervalo establecido.

La ordenada al origen y su respectivo intervalo, estando comprendido el valor de pendiente en el intervalo establecido de la misma.

Un valor de coeficiente de determinación mayor de 0.98.

Un coeficiente de variación de regresión no mayor de un 3 %.

TABLA N°8 RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS CUALES SE COMPROBO LA LINEALIDAD DEL METODO. (Ver anexo N° 2).

N° REPLI CAS	Concentración real	Concentración Obtenida (X) ppm	Propiedad medida Absorbancia (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.2	0.282	0.061	0.079524	3.721x10 ⁻³	17.202x10 ⁻³
2	0.2	0.173	0.040	0.029929	1.600x10 ⁻³	6.920x10 ⁻³
3	0.2	0.259	0.057	0.067081	3.249x10 ⁻³	14.763x10 ⁻³
4	0.5	0.485	0.101	0.235225	10.201x10 ⁻³	48.985x10 ⁻³
5	0.5	0.406	0.085	0.164836	7.225x10 ⁻³	34.510x10 ⁻³
6	0.5	0.455	0.095	0.207025	9.025x10 ⁻³	43.225x10 ⁻³
7	1.0	1.165	0.232	1.357225	53.824x10 ⁻³	270.280x10 ⁻³
8	1.0	1.018	0.204	1.036324	41.616x10 ⁻³	207.672x10 ⁻³
9	1.0	1.125	0.225	1.265625	50.625x10 ⁻³	253.125x10 ⁻³
10	1.5	1.683	0.333	2.832489	110.889x10 ⁻³	560.439x10 ⁻³
11	1.5	1.468	0.291	2.155024	84.681x10 ⁻³	427.188x10 ⁻³
12	1.5	1.635	0.323	2.673225	104.329x10 ⁻³	528.105x10 ⁻³
13	2.0	2.271	0.447	5.157441	199.809x10 ⁻³	1.015137
14	2.0	2.019	0.398	4.076361	158.404x10 ⁻³	803.562x10 ⁻³
15	2.0	2.095	0.413	4.389025	170.569x10 ⁻³	865.235x10 ⁻³
		Σ_X=16.539	Σ_Y=3.305	Σ_X²=25.726359	Σ_Y²=1.009767	Σ_{XY}=5.096348

A continuación se muestran los resultados obtenidos:

$$\bar{x} = 1.1026$$

$$\bar{y} = 0.2203$$

$$b_1 = 0.193880$$

$$b_0 = 0.006560$$

$$r^2 = 0.999995$$

$$IC(\beta_1) = 0.193880 \pm (3.182 \times 0.00008) = 0.1937072, 0.1940528$$

$$IC(\beta_0) = 0.006560 \pm (3.182 \times 0.0005832) = 0.0059768, 0.0071432$$

$$CV_{y/x} = 0.26\%$$

Con los resultados estadísticos obtenidos puede notarse que se está comprobando la linealidad del método, al cumplirse los criterios de aceptación en lo correspondiente a:

La pendiente con su respectivo intervalo, estando comprendido el valor de pendiente en el intervalo establecido.

La ordenada al origen y su respectivo intervalo, estando comprendido el valor de pendiente en el intervalo establecido de la misma.

Un valor de coeficiente de determinación mayor de 0.98

Un coeficiente de variación de regresión no mayor de un 3 %

5.7 Determinación del Intervalo del Método Espectrofotométrico (3500Fe-D)

El intervalo del método se determinó considerando que debe estar conformado conformar por el valor máximo cuantificable de la linealidad y el valor mínimo del límite de cuantificación, donde estos valores no

presentan desviación de la Ley de Beer. Por lo que el intervalo del método es:

0.1 mg/L-2.0 mg/L.

Por medio de la robustez se definieron los factores que influyen en el método 3500Fe-D pudiendo estos afectar los resultados ya sea de manera cuantitativa como cualitativa. Dichos factores fueron temperatura y humedad. A continuación se presenta el desarrollo de dicho estudio:

5.8 Determinación de la Robustez del Método Espectrofotométrico (3500Fe-D)

La robustez se realizó con el análisis de tres soluciones estándar a una concentración de 0.2mg/L cada una, evaluando la temperatura y la humedad. Mediante el cálculo de la media aritmética de la condición normal de operación, la media aritmética del análisis de cada condición de operación, diferente a la condición normal y diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética de la condición normal, utilizando las siguientes formulas:

Media aritmética a temperatura ambiente (condición normal)

$$\bar{y}_o = \frac{\sum y_o}{n_o}$$

n_o = número de muestras a temperatura ambiente.

y_o = temperatura a condición normal.

Media aritmética para el análisis de temperatura controladas

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

n_i = numero de muestras a temperatura controlada.

y_i = temperatura a condiciones controladas.

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética de la condición normal.

$$d_i = \bar{y}_i - \bar{y}_o$$

TABLA N°9 RESULTADOS DE LA ROBUSTEZ PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL (3500-FE D)

	Condición		
	Baja	Controlada(Normal)	Alta
Muestra	16.3°C / 62% (y ₁)	20.9°C / 38% humedad (y ₀)	31.1°C / 35% humedad (y ₂)
1	0.030	0.049	0.042
2	0.028	0.049	0.042
3	∑y₁=0.058	∑y₀=0.098	∑y₂=0.084

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Media aritmética a temperatura controlada (condición normal)

$$\bar{y}_o = \frac{0.098}{2} = 0.049$$

Media aritmética para el análisis de temperatura alta.

$$\bar{y}_2 = \frac{0.084}{2} = 0.042$$

Media aritmética para el análisis de temperatura baja.

$$\bar{y}_1 = \frac{0.058}{2} = 0.029$$

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética de la condición normal.

$$d_i = | \bar{y}_i - \bar{y}_o |$$

$$d_1 = | y_1 - y_0 |$$

$$d_1 = | 0.029 - 0.049 | = 0.02$$

$$d_2 = | y_2 - y_0 |$$

$$d_2 = | 0.042 - 0.049 | = 0.007$$

El valor de la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la normal no es mayor de un 3%, y los valores de absorbancia no reflejan variación a diferentes condiciones.

A continuación se presenta el reporte de validación de los resultados obtenidos, durante la realización del método 3500-Fe D, comprobándose el cumplimiento de dicho método por medio de los parámetros de desempeño.

CUADRO N°3 INFORME DE VALIDACION PARA METODO ESPECTROFOTOMETRICO (3500Fe-D)

LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS			
TITULO: Protocolo para determinar parámetros de desempeño en el método analítico espectrofotométrico (3500-Fe D) de fenantrolina, para la determinación de hierro total en agua potable.			
Estándar (Ver anexoN° 3)			
Nombre	Concentración	Lote	vencimiento
Hierro en ácido Nítrico 5%	1000 ug/mL	H50597	31/12/2011
Equipos			
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Balanza Analítica Adventurer	OHAUS	27/09/2010	
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Espectrofotómetro Shimadzu	UV 1800	14/10/2009	
Fecha de emisión	Fecha de revisión	Fecha de aprobación	Página N°:
15-10-2010	16-10-2010	18-10-2010	1/6
<p>OBJETIVO. Demostrar mediante este documento que el método analítico espectrofotométrico para la determinación de hierro total en agua potable, cumple con los requerimientos de: exactitud, precisión (repetibilidad), especificidad, límite de cuantificación, límite de detección, linealidad, robustez, intervalo.</p> <p>ALCANCE. Método de análisis que se utiliza para determinar Hierro total en agua potable de una concentración de 0.1 mg/mL a 2.0 mg/mL utilizando el Espectrofotómetro Shimadzu UV 1800</p> <p>MATERIALES Erlenmeyer 125 mL Balón volumétrico 50.0 mL Pipeta volumétrica 50.0 mL Pipeta volumétrica 10.0 mL Pipeta volumétrica 4.0 mL Pipeta volumétrica 2.0 mL Pipeta volumétrica 1.0 mL</p> <p>REACTIVOS (ver anexo N°1) Ácido clorhídrico concentrado Solución de hidroxilamina Solución tampón de acetato de amonio Solución de fenantrolina Solución de hierro de reserva Solución de hierro patrón</p>			

LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS			
TITULO: Protocolo para determinar parámetros de desempeño en el método analítico espectrofotométrico (3500-Fe D) de fenantrolina, para la determinación de hierro total en agua potable.			
Estándar			
Nombre	Concentración	Lote	vencimiento
Hierro en ácido Nítrico 5%	1000 ug/mL	H50597	31/12/2011
Equipos			
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Balanza Analítica Adventurer	OHAUS	27/09/2010	
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Espectrofotometro Shimadzu	UV 1800	14/10/2009	
Fecha de emisión	Fecha de revisión	Fecha de aprobación	Página N°:
15-10-2010	16-10-2010	18-10-2010	2/6
PARAMETROS DE DESEMPEÑO. (ver anexo N° 7) Para validar el método se estudiaron el siguiente parámetro:			
EXACTITUD (Ver anexo N° 7, Tabla N°1)			
RESULTADOS			
Resultados			
CV= 58.27%	$y = 0.1275$	IC(μ)= 0.0698 , 0.1841	
Parámetro	Criterio de Aceptación		
Exactitud	El coeficiente de variación: Comprende de 50-120% para impurezas. El valor de la media poblacional (\bar{y}) debe incluirse dentro del intervalo.		
Conforme	No conforme		
Si es conforme			

LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS			
TITULO: Protocolo para determinar parámetros de desempeño en el método analítico espectrofotométrico (3500-Fe D) de fenantrolina, para la determinación de hierro total en agua potable.			
Estándar			
Nombre	Concentración	Lote	vencimiento
Hierro en ácido Nítrico 5%	1000 ug/mL	H50597	31/12/2011
Equipos			
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Balanza Analítica Adventurer	OHAUS	27/09/2010	
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Espectrofotometro Shimadzu	UV 1800	14/10/2009	
Fecha de emisión	Fecha de revisión	Fecha de aprobación	Página N°:
15-10-2010	16-10-2010	18-10-2010	3/6
PRECISION (REPETIBILIDAD) (Ver anexo N° 7, Tabla N°2)			
RESULTADOS			
Resultados			
CV= 7.11%	$\bar{y} = 0.0605$	IC(μ)= 0.0564 , 0.0645	
Parámetro	Criterio de Aceptación		
Precisión (Repetibilidad)	El coeficiente de variación para soluciones menores a 1 ppm debe ser $\leq 11\%$ El valor de la media poblacional (\bar{y}) debe incluirse dentro del intervalo.		
Conforme	No conforme		
Si es conforme			

LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS			
TITULO: Protocolo para determinar parámetros de desempeño en el método analítico espectrofotométrico (3500-Fe D) de fenantrolina, para la determinación de hierro total en agua potable.			
Estándar			
Nombre	Concentración	Lote	Vencimiento
Hierro en ácido Nítrico 5%	1000 ug/mL	H50597	31/12/2011
Equipos			
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Balanza Analítica Adventurer	OHAUS	27/09/2010	
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Espectrofotómetro Shimadzu	UV 1800	14/10/2009	
Fecha de emisión	Fecha de revisión	Fecha de aprobación	Página N°:
15-10-2010	16-10-2010	18-10-2010	4/6
ESPECIFICIDAD (Ver anexo N° 7, Tabla N°3)			
RESULTADOS			
Resultados			
0.2 mg/L de hierro			
Parámetro	Criterio de Aceptación		
Especificidad	La respuesta del método debe ser debida únicamente al analito		
Conforme	No conforme		
Si es conforme			
LIMITE DE CUANTIFICACION (Ver anexo N° 7, Tabla N°4 y 4.1)			
Resultados			
$r^2 = 0.998983$	$IC_{(\beta_1)} = 0.217747, 0.2244890$	LC= 0.019324	
Parámetro	Criterio de Aceptación		
Límite de Cuantificación	$r^2 \geq 0.98$ El $IC(\beta_1)$, no debe incluir el cero		
Conforme	No conforme		
Si es conforme			

LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS			
TITULO: Protocolo para determinar parámetros de desempeño en el método analítico espectrofotométrico (3500-Fe D) de fenantrolina, para la determinación de hierro total en agua potable.			
Estándar			
Nombre	Concentración	Lote	Vencimiento
Hierro en ácido Nítrico 5%	1000 ug/mL	H50597	31/12/2011
Equipos			
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Balanza Analítica Adventurer	OHAUS	27/09/2010	
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Espectrofotometro Shimadzu	UV 1800	14/10/2009	
Fecha de emisión	Fecha de revisión	Fecha de aprobación	Página N°:
15-10-2010	16-10-2010	18-10-2010	5/6
LIMITE DE DETECCION (Ver anexo N° 7, Tabla N°5)			
RESULTADOS			
Resultados			
$r^2 = 0.998983$	$IC_{(\beta_1)} = 0.217747, 0.2244890$	LD= 0.005797	
Parámetro		Criterio de Aceptación	
Límite de Detección		$r^2 \geq 0.98$ El $IC(\beta_1)$, no debe incluir el cero	
Conforme		No conforme	
Si es conforme			
LINEALIDAD (Ver anexo N° 7, Tabla N°6)			
Resultados			
$r^2 = 0.999995$	$IC_{(\beta_1)} = 0.1937072, 0.01940528$	$IC_{(\beta_0)} = 0.0059768, 0.0071432$	$CV_{y/x} = 0.26\%$
Parámetro		Criterio de Aceptación	
Linealidad del Método		Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $r^2 \geq 0.98$ El $IC(\beta_1)$, el valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo. El $IC(\beta_0)$, el valor de la ordenada debe incluir el intervalo. El $CV_{y/x}$, no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico.	
Conform		No onforme	
Si es conforme			

LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS			
TITULO: Protocolo para determinar parámetros de desempeño en el método analítico espectrofotométrico (3500-Fe D) de fenantrolina, para la determinación de hierro total en agua potable.			
Estándar			
Nombre	Concentración	Lote	vencimiento
Hierro en ácido Nítrico 5%	1000 ug/mL	H50597	31/12/2011
Equipos			
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Balanza Analítica Adventurer	OHAUS	27/09/2010	
Nombre	Modelo	Fecha de calibración	
Espectrofotómetro Shimadzu	UV 1800	14/10/2009	
Fecha de emisión	Fecha de revisión	Fecha de aprobación	Página N°:
15-10-2010	16-10-2010	18-10-2010	6/6
INTERVALO (Ver anexo N°7)			
RESULTADOS			
Resultados			
0.1 mg/L – 2.0 mg/L de hierro			
Parámetro	Criterio de Aceptación		
Intervalo	Debe incluir la concentración inferior y superior del analito, con adecuada precisión, exactitud y linealidad.		
Conforme	No conforme		
Si es conforme			
ROBUSTEZ (Ver anexo N°7, Tabla N°7)			
Resultados			
$d_1 = 0.02$	$d_2 = 0.007$		
Parámetro	Criterio de Aceptación		
Robustez	$ d_i \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos.		
Conforme	No conforme		
Si es conforme			

CUADRO N°4 RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS PARA METODO ESPECTROFOTOMETRICO (3500-Fe D)

Parámetros Evaluados	Criterio de Aceptación	Resultado	Dictamen
Exactitud	CV: 50-120% para impurezas. ₍₅₎	CV= 58.27%	Cumple
	y : debe incluirse dentro del intervalo. ₍₅₎	IC(μ)= 0.0698 , 0.1841 y = 0.1275	
Precisión (Repetibilidad)	CV: $\leq 11\%$ para soluciones menores a 1ppm ₍₅₎	CV= 7.11%	Cumple
	y : debe incluirse dentro del intervalo. ₍₅₎	IC(μ)= 0.0564 , 0.0645 y = 0.1275	
Especificidad	La respuesta del método debe ser debida únicamente al analito en estudio. ₍₅₎	0.2mg/L Fe	Cumple
Límite de Cuantificación	$r^2 \geq 0.98$ ₍₅₎	$r^2 = 0.998983$	Cumple
	IC(β_1), no debe incluir el cero. ₍₃₎	IC(β_1)= 0.217747 , 0.2244890	
Límite de Detección	$r^2 \geq 0.98$ ₍₃₎	$r^2 = 0.998983$	Cumple
	IC(β_1), no debe incluir el cero. ₍₃₎	IC(β_1)= 0.217747 , 0.2244890	
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$ ₍₃₎	$r^2 \geq 0.999995$	Cumple
	IC(β_1), el valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo. ₍₃₎	IC(β_1) = 0.1937072 , 0.01940528	
	IC(β_0), el valor de la ordenada debe incluir el intervalo. ₍₃₎	IC(β_0) = 0.0059768 , 0.0071432	
	CV _{y/x} no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico ₍₃₎	CV _{y/x} = 0.26%	
Intervalo	Debe incluir la concentración inferior y superior del analito, con adecuada precisión, exactitud y linealidad ₍₅₎	0.1 mg/L – 2.0 mg/L de hierro	Cumple
Robustez	di $\leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos ₍₃₎	di= 0.02 di=0.007	Cumple

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño de la validación del Método Espectrofotométrico de la Fenantrolina para determinación de hierro total en agua potable, demuestran ser: exactos, precisos y lineales; en un rango de concentraciones en parte por millón (mg/L), que comprenden desde el valor mínimo del límite cuantificable hasta el valor máximo cuantificable de la linealidad (0.1 - 2.0 mg/L). Lo que contribuye a una mayor credibilidad en los resultados de los análisis que se realizaron.
2. En la determinación de la exactitud y precisión se obtuvieron datos con poca variabilidad entre ellos, tanto en los resultados de intervalo de confianza que demuestra que el valor de la media poblacional posee fiabilidad en la estimación realizada, al encontrarse dentro del intervalo establecido, como el resultado de coeficiente de variación (CV), el cual fue del 58.27% para la exactitud, cumpliendo así con el criterio de aceptación que establece que el valor del coeficiente de variación debe estar dentro del rango del 50 al 120%; y para la precisión obtuvo un CV del 7.11% valor que resulto ser menor al criterio de aceptación, donde este dice que debe ser menor al 11% para impurezas a una concentración de analito menor a 1 ppm.
3. El Método Espectrofotométrico de la Fenantrolina para la determinación de hierro total en agua potable resulta ser específico, pues este es capaz de identificar el hierro en forma inequívoca, brindando una mayor confiabilidad al momento de aplicar dicho método.

4. El límite de cuantificación, demuestra que el método posee un límite cuantificable de 0.1mg/L, que es la menor concentración fiable, pues el valor de la pendiente se encuentra dentro del intervalo de confianza de la misma y el coeficiente de determinación es mayor de 0.98, con lo que se da cumplimiento a los criterios de aceptación para este parámetro.
5. En el límite de detección el analito en estudio demostró que a las concentraciones evaluadas es capaz de emitir una señal, que no necesariamente es cuantificable, pero sí debe cumplir con exactitud y precisión tal como lo expresa la bibliografía, dicho valor fue determinado a través de la fórmula.
6. La determinación de la linealidad produjo resultados aceptables como un coeficiente de determinación mayor de 0.98, siendo este de 0.999995, lo que demuestra una correlación entre la concentración del analito y la respuesta analítica (Absorbancia); además de un coeficiente de variación de regresión menor de un 3%, demostrando así la linealidad del método.
7. El parámetro de la robustez aplicado al método en estudio, demostró en sus resultados que la diferencia absoluta de la media poblacional, para dicho método se mantiene estable ante variaciones de humedad y temperatura en el Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, al ser estos resultados menores al 3% según criterio de aceptación para métodos químicos o espectrofotométricos.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Desarrollar el Método Analítico de la Fenantrolina, verificando constantemente la etapa de ebullición de la muestra, para evitar que la ebullición sea violenta y ocasionar pérdidas del analito o contaminación entre muestras.
2. Validar el procedimiento de lavado de cristalería ya que resulta crítico al momento de realizar análisis de metales como el Hierro; en este proceso debe eliminarse cualquier tipo de interferencias. Utilizar cristalería clase "A", en el desarrollo del Método Analítico de la Fenantrolina.
3. Implementar el Método de Primeras Entradas, Primeras Salidas (PEPS), este consiste básicamente en darle salida del inventario a aquellos productos que tiene mayor tiempo de ingreso, por lo que quedarán aquellos productos comprados más recientemente.
4. Utilizar agua destilada libre de Hierro o con una concentración mínima que no afecte el análisis de determinación de hierro, pudiendo dar falsos positivos.
5. Que las Autoridades de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, para la compra de insumos que serán útiles, en el desarrollo de validación de los procedimientos analíticos dentro del Laboratorio Físicoquímico de Aguas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. APHA, AWWA, WPCF. 1992. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas potables y Residuales. 17ª edición. Madrid España. Ediciones Días Sánchez. S.A. Páginas 3-112 a 3-115.
2. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). NSR ISO/IEC 17025:2005. Norma Salvadoreña
3. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación de Métodos Analíticos México. AC. Edición 2002.Volumen único. Páginas 33-36, 59-87.
4. Skoog, y otros. Análisis Instrumental. 7ª edición. México. Mc Graw Hill/INTERAMERICANA DE MEXICO, S.A. DE C.V. páginas 577 y 578.
5. Ortega Aguirre L. y Otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona España. Páginas 33-36, 46-47, 54-58, 68-70,75-77 y 85.
6. López Luz M. 2009. Determinación de Parámetros de Desempeño en Métodos Analíticos Espectrofotométricos Específicos para Cuantificar Fósforo y Potasio en Suelos Utilizados para Cultivos de Café. Licenciatura en Química y Farmacia. San salvador El salvador. Universidad de El Salvador. Página 27.
7. http://es.Wikipedia.org/wiki/Agua_potable.

