

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Química



INFORME DE SUFICIENCIA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

Titulado:

**“VALIDACIÓN Y OBTENCIÓN DE LA INCERTIDUMBRE
DE UN MÉTODO DE ENSAYO PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL EN
CUERPOS DE AGUAS”**

Presentado por:

JUNIOR ÑIQUEN NECIOSUP

Asesor:

CHRISTIAN JACINTO

LIMA-PERÚ

2013

DEDICATORIA

Dedico mi informe de titulación a Dios quien me guía día tras día permitiéndome seguir adelante, a la memoria de mis abuelitos, su recuerdos los llevo siempre presentes en mi mente. A mis padres Gregorio y María, por todo el apoyo brindado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al apoyo de los profesores Christian Jacinto ,mi asesor, así como a los profesores de la Facultad de Ciencias de la UNI, por el apoyo y la orientación que me brindaron para realizar este trabajo.

Gracias a mis amigos por darme su apoyo moral y humano que me dieron fuerza y ganas de seguir adelante, así como a los amigos que apoyaron en la obtención de los datos para este trabajo.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	3
RESUMEN	4
CAPITULO 1. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
1.1 Métodos de determinación de Nitrógeno Total.....	6
1.2 Métodos Analíticos para la determinación de nitrógeno en cuerpos de agua.....	7
1.2.1 Determinación de Nitrógeno por Digestión en línea con UV/Persulfato en línea y oxidación por FIA.....	6
1.2.2 Determinación de Nitrógeno por digestión con Persulfato.....	8
1.2.3 Determinación de Nitratos por el método colorimétrico (Brucina)	9
1.3 PARAMETROS DE VALIDACIÓN.....	10
1.3.1 Exactitud.....	11
1.3.1.1 Veracidad.....	11
1.3.1.2 Precisión.....	12
1.3.1.3 Repetibilidad.....	13
1.3.1.4 Reproducibilidad.....	13
1.3.1.5 Técnicas para el análisis de estudio de R y r (análisis numérico).....	13
1.3.2 Linealidad.....	15
1.3.3 Límite de Detección de Método (LDM).....	17
1.3.4 Límite de Cuantificación del Método (LCM).....	18
1.3.5 Sensibilidad.....	19
1.3.6 Robustez.....	19
1.3.7 Intervalo / Rango de Trabajo del Método.....	22
1.3.8 Selectividad (Especificidad).....	22
1.3.9 Incertidumbre de Medición	23
1.3.9.1 El Mensurando	23
1.3.9.2 Modelo Físico	24
1.3.9.3 Modelo Matemático.....	24
1.3.9.4 Identificación de fuentes de Incertidumbre.....	25
1.3.9.5 Cuantificación	26
1.3.9.6 Coeficiente de Sensibilidad	30

1.3.9.7 Cálculo de Incertidumbres Relativas	30
1.3.9.8 Propagación de incertidumbres para magnitudes de entrada correlacionadas	31
1.3.9.9 Incertidumbre Expandida.....	32
1.3.9.10 Factor de Cobertura y Nivel de Confianza	32
1.3.9.11 Distribución t de Student.....	33
1.3.9.12 Expresión de la Incertidumbre.....	34

CAPÍTULO 2. DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE EVALUACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL EN CUERPOS DE AGUA

2.1 Muestra de Trabajo	36
2.2 Aparatos y Materiales	36
2.3 Patrones, MRC, Reactivos y Preparación de Soluciones	36

CAPÍTULO 3. DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE NITRÓGENO TOTAL EN CUERPOS DE AGUA.....

3.1 Preparación de las muestras de aguas de diferentes matrices para la evaluación de los parámetros de validación del método.....	40
3.2 Escrutinio de resultados para determinar la consistencia de valores resagados, erráticos y atípicos.....	42
3.2.1 Cálculo de la Estadística de Consistencia entre laboratorios (Mandel: h).....	42
3.2.2 Cálculo de la Estadística de Consistencia dentro de laboratorios (Mandel: k).....	43
3.2.3 Pruebas Numéricas para validez de Resultados (Prueba de Cochran)	45
3.2.4 Pruebas Numéricas de observación de valores erráticos o atípicos (Prueba Grubbs)	46
3.2.5 Normalidad y homogeneidad de los datos	48
3.2.5.1 Normalidad de los datos (Prueba de Anderson Darling).....	48
3.2.5.2 Homogeneidad de los datos.....	53
3.3 Precisión del Método	56
3.4 Recuperaciones en Matrices y Cartas de Control	58
3.5 Veracidad del Método.....	60
3.6 Veracidad Obtenida por interlaboratorios.....	60
3.7 Linealidad del Método.....	62

3.8	Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Método	67
3.9	Sensibilidad del Método.....	69
3.10	Robustéz del Método	70
3.11	Intervalo o Rango de Trabajo del Método	71
3.12	Selectividad del Método.....	72
3.13	Incertidumbre del Método.....	72
3.13.1	Mensurando.....	74
3.13.2	Modelo Físico	74
3.13.3	Modelo Matemático	74
3.13.4	Fuentes de Incertidumbre.....	74
3.13.5	Desarrollo de Incertidumbre por cada una de las fuentes determinadas	75
3.13.5.1	Incertidumbre debida al volumen inicial de la muestra	76
3.13.5.2	Incertidumbre debida a la reproducibilidad cuando se analiza la muestra	77
3.13.5.3	Incertidumbre debida a la temperatura antes de la lectura.....	79
3.13.5.4	Incertidumbre debida a la Temperatura de Digestión	79
3.13.5.5	Incertidumbre debida a un factor de dilución (de ser necesario).....	80
3.13.5.6	Incertidumbre debida a la preparación de solución stock para curva de calibración...	81
3.13.5.7	Incertidumbre debida a la cuantificación con una curva de calibración	84
3.13.5.8	Incertidumbre Combinada	84
3.13.5.9	Incertidumbre Expandida.....	85
	CONCLUSIONES.....	88
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	90
	ANEXOS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1.1 Diagrama de nitrógeno total por el método automático FIA	8
Figura 1.2 Reacción del Nitrato con la Brucina para determinación colorimétrica.....	10
Figura 1.3 Intervalo de Trabajo de un Método Analítico	22
Figura 1.4 Diagrama para la estimación de incertidumbres de la medición.....	25

CAPITULO 2

Figura 2.1 Diagrama de Flujo del proceso de determinación de Nitrógeno total en cuerpos de agua por el metodo a validar.....	38
--	----

CAPITULO 3

Figura 3.1 Valores de k para los resultados de Nitrógeno Total.....	44
Figura 3.2 Valores de h para los resultados de Nitrógeno Total	45
Figura 3.3 Gráficos de probabilidad que muestran la normalidad de los datos obtenidos para Agua potable y agua superficial a concentraciones de 1 y 2.9 ppm N.....	51
Figura 3.4 Gráficos de probabilidad que muestran la normalidad de los datos obtenidos para Agua subterránea y residual a concentraciones de 1 y 2.9 ppm N.....	52
Figura 3.5 Resultados de la Prueba de Barlett para el Nivel 1 (Agua Potable con 1 ppm N).....	54
Figura 3.6 Resultados de la Prueba de Barlett para el Nivel 2 (Agua Superficial con 2.9 ppm N).....	54
Figura 3.7 Resultados de la Prueba de Barlett para el Nivel 3 (Agua Subterránea con 10 ppm N).....	55
Figura 3.8 Resultados de la Prueba de Barlett para el Nivel 4 (Agua Residual con 20 ppm N).....	55
Figura 3.9 Tendencia de la Desviación Estandar Relativa de la Repetibilidad (S_r).....	56
Figura 3.10 Tendencia de la Desviación Estandar de la Reproducibilidad (S_R).....	57

Figura 3.11 Carta de Control de Recuperaciones – Matriz Agua de Consumo.....	58
Figura 3.12 Carta de Control de Recuperaciones – Matriz Agua de Superficial.....	59
Figura 3.13 Carta de Control de Recuperaciones – Matriz Agua de Subterránea.....	59
Figura 3.14 Carta de Control de Recuperaciones – Matriz Agua de Residual.....	60
Figura 3.15 Curva de Calibración para la determinación de N.T.por el Método Validado	64
Figura 3.16 Desviación de la linealidad para concentraciones mayores de 5 ppm de N.....	72
Figura 3.17 Diagrama de Causa y Efecto para determinar las fuentes de Incertidumbre que afectan al Método de determinación de Nitrógeno en cuerpos de agua.....	75
Figura 3.18 Curva de Relación entre el SR y Concentración de Nt (ppm).....	78
Figura 3.19 Gráfico de los aportes porcentuales de cada una de las fuentes de incertidumbre.....	86
Figura 3.20 Ecuación de Relación entre la Concentración y la Incertidumbre.....	87

INDICE DE TABLAS

CAPITULO 1

TABLA 1.1 Recuperaciones de N_T por digestión Persulfato/UV y por FIA.	8
TABLA 1.2 Recuperaciones de N_T por digestión Persulfato y Columna de Cadmio.	9
TABLA 1.3 Pruebas de Hipótesis para la Regresión Lineal.....	16
TABLA 1.4 Pruebas de Hipótesis para la Regresión y Linealidad.	17
TABLA 1.5 Prueba de Youden-Steiner para analizar los efectos de factores que influyen en el resultado del método.....	20
TABLA 1.6 Evaluación para la Robustez de siete factores.....	21
TABLA 1.7 Valores de $t_p(v_{ef})$ para $p=95,45\%$	34

CAPITULO 2

TABLA 2.1 Reactivos usados para la validación del Método	36
TABLA 2.2 Reactivos utilizados como Estándares utilizados para el desarrollo del método para la Determinación de Nitrógeno	36

CAPITULO 3

TABLA 3.1 Datos obtenidos por tres analistas - Matriz Agua Potable con 1 ppm N.....	40
TABLA 3.2 Datos obtenidos por tres analista - Matriz Agua Superficial con 2.9 ppm N	41
TABLA 3.3 Datos obtenidos por tres analistas - Matriz Agua Subterránea con 10 ppm N.	41
TABLA 3.4 Datos obtenidos por tres analistas - Matriz Agua Residual con 20 ppm N.....	42
TABLA 3.5 Valores críticos de h y k de Mandel para tres analistas al 1% y 5%.....	44

TABLA 3.6 Resultados de h y k para el ensayo de las muestras realizadas con el método por validar para la determinación de nitrógeno total en aguas.....	44
TABLA 3.7 Valores Críticos de la Prueba de Cochran.....	46
TABLA 3.8 Resultados de Cochran para el ensayo de muestras de agua con el método a validar.....	46
TABLA 3.9 Valores Críticos de la prueba de Grubbs.....	47
TABLA 3.10 Resultados de Grubbs para el ensayo de muestras.....	47
TABLA 3.11 Residuales de los datos obtenidos por el método a Validar en Agua Potable y En agua superficial a concentraciones de 1 y 2.9 ppm respectivamente.....	49
TABLA 3.12 Residuales de los datos obtenidos por el método a Validar en Agua Subterránea y en Agua residual a concentraciones de 10 y 20 ppm respectivamente.....	50
TABLA 3.13 Valores d p-Value para los cuatro niveles.....	53
TABLA 3.14 Resultados de los Promedios, Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad y Reproducibilidad.....	56
TABLA 3.15 Intervalo de los Porcentajes de Recuperaciones obtenidas por Matrices.....	58
TABLA 3.16 Resultados obtenidos por los cinco analistas de un material de Referencia certificado de nitrógeno Total – Nivel Alto.....	60
TABLA 3.17 Resultados obtenidos por los cinco analistas de un material de Referencia certificado de nitrógeno Total – Nivel Bajo.....	61
TABLA 3.18 Resultados obtenidos por los tres analistas para el MRC Wibby Environmental, Valor Certificado 47.2 ppm y 5.4 ppm de Nt.....	61
TABLA 3.19 Resultados obtenidos para la evaluación de la veracidad del Método, con MRC Wibby Enviromental.....	62
TABLA 3.20 Evaluación de la Linealidad en el Espectrómetro UV-VISIBLE.....	63
TABLA 3.21 Datos para la obtención de estadísticos para la linealidad.....	64
TABLA 3.22 Resultados de Pendiente, Intercepto, y Coeficiente de Determinación.....	64
TABLA 3.23 Prueba de Hipótesis para la pendiente.....	65

TABLA 3.24 Prueba de Hipótesis para el Intercepto	65
TABLA 3.25 Prueba de hipótesis del Coeficiente de correlación.	66
TABLA 3.26 Prueba de Fisher para la determinación de la Linealidad y la Regresión	66
TABLA 3.27 Resultados para la determinación del Límite de Detección Instrumental.....	67
TABLA 3.28 Resultados para la determinación del Limite de Detección del Método.....	68
TABLA 3.29 Limite de Detección y Limite de Cuantificación del Método.	69
TABLA 3.30 Resultados para la determinación la sensibilidad, cinco curvas.	69
TABLA 3.31 Resultados de Sensibilidad y su Intervalo de confianza.....	70
TABLA 3.32 Factores a evaluar y niveles por cada factor.	70
TABLA 3.33 Combinación de Factores para la evaluación de la Robustéz	70
TABLA 3.34 $t_{calculada}$ y t_{Tablas} , para la demostración de la robustéz.....	71
TABLA 3.35 Evaluación de la Selectividad en Agua Residual con Interferente Fe^{3+}	73
TABLA 3.36 Datos para la incertidumbre del volumen inicial de la muestra.....	77
TABLA 3.37 Resultados de incertidumbre estándar y relativa para el Vol. Inicial.	77
TABLA 3.38 S_R vs Promedios de Resultados por Niveles.....	78
TABLA 3.39 Resultados de la Incertidumbre Estándar y Relativa de la Reproducibilidad.....	78
TABLA 3.40 Certificado de Calibración del Baño María a 100°C.	78
TABLA 3.41 Incertidumbre Estándar y Relativa de la Temperatura antes de Lectura.	79
TABLA 3.42 Certificado de Calibración del Autoclave a 105°C.	79
TABLA 3.43 Incertidumbre Estándar y Relativa de la Temperatura de Digestión	79
TABLA 3.44 Datos para la incertidumbre del Factor de Dilución.	80
TABLA 3.45 Incertidumbre Estándar y Relativa de la dilución	80
TABLA 3.46 Datos para calcular La incertidumbre estándar del peso de Muestra.....	81
TABLA 3.47 Datos para calcular la Desviación de la Lectura por la Corrección.....	81

TABLA 3.48 Datos para la incertidumbre del peso del Ácido Glutámico.	82
TABLA 3.49 Incertidumbre Estándar y Relativa del peso del Ácido Glutámico.	82
TABLA 3.50 Incertidumbre Estándar y Relativa de la fiola en que se prepara el patrón.....	83
TABLA 3.51 Incertidumbre Estándar y Relativa de la preparación de Solución Stock..	83
TABLA 3.52 Resultados obtenidos para el cálculo de la incertidumbre debida al uso de una curva de calibración para cuantificar.	84
TABLA 3.53 Incertidumbre Estándar y Relativa debido a la Curva de Calibración.....	84
TABLA 3.54 Resumen de los aportes de incertidumbre de cada fuente	84
TABLA 3.55 Datos para hallar la Concentraciones e Incertidumbre	85

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Validación.- Proceso de definición de las necesidades analíticas y la confirmación de que el método en cuestión ha considerado capacidades consistentes con las que la aplicación requiere.