8. <http://hierroenagua/La Prueba del Agua. mht>

9. www.fq.uh.cu/dpto/qf/docencia/pregrado/estruc_2/uv_descargas/v_1.pdf

GLOSARIO (3,5)

Análisis: Estudio de una muestra para determinar sus composición o naturaleza química.

Analito: Especie química que se analiza.

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

Calidad: Conjunto de propiedades y características de un proceso que le confiere su aptitud para satisfacer las necesidades establecidas o implícitas.

Cantidad nominal: es la cantidad o concentración teórica de un analito. Cuando se trabaja con concentraciones relativas se le da un valor de cien.

Coefficiente de aceptación: Probabilidad en porcentaje, de que un resultado de una medida este comprendido en el intervalo de aceptación o entre los limites de aceptación.

Control de calidad: Conjunto de medidas que, según una metodología de análisis de muestra, aseguran que el proceso se encuentra bajo control. Proceso de regulación a través del cual se puede medir la calidad real, comparada con las normas o especificaciones y actuar sobre la diferencia.

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

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

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

Evaluación de calidad: Procedimiento para la determinación de la calidad de las medidas de laboratorio mediante el empleo de datos a partir de las medidas de control de calidad internas y externas.

Garantía de calidad: Plan que define el funcionamiento del laboratorio especifica las medidas utilizadas para producir datos de una nueva precisión y un sesgo conocido.

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

Limite de cuantificación: concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Limite de detección: concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Linealidad: capacidad del método para proporcionar resultados directamente o por medio de transformaciones matemáticas definidas, proporcionales a las concentraciones de analito en las muestra dentro de un rango establecido.

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.

Muestra: Parte representativa de la materia muestra del análisis.

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

Precisión: capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. Grado de dispersión de los resultados analíticos respecto a su valor medio.

Protocolo de validación: descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

Repetibilidad: evalúa la precisión del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (aparatos, reactivos, analista) en un mismo laboratorio y en un mismo periodo de tiempo corto.

Robustez: capacidad del método analítico para mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros de desempeño del método.

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

Validación: establecimiento de la evidencia documental 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.

ANEXO N°1
MÉTODO OFICIAL DE LA APHA, MÉTODO DE LA
FENANTROLINA.

3500-Fe D. Método de fenantrolina

1. Discusión general

a) *Principio:* Se disuelve el hierro, se reduce al estado ferroso por ebullición con ácido e hidroxilamina y se trata con 1,10-fenantrolina a pH de 3,2 a 3,3. El complejo rojo-naranja que se forma es un quelato de tres moléculas de fenantrolina por cada átomo de hierro ferroso. La solución coloreada obedece a la ley de Beer; su intensidad es independiente del pH entre 3 y 9. Un pH entre 2,9 y 3,5 asegura un rápido desarrollo del color en presencia de un exceso de fenantrolina. Los patrones del color son estables durante al menos 6 meses.

b) *Interferencia:* Entre las sustancias que interfieren están los oxidantes fuertes, cianuro, nitrito, y fosfatos (más los polifosfatos que el ortofosfato), cromo, zinc en concentración 10 veces superior a la del hierro, cobalto y cobre por encima de 5 mg/l y níquel por encima de 2 mg/l. El bismuto, el cadmio, el mercurio, el molibdato y la plata precipitan la fenantrolina. La ebullición inicial con ácido convierte los polifosfatos en ortofosfato y elimina el cianuro y el nitrito, que, por otra parte, podrían interferir. La adición de un exceso de hidroxilamina elimina los errores causados por concentraciones excesivas de reactivos fuertemente oxidantes. En la presencia de iones metálicos que interfieran, utilícese un mayor exceso de fenantrolina para sustituir a la complejada por los metales que interfieren. Cuando existen concentraciones excesivas de iones metálicos que interfieren, puede emplearse el método de extracción.

Si existen cantidades apreciables de materia colorante u orgánica, puede ser necesario evaporar la muestra, llevar el residuo a combustión seca suave y volver a disolver en ácido. La combustión seca se puede realizar en crisoles de sílice, por-

celana o platino que hayan sido hervidos durante varias horas en HCl 1 + 1. La presencia de cantidades excesivas de materia orgánica puede hacer necesaria la digestión antes de emplear el procedimiento de extracción.

c) *Concentración mínima detectable:* Concentraciones de hierro disuelto o total tan bajas como 10 $\mu\text{g/l}$ pueden determinarse con un espectrofotómetro provisto de células con un trayecto luminoso de 5 cm o más largo. Trátase un blanco con el procedimiento completo para la corrección.

2. Instrumental

a) *Equipo colorimétrico:* Se necesita uno de los siguientes:

1) *Espectrofotómetro,* para utilizarlo a 510 nm, que proporciona un trayecto luminoso de 1 cm o más largo.

2) *Fotómetro de filtro,* que proporciona un trayecto luminoso de 1 cm o más largo y equipado con un filtro verde con una transmitancia máxima próxima a 510 nm.

3) *Tubos de Nessler,* emparejados, 100 ml, forma alargada.

b) *Material de vidrio lavado con ácido:* Lávese todo el material de vidrio con ácido clorhídrico conc. (HCl) y enjuáguese con agua destilada antes de utilizarlo, con objeto de eliminar depósitos de óxido de hierro.

c) *Embudos de separación:* 125 ml, forma Squibb, con espitas y tapones de vidrio o TFE.

3. Reactivos

Utilícense reactivos bajos en hierro. Para preparar las soluciones patrón y de

los reactivos, empléese agua destilada libre de hierro. Almacénense los reactivos en botellas con tapón de vidrio. Las soluciones de HCl y acetato de amonio son estables indefinidamente si están herméticamente tapadas. Las soluciones de hidroxilamina, de fenantrolina y de hierro de reserva son estables durante varios meses. Las soluciones de hierro patrón no son estables; prepárense a diario según se necesiten, por dilución de la solución de reserva. Los patrones visuales en tubos de Nessler son estables durante varios meses si están bien cerrados y protegidos de la luz.

a) *Ácido clorhídrico*, HCl conc. con menos de 0,00005 por 100 de hierro.

b) *Solución de hidroxilamina*: Disuélvase 10 g de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en 100 ml de agua.

c) *Solución tampón de acetato de amonio*: Disuélvase 250 g de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ en 150 ml de agua. Añádanse 700 ml de ácido acético conc. (glacial). Como incluso el $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ de buena calidad contiene una cantidad significativa de hierro, prepárense nuevos patrones de referencia con cada preparación del tampón.

d) *Solución de acetato de sodio*: Disuélvase 200 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 800 ml de agua.

e) *Solución de fenantrolina*: Disuélvase 100 mg de monohidrato de 1,10-fenantrolina, $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, en 100 ml de agua por agitación y calentamiento a 80 °C. No hervir. Descártese la solución si se oscurece. El calentamiento es innecesario si se añaden al agua dos gotas de HCl conc. (NOTA: Un mililitro de este reactivo es suficiente para no más de 100 μg Fe.)

f) *Solución de hierro de reserva*: Utilícese metal (1) o sal (2) para preparar la solución de reserva.

1) Utilícese alambre de hierro electrolítico o «alambre de hierro para estandarización» en la preparación de la solu-

ción. Si es necesario, límpiase el alambre con papel de lija fino al objeto de eliminar cualquier capa de óxido y producir una superficie brillante. Pésense 200,0 mg de alambre e introdúzcanse en un matraz volumétrico de 1.000 ml. Disuélvase en 20 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 6N y dilúyase con agua hasta la señal; 1,00 ml = 200 μg Fe.

2) Si se prefiere sulfato amónico ferroso, añádanse lentamente 20 ml de H_2SO_4 conc. a 50 ml de agua y disuélvase 1,404 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Añádase permanganato potásico (KMnO_4) 0,1N gota a gota hasta que persista un color rosa pálido. Dilúyase hasta 1.000 ml con agua y mézclese; 1,00 ml = 200 μg Fe.

g) *Soluciones de hierro patrón*: Prepárense diariamente para su uso.

1) Llévase con la pipeta 50,00 ml de solución de reserva a un matraz volumétrico de 1.000 ml y dilúyase con agua hasta la señal; 1,00 ml = 10,0 μg Fe.

2) Llévase con la pipeta 5,00 ml de solución de reserva a un matraz volumétrico de 1.000 ml y dilúyase con agua hasta la señal; 1,00 ml = 1,00 μg Fe.

h) *Éter diisopropílico o isopropílico*. (PRECAUCIÓN: Los éteres pueden formar compuestos explosivos; pruébense antes del uso.)

4. Procedimiento

a) *Hierro total*: Mézclese cuidadosamente la muestra y midanse 50,0 ml en un erlenmeyer de 125 ml. Si este volumen de muestra contiene más de 200 μg de hierro, utilícese una porción más pequeña medida con precisión y dilúyase hasta 50,0 ml. Añádanse 2 ml de HCl conc. y 1 ml de solución de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$. Añádanse unas cuantas bolas de vidrio y caliéntese a ebullición. Para asegurar la disolución de todo el hierro, continúese la ebullición hasta que el volumen se reduz-

ca a 15-20 ml. (Si la muestra ha sido sometida a combustión seca, disuélvase el residuo en 2 ml de HCl conc. y 5 ml de agua). Enfriese hasta temperatura ambiente y pásese a un matraz volumétrico de 50 o 100 ml o a un tubo de Nessler. Añádase 10 ml de solución tampón de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ y 4 ml de solución de fenantrolina y dilúyase con agua hasta la señal. Mézclase cuidadosamente y déjese al menos durante 10 a 15 minutos para que se desarrolle el color al máximo.

b) *Hierro disuelto*: Inmediatamente después de tomada, filtre la muestra a través de un filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ a un matraz de vacío que contenga 1 ml de HCl conc./100 ml de muestra. Analícese el filtrado en cuanto al hierro total disuelto (apartado 4a) y/o hierro ferroso disuelto (apartado 4c). (Este procedimiento también puede emplearse en el laboratorio sabiendo que la exposición normal de la muestra al aire durante el traslado puede dar lugar a la precipitación del hierro.)

Calcúlese el hierro suspendido restando el hierro disuelto del hierro total.

c) *Hierro ferroso*: Determínese el hierro ferroso en el lugar donde se ha tomado la muestra, pues con el tiempo puede cambiar la relación ferroso-férrico en soluciones ácidas. Para determinar el hierro ferroso solamente, acidúlese una muestra separada con 2 ml de HCl conc./100 ml de muestra en el momento de su toma. Llénese una botella directamente de la fuente de donde se toman las muestras y tápese. Extráigase a continuación una porción de 50 ml de muestra acidulada y añádase 20 ml de solución de fenantrolina y 10 ml de solución de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ agitando con energía. Dilúyase hasta 100 ml y mídase la intensidad del color dentro de los 5 a 10 minutos. No hay que exponerla a la luz del sol. (El desarrollo de color es rápido en presencia de exceso de fenantrolina. El volumen de fenantrolina dado es adecuado para menos de $50 \mu\text{g}$ de hierro total;

si existen cantidades mayores, utilícese un volumen de fenantrolina correspondientemente mayor a un reactivo más concentrado. Se necesita un exceso de fenantrolina por la cinética del proceso de formación de complejo.)

Calcúlese el hierro férrico por sustracción del hierro ferroso del hierro total.

d) *Medida del color*: Prepárese una serie de patrones llevando con la pipeta volúmenes calculados con precisión de soluciones de hierro patrón (utilícese una solución más débil para medir porciones de 1 a $10 \mu\text{g}$) a matraces erlenmeyer de 125 ml, diluyendo hasta 50 ml por adición de volúmenes medidos de agua y realizando los pasos indicados en el apartado 4a.

Para comparación visual, prepárese una serie de 10 patrones por lo menos, cuyo contenido varíe de 1 a $100 \mu\text{g}$ Fe en el volumen final de 100 ml. Compárense los colores en tubos de Nessler de 100 ml de forma alargada.

Para la medida fotométrica, utilícese la tabla 3500-Fe:I como una guía aproximada para la selección del apropiado trayecto luminoso a 510 nm. Léanse los patrones frente a agua destilada fijada a absorbancia cero y trácese una curva de calibración, incluyendo un blanco (véase apartado 3c y la Introducción general).

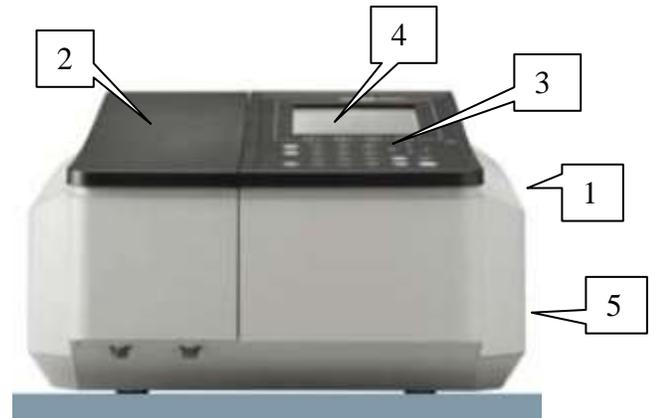
TABLA 3500-Fe:I. SELECCIÓN DE LONGITUD DEL RECORRIDO DE LUZ PARA DIVERSAS CONCENTRACIONES DE HIERRO

Fe μg		Recorrido de luz cm
50 ml de volumen final	10 ml de volumen final	
50-200	100-400	1
25-100	50-200	2
10-40	20-80	5
5-20	10-40	10

ANEXO N°2
PARTES Y FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO ESPECTROFOTOMÉTRICO
SHIMADZU UV 1800

ESPECTROFOTÓMETRO SHIMADZU UV-1800

Espectrofotómetro UV-VIS de 1nm ancho de banda, eficiencia en la lectura, confiabilidad de datos en una unidad compacta con atributos de un equipo de primera línea. Pantalla de cristal líquido con un menú sencillo. Rango de longitud de onda de 190-1100 nm con un ancho de banda espectral mejor que 1nm. Puede ser usado de forma independiente o conectado con una PC. Tiene puerto USB



PARTES DEL EQUIPO

1. SWITCH DE ENCENDIDO-APAGADO
2. COMPARTIMIENTO DE LA MUESTRA
3. PANEL DE CONTROL
4. PANTALLA
5. COMPARTIMIENTO DE LAMPARAS

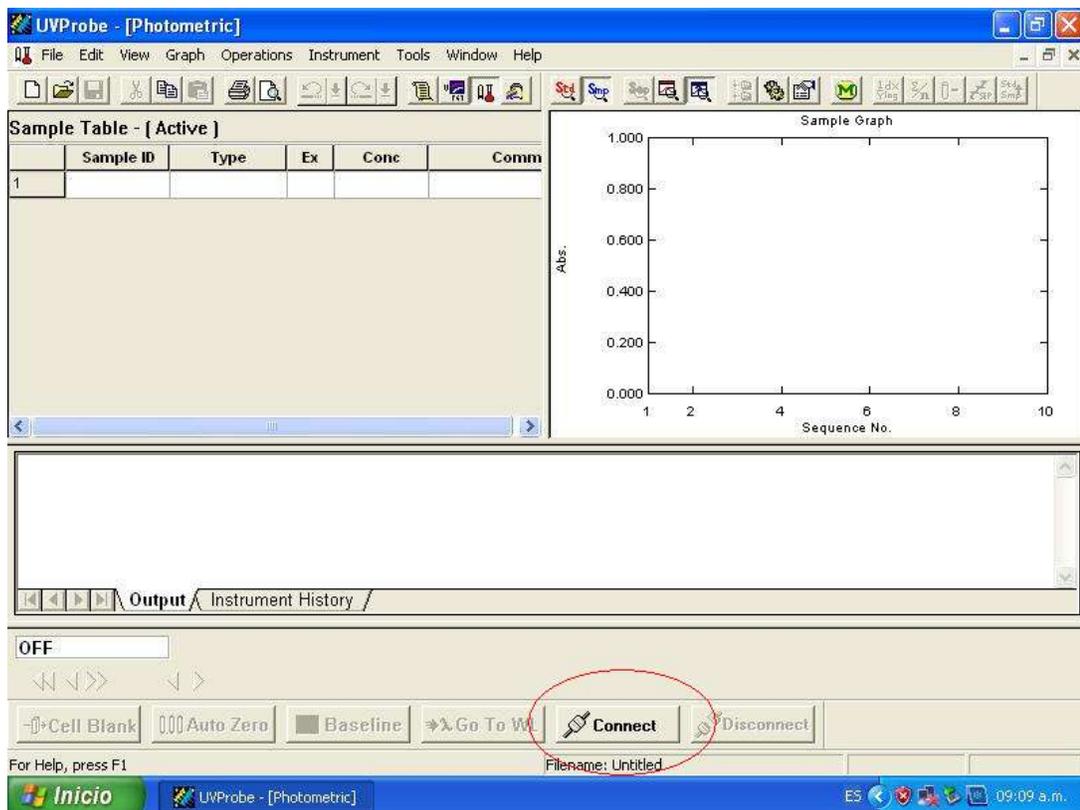
Conectividad directa a computadora por medio de puerto USB

Manejo y configuración por medio de computadora por medio del software UV Probe 2.31