Límite de detección.- Concentración más pequeña del analito o el valor de propiedad que puede ser confiablemente detectada por el método.

Límite de cuantificación.- Concentración más baja de analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y de veracidad.

Exactitud.- Cercanía de un resultado al valor verdadero.

Veracidad.- Comparación de los resultados promedio de un método con valores conocidos.

Sesgo.- Diferencia entre el valor promedio del método y el valor verdadero.

Precisión.- Dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud.

Repetibilidad.- Condiciones bajo las cuales se obtienen resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, en el mismo laboratorio, por el mismo operador usando el mismo equipo en intervalos de tiempo cortos.

Reproducibilidad.- Condiciones bajo las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, en un material idéntico, en diferentes laboratorios por diferentes operadores usando diferentes equipos.

Selectividad.- Habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés.

Sensibilidad.- Respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo.

Robustez.- Capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método.

Prueba de Youden-Steiner.- Método en el que pueden utilizarse ocho análisis distintos para determinar el efecto de la variación de siete etapas diferentes en un proceso analítico.

Prueba T de Student.- Determina las diferencias entre dos medias muestrales.

Incertidumbre.- Parámetro que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos razonablemente al mensurando.

Distribución normal.- Distribución normal, distribución de Gauss o distribución gaussiana, a una de las distribuciones de probabilidad de variable continua que con más frecuencia aparece en fenómenos reales.

Factor de cobertura k .- Factor que multiplica a la incertidumbre y está íntimamente ligado al número de grados de libertad de la medición y el nivel de confianza con el que se desea reportar el resultado.

Coefficiente de sensibilidad.- Describe, qué tan sensible es el mensurando con respecto a variaciones de la magnitud de entrada.

Grados de libertad.- Es un estimador del número de categorías independientes en una prueba particular o experimento estadístico.

Consistencia de datos.- Se determina utilizando los estadísticos de h y k de Mandel.

Prueba de Cochran.- Prueba estadística utilizada para identificar valores rezagados.

Prueba de Grubbs.- Prueba estadística utilizada para identificar datos anómalos.

Prueba de Anderson-Darling.- Evalúa si los datos generados siguen una distribución normal.

Prueba de Barlett.- Evalúa la Homogeneidad de Varianzas.

Hipótesis nula.- Hipótesis que se presume verdadera hasta que una evidencia estadística en la forma de una prueba empírica de la hipótesis indique lo contrario.

Hipótesis Alterna.- Es cualquier hipótesis que difiera de la hipótesis nula.

INTRODUCCIÓN

El uso del agua por el hombre ha conllevado a la degradación de la misma, hasta el punto de ser inservible, dañina e incluso mortal en algunos lugares. La contaminación del agua consiste en una modificación de la calidad de la misma, haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la agricultura, la pesca, actividades recreativas así como para los animales o la vida natural. Las fuentes primarias de contaminación de las aguas son producidas por desechos, residuos industriales, riego y vertidos de aceite^{1,2}

El fenómeno de la contaminación de las aguas se ha convertido en un problema cada vez más complejo debido al tipo y diversidad de los contaminantes, de modo que los sistemas convencionales de evaluación se fundamentan en indicadores que no reflejan la calidad del agua con la exactitud requerida³.

La contaminación del agua procedente de fuentes difusas, es el resultado de un amplio grupo de actividades humanas, donde los contaminantes no tienen un punto preciso de ingreso en los cursos de agua que los reciben; esta se presenta cuando el agua discurre sobre la superficie del terreno – escorrentía y al percolar por el subsuelo arrastra los contaminantes y los agrega finalmente a aguas superficiales, costeras y subterráneas, por lo que son más difíciles de identificar, medir y controlar⁴.

En los últimos veinte años, científicos, gestores y autoridades públicas, han reconocido que los ecosistemas acuáticos sufren diferentes problemas ambientales, que son consecuencia de una compleja cadena de eventos que varían de un sitio a otro, y que pueden en parte, ser atribuidos al enriquecimiento de los nutrientes nitrógeno y fósforo, la escorrentía de las tierras agrícolas, actividades de engorde de animales, áreas urbanas, vertido de aguas residuales, precipitación atmosférica de compuestos liberados durante la ignición de combustibles fósiles, son actividades que entre otros contaminantes añaden nutrientes al agua. Este tipo de contaminación que altera la calidad del agua por exceso de nitrógeno y fósforo, se conoce como el proceso de eutrofización^{5,6,7}.

Diversos trabajos científicos han documentado la existencia de los problemas ambientales y la pérdida de la calidad del agua por el enriquecimiento de nutrientes, pero en su mayoría refieren a casos particulares de países localizados en regiones tropicales⁸. Las formas de nitrógeno de mayor interés en las aguas naturales y residuales son, por orden decreciente de su estado de oxidación,

nitrato, nitrito, amoníaco y nitrógeno orgánico. Todas estas formas del nitrógeno, lo mismo que el nitrógeno gaseoso (N_2), son interconvertibles bioquímicamente y forman parte del ciclo del nitrógeno⁹.

El nitrógeno en forma de nitrato en el agua, aparte de ser el máximo responsable del proceso de eutrofización, también es el causante de diferentes enfermedades como son la metahemoglobinemia, el cáncer de esófago y estómago. Además produce cianosis sobre todo en niños que consumen con frecuencia aguas contaminadas por este, lo que hace imprescindible un riguroso control de la calidad de las aguas respecto a este analito.

El manejo y control de la calidad de las aguas, constituyen uno de los problemas asociados a la contaminación ambiental que requiere de la utilización de métodos confiables, que sean capaces de dar una respuesta eficaz sobre el estado del agua y su posible uso, permitiendo tomar medidas para preservar su calidad y evitar su deterioro¹⁰.

Los esfuerzos de la Química Analítica medioambiental deben ir encaminados hacia la mejora de los procedimientos ya existentes y al desarrollo de nuevos procedimientos que permitan adecuar los avances metodológicos y químicos a las necesidades del análisis de la calidad del agua¹¹. En la actualidad se encuentran métodos analíticos para determinar nitrógeno total en diferentes tipos de aguas que utilizan equipos sofisticados para la determinación de Nitrógeno Total con una previa digestión. Este trabajo da una alternativa a los laboratorios analíticos acreditados que no cuenten con equipos sofisticados, como un equipo FIAS para la determinación de nitratos. Este método validado es sencillo y se puede llevar a cabo en cualquier laboratorio y se han desarrollado programas de control que aseguren la calidad de los resultados incluso tiene una prueba de **interlaboratorios (Ver Anexo 3)**, donde se obtuvieron resultados satisfactorios para el método validado.

OBJETIVOS

Objetivo General

Validar y estimar la incertidumbre del Método propuesto para la determinación de Nitrógeno total , con la finalidad de asegurar que las mediciones del análisis de rutina sean veraces y precisos, en muestras de aguas

Objetivos Específicos

Evaluar los parámetros de validación que requiere un método de ensayo nuevo (precisión, exactitud, linealidad, robustez, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad), para demostrar que las variaciones realizadas al método normalizado (tiempo y concentración) no afectan a los resultados del ensayo.

Evaluar las diferentes fuentes de incertidumbre del método y hallar la Incertidumbre expandida, para cualquier concentración que se determine.

RESUMEN

El trabajo que se presenta se inicia con la revisión bibliográfica de los métodos actuales para la determinación de nitrógeno total en cuerpos de agua, con la finalidad de implementar un método que no requiera de un sofisticado equipo FIAS y a su vez que utilice la menor cantidad de reactivo posible y en el menor tiempo posible, sin afectar la exactitud y la precisión de los resultados. Las pruebas realizadas se llevaron a cabo en un laboratorio del Callao, en el área de Medio Ambiente, y con analistas encargados de la implementación, que cuentan con experiencia en análisis colorimétricos y el adecuado manejo de equipos de laboratorio y han demostrado competencia técnica ante INDECOPI y en el Interlaboratorio en el cual se participaron con resultados aceptables. El método a validar empieza utilizando una variación del método SMEWW-APHA-AWWA-WEF.4500-N.C 2012. 22nd Ed. en cuanto a la concentración del reactivo de digestión (peroxidisulfato/hidróxido), y tiempo de autoclavado (previas pruebas), en diferentes matrices de agua, el cual convierte todas las formas de nitrógeno presentes en nitratos. Para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-) en estas muestras se usó como referencia el Método EPA#: 352.1 el cual está basado en la reacción de los nitratos con el sulfato de brucina en medio ácido sulfúrico a 100°C , la coloración del complejo resultante fue medido a 410 nm de longitud de onda y se determinó cuantitativamente el nitrógeno de nitrato con una curva de calibración. Se realizaron variaciones en concentración del ácido (de 13N a 10 N) y tiempo de desarrollo de color (de 25 a 15 minutos) y se hizo un análisis de recuperaciones, debido a que el medio para la lectura de nitratos es muy diferente al método original ya que proviene de una digestión peróxido alcalina. Se demostró que los estándares adicionados a las matrices recuperan entre el 90-100% (agua superficial, agua consumo, agua residual y subterránea) demostrando la veracidad del método validado.

Una vez implementado el método a ejecutar, se procedió a evaluar estadísticamente los parámetros de validación sobre la base de: intervalo de trabajo, límite de detección y cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, veracidad, sensibilidad, selectividad, robustez e incertidumbre. Como resultado principal se obtiene un método analítico confiable para la determinación de nitrógeno total en cuerpos de agua superficiales, potable, residuales, subterráneas, los cuales cumple con los controles de calidad necesarios y demostración de los parámetros de validación que se necesita para un método de ensayo nuevo, incluyendo una participación en Ensayos de Aptitud, (**Anexo 3 Interlaboratorio del Método Validado**).

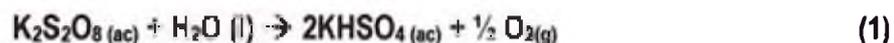
CAPÍTULO PRIMERO

FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL ¹²

Menzel y Corwin reportaron el uso de oxidación con peroxodisulfato para determinar Fósforo total (FT) en agua de mar debido a su mayor simplicidad y la fiabilidad, y sucesivamente Gales et al. propuso el procedimiento de digestión en peroxodisulfato un medio ácido sulfúrico. Koroleff introdujo la oxidación con peroxodisulfato en un medio alcalino como un método mejorado para la determinación de nitrógeno total (NT) en agua, y D'Elia et al. y Nydahl modificó el método. En la actualidad, el método alcalino de oxidación con peroxodisulfato como un medio de medición de NT ha despertado el interés especial, y método de oxidación con peroxodisulfato en medio ácido para el FT está en uso de rutina. Aunque ambos métodos utilizan peroxodisulfato potásico ($K_2S_2O_8$) como reactivo oxidante, han sido utilizados por separado a causa de los diferentes pH.

El $K_2S_2O_8$ se descompone en soluciones acuosas ($60^\circ C$) de acuerdo con la siguiente ecuación:



Y forma H^+ además de oxígeno. 2 mL en H^+ es formado por 1 mol de $K_2S_2O_8$. Si hay 1 mol de Hidróxido de Sodio (NaOH) por 1 mol de $K_2S_2O_8$, la solución oxidante se convierte en ácido después de la oxidación, ya que hay una abundancia de H^+ , aunque fue alcalino en el inicio del procedimiento.¹³ El pH cambia durante el curso de la oxidación y son posibles a temperaturas entre $60-100^\circ C$. El pH cambia conforme la descomposición del $K_2S_2O_8$ empezando con un $pH=12.57$ a un pH final de 2.12. Para tomar ventaja de esta situación, los autores intentaron desarrollar un método que permita la digestión de NT y FT, usando la oxidación con solución alcalina que es el principio y se convierte ácido durante la oxidación. Los resultados han confirmado que dicho método es posible y que da nitratos y ortofosfatos, los cuales fueron medidos simultáneamente usando un método de determinación para cada uno de ellos.