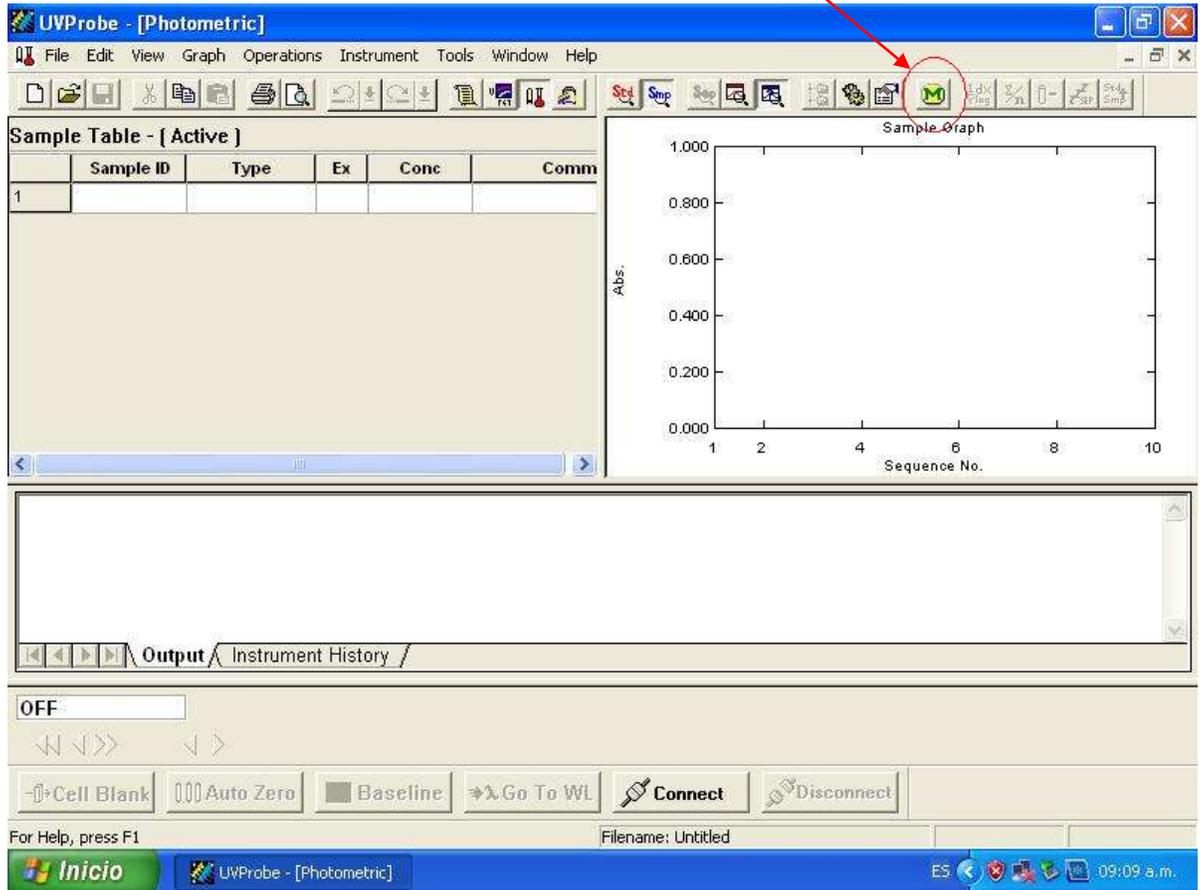


FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO

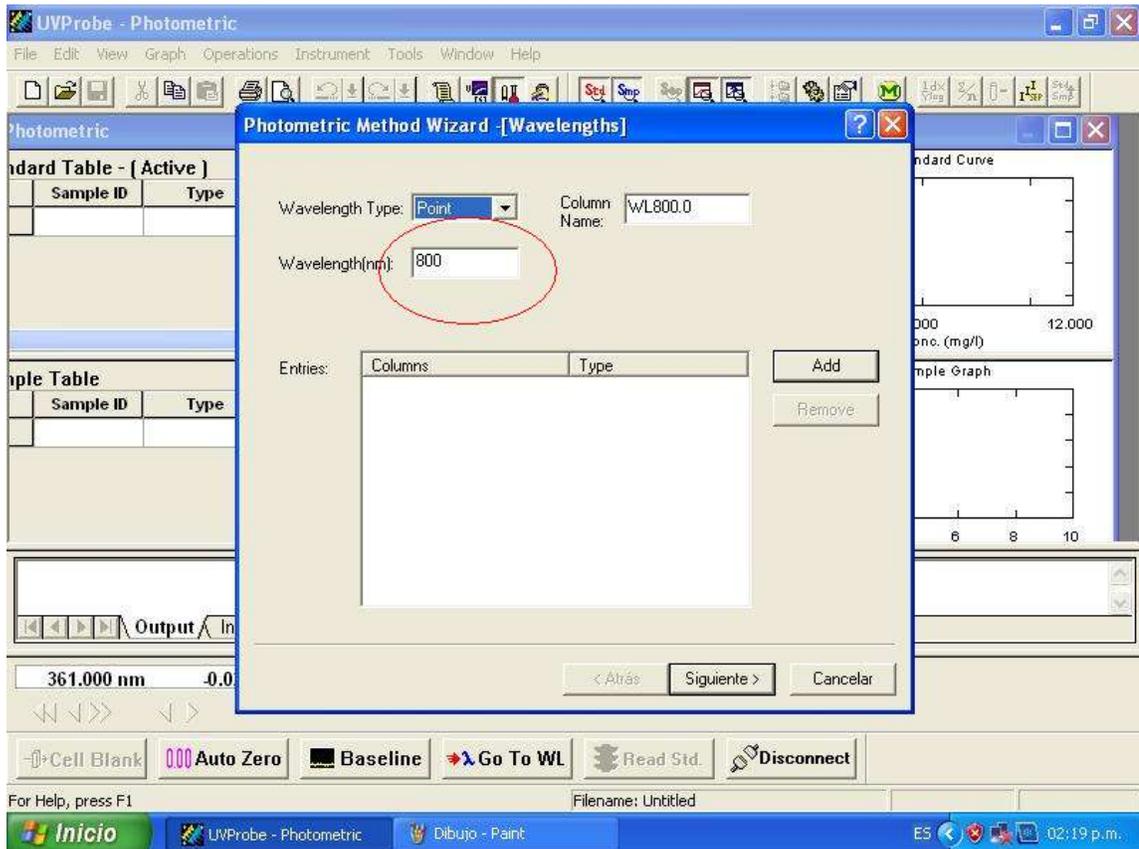
1. Activar la fuente (On).
2. Encender el equipo (PC).
3. Encender el equipo (Shimadzu 1800) y esperar chequeo.
4. Dar doble click en el programa (UV Prove 2.31) ubicado en el escritorio.
5. Presionar la tecla **F4** Ubicado en el teclado de la (PC).
6. Estando dentro del programa UV Prove 2.31, seleccionar el icono Connect.



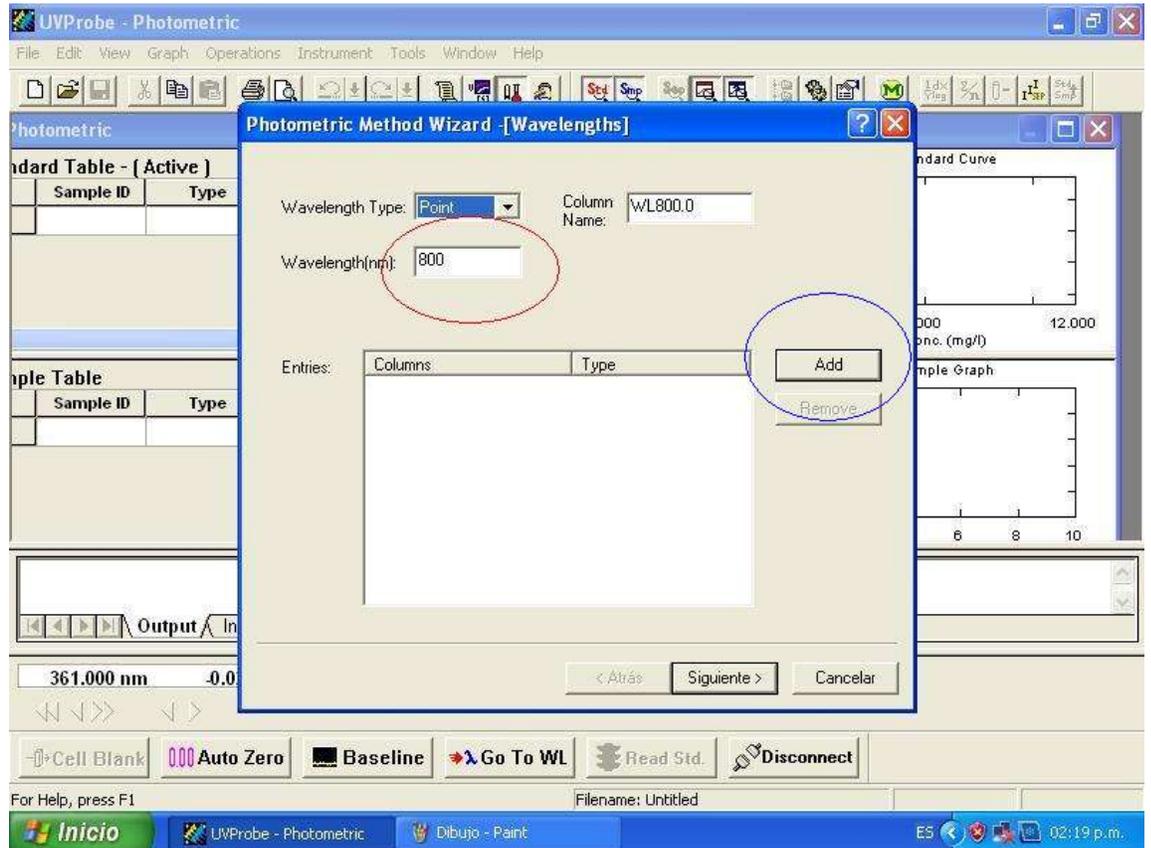
7. Seleccionar el icono método.



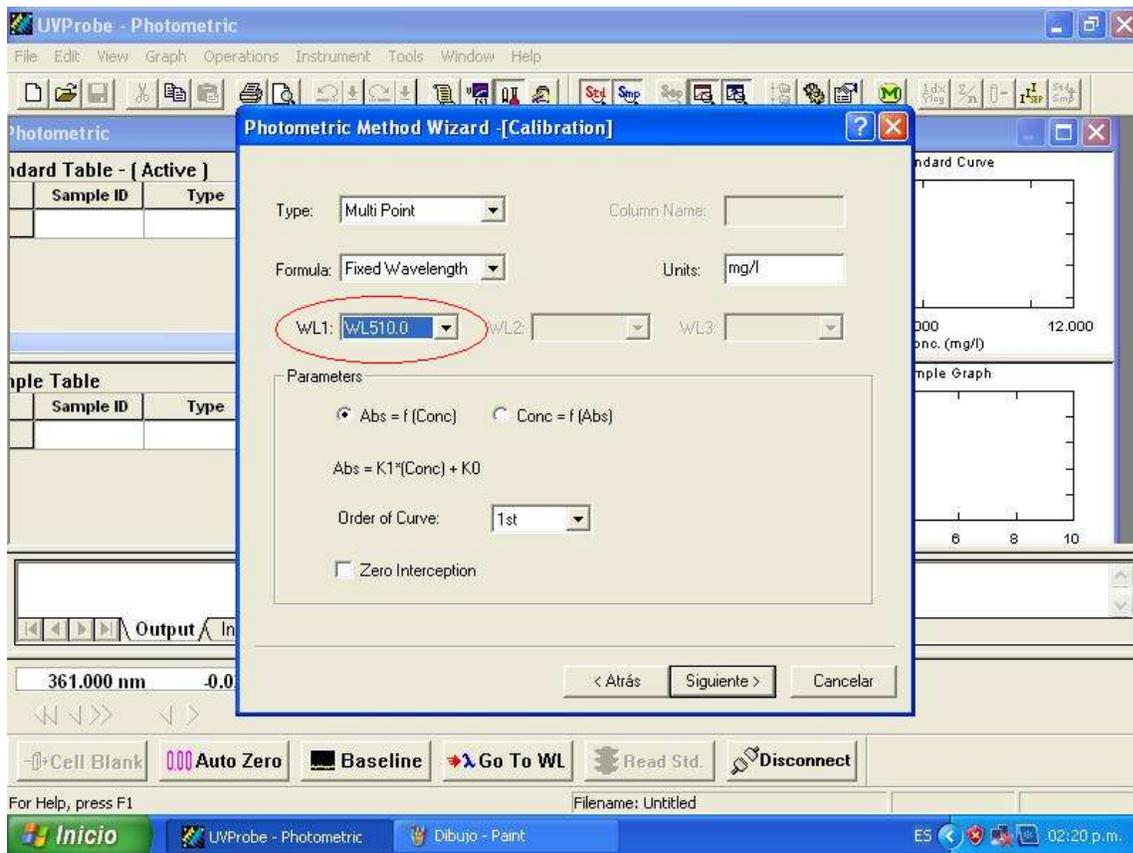
- Al dar click en método se desplegará una venta, en la que hay que seleccionar la longitud de onda.



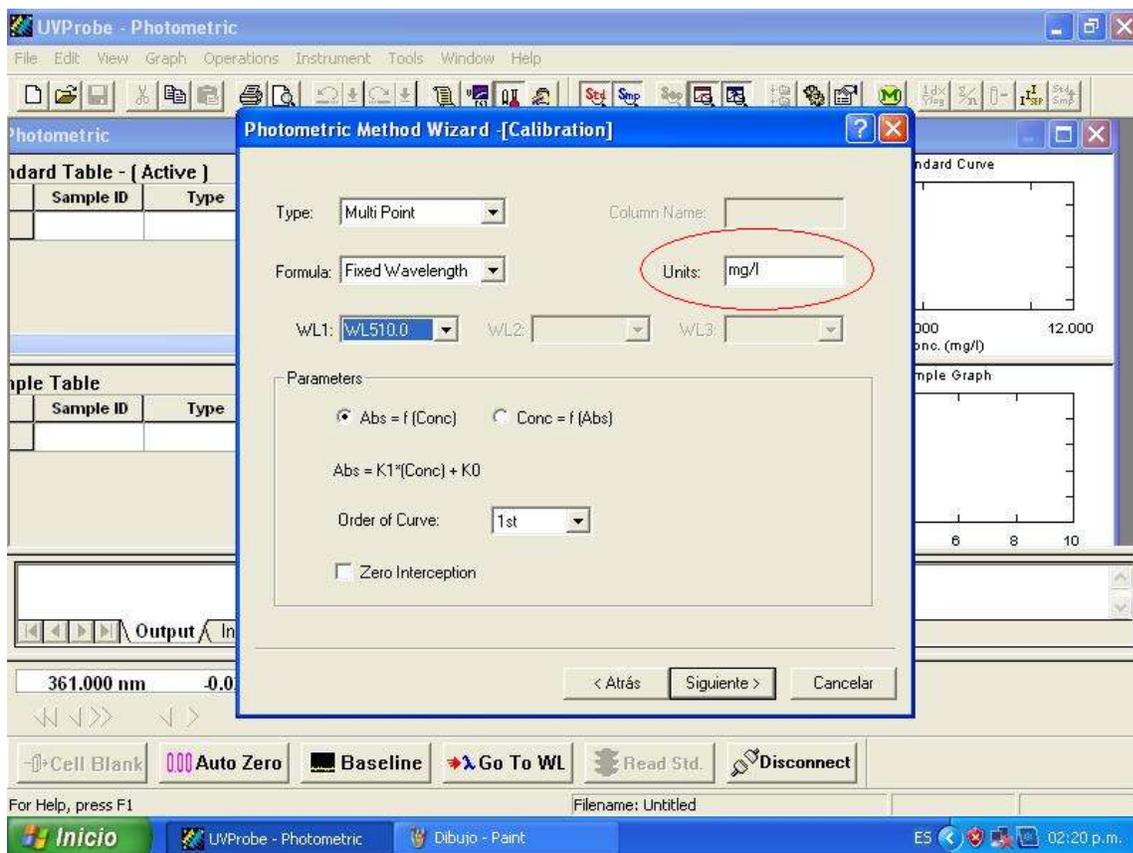
9. Luego dar click el botón **Add** y dar siguiente