1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL EN CUERPOS DE AGUA

Existen actualmente varios métodos analíticos para la determinación del nitrógeno total en cuerpos de agua, pero los métodos principales para la etapa de digestión son:

- Determinación de nitrógeno por digestión en línea con UV/Persulfato y oxidación con FIA
- **Determinación de nitrógeno por el método del Persulfato.**

Los Métodos para la lectura de Nitratos en aguas mencionamos los siguientes:

- Determinación de Nitratos por Columna de Cadmio
- Determinación de Nitratos por Cromatografía Iónica
- Determinación de Nitratos por Espectrometría UV-Visible
- **Determinación de Nitratos por el Método de Brucina que es el que utilizaremos como referencia para esta validación.**

1.2.1 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR DIGESTIÓN EN LÍNEA CON UV / PERSULFATO Y OXIDACIÓN POR FIA ¹⁴

Los compuestos de nitrógeno son digeridos y oxidados en línea a nitrato usando persulfato con calentamiento en medio alcalino y radiación ultravioleta. La muestra digerida es inyectada en un colector donde el nitrato es reducido a nitrito por columna de cadmio granulado como se observa en la **Figura 1.2**. El nitrito es determinado por diazotización con sulfanilamida bajo condiciones ácidas para formar el ion diazonio. El ión diazonio es acoplado con N-(1-naftil) etilendiamina dihidrocloro. El resultado es un tinte rosa que absorbe a 540 nm y es proporcional al nitrógeno total. El método recupera casi todas las formas de nitrógeno orgánico e inorgánico, reducido y oxidado, incluido el amonio, nitrato y nitrito. A diferencia del método de Nitrógeno Total Kjendahl estos no recuperan las formas oxidadas de nitrógeno. Este método recupera compuestos de nitrógeno de origen biológico tales como aminoácidos, proteínas y péptidos como amonio, pero no se puede recuperar los compuestos de nitrógeno de algunas aguas industriales tales como aminas, compuestos nitro, hidrazonas, oximas, semicarbazonas y algunas aminas terciarias.

Compound	Mean Recovery %	
	10 mg N/L	4 mg N/L
Ammonium chloride	98.1	99.7
Sodium nitrite	100.5	101.8
Glycine	101.0	100.8
Glutamic acid	99.7	99.2
Ammonium <i>p</i> -toluenesulfonate	99.6	97.4
Glycine <i>p</i> -toluenesulfonate	101.4	102.3
Nicotinic acid	98.6	102.0
Urea	94.9	98.0
EDTA	89.4	89.4

Tabla 1.1 Recuperaciones de N_T por digestión Persulfato/UV y por FIA

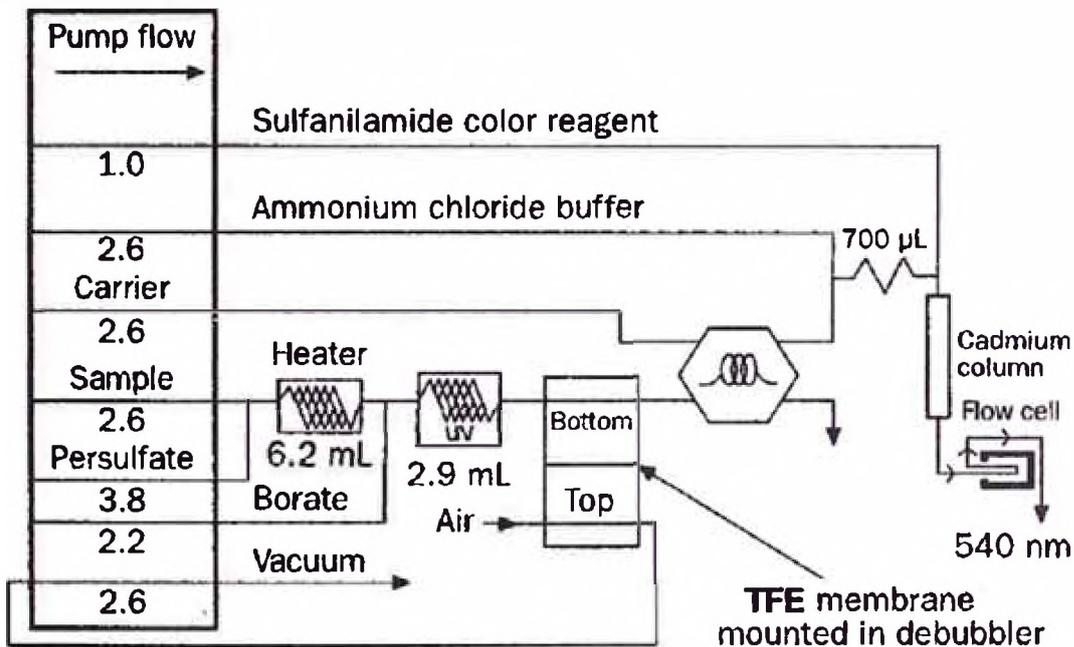


Figura 1.1 Diagrama de nitrógeno total por el método automático FIA

La **Tabla 1.1** muestra las recuperaciones promedio para algunos compuestos nitrogenados, como el cloruro de amonio, EDTA, Acido Glutámico, obtenidos por el método de digestión con Persulfato/UV y el nitrato leído por FIA con columna de cadmio.

1.2.2 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR DIGESTIÓN CON PERSULFATO ¹⁵

El método del persulfato determina el nitrógeno total por oxidación de todos los compuestos de nitrógeno a nitrato. Si el amonio, nitrato y nitrito son determinados individualmente, el nitrógeno orgánico puede ser obtenido por diferencia.

El principio del método radica en la oxidación alcalina a 100-110°C convierte el nitrógeno orgánico e inorgánico a nitrato. El nitrógeno total es determinado por análisis de nitrato en el digestado. Se puede seleccionar el método de medida de nitrógeno, las cuales son dos que se presentan: El Automático o por reducción de cadmio manual puede ser usado para determinar niveles de nitrógeno total debajo de 2.9 ppm N. Algunos resultados de recuperaciones con tal digestión y usando reducción de cadmio automatizado se presentan en la **Tabla 1.2**.

Compound	Expected value (mg N l ⁻¹)	Observed value (mg N l ⁻¹)	Coefficient of variation (%)	Alkaline oxidation* Recovery (%)
Ammonium chloride	2.00 (5)	1.96	0.84	98.2
Potassium nitrate	2.00 (5)	2.00	0.41	100.0
Sodium nitrite	2.00 (5)	1.97	0.53	97.5
Urea	2.00 (5)	1.97	0.53	96.3
Glycine	2.00 (5)	1.94	0.79	97.9
EDTA disodium salt	5.00 (5)	5.01	0.40	96.0
Guanidinium carbonate	2.00 (5)	1.65	0.57	67.6
	5.00 (5)	3.68	1.80	53.3
Aminoantipyrine	2.00 (4)	0.925	2.51	42.5
Creatinine	2.00 (5)	1.78	0.00	76.9
Caffeine	2.00 (5)	1.80	0.93	86.8

Tabla 1.2 Recuperaciones de N_T por digestión Persulfato y Columna de Cadmio

1.2.3 DETERMINACIÓN DE NITRATOS POR MÉTODO COLORIMÉTRICO (BRUCINA) ¹⁶

Este método es aplicable para el análisis de aguas de bebida, superficiales, residuales (domesticas e industriales), y salinas. El rango de aplicación es de 0.1 a 5 ppm N-NO₃.

Este método está basado en la reacción del ion nitrato con el sulfato de brucina en una solución de H₂SO₄ 13N a una temperatura de 100°C. El color del complejo resultante, es medido a 410 nm. El control de la temperatura durante el desarrollo del color es extremadamente crítico.

¹⁷ La reacción del nitrato con brucina en medio sulfúrico, aparece un color rojo inestable por oxidación de aquella a su forma quinónica. Pasará al color naranja y finalmente a color amarillo lentamente. La reacción se presenta en la siguiente **Figura 1.2**:

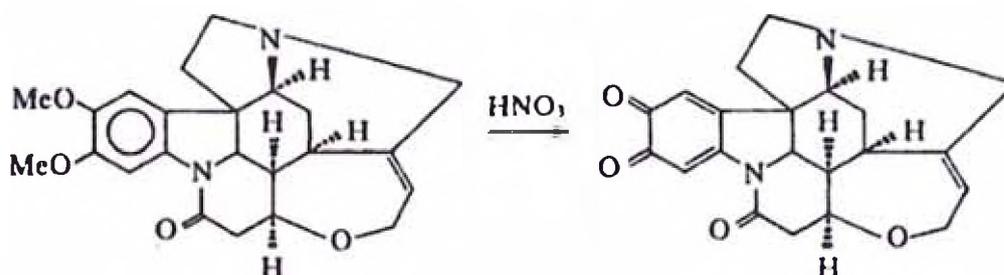


Figura 1.2 Reacción del Nitrato con la Brucina para determinación colorimétrica

1.3 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

La validación de un método analítico se define como el proceso mediante el cual se define requisitos analíticos que aseguran que el método de ensayo bajo ciertas consideraciones ha desarrollado capacidades consistentes con la aplicación definida¹⁸. La validación del Método de Ensayo establece, mediante estudios sistemáticos de Laboratorio, que las características técnicas, de dicho método cumplen con las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos. Un laboratorio acreditado debe validar cumpliendo el requisito 5.4.5.2 de la Norma NTP ISO/IEC 17025. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método.

La Comisión de Reglamentos Técnicos (CRT) ha estimado conveniente que dependiendo de la naturaleza del método a validar, los estudios de validación deben contener la determinación de los siguientes parámetros:

- Precisión
- Veracidad
- Linealidad
- LD y LC
- Sensibilidad
- Robustez
- Intervalo / Rango de trabajo
- Selectividad
- Incertidumbre

1.3.1 Exactitud

La "exactitud" expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados mediante el establecimiento de efectos sistemáticos y aleatorios en los resultados. Normalmente la exactitud se estudia como dos componentes: la "**veracidad**" y la "**precisión**". La veracidad es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados del valor real. La veracidad normalmente se expresa en términos de sesgo. La "precisión" es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante mediciones tal como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados.

1.3.1.1 Veracidad

La asignación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de los resultados promedio de un método con valores conocidos, esto es, la veracidad se asigna contra el valor de un Material de Referencia Certificado (MRC). Los valores de referencia son idealmente trazables a los estándares internacionales.

La validación requiere la adecuación a un propósito por lo tanto, la selección de un material de referencia está basada en el propósito de la validación. Para un trabajo de validación es relevante el empleo de un material de referencia certificado e idealmente con una matriz similar. Para métodos que se utilizarán por largos periodos de tiempo, deberá utilizarse un material interno de referencia que sea estable. Similarmente la veracidad también se puede demostrar haciendo participar el método a validar a un interlaboratorio.

Para evaluar la veracidad del método tres analistas diferentes analizan un MRC de Nitrógeno Total, en dos niveles diferentes. La prueba de t de Student se utiliza para comparar la media de los valores medidos con un valor de referencia fijo para tamaño de muestras menores a 30, en condiciones de repetibilidad.

Hipótesis

Ho: La media estimada de los valores medidos es igual al valor de referencia.

Ha: La media estimada de los valores medidos es diferente al valor de referencia

Prueba Estadística

$$t_{obs} = \frac{y - \mu_o}{s / \sqrt{n}} \quad (2)$$

Donde:

- y: Media de las medidas obtenidas
- μ_o : Valor del Material de Referencia
- s: Desviación Estándar de los promedios
- n: Números de datos por analista

Criterio de Aceptación

$$t_{obs.} < t_{Tablas} \quad (3)$$

Donde: t Tablas (también llamado t crítico para n datos, n-1 grados de libertad, $\alpha=0.05$, 2 colas)

Y se acepta la hipótesis nula. Concluyéndose que hay trazabilidad de los resultados con respecto al material de referencia.

1.3.1.2 Precisión¹⁹

Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. Ellas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se desarrolla por un solo analista, con equipo en un periodo corto de tiempo, por ejemplo es la clase de variabilidad que se espera entre resultados si las muestras se analizan por duplicado.

La precisión se establece por lo general en términos de la desviación estándar o desviación estándar relativa y dependen de la concentración del analito y deben determinarse a un número de concentraciones y, de ser relevante, establecer la relación entre la precisión y la concentración del analito. La desviación estándar relativa será más útil en este caso puesto que la concentración ha sido evaluada en diferentes concentraciones, lo que significa que debe ser constante sobre el intervalo de interés proporcionado.

1.3.1.3 Repetibilidad

Condiciones bajo las cuales se obtienen resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, en el mismo laboratorio, por el mismo operador usando el mismo equipo en intervalos de tiempo cortos.

La desviación estándar de la repetibilidad (s_r), es útil para calcular la repetibilidad "r", el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre el análisis de la muestra determinados bajo condiciones de repetibilidad.

1.3.1.4 Reproducibilidad.

Condiciones bajo las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, en un material idéntico, en diferentes laboratorios por diferentes operadores usando diferentes equipos.

La desviación estándar de la reproducibilidad S_R , es útil para calcular la reproducibilidad "R", el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre el análisis de duplicados de la muestra determinados bajo condiciones de reproducibilidad.

El límite de reproducibilidad es el menor valor que o igual a, al cual la diferencia absoluta entre dos resultados de pruebas individuales obtenidas bajo condiciones de reproducibilidad.

1.3.1.5 Técnicas para hallar los parámetros de Precisión R y r

Para evaluar la precisión del método, tres analistas estudian diferentes matrices en diferentes niveles, si la matriz no presentase el analito, se adiciona un estándar en la cantidad deseada. Luego para la cantidad de datos obtenidos por cada analista se calcula el promedio, desviación estándar, varianza, el promedio total, desviación estándar de los promedios, y la suma de varianzas, con la finalidad de determinar los valores atípicos (técnicas gráficas y numéricas), normalidad y homogeneidad. Una vez eliminado los valores atípicos, se procede a calcular el S_r (desviación estándar de repetibilidad) y S_R (desviación estándar de reproducibilidad), para después calcular los demás parámetros de precisión.

El S_r se calcula de la siguiente manera:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (n_i - 1) S_i^2}{\sum_{i=1}^p (n_i - 1)}} \quad (4)$$

Donde:

p_i : Cantidad de analistas

S_i : Desviación estándar de los datos del analista i

n_i : Cantidad de datos del analista i

De la Ecuación (4) se obtiene el parámetro de precisión.

a. Estándar de la Repetibilidad S_r .

El S^2_d se calcula de la siguiente manera:

$$S^2_d = (1/t) \sum_{i=1}^{tmn} (X_m - X_i)^2 \cdot p_i \quad (5)$$

Donde:

t : Son los grados de libertad entre los grupos ($n-1$), n es el número de analistas

X_m : Es la media de los resultados obtenidos entre los n analistas

X_i : Es la media de los resultados obtenidos por cada analista i

p_i : Es la cantidad de datos realizados por cada analista i

El siguiente paso es calcular el s^2_L con la finalidad de calcular el S_R para ello se utiliza la siguiente ecuación:

$$S^2_L = \frac{S^2_d - S^2_r}{p} \quad (6)$$

p : Es la cantidad de datos realizados por analista

Con estos dos datos se calcula el S_R , mediante la siguiente ecuación:

$$S_R = \sqrt{S^2_L + S^2_r} \quad (7)$$

De esta forma se calcula la **Desviación Estándar de la Reproducibilidad**.

b. Cálculo de la RSD_r y la RSD_R

El cálculo se realiza dividiendo las desviaciones estándar encontradas (en las Ecuaciones (4) y (7)) entre el promedio de los promedios de los resultados obtenidos, multiplicado por 100.

c. Cálculo de la r y R

Finalmente el cálculo del r y R se obtiene multiplicando las desviaciones estándar de las Ecuaciones (4) y (7) por una constante cuyo valor es 2.8.

d. Cálculo del $LRSD_r$ y $LRSD_R$

Se obtienen multiplicando el RSD_r y RSD_R por el factor 2.8, análogamente al r y R .

1.3.2 Linealidad

Es la relación entre la concentración del analito y la respuesta del método. Esta relación, denominada comúnmente curva patrón o curva de calibración, no tiene por qué ser lineal para que el método sea eficaz. Cuando no sea posible la linealidad para un método, se deberá encontrar un algoritmo adecuado. También se define la linealidad como la capacidad de un método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración de analito²⁰.

La linealidad se expresa usualmente en términos de varianza alrededor de la pendiente de la recta de regresión, ajustada por mínimos cuadrados. La recta presenta regresión, linealidad y debe de converger por el origen, estos atributos deben de ser evaluados estadísticamente. El análisis de varianza constituya el mejor evaluador de la regresión y la linealidad. Además debe realizarse una prueba para demostrar la convergencia al origen.

Para determinar la linealidad se analizarán cinco curvas de calibración con seis puntos incluyendo el cero, cada punto es leído cinco veces, obteniéndose así $n = 30$ datos. Con los datos establecidos se calculan los parámetros S_x^2 , S_y^2 y S_{xy}

$$S_x^2 = \sum(X^2) - ((\sum X)^2/n) \quad (8)$$

$$S_y^2 = \sum(Y^2) - ((\sum Y)^2/n) \quad (9)$$

$$S_{xy} = \sum XY - ((\sum X * \sum Y)/n) \quad (10)$$

Cada uno de las ecuaciones (8), (9) y (10) ayudan a determinar, la pendiente, intercepto, coeficiente de correlación múltiple(r) y coeficiente de determinación (R^2). No es objetivo dar a conocer las

ecuaciones involucradas, pero si, interpretar los resultados que muestra una regresión como se muestra en el Capítulo 3. Para revisar las ecuaciones debe revisarse bibliografía. En la Tabla 1.3 se muestra los estadísticos para determinar los criterios de aceptación para la pendiente, el intercepto y del coeficiente de determinación.

Pruebas de Hipotesis para la Regresión Lineal			
Terminos	Pendiente	Intercepto	Coficiente de Correlacion Multiple
Hipotesis nula	$b = 0$	$a = 0$	$r = 0$
Hipotesis Alterna	$b \neq 0$	$a \neq 0$	$r \neq 0$
Desviacion Estandar	$S_b = \sqrt{\frac{S_{yy}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}}}$	$S_a = \sqrt{S_b^2 \cdot \frac{\sum X^2}{N}}$	$S_r = \sqrt{\frac{1-r^2}{N-2}}$
t calculado	$t_b = \frac{b}{S_b}$	$t_a = \frac{a}{S_a}$	$t_r = \frac{r}{S_r}$
Se acepta la Hipotesis Nula	$t_b > t_{Tablas}$	$t_a < t_{Tablas}$	$t_r > t_{Tablas}$
Condiciones	$\alpha = 0.05$ y $GL(N-2)$	$\alpha = 0.05$ y $GL(N-2)$	$\alpha = 0.05$ y $GL(N-2)$
Intervalo de Confianza	$IC(\beta) = b \pm t * S_b$	$IC(\alpha) = a \pm t * S_a$	
Conclusiones	La pendiente es significativamente diferente de cero	El intercepto es significativamente igual a cero	Existe un grado de asociacion entre la concentracion y la respuesta que es diferente de cero

Tabla 1.3 Pruebas de Hipótesis para la Regresión Lineal

También se realiza una hipótesis para demostrar regresión y desviación de la linealidad. La variación entre concentraciones corresponde a la varianza de la regresión y la variación dentro de las concentraciones corresponde a la varianza debida a la desviación lineal. Si en el análisis de varianza para la regresión lineal, el valor de F calculado para el desvío de la linealidad es menor que el valor de F de tablas en las condiciones establecidas, se demuestra que no hubo desviación significativa de la linealidad y si el valor de F Calculado es mayor que el F de Tablas, en condiciones preestablecidas, se demuestra que la regresión es significativa.

Prueba de F para la Linealidad y la Regresion		
Terminos	Linealidad	Regresion
Criterio		$F_{cal} > F_{Tablas}$
Criterio	$F_{cal} < F_{Tablas}$	
Conclusiones	<i>La falta de ajuste es no significativa por lo tanto presenta linealidad</i>	<i>Existe una gran regresión significativa entre X é Y</i>

Tabla 1.4 Pruebas de Hipótesis para la Regresión y Linealidad

1.3.3 Límite de Detección (LDM).

El límite de detección de un procedimiento analítico es la menor cantidad de analito en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es el contenido más bajo que se puede medir con certeza estadísticamente razonable. También se puede decir que es la concentración más baja del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificable. Para estimar el LDM, se determinara primero el **Límite de Detección Instrumental**, el cual se define como la concentración que produce una señal más grande que tres veces la desviación estándar del nivel medio de ruido, obtenido con blancos de calibración²¹. La relación entre estos niveles es el siguiente: LDI: LDM = 1:4²².

Para la determinación del LDM se aplicará el procedimiento²³:

Se analiza 10 veces el blanco de calibración, el cual produce un nivel de ruido (a partir de un solo blanco), en tres fechas diferentes. El límite de detección instrumental es tres veces la desviación estándar de la concentración de los diez blancos obtenidos.

Finalmente se calcula el promedio de los tres LDI, para dar el limite de detección instrumental final.

Para la determinación del limite de detección se prepara una solución no más grande que cinco veces el valor del limite de detección instrumental (LDI: LDM: LCM= 1:4:10), y se analiza siete vece en tres días diferentes.

$$LDM = s \times t_{0.95(n-1)} \quad (11)$$

Donde:

LDM: Limite de Detección del Método

s: Desviación estándar de los siete resultados del estándar preparado

$t_{x(n-1)}$: Distribución t de student para n-1 grados de libertad, con una confianza del $x = 0.95$

n= número de réplicas.

Consideraciones:

El valor de la concentración de las réplicas debe de encontrarse en el rango de uno y cinco veces el límite de detección. De no ser así se rechaza la estimación y se realiza nuevos análisis.

Las Recuperaciones del estándar preparado deben de estar entre el 50 – 150%

El %RSD debe de ser menor al 20%.

1.3.4 Limite de Cuantificación (LCM)

El límite de cuantificación es la concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión (repetibilidad) bajo condiciones indicadas en la prueba. Se establece examinando una muestra o un material de referencia apropiado. Es el contenido igual o mayor que el punto de más baja concentración en la curva de calibración. Los límites de cuantificación son las características de funcionamiento que definen la capacidad de un proceso de medición química para cuantificar adecuadamente un analito.

Para el cálculo del límite de cuantificación se aplicará la siguiente relación mencionada en el apartado 1.3.1., la cual es una función proporcional del valor obtenido de límite de detección.

$$LCM = K \times LDM \tag{12}$$

LCM: Limite de Cuantificación del Método

K: Factor multiplicativo comprendido. El valor para esta técnica analítica es de 2.5, ya que la relación de LDM: LCM = 4:10

LDM: Limite de Detección del Método.

1.3.5 Sensibilidad.

La sensibilidad es el gradiente de la curva de respuesta, o lo que es lo mismo, el cambio en la señal correspondiente a un cambio de concentración de analito. Para el intervalo de trabajo de un método, la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración, y es un parámetro objeto de seguimiento cuando se efectúan calibraciones rutinarias. La sensibilidad en resumen vendría a ser en métodos instrumentales que usan una curva de calibración, la pendiente de la curva.

Para la evaluación de la sensibilidad se repite cinco veces la curva de calibración en días diferentes, para determinar el intervalo de confianza en el que debe estar la pendiente, cuando se trabaja en las mismas condiciones de la validación. Se calcula el promedio y la desviación estándar de la pendiente de las curvas de calibración y se calcula el intervalo de confianza con la siguiente ecuación:

$$IC = X \pm \frac{t^* s}{\sqrt{n}} \quad (13)$$

Donde:

IC: Es el Intervalo de Confianza para la Pendiente

X: Es la media de la pendiente

s: Desviación estándar de las pendientes encontradas en los cinco días

n: Cantidad de curvas de calibración consideradas

t: t de student para n-1 grados de Libertad y de dos colas con un 95% de confianza

1.3.6 Robustez

La Robustez es la medida de la resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones en el procedimiento. La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de no ser afectado por pequeñas variaciones en parámetros del método, y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su normal uso.

Al evaluar la robustez de un método, se trata de identificar las variables que tienen un efecto más crítico sobre su exactitud, precisión y selectividad. De modo que estas serán las variables que más tendrán que ser controladas durante la aplicación rutinaria del método. Al planificar el estudio de la robustez hay que tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Elegir factores cuya influencia se desea evaluar.
- Elegir valores de dichos factores. Generalmente se estudian dos valores situados alrededor del valor nominal. Por ejemplo si el valor nominal de la concentración de un reactivo es 0.2M es lógico estudiar la influencia de las concentraciones a 0.17 M y 0.23 M.
- Elegir la respuesta cuya variación se requiere controlar. Por ejemplo: la exactitud del resultado, precisión, la resolución de una separación cromatografía. Planificar y hacer el análisis.
- Evaluar los efectos de los distintos factores. Una vez realizados los análisis y obtenidas las respuestas, es necesario tratar estadísticamente los datos obtenidos con el objeto de ver qué factores son los que producen efectos significativos sobre la respuesta.

Para realizar esta prueba se denotan a los valores iniciales de los factores con letras mayúsculas de la A a la G, y las variaciones con letras minúsculas correspondientes. A continuación se establece la siguiente **Tabla 1.5** con los factores a evaluar.

Factor/Ensayo	Repeticiones							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

TABLA 1.5 Prueba de Youden-Steiner para analizar los efectos de factores que influyen en el resultado del método.

A partir de los resultados de cada variable se debe calcular el promedio de los análisis que contiene la variable en un valor más alto y el promedio que corresponde al valor más bajo.

$$\begin{array}{rclcl}
 \frac{s + t + u + v}{4} & = & \frac{4A}{4} & = & A \\
 \frac{w + x + y + z}{4} & = & \frac{4a}{4} & = & a \\
 \cdot & & \cdot & & \\
 \cdot & & \cdot & & \\
 \cdot & & \cdot & & \\
 \frac{s + v + x + y}{4} & = & \frac{4G}{4} & = & G \\
 \frac{t + u + w + z}{4} & = & \frac{4g}{4} & = & g
 \end{array}
 \left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \right\} \begin{array}{l} D_1 \\ \\ \\ D_7 \end{array}$$

TABLA 1.6 Evaluación para la Robustez de siete factores

Luego se deberá evaluar la significancia a través de una prueba T de Student:

$$t_{cal} = \frac{\sqrt{n} \times |D|}{S \times \sqrt{2}} \quad (14)$$

Donde:

t_{cal} : Es el t calculado para la prueba de Youner Steiner

n: Es la cantidad de repeticiones, para Youner Steiner es cuatro

D: Diferencia entre los dos resultados (Mayúscula y Minúscula)

S: Desviación Estándar de Reproducibilidad del Método para el nivel de concentración en el que se analiza la robustez.