10. Confirmar la longitud de onda en la que se trabajará, y dar siguiente

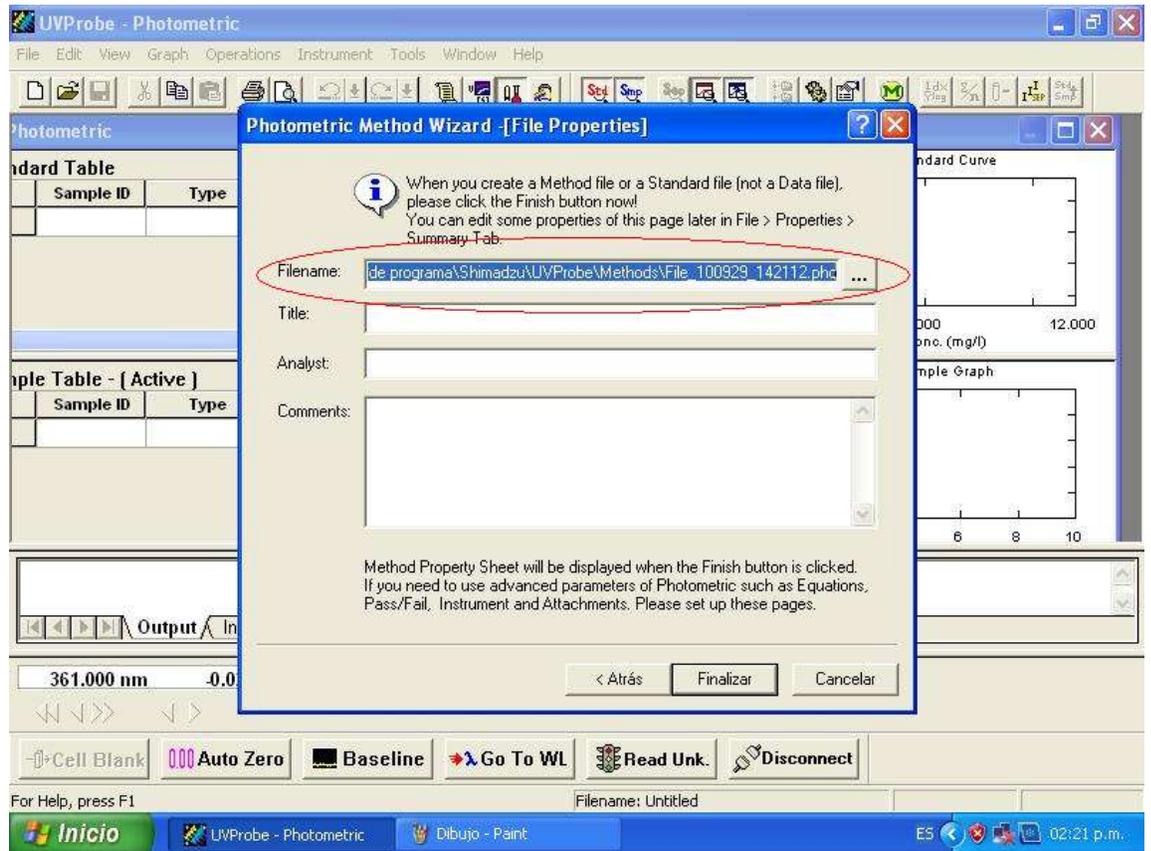


11. Digitar las unidades de trabajo y dar siguiente



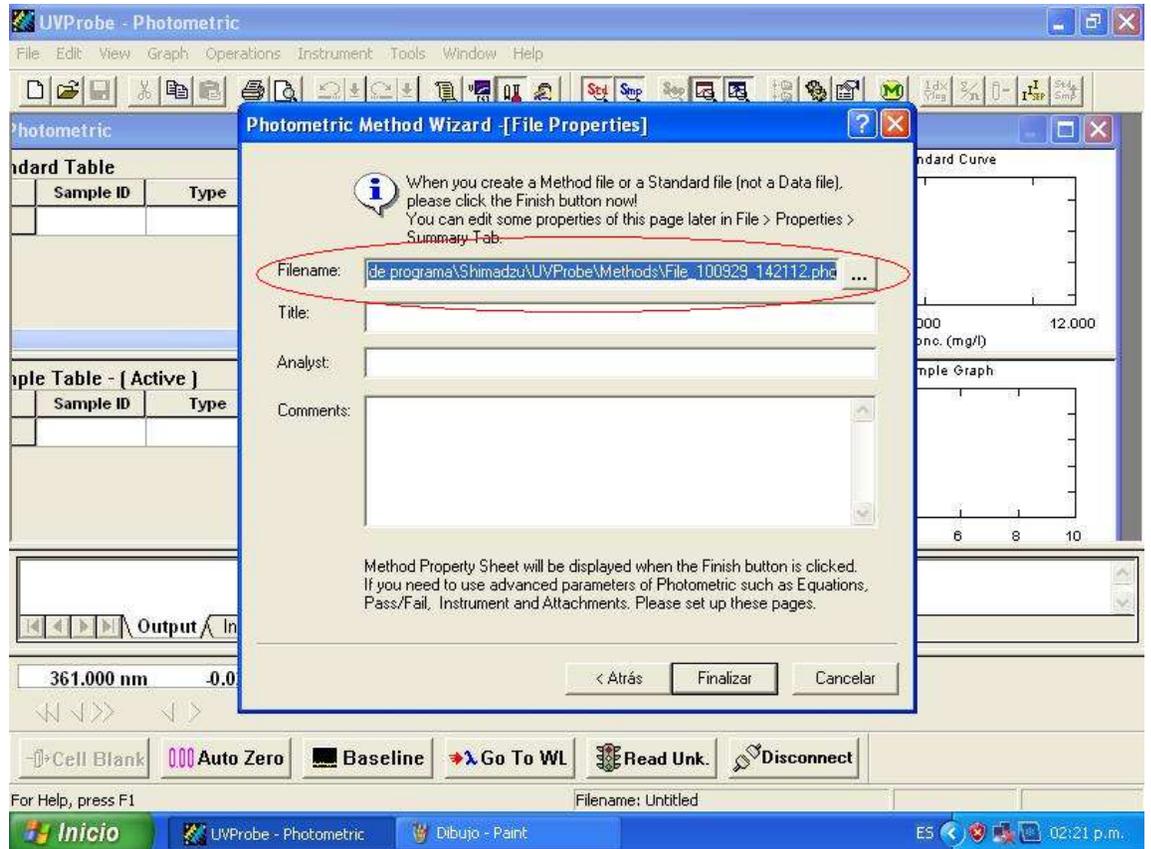
12. Dar click nuevamente en siguiente

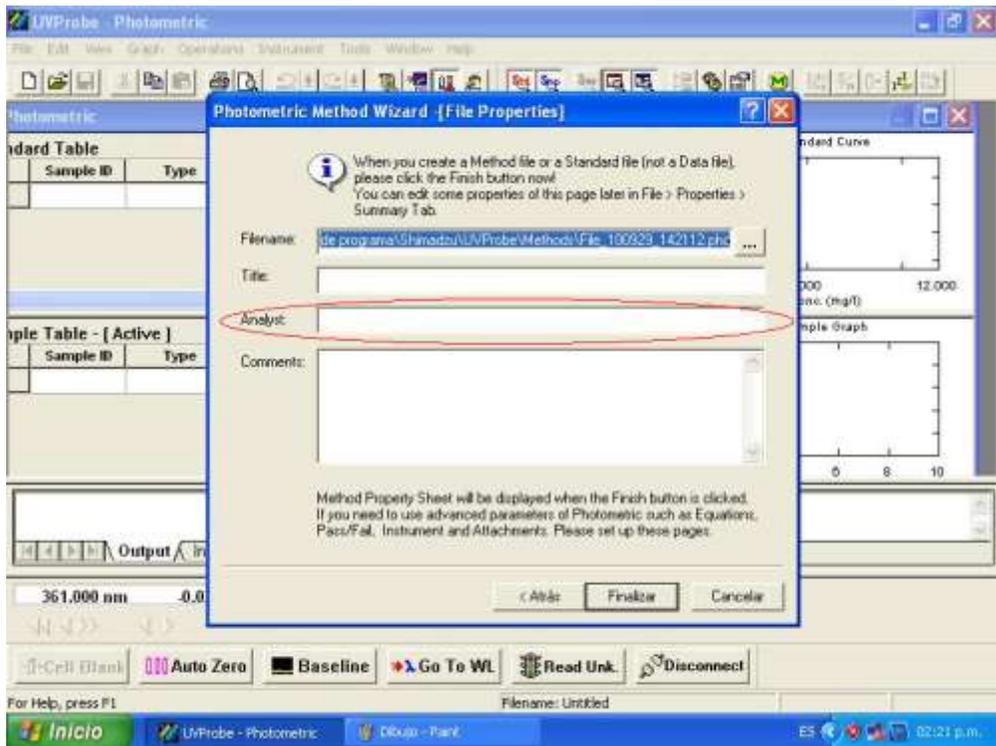
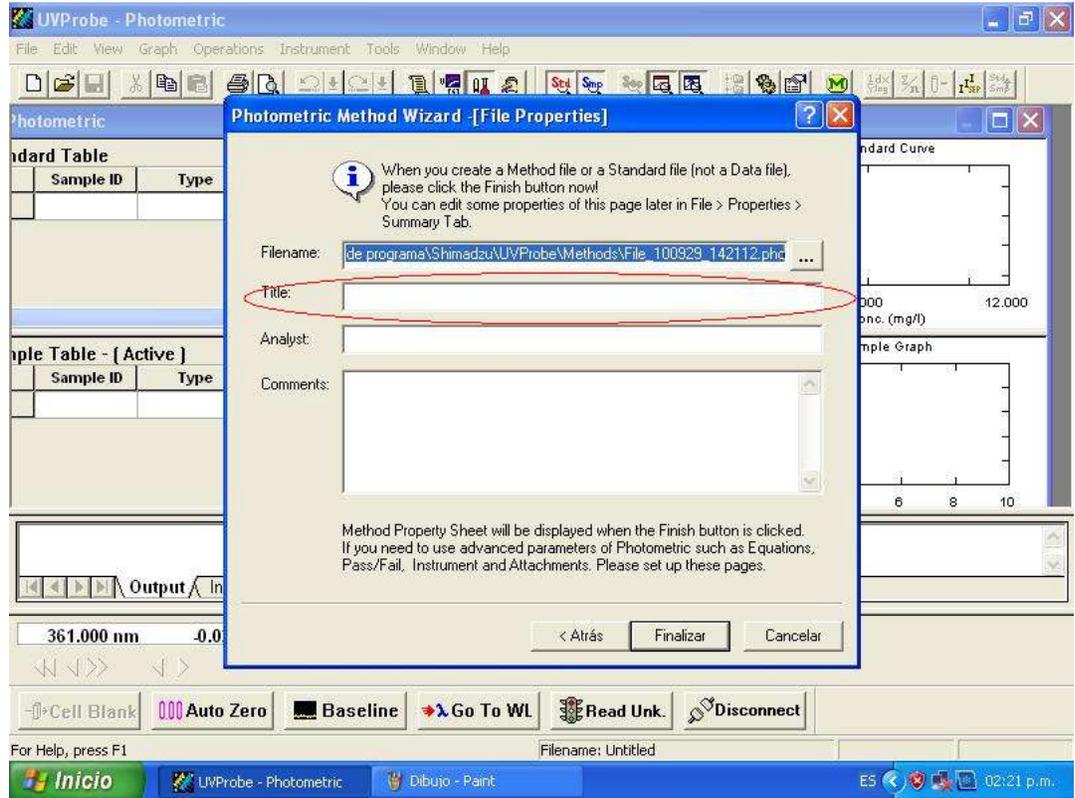
13. Nombrar el método, escribir el título, escribir nombre del analista.