Si $t_{cal} < t_{tablas}$, para el 95% de probabilidad y n-1 grados de libertad. El método es Robusto.

Luego de evidenciar la diferencia de los resultados (efecto de cada variable). Cuanto mayor sea la diferencia (diferencias significativas) mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico. Estas variables recibirán especial atención, a la hora de redactar el método, remarcando la necesidad de un estricto control para conseguir resultados de calidad.

1.3.7 Intervalo / Rango de Trabajo del Método

Es el intervalo entre la más alta y la más baja concentración del analista en la muestra, para la cual se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel apropiado de precisión, exactitud y linealidad.

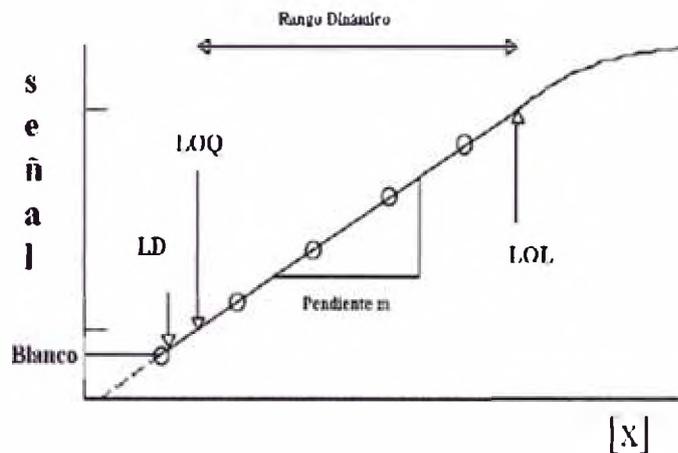


Figura 1.3 Intervalo de Trabajo de un Método Analítico

En el extremo inferior del rango de concentraciones, los factores limitantes son los valores límite de cuantificación (LOQ). En el extremo superior del rango de concentraciones, las limitaciones aparecen por varios efectos que dependen de la respuesta del instrumento.

Para la evaluación del intervalo de trabajo se realiza las mismas pruebas estadísticas para determinar la linealidad (1.3.2). Se aumentaran puntos sucesivos y cuando ya no cumpla las pruebas estadísticas de linealidad, regresión, pendiente, correlación e intercepto, se concluirá que hasta el punto anterior es nuestro Rango de Trabajo, Limite de Observación Lineal (LOL).

1.3.8 Selectividad (Especificidad)

La habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de la prueba. Por lo general, los resultados de un experimento, casi no coinciden con los valores predichos por la teoría, es posible que las interferencias puedan aumentar o disminuir la señal. La prueba consiste en verificar que las interferencias no afectan significativamente la señal.

Para la evaluación de la selectividad, se analizan estándares en dos niveles como mínimo en presencia del o los interferentes más potenciales y comunes en las muestras en tres niveles como

mínimo y luego se utiliza el estadístico de la t de student, para verificar si afecta la presencia del interferente en el resultado.

Hipótesis

Ho: El interferente no afecta el resultado

Ha: El interferente afecta el resultado

Prueba Estadística

$$t_{\text{calculado}} = \frac{Y - Y_0}{s/\sqrt{n}} \quad (15)$$

Donde:

Y: Es la media de los resultados para las muestras con el interferente

Yo: Es la media de los resultados obtenidos para la muestra sin interferente

s: Desviación estándar de los resultados de las muestras con interferente

n: Cantidad de veces que se analizó la muestra con interferente.

Criterio de Aceptación

$$t_{\text{Calculado}} < t_{\text{Tablas}} \quad (16)$$

t tablas, es el t de Student, para un nivel del 95% de confianza y de dos colas con n-1 grados de libertad. Si se cumple la relación (15) y se acepta la hipótesis nula, concluyéndose así que el Método en cuestión es selectivo.

1.3.9 INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

1.3.9.1 El Mensurando

El propósito de una medición es determinar el valor de una magnitud, llamada el Mensurando. Es el atributo sujeto a medición de un fenómeno, cuerpo o sustancia que puede ser distinguido cualitativamente y determinado cuantitativamente.

La imperfección natural de la realización de las mediciones, hace imposible conocer con certeza absoluta el valor verdadero de una magnitud: Toda medición lleva implícita una incertidumbre, que es

un parámetro que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos razonablemente al mensurando.

Una definición completa del mensurando incluye especificaciones sobre las magnitudes de entrada relevantes. El resultado de una medición incluye la mejor estimación del valor del mensurando y una estimación de la incertidumbre sobre ese valor.

1.3.9.2 Modelo Físico

Pretender estudiar el proceso de medición de manera exacta y completa está usualmente fuera de las actividades rutinarias, más aún es necesaria la simplificación del fenómeno o de la situación real conservando las características más relevantes para el propósito pretendido, mediante la construcción de un modelo para la medición.

Un modelo físico de la medición consiste en el conjunto de suposiciones sobre el propio Mensurando y las variables físicas o químicas relevantes para la medición.

1.3.9.3 Modelo matemático

El modelo físico se representa por un modelo descrito con lenguaje matemático. El modelo matemático supone aproximaciones originadas por la representación imperfecta o limitada de las relaciones entre las variables involucradas.

Considerando a la medición como un proceso, se identifican magnitudes de entrada denotadas por el conjunto $\{X_i\}$ expresión en la cual el índice i toma valores entre 1 y el número de magnitudes de entrada N .

La relación entre las magnitudes de entrada y el mensurando Y como la magnitud de salida se representa como una función.

$$Y = f(X_i) = f(X_1, X_2, \dots, X_N) \quad (17)$$

Representada por una tabla de valores correspondientes, una gráfica o una ecuación, en cuyo caso y para los fines de este documento se hará referencia a una relación funcional.

En este trabajo se denota con x_i al mejor estimado de las magnitudes de entrada X_i . Los valores de las magnitudes de entrada pueden ser resultados de mediciones recientes realizadas por el usuario o tomados de fuentes como certificados, literatura, manuales, etc.

El mejor estimado del valor del mensurando es el resultado de calcular el valor de la función f evaluada en el mejor estimado de cada magnitud de entrada:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_N) \quad (18)$$

En algunas ocasiones se toma el mejor estimado de Y como el promedio de varios valores y_j del mensurando obtenidos a partir de diversos conjuntos de valores $\{X_{ij}\}$ de las magnitudes de entrada

1.3.9.4 Identificación de las fuentes de incertidumbre

Una vez determinados el mensurando, el principio, el método y el procedimiento de medición, se identifican las posibles fuentes de incertidumbre, para ello nos guiaremos de la **Figura 1.4**

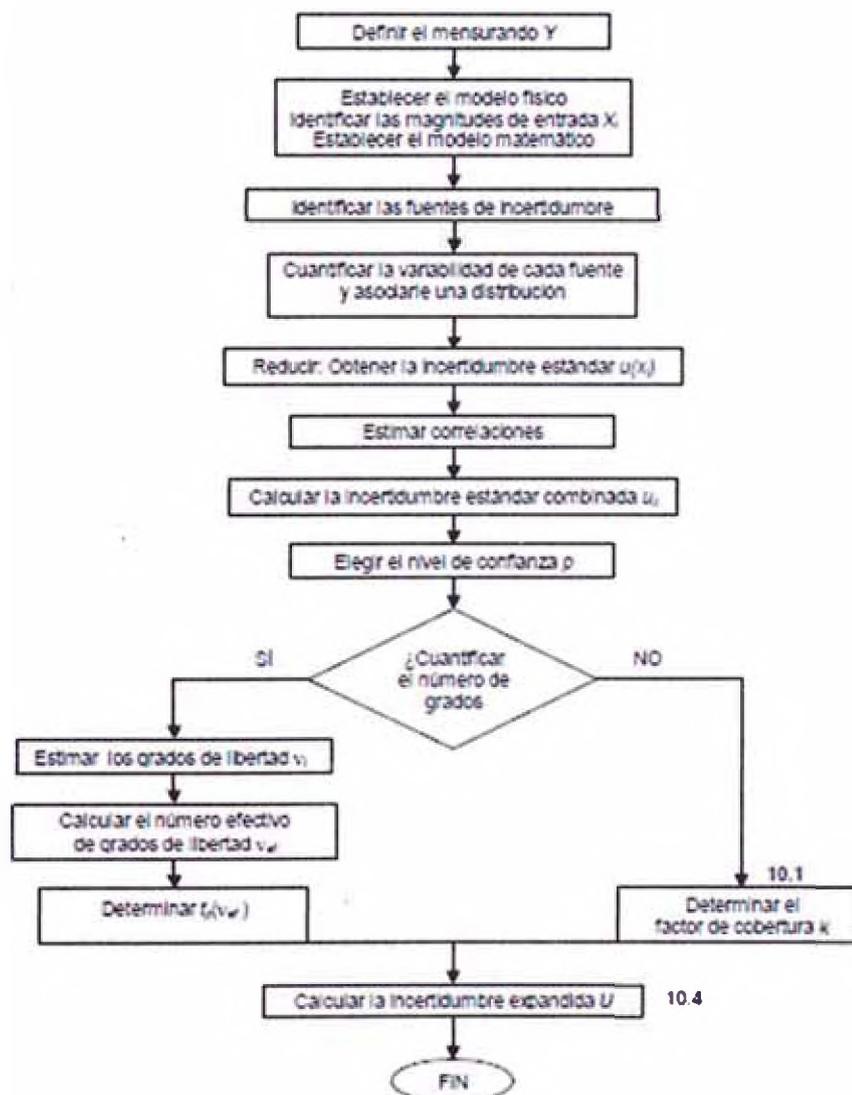


Figura 1.4 Diagrama para la estimación de incertidumbres de la medición

Los factores que influyen en la incertidumbre son:

- Los resultados de la calibración del instrumento.
- La incertidumbre del patrón o del material de referencia.
- La repetibilidad de las lecturas.
- La reproducibilidad de las mediciones por cambio de observadores, instrumentos u otros elementos.
- Características del propio instrumento, como resolución, histéresis, deriva.
- Variaciones de las condiciones ambientales.
- La definición del propio mensurando.
- El modelo particular de la medición.

1.3.9.5 Cuantificación

Se distinguen dos métodos principales para cuantificar las fuentes de incertidumbre: El Método de Evaluación Tipo A está basado en un análisis estadístico de una serie de mediciones, mientras el Método de Evaluación Tipo B comprende todas las demás maneras de estimar la incertidumbre.

a) Evaluación tipo A:

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

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

$$x_i = \bar{q} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n q_j \quad (19)$$

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

$$s(q) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (q_j - \bar{q})^2} \quad (20)$$

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

$$u(x_i) = s(\bar{q}) = \frac{s(\bar{q})}{\sqrt{n}} \quad (21)$$

Así que resulta para la incertidumbre estándar de X_i :

$$u(x_i) = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2} \quad (22)$$

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

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

$$u(x_i) = \frac{s_p}{\sqrt{n}} \quad (23)$$

b) Evaluación tipo B

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

- Certificados de calibración.
- Manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento.
- Normas o literatura.
- Valores de mediciones anteriores.
- Conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición.

b.1 Distribuciones de probabilidad

La cuantificación de una fuente de incertidumbre incluye la asignación de un valor y la determinación de la distribución a la cual se refiere este valor. Las distribuciones que aparecen más frecuentemente son:

Distribución normal: Los resultados de una medición repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen en buena aproximación una distribución normal. También la incertidumbre indicada en certificados de calibración se refiere generalmente a una distribución normal.

Distribución rectangular: En una distribución rectangular cada valor en un intervalo dado tiene la misma probabilidad, o sea la función de densidad de probabilidad es constante en este intervalo. Ejemplos típicos son la resolución de un instrumento digital o la información técnica sobre tolerancias de un instrumento. En general, cuando exclusivamente hay conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada, lo más conservador es suponer una distribución rectangular.

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

b.2 Reducción

Antes de comparar y combinar contribuciones de la incertidumbre que tienen distribuciones diferentes, es necesario representar los valores de las incertidumbres originales como **incertidumbres estándar**. Para ello se determina la desviación estándar de la distribución asignada a cada fuente.

Distribución normal: La desviación estándar experimental de la media calculada a partir de los resultados de una medición repetida según la **Ecuación (22)** ya que representa la incertidumbre estándar. Cuando se dispone de valores de una incertidumbre expandida U , como los presentados por ejemplo en certificados de calibración, se divide U entre el factor de cobertura k , obtenido ya sea directamente o a partir de un nivel de confianza dado

$$u(x_i) = \frac{U}{k} \quad (24)$$

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

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2} \quad (25)$$

y la incertidumbre estándar se calcula por:

$$u(x_i) = \frac{a_+ - a_-}{\sqrt{12}} \quad (26)$$

O por

$$u(x_i) = \frac{a/2}{\sqrt{3}} \quad (27)$$

Donde $a/2$ es el semi-ancho del intervalo a con

$$a = a_+ - a_-$$

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

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2} \quad (28)$$

La incertidumbre estándar se calcula en este caso por:

$$u(x_i) = \frac{a_+ - a_-}{\sqrt{24}} = \frac{a/2}{\sqrt{6}} \quad (29)$$

b.3 Combinación

El resultado de la combinación de las contribuciones de todas las fuentes es la incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$, la cual contiene toda la información esencial sobre la incertidumbre del mensurando Y . La contribución $u_i(y)$ de cada fuente a la incertidumbre combinada depende de la incertidumbre estándar $u(x_i)$ de la propia fuente y del impacto de la fuente sobre el mensurando. Es posible encontrar que una pequeña variación de alguna de las magnitudes de influencia tenga un impacto importante en el mensurando, y viceversa.