14. Dar click nuevamente en siguiente

15. Nombrar el método, escribir el título, escribir nombre del analista.





16. Para dar por terminado el proceso dar click en 

Creado el método se puede proceder a la corrección con el blanco y luego a la toma de lecturas de las muestras en estudio. El proceso es el siguiente:

- Para corregir con los blancos dar click en la tecla 
- Luego de la corrección proceder a la toma de lecturas, colocar la muestra el en porta celdas, dar click en la longitud de onda.

Sample Table - [Active]					
	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL244.0
1	Muestra 1	Unknown		102.819	0.802
2					

Luego se ilumina el botón , dar click para tomar la lectura.

ANEXO N° 3



Iron, 1000 ug/mL
TRAKER INSTRA-ANAL Y/FI[®] Reagent
(Fe metal in 5% HNO₃)
3

Product No. 6453
 Lot No. 1150597
 Release Date 12/08/2009

Certificate of Analysis		
TEST	SPECIFICATION	RESULT
Iron (Fe)	990 - 1010	1000 ug/mL
The standardization is traceable to NIST		
SRM 915, Calcium Carbonate, Lot #		948712
Prepared by dissolution of Iron metal of 99.99% spectral purity. The metal content of the solution is confirmed by titration with EDTA, traceable to		
NIST SRM 915		948712
The balance used to weigh the raw materials is calibrated regularly using NIST traceable mass standards.		
The uncertainty associated with the reported concentration is +/-0.3%.		
For Laboratory, Research or Manufacturing Use		
USE BEFORE December 31, 2011		
Country of Origin: USA		

ISO

Phillipsburg, NJ 9001-2008 & 14001-2004
 Paris, KY 9001-2008
 Mexico City, Mexico 9001-2008
 Deventer, Holland 9001-2008 & 14001-2004
 Selangor, Malaysia 9001-2008



Mary M. Mastro
Director of QA & Regulatory Affairs

For questions on this Certificate of Analysis please contact Technical Services at 1-800-562-2537 or 908-859-2151
 Mallinckrodt Baker, Inc. • 222 Red School Lane • Phillipsburg, NJ 08865 • Phone: 908.859.2151 • Fax: 908.859.6005

Figura N°1 Certificado de análisis del estándar de hierro.

ANEXO 4
PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTÁNDAR

logo	PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR	CODIGO: LF 910 DVG 1582 02
	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS	HOJA: 1 DE 3
		FECHA: ____/____/____/
		REVISION Nº: 1
VIGENTE DESDE:	TITULO: Procedimiento analítico, para la determinación de hierro total en agua potable, por el método oficial de la fenantrolina.	COPIA Nº: 1
<p>Objetivo Describir el procedimiento adecuado, para la determinación de hierro total en agua potable, por el método oficial de la fenantrolina y de esta manera evitar errores en la determinación del mismo.</p> <p>Alcance Aplicable al Laboratorio Físicoquímico de Aguas, en la determinación de hierro total en agua potable, por el método oficial de la fenantrolina, el cual tiene un límite máximo permisible de 0.30 mg/L de hierro, según la Norma Salvadoreña de Agua.</p> <p>Principio Se disuelve el hierro, se reduce al estado ferroso por ebullición con ácido e hidroxilamina y se trata con 1.10-fenantrolina a pH de 3,2 a 3,3. El complejo rojo-naranja que se forma es un quelato de tres moléculas de fenantrolina por cada átomo de hierro ferroso.</p> <p>Equipo, Materiales y Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Equipo: Shimadzu, Hot plate. - Materiales: <ul style="list-style-type: none"> 4 Beakers de 10mL 1 Beaker de 50mL 4 Probetas de 10mL 1 Probeta de 50mL 1 Erlenmeyer de 125mL 1 Matraz volumétrico de 50 ó 100mL 3 Agitadores de vidrio - Reactivos: <ul style="list-style-type: none"> Acido clorhídrico concentrado con menos de 0,00005 por 100 de hierro. Solución de hidroxilamina. Solución tampón de acetato de amonio. Solución de acetato de sodio. Solución de fenantrolina. Solución de hierro de reserva. Solución de hierro patrón. 		
REDACTADO POR :	VERIFICADO POR:	APROBADO POR:

ANEXO N°5

CONCENTRACION vrs ABSORBANCIA

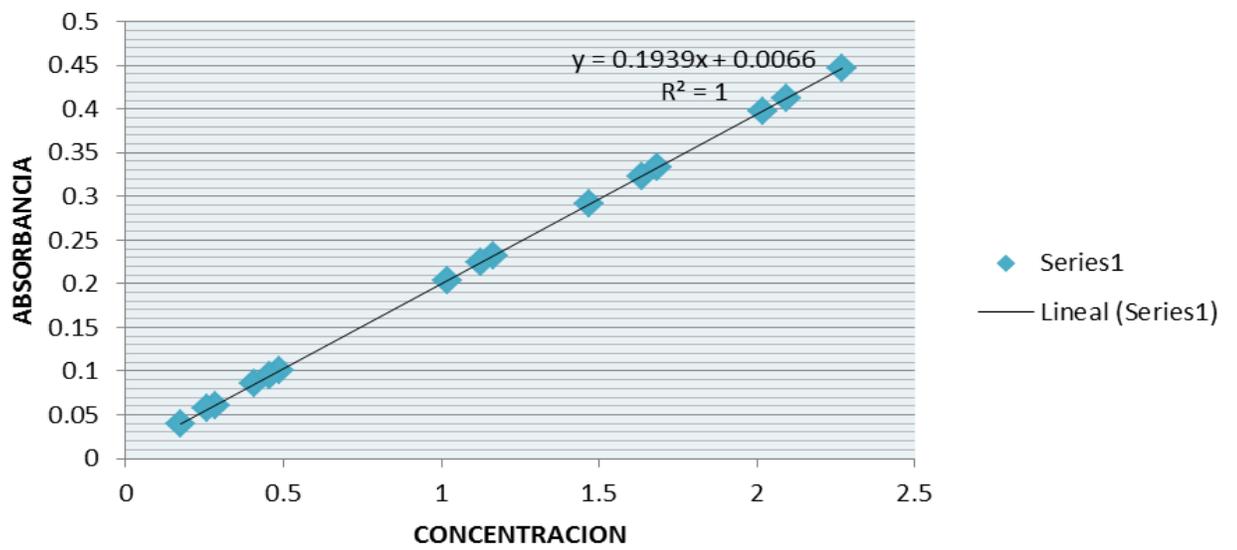


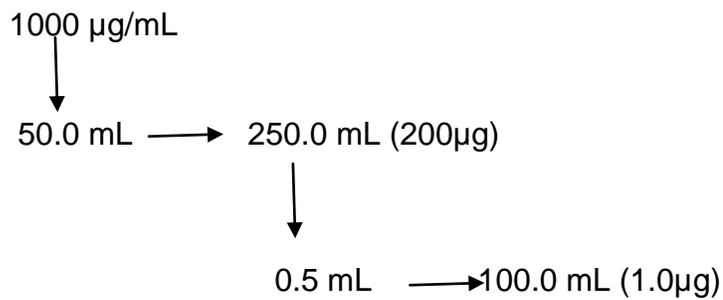
Figura N°2 Gráfica linealidad del Método Espectrofotométrico (3500Fe-D).

ANEXO N°6
EJEMPLO DE CASCADA DE DILUCION PARA LA PREPARACION
DE SOLUCIÓN ESTANDAR

Diluciones realizadas para la preparación de las soluciones estándar

Se partió de un estándar de hierro de concentración de $1000\mu\text{g/mL}$, de este se tomó una alícuota de 50.0mL se pasó a un balón volumétrico de 250 mL , llevándose a volumen con agua destilada, ésta fue la solución madre de la cual se tomaron alícuotas para preparar los estándares a utilizar en cada parámetro de estudio.

A continuación se ejemplifica las cascadas de dilución:



ANEXO N°7
CALCULOS Y RESULTADOS PARA EL PROTOCOLO DE
VALIDACION

TABLA N°1 RESULTADOS DE EXACTITUD DE HIERRO TOTAL EN AGUA POTABLE

N° REPLICAS	Concentración Original (ppm)	Concentración Obtenida ppm (X)	Propiedad medida Absorbancia (Y)	Y ²
1	0.2	0.282	0.061	3.721x10 ⁻³
2	0.5	0.485	0.101	10.201x10 ⁻³
3	1.0	1.095	0.219	47.961x10 ⁻³
4	0.2	0.259	0.057	3.249x10 ⁻³
5	0.5	0.492	0.102	10.404x10 ⁻³
6	1.0	1.125	0.225	50.625x10 ⁻³
7	0.2	0.254	0.056	3.136x10 ⁻³
8	0.5	0.486	0.101	10.201x10 ⁻³
9	1.0	1.133	0.226	51.076x10 ⁻³
			ΣY=1.148	ΣY²=0.190574

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

-Media Aritmética:

$$y = \frac{1.148}{9} = 0.1275$$

-Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{9(0.190574) - (1.148)^2}{9(9-1)}} = 0.0743$$

-Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{0.0743}{0.1275} * 100 = 58.27\%$$

-Intervalo de Confianza

El valor de tabla de la distribución t de Student, se determina para un t de 0.975, n-1 grados de libertad, siendo “n” el número de réplicas.