Se determina $u_i(y)$ por el producto de $u(x_i)$ y su coeficiente de sensibilidad c_i (o factor de sensibilidad):

$$u_i(y) = c_i \cdot u(x_i) \quad (30)$$

1.3.9.6 Coeficiente de sensibilidad

El coeficiente de sensibilidad describe, qué tan sensible es el mensurando con respecto a variaciones de la magnitud de entrada correspondiente. Para su determinación existen dos métodos:

- a) Determinación a partir de una relación funcional.- Si el modelo matemático para el mensurando $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N)$ describe la influencia de la magnitud de entrada X_i suficientemente bien mediante una relación funcional, el coeficiente de sensibilidad c_i se calcula por la derivada parcial de f con respecto a X_i :

$$c_i = \left. \frac{\partial f(X_1, \dots, X_N)}{\partial X_i} \right|_{X_1=x_1, \dots, X_N=x_N} \quad (31)$$

- b) Otros métodos de determinación.- Si la influencia de la magnitud de entrada X_i en el mensurando Y no está representada por una relación funcional, se determina el coeficiente de sensibilidad c_i por una estimación del impacto de una variación de X_i en Y según:

$$c_i = \frac{\Delta Y}{\Delta X_i} \quad (32)$$

Esto es, manteniendo constantes las demás magnitudes de entrada, se determina el cambio de Y producido por un cambio en X_i por una medición o a partir de la información disponible (como una gráfica o una tabla).

1.3.9.7 Cálculo con incertidumbres relativas

Si el modelo matemático se compone de productos de las magnitudes de entrada X_i :

$$f(X_1, \dots, X_N) = \text{const} \cdot \prod_{i=1}^N (X_i)^{p_i} \quad (33)$$

Donde **const** es una constante y los exponentes **pi** son constantes reales (positivas o negativas), el cálculo (numérico) de la incertidumbre combinada se facilita utilizando incertidumbres relativas. Los coeficientes de sensibilidad en este caso son **pi**, y la ley de propagación de incertidumbre **Ecuación (27)**, para calcular la incertidumbre combinada relativa **u_{c,rel}(y)** se simplifica:

$$u_{c,rel}(y) = \frac{u_c(y)}{y} = \sqrt{\sum_{i=1}^N [p_i \cdot u_{rel}(x_i)]^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[p_i \cdot \frac{u(x_i)}{x_i} \right]^2} \quad (34)$$

Un caso particular muy común es que todos los exponentes **pi** son +1 o -1, o sea **Y** es un producto o cociente de las magnitudes de entrada, puesto que en este caso los coeficientes de sensibilidad son 1 y la incertidumbre combinada relativa **u_{c,rel}(y)** es la suma geométrica de las incertidumbres relativas de las magnitudes de entrada:

$$u_{c,rel}(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N [u_{rel}(x_i)]^2} \quad (35)$$

1.3.9.8 Propagación de la incertidumbre para magnitudes de entrada correlacionadas

Si algunas de las magnitudes de entrada están correlacionadas, hay que considerar las covarianzas entre las magnitudes correlacionadas y **Ecuación (34)** se modifica a:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial X_i} \cdot u(x_i) \right]^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i \neq j}}^N \frac{\partial f}{\partial X_i} \cdot \frac{\partial f}{\partial X_j} \cdot u(x_i) \cdot u(x_j) \cdot r(X_i, X_j)} \quad (36)$$

Donde **r(X_i, X_j)** es el factor de correlación entre las magnitudes de entrada **X_i** y **X_j**.

Desde el punto de vista estadístico, dos variables son independientes cuando la probabilidad asociada a una de ellas no depende de la otra, esto es, si **q** y **w** son dos variables aleatorias independientes, la probabilidad conjunta se expresa como el producto de las probabilidades de las variables respectivas.

$$p(q, w) = p(q) \cdot p(w) \quad (37)$$

Frecuentemente, se encuentran magnitudes de entrada que no son independientes. La independencia lineal de dos variables puede estimarse estadísticamente con el coeficiente de correlación.

$$r(q, w) = \frac{u(q, w)}{u(q) \cdot u(w)} \quad (38)$$

En el denominador aparecen las incertidumbres estándar de las variables aludidas y en el numerador la covarianza de las mismas.

La covarianza puede ser estimada a partir de un conjunto de n valores de q y w según:

$$u(q, w) = \frac{1}{n(n-1)} \cdot \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q}) \cdot (w_k - \bar{w}) \quad (39)$$

Un valor de $r = 0$ indica independencia de q y w . Los valores de $r = +1$ o -1 indican una correlación total.

1.3.9.9 Incertidumbre Expandida

La forma de expresar la incertidumbre como parte de los resultados de la medición depende de la conveniencia del usuario. A veces se comunica simplemente como la incertidumbre estándar combinada, otras ocasiones como un cierto número de veces tal incertidumbre, algunos casos requieren se exprese en términos de un **nivel de confianza** dado, etc. En cualquier caso, es indispensable comunicar sin ambigüedades la manera en que la incertidumbre está expresada.

1.3.9.10 Factor de cobertura y nivel de confianza

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

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

$$U = k \cdot u_c \quad (40)$$

La incertidumbre expandida U indica entonces un intervalo que representa una fracción p de los valores que puede probablemente tomar el mensurando. El valor de p es llamado el nivel de confianza y puede ser elegido a conveniencia.

1.3.9.11 Distribución t de Student

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

La distribución t de Student es caracterizada por un parámetro n llamado número de grados de libertad. Considerando lo anterior, es necesario ampliar el intervalo correspondiente al nivel de confianza p , por lo que la **Ecuación (32)** se transforma a.

$$U = t_p(v) \cdot u_c \quad (41)$$

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

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

Nuevamente, la disponibilidad limitada de información hace necesario el uso de la distribución t de Student para determinar la incertidumbre expandida de manera rigurosa (con la suposición de que los valores del mensurando obedecen una distribución normal).

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

1.3.9.12 Expresión de la incertidumbre

Es expresar los resultados de sus mediciones con un nivel de confianza no menor al 95%, en vista de la costumbre en laboratorios similares.

Es difícil asegurar un valor preciso de la incertidumbre debido a las múltiples aproximaciones realizadas durante su estimación. Por ello, generalmente los valores de $t_p(v_{ef})$ para $p = 95\%$ se aproximan por los que corresponden a $t_p(v_{ef})$ para $p = 95,45\%$ con el fin de obtener un valor de $k = 2,00$ en el límite de una distribución normal.

Los valores de $t_p(v_{ef})$ para $p=95,45\%$ se muestran en la siguiente tabla 2:

v	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	50	100	∞
$t_p(v_{ef})$	13.97	4.53	3.31	2.87	2.65	2.52	2.43	2.37	2.32	2.28	2.13	2.05	2.025	2.000

TABLA 1.7 Valores de $t_p(v_{ef})$ para $p=95,45\%$

La expresión de la incertidumbre expandida U incluye su indicación como un intervalo centrado en el mejor estimado y del mensurando, la afirmación de que p es del 95% (o el valor elegido) aproximadamente y el número efectivo de grados de libertad, cuando sea requerido. Una manera de expresar el resultado de la medición es:

$$Y = y \pm U \tag{42}$$

CAPÍTULO SEGUNDO

DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

2.1 Muestras de trabajo

Para la realización del presente trabajo se contó con muestras de agua de diferentes matrices (agua potable, agua residual, agua subterránea y agua superficial), a las cuales se les hizo una adición de patrón de nitrógeno (Ácido Glutámico) para las evaluaciones.

2.2 Aparatos y materiales

Autoclave capaz de alcanzar temperaturas de 100-110°C por 30 minutos

Tubos de vidrio de 30 mL de 20 mm OD x 150 mm largo. Limpiar antes de su uso inicial por auto-clavado con reactivo de digestión.

Espectrofotómetro capaz de medir absorbancias a 410 nm.

Bastidores de alambre recubiertas de neopreno, para sujetar los tubos de muestra.

Baño de agua disponible para usar a 100°C. Este baño debe contener un sistema de

Agitación de tal manera que todos los tubos estén a la misma temperatura

Baño de agua para usar a 10-15°C

2.3 Patrones, MRC, Reactivos y Preparación de Soluciones

Estándar	Concentración (ppm N)	Marca	Lote
Acido L-Glutámico	-	Mallinkroft	5095 X50H03
MRC Nitrógeno Total	5.499	Inorganic Venture	B2-NUT01109
QC Nitrógeno Total	46.7	Wibby Env.	8109-10

TABLA 2.1 Reactivos utilizados como Estándares utilizados para el desarrollo del método para la Determinación de Nitrógeno

Reactivo	Marca	Lote
Persulfato de Potasio (<0.001%N)	Merck	A0249192
Hidróxido de Sodio	Merck	BO466398
Ácido Sulfúrico	Merck	A098893
Ácido Sulfanílico	Panreac	169275
Ácido Acético	Panreac	154333
Sulfato de Brucina	Sigma Aldrich	10727DD

TABLA 2.2 Reactivos usados para la validación del Método

Calidad del Agua para el análisis

El agua utilizada para todo el proceso de validación debe de estar libre de sustancias que puedan interferir al método analítico, en este caso el Nitrógeno.

El agua utilizada para esta validación es de Alta Calidad (<0.1 uS/cm, a 25°C). Resistencia mínima de 10 megaohmios-cm a 25 ° C. Por lo general se prepara a través de destilación, deionización, o de ósmosis inversa de alimentación de agua seguida por una deionización por lecho mixto y la membrana de filtración (0,2 um de poro).

Soluciones preparadas

Solución Stock de Acido Glutámico (100 ppm N): Secar el ácido glutámico en una estufa a 105°C por 24 horas. Disolver 1.051 g en agua y diluir a 1L, preservar con 2 mL CHCl₃/L

Reactivo de Digestión: Disolver 15 g de Persulfato de Potasio (bajo de Nitrógeno <0.001%N) y 2.2 g de NaOH en agua y diluir a 1L

Solución de Ácido Sulfúrico: Cuidadosamente adicionar 500 a 400 mL de agua purificada.

Reactivo acido de Brucina-Acido Sulfanilico: Disolver 1g de Ácido Sulfanilico en 70 mL de agua caliente, adicionar 3 mL de HCl concentrado, enfriar y diluir a 100 mL con agua destilada. Almacenar en botellas ámbar a 5°C.

Ácido Acético (1+3): Diluir 1 volumen de Ácido acético glacial con 3 volúmenes de agua destilada.

Hidróxido de Sodio (1N): Disolver 40g de NaOH en agua destilada. Enfriar y diluir a 1L.

A continuación la **Figura 2.1** presenta un diagrama de flujo del procedimiento del Método Validado para la determinación de nitrógeno total en aguas.

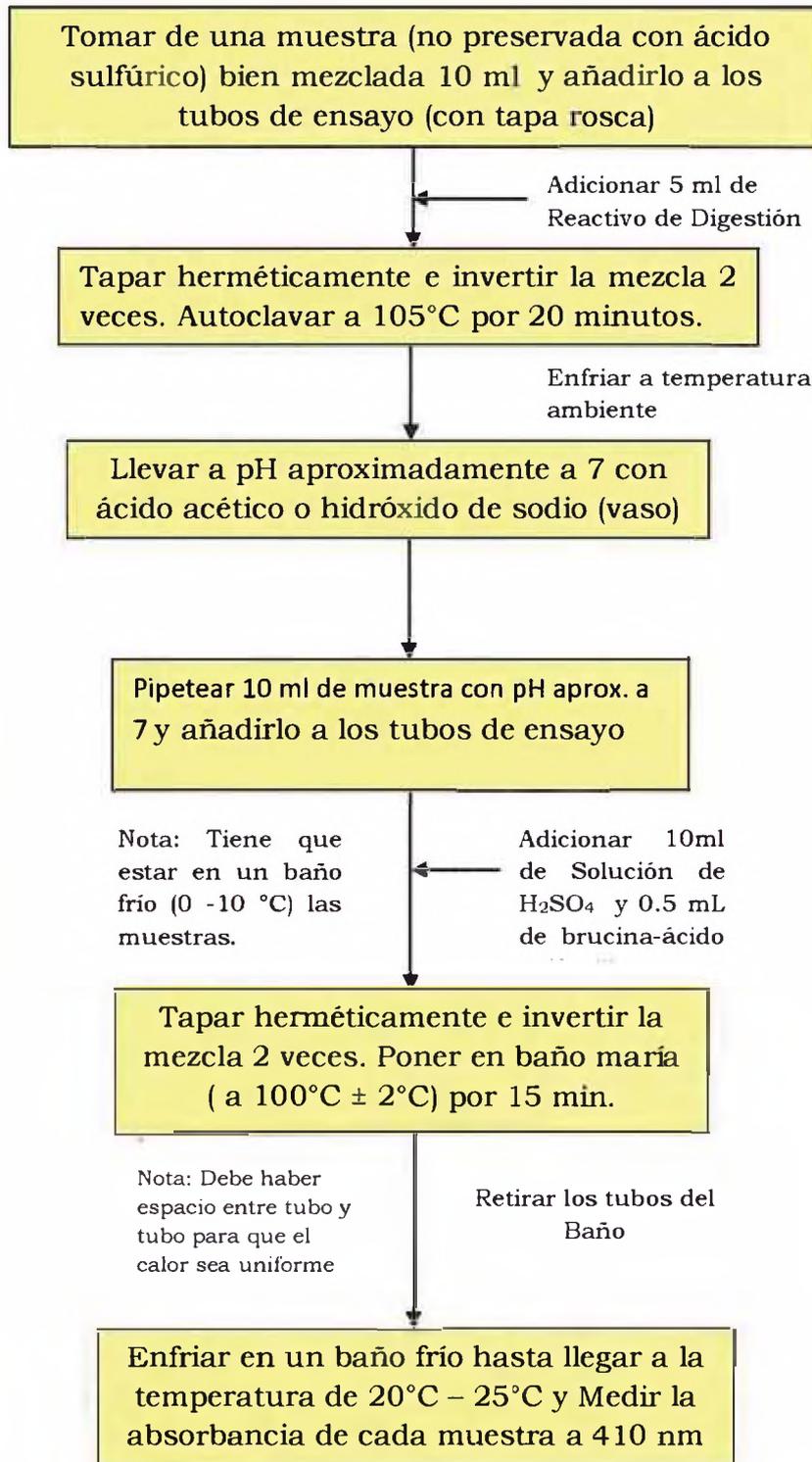


Figura 2.1 Diagrama de flujo del proceso de determinación de Nitrógeno Total en Cuerpos de agua por el Método a Validar.

CAPITULO 3

DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO PARA DETERMINAR NITRÓGENO TOTAL EN CUERPOS DE AGUA

3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUAS DE DIFERENTES MATRICES PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para la realización de la presente validación se contó con muestras de agua de diferentes matrices (agua potable, agua residual, agua subterránea, agua superficial), muestras reales monitoreadas en campo, a las cuales se le hizo una adición del patrón de nitrógeno (ácido glutámico) para las evaluaciones. Así como se utilizó un patrón de trabajo (ácido glutámico) para obtener todos nuestros resultados.

Se adicionó una concentración de nitrógeno a las matrices mencionadas anteriormente, previo cálculo para obtener una concentración final esperada. Se prepararon cuatro niveles (1, 2.9, 10, 20 ppm de Nt), a las matrices Agua Potable, Agua Superficial, Agua Subterránea y Residual respectivamente. Dichas muestras sintéticas fueron analizadas por tres analistas, 10 veces cada uno en cada nivel, obteniéndose los siguientes resultados, y haciendo diluciones de tal manera que entre en la Curva de Calibración preparada.

AGUA POTABLE (1 ppm N)			
Replicas	Analistas		
	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	1.004	1.040	0.989
2	0.990	0.979	1.059
3	1.076	1.069	0.967
4	1.031	0.959	1.046
5	0.977	1.110	0.988
6	1.002	1.045	0.963
7	0.997	0.992	1.037
8	1.062	1.055	0.985
9	1.002	1.067	1.054
10	1.071	1.114	0.952

TABLA 3.1 Datos obtenidos por tres analistas - Matriz Agua Potable con 1 ppm N

AGUA SUPERFICIAL (2.9 ppm N)			
Replicas	Analistas		
	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	2.812	2.851	2.625
2	2.830	2.791	2.803
3	2.683	2.872	2.706
4	2.870	2.937	2.848
5	2.799	2.766	2.917
6	2.925	2.823	2.769
7	2.711	2.755	2.714
8	2.931	2.952	2.851
9	2.778	2.759	2.701
10	2.930	2.694	2.630

TABLA 3.2 Datos obtenidos por tres analista - Matriz Agua Superficial con 2.9 ppm N

AGUA SUBTERRANEA (10 ppm N)			
Replicas	Analistas		
	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	9.583	10.088	9.785
2	10.591	9.676	9.553
3	9.488	9.588	9.785
4	10.149	10.149	9.995
5	10.039	9.688	9.559
6	10.317	10.297	10.163
7	9.749	9.749	9.594
8	9.843	9.814	9.688
9	10.292	10.292	9.983
10	9.916	9.748	9.633

TABLA 3.3 Datos obtenidos por tres analistas - Matriz Agua Subterránea con 10 ppm N

AGUA RESIDUAL (20 ppm N)			
Replicas	Analistas		
	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	19.068	19.758	19.524
2	18.812	20.359	20.114
3	20.437	20.320	20.076
4	19.021	20.116	19.876
5	19.135	18.991	18.773
6	19.030	19.864	19.629
7	18.945	18.846	19.705
8	20.171	20.048	19.810
9	19.040	20.272	20.029
10	20.342	20.223	19.981

TABLA 3.4 Datos obtenidos por tres analistas - Matriz Agua Residual con 20 ppm N

3.2 ESCRUTINIO DE RESULTADOS PARA DETERMINAR LA CONSISTENCIA DE VALORES REZAGADOS, ERRÁTICOS O ATÍPICOS.

Esta evaluación se realiza antes de proceder a la evaluación estadística para eliminar datos inconsistentes.

3.2.1 Cálculo de la Estadística de Consistencia entre Laboratorios (MANDEL: h)

Hipótesis

Ho: El analista no tiene valores atípicos

Ha: El analista tiene valores atípicos

Prueba Estadística

$$h_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j}{\sqrt{\frac{1}{(p_j - 1)} \sum_{i=1}^{p_j} (y_{ij} - \bar{y}_j)^2}}$$

(43)

Donde:

y_i : Media del analista i

y_m : Promedio de las medias

p : número de analistas

h_{ij} : h de Mandel

Criterio de Aceptación

$$h_{Calculado} < h_{Tablas} \quad (44)$$

Y se acepta la hipótesis nula.

3.2.2 Cálculo de la Estadística de Consistencia dentro de Laboratorios (MANDEL: k)

Hipótesis

H_0 : El analista no tiene valores atípicos

H_a : El analista tiene valores atípicos

Prueba Estadística

$$k_{ij} = \frac{s_{ij} \sqrt{p_j}}{\sqrt{\sum s_{ij}^2}} \quad (45)$$

Donde:

p_j : número de analistas

S_{ij} : Desviación Estándar

k_{ij} : k de Mandel

Criterio de Aceptación

$$k_{Calculado} < k_{Tablas} \quad (46)$$

Y se acepta la hipótesis nula.

Los valores críticos (1% y 5%) de *h* y *k* de Mandel se presentan en la **Tabla 3.5** La **Tabla 3.6** muestra los resultados de *h* y *k* calculados para cada analista utilizando los datos de las **Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4**, y utilizando las ecuaciones (43) y (45).

Nivel de Significancia (de tablas)		
	1%	5%
h-Mandel	1.150	1.150
K-Mandel	1.390	1.290

TABLA 3.5 Valores críticos de *h* y *k* de Mandel para tres analistas

Analista	Parámetro	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Analista 1	h Mandel	-0.085	0.666	0.922	-1.116
	k Mandel	0.825	0.982	1.235	1.196
Analista 2	h Mandel	1.040	0.484	0.141	0.816
	k Mandel	1.203	0.926	0.957	1.012
Analista 3	h Mandel	-0.955	-1.150	-1.063	0.300
	k Mandel	0.934	1.086	0.747	0.739

TABLA 3.6 Resultados de *h* y *k* para el ensayo de las muestras realizadas con el método por validar para la determinación de nitrógeno total en aguas

Comparando los resultados de *h* y *k* de cada analista con los críticos y observamos todos están dentro de los valores críticos tanto al 1% y al 5. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula de que los analistas no tienen valores atípicos y rezagados.

El análisis de la **Figura 3.1 y 3.2** de *h* y *k* indican que los resultados no son marcadamente diferentes de los otros, por tanto conservaremos los datos por el momento.

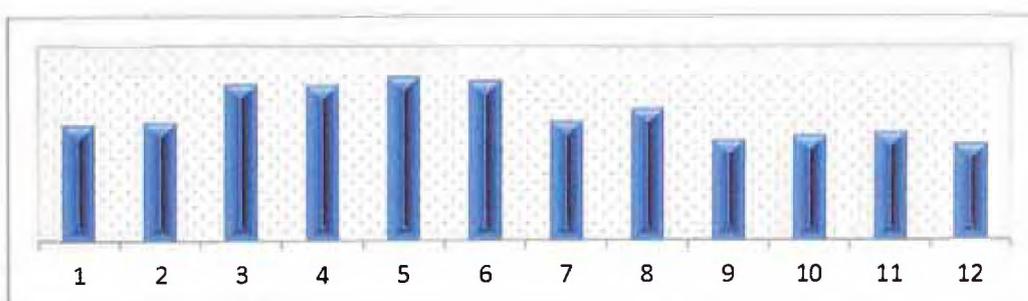


Figura 3.1. Valores de *k* para los resultados de Nitrógeno Total

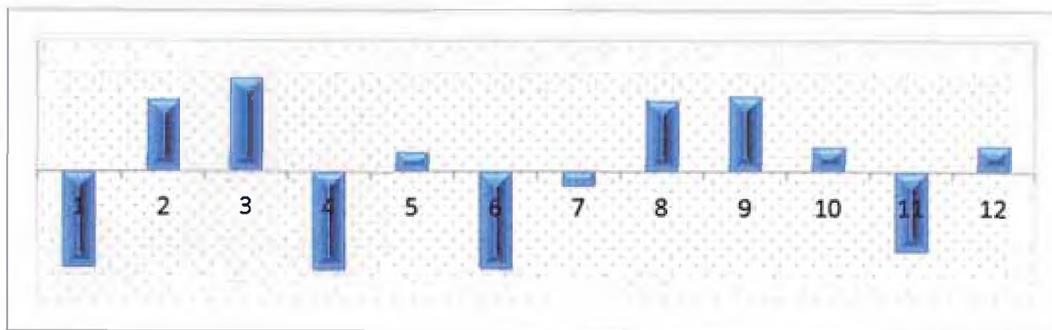


Figura 3.2 Valores de h para los resultados de nitrógeno total

3.2.3 Prueba numérica para dar validez a los resultados - Prueba de Cochran

La prueba de Cochran la aplicaremos para identificar valores rezagados, erráticos o atípicos.

Hipótesis

Ho: El analista no tiene valores atípicos

Ha: El analista tiene valores atípicos

Prueba Estadística

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2} \quad (47)$$

Donde:

S^2_{max} : Varianza Máxima de las varianzas de los analistas participantes

S^2_i : Varianza de los analistas

p: número de analistas

Criterio de Aceptación

$$C_{Calculado} < C_{Tablas} \quad (48)$$

Y se acepta la hipótesis nula.

Los valores críticos (1% y 5%) de la prueba de Cochran se presentan en la **Tabla 3.7**. La **Tabla 3.8** muestra los resultados de Cochran para cada nivel utilizando los datos de las **Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4**, y utilizando la ecuación (47):

Nivel de Significancia (de tablas)		
	1%	5%
Cochrane	0.793	0.707

TABLA 3.7 Valores Críticos de la Prueba de Cochran

Nivel	Cochrane
Nivel 1	0.482
Nivel 2	0.393
Nivel 3	0.508
Nivel 4	0.477

TABLA 3.8 Resultados de Cochran para el ensayo de muestras de agua con el método a validar

Comparando los resultados de Cochran de cada nivel con los críticos y observamos todos están dentro de los valores críticos tanto al 1% y al 5. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula de que los analistas no tienen valores atípicos.

3.2.4 Prueba numérica de observación de valores erráticos o atípicos-prueba de Grubbs

Los valores críticos y los resultados se presentan en la tabla 10 respectivamente:

Para verificar que nuestra serie de datos, alguno o algunos de los valores no difieran del resto de forma inexplicable (errores crasos) se aplica un contraste de datos anómalos.

Hipótesis

Ho: El analista no tiene valores atípicos

Ha: El analista tiene valores atípicos

Prueba Estadística

$$G_p = (x_p - x) / s \quad (49)$$

Donde:

Xp: Media Máxima o Mínima de los resultados obtenidos por los analistas

X: Media de los promedios

s: Desviación Estándar de los promedios.

Gp: Grubbs calculado

Criterio de Aceptación

$$G_{\text{Calculado}} < G_{\text{Tablas}} \quad (50)$$

Y se acepta la hipótesis nula si G calculado es menor que el valor crítico para una probabilidad de 0,05 (nivel de confianza del 95%) y n mediciones.

Los valores críticos (1% y 5%) de la prueba de Grubbs se presentan en la **Tabla 3.9**. La **Tabla 3.10** muestra los resultados de Grubbs para cada nivel, utilizando los datos de las **Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4**, y utilizando la ecuación (49).

Nivel de Significancia (de tablas)		
	1%	5%
Grubbs	1.155	1.155

TABLA 3.9 Valores Críticos de la prueba de Grubbs

Nivel	Grubbs	
	Mínimo	Máximo
Nivel 1	0.955	1.040
Nivel 2	1.150	0.666
Nivel 3	1.063	0.922
Nivel 4	1.116	0.816

TABLA 3.10 Resultados de Grubbs para el ensayo de muestras

Comparando los resultados de Grubbs de cada nivel con los críticos y observamos todos están dentro de los valores críticos tanto al 1% y al 5. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula de que los analistas no tienen valores atípicos.

3.2.5 NORMALIDAD Y HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS

Muchos eventos reales y naturales tienen una distribución de frecuencias cuya forma es muy parecida a la distribución normal. La distribución normal es llamada también campana de Gauss por su forma acampanada.