Ejemplo: $n = 9$ para $n-1$, corresponde a $9-1 = 8$ y para ocho grados de libertad el de t de Student de tabla es de 2.306.

$$IC_{(\mu)} = 0.1275 \pm 2.306 \frac{0.0743}{9} = 0.0698, 0.1841$$

TABLA N°2 RESULTADOS DE REPETIBILIDAD DE HIERRO TOTAL EN AGUA POTABLE

N° REPLICAS	Concentración Original (ppm)	Concentración Obtenida ppm (X)	Propiedad medida Absorbancia (Y)	Y ²
1	0.3	0.267	0.058	3.364×10^{-3}
2	0.3	0.320	0.069	4.761×10^{-3}
3	0.3	0.278	0.061	3.721×10^{-3}
4	0.3	0.250	0.055	3.025×10^{-3}
5	0.3	0.260	0.057	3.249×10^{-3}
6	0.3	0.298	0.063	3.969×10^{-3}
			$\Sigma Y = 0.363$	$\Sigma Y^2 = 0.022089$

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

-Media Aritmética:

$$\bar{y} = \frac{0.363}{6} = 0.0605$$

-Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{6(0.022089) - (0.363)^2}{6(6-1)}} = 0.0043$$

-Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{0.0043}{0.0605} * 100 = 7.11\%$$

-Intervalo de Confianza

$$IC_{(\mu)} = 0.06005 \pm 2.306 \frac{0.0043}{6} = 0.0564, 0.0645$$

TABLA N°3 RESULTADOS DE LA ESPECIFICIDAD DE HIERRO TOTAL EN AGUA POTABLE

N° REPLICA	Concentración Original ppm	Concentración de muestra ppm (X)	Propiedad medida Absorbancia (Y)
1 (contaminada)	0.2	0.255	0.056
2 (Normal)	0.2	0.263	0.057

TABLA N°4 RESULTADOS DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL (3500-FE D)

N° REPLICAS	Concentración real	Concentración Obtenida (X) ppm	Propiedad medida Absorbancia (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.2	0.206	0.047	42.436x10 ⁻³	2.209x10 ⁻³	9.3741124x10 ⁻³
2	0.1	0.137	0.033	18.769x10 ⁻³	1.089x10 ⁻³	2.0439441x10 ⁻³
3	0.05	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00
4	0.02	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00
5	0.005	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00
		Σ_X=0.343	Σ_Y=0.08	Σ_X²=0.061205	Σ_Y²=3.298x10⁻³	Σ_{XY}=0.014303

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Pendiente

$$b_1 = \frac{5(0.014203) - (0.343)(0.08)}{5(0.061205) - (0.343)^2} = 0.231319$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(5(0.014203) - (0.343)(0.08))^2}{(5(0.061205) - (0.343)^2)(5(3.298 \times 10^{-3}) - (0.08)^2)} = 0.998983$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{3.298 \times 10^{-3} - (0.231319)(0.014203) - (1.314976 \times 10^{-4})(0.08)}{5 - 2}} = 0.000828$$

$$Sb_1 = 0.000828 \sqrt{\frac{1}{0.061205 - \frac{(0.343)^2}{5}}} = 0.004265$$

$$IC(\beta_1) = 0.231319 \pm (3.182 \times 0.004265) = 0.217747, 0.244890$$

TABLA N°4.1 RESULTADO DE LOS BLANCOS DE HIERRO TOTAL

Blanco N°	Propiedad medida Absorbancia (Y)	Y ²
1	0.001	1x10 ⁻⁶
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
	$\sum Y = 1 \times 10^{-3}$	$\sum Y^2 = 1 \times 10^{-6}$

Para los blancos se calculó la desviación estándar (Sb) de estos, por la siguiente ecuación:

$$S_b = \sqrt{\frac{5(1 \times 10^{-6}) - (1 \times 10^{-3})^2}{5 - (5 - 1)}} = 0.00447$$

Límite de cuantificación

$$LC = \frac{10 * 0.00447}{0.231319} = 0.019324$$

TABLA N°5 RESULTADOS DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL (3500-FE D)

N° REPLI CAS	Concentración real	Concentración Obtenida (X) ppm	Propiedad medida Absorbancia (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.05	-0.047	-0.002	0.00	0.00	0.00
2	0.02	0.001	0.007	0.00	0.00	0.00
3	0.005	-0.062	-0.005	0.00	0.00	0.00
		ΣX =0.00	ΣY=0.000	ΣX²=0.00	ΣY²=0.00	ΣXY=0.00

Debido a que se obtuvieron respuesta analíticas no confiables, se realizó el cálculo del límite de detección de manera teórico, mediante siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3.x0.000447}{0.231319} = 0.005797$$

TABLA N°6 RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL (3500-FE D)

N° REPLI CAS	Concentración real	Concentración Obtenida (X) ppm	Propiedad medida Absorbancia (Y)	X ²	Y ²	XY
1	0.2	0.282	0.061	0.079524	3.721x10 ⁻³	17.202x10 ⁻³
2	0.2	0.173	0.040	0.029929	1.600x10 ⁻³	6.920x10 ⁻³
3	0.2	0.259	0.057	0.067081	3.249x10 ⁻³	14.763x10 ⁻³
4	0.5	0.485	0.101	0.235225	10.201x10 ⁻³	48.985x10 ⁻³
5	0.5	0.406	0.085	0.164836	7.225x10 ⁻³	34.510x10 ⁻³
6	0.5	0.455	0.095	0.207025	9.025x10 ⁻³	43.225x10 ⁻³
7	1.0	1.165	0.232	1.357225	53.824x10 ⁻³	270.280x10 ⁻³
8	1.0	1.018	0.204	1.036324	41.616x10 ⁻³	207.672x10 ⁻³
9	1.0	1.125	0.225	1.265625	50.625x10 ⁻³	253.125x10 ⁻³
10	1.5	1.683	0.333	2.832489	110.889x10 ⁻³	560.439x10 ⁻³
11	1.5	1.468	0.291	2.155024	84.681x10 ⁻³	427.188x10 ⁻³
12	1.5	1.635	0.323	2.673225	104.329x10 ⁻³	528.105x10 ⁻³
13	2.0	2.271	0.447	5.157441	199.809x10 ⁻³	1.015137
14	2.0	2.019	0.398	4.076361	158.404x10 ⁻³	803.562x10 ⁻³

15	2.0	2.095	0.413	4.389025	170.569×10^{-3}	865.235×10^{-3}
		$\sum x = 16.539$	$\sum y = 3.305$	$\sum x^2 = 25.726359$	$\sum y^2 = 1.009767$	$\sum xy = 5.096348$

A continuación se muestran los resultados obtenidos:

$$\bar{x} = 1.1026$$

$$\bar{y} = 0.2203$$

$$b_1 = 0.193880$$

$$b_0 = 0.006560$$

$$r^2 = 0.999995$$

$$IC(\beta_1) = 0.193880 \pm (3.182 \times 0.00008) = 0.1937072, 0.1940528$$

$$IC(\beta_0) = 0.006560 \pm (3.182 \times 0.0005832) = 0.0059768, 0.0071432$$

$$CV_{y/x} = 0.26\%$$

DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO (3500FE-D)

El intervalo del método se determinó considerando que debe estar conformado conformar por el valor máximo cuantificable de la linealidad y el valor mínimo del límite de cuantificación, donde estos valores no presentan desviación de la Ley de Beer. Por lo que el intervalo del método es:

0.1 mg/L-2.0 mg/L.

TABLA N°7 RESULTADOS DE LA ROBUSTEZ PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL (3500-FE D)

	Condición		
	Baja	Controlada(Normal)	Alta
Muestra	16.3°C / 62% (y ₁)	20.9°C / 38% humedad (y ₀)	31.1°C / 35% humedad (y ₂)
1	0.030	0.049	0.042
2	0.028	0.049	0.042
3	∑y₁=0.058	∑y₀=0.098	∑y₂=0.084

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Media aritmética a temperatura controlada (condición normal)

$$y_o = \frac{0.098}{2} = 0.049$$

Media aritmética para el análisis de temperatura alta.

$$\bar{y}_2 = \frac{0.084}{2} = 0.042$$

Media aritmética para el análisis de temperatura baja.

$$y_1 = \frac{0.058}{2} = 0.029$$

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética de la condición normal.

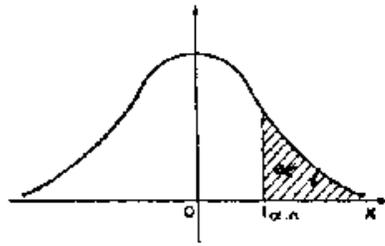
$$d_t = | y_1 - y_o |$$

$$d_t = | 0.029 - 0.049 | = 0.02$$

$$d_t = | \bar{y}_2 - y_o |$$

$$d_t = | 0.042 - 0.049 | = 0.007$$

ANEXO N° 8
TABLA t-STUDENT



$\alpha/2$ df	0,40	0,30	0,20	0,10	0,050	0,025	0,010	0,005	0,001	0,0005
1	0,325	0,727	1,376	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	636,6
2	0,289	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60
3	0,277	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,22	12,94
4	0,271	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	0,267	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,859
6	0,265	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	0,263	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,405
8	0,262	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	0,261	0,543	0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	0,260	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	0,260	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	0,259	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	0,259	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	0,258	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	0,258	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073
16	0,258	0,535	0,863	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,013
17	0,257	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	0,257	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,611	3,922
19	0,257	0,533	0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	0,257	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
21	0,257	0,532	0,859	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	0,256	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	0,256	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,767
24	0,256	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745
25	0,256	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	0,256	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	0,256	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	0,256	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	0,256	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	0,256	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	0,255	0,529	0,851	1,303	1,648	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
50	0,253	0,528	0,849	1,298	1,676	2,009	2,403	2,678	3,262	3,495
60	0,254	0,527	0,848	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
80	0,254	0,527	0,846	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,415
100	0,254	0,526	0,845	1,290	1,660	1,984	2,365	2,626	3,174	3,389
200	0,254	0,525	0,843	1,286	1,653	1,972	2,345	2,601	3,131	3,339
500	0,253	0,525	0,842	1,283	1,648	1,965	2,334	2,586	3,106	3,310
∞	0,253	0,524	0,842	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291