3.2.5.1 Normalidad de los datos (Prueba de Anderson-Darling)

Para evaluar si los datos generados siguen una distribución normal se utiliza el Test de Anderson-Darling. Esta prueba se realiza haciendo un gráfico con los residuales de los datos obtenidos.

Hipótesis:

Ho: Los datos obtenidos presentan una distribución normal

Ha: Los datos obtenidos no presentan una distribución normal

Regla de Decisión: Se acepta la Ho a un nivel de significación aproximado de 0,05 si p-value es superior a 0.05

En las **Figuras 3.3 y 3.4**, se observa los gráficos de probabilidad de los residuos de los datos obtenidos en las **Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4**, que indica que la distribución de los mismos se ajusta de forma suficiente a una curva normal. La diagonal principal representa a la distribución normal teórica donde los residuos muestrales se ajustan a esta diagonal. En ninguno de los gráficos aparecen desviaciones entre ambas distribuciones (la teórica y la muestral). Además, según el Test de Anderson-Darling se obtiene valores de p-value mayores de 0.05 por lo que las muestras tienen una distribución normal.

Haciendo uso del MINITAB 15 obtenemos los residuales de los 30 datos en cada matriz y se muestran en las **Tablas 3.11 y 3.12** a continuación.

Nivel 1 (Agua Potable)		
Analista	N.T.(ppm N)	Residual
1	1.004	-0.017
1	0.990	-0.031
1	1.076	0.055
1	1.031	0.010
1	0.977	-0.044
1	1.002	-0.019
1	0.997	-0.024
1	1.062	0.041
1	1.002	-0.019
1	1.071	0.050
2	1.040	-0.003
2	0.979	-0.064
2	1.069	0.026
2	0.959	-0.084
2	1.110	0.067
2	1.045	0.002
2	0.992	-0.051
2	1.055	0.012
2	1.067	0.024
2	1.114	0.071
3	0.989	-0.015
3	1.059	0.055
3	0.967	-0.037
3	1.046	0.042
3	0.988	-0.016
3	0.963	-0.041
3	1.037	0.033
3	0.985	-0.019
3	1.054	0.050
3	0.952	-0.052

Nivel 2 (Agua Superficial)		
Analista	N.T.(ppm N)	Residual
1	2.812	-0.015
1	2.830	0.003
1	2.683	-0.144
1	2.870	0.043
1	2.799	-0.028
1	2.925	0.098
1	2.711	-0.116
1	2.931	0.104
1	2.778	-0.049
1	2.930	0.103
2	2.851	0.031
2	2.791	-0.029
2	2.872	0.053
2	2.937	0.118
2	2.766	-0.054
2	2.823	0.003
2	2.755	-0.065
2	2.952	0.132
2	2.759	-0.061
2	2.694	-0.126
3	2.625	-0.131
3	2.803	0.047
3	2.706	-0.050
3	2.848	0.092
3	2.917	0.160
3	2.770	0.013
3	2.714	-0.042
3	2.851	0.095
3	2.701	-0.056
3	2.630	-0.127

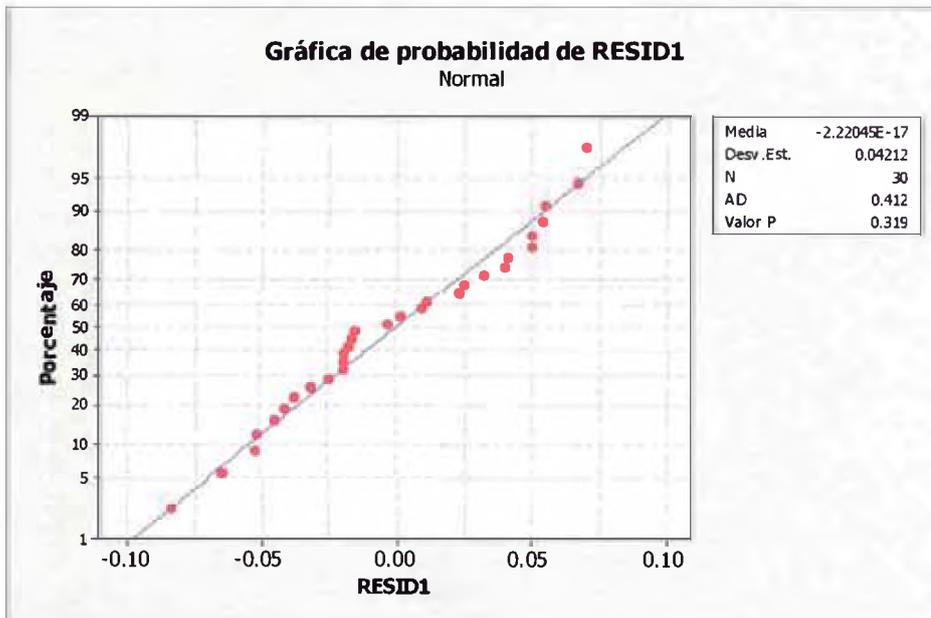
TABLA 3.11 Residuales de los datos obtenidos por el método a Valida en Agua Potable y en agua superficial a concentraciones de 1 y 2.9 ppm respectivamente

Nivel 3 (Agua Subterránea)		
Analista	N.T.(ppm N)	Residual
1	9.583	-0.413
1	10.591	0.594
1	9.488	-0.509
1	10.149	0.153
1	10.039	0.042
1	10.317	0.320
1	9.749	-0.248
1	9.843	-0.154
1	10.292	0.296
1	9.916	-0.081
2	10.088	0.179
2	9.676	-0.233
2	9.588	-0.321
2	10.149	0.240
2	9.688	-0.221
2	10.297	0.389
2	9.749	-0.160
2	9.814	-0.095
2	10.292	0.383
2	9.748	-0.161
3	9.785	0.011
3	9.553	-0.221
3	9.785	0.011
3	9.995	0.221
3	9.559	-0.215
3	10.163	0.389
3	9.594	-0.180
3	9.688	-0.086
3	9.983	0.210
3	9.633	-0.141

Nivel 4 (Residual)		
Analista	N.T.(ppm N)	Residual
1	19.068	-0.332
1	18.812	-0.588
1	20.437	1.037
1	19.021	-0.379
1	19.135	-0.265
1	19.030	-0.370
1	18.945	-0.455
1	20.171	0.771
1	19.040	-0.360
1	20.342	0.942
2	19.758	-0.122
2	20.359	0.479
2	20.320	0.440
2	20.116	0.237
2	18.991	-0.888
2	19.864	-0.016
2	18.846	-1.034
2	20.048	0.169
2	20.272	0.392
2	20.223	0.343
3	19.524	-0.227
3	20.114	0.363
3	20.076	0.324
3	19.876	0.125
3	18.773	-0.979
3	19.629	-0.123
3	19.705	-0.047
3	19.810	0.058
3	20.029	0.277
3	19.981	0.229

TABLA 3.12 Residuales de los datos obtenidos por el método a Validar en Agua Subterránea y en Agua residual a concentraciones de 10 y 20 ppm respectivamente

Nivel 1 (Aqua potable 1 ppm N)



Nivel 2 (Aqua Superficial 2.9 ppm N)

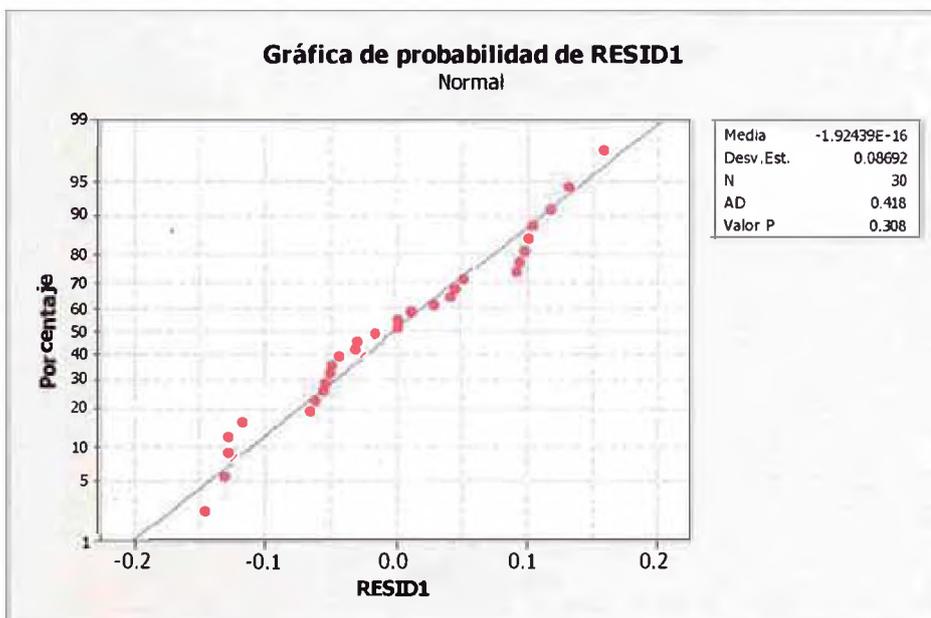
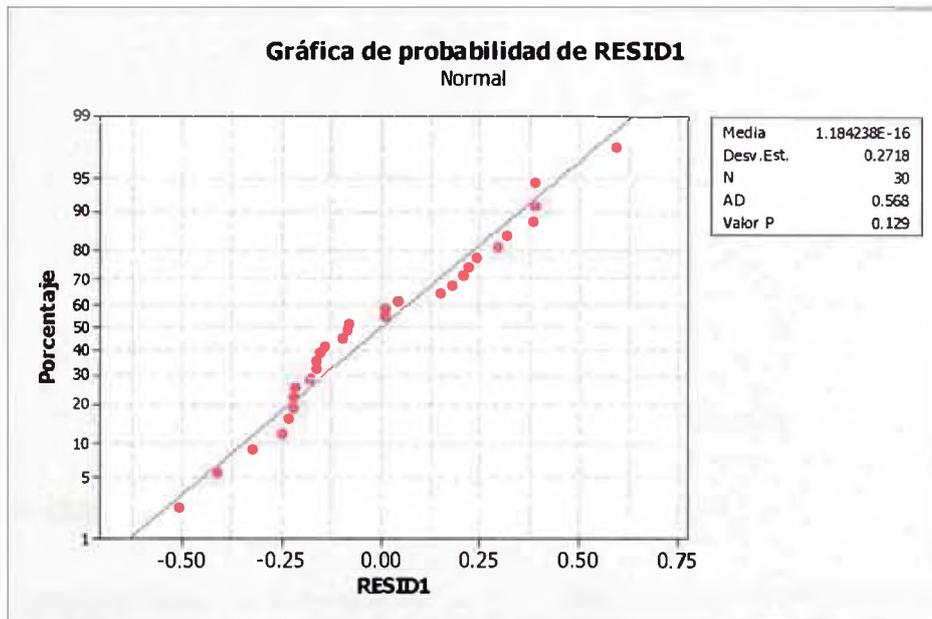


Figura 3.3 Gráficos de probabilidad que muestran la Normalidad de los datos obtenidos para Agua Potable y agua Superficial a concentraciones de 1 y 2.9 ppm N

Nivel 3 (Agua Subterránea 10 ppm N)



Nivel 4 (Agua Residual 20 ppm N)

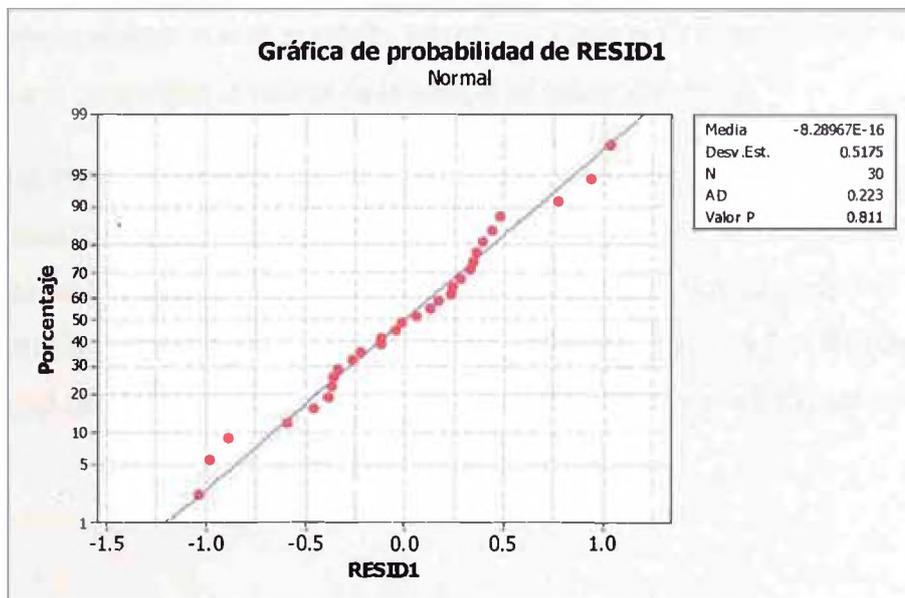


Figura 3.4 Gráficos de probabilidad que muestran la Normalidad de los datos obtenidos para Agua Subterránea y Agua Residual a concentraciones de 10 y 20 ppm N

Como se puede ver de los gráficos para cada nivel de concentración de nitrógeno total en las diferentes matrices el p Value es mayor a 0.05 por lo que se concluye que los datos obtenidos son normales.

Nivel	p Value
Nivel 1	0.319
Nivel 2	0.308
Nivel 3	0.129
Nivel 4	0.811

TABLA 3.13 Valores de p-Value para los cuatro niveles

3.2.5.2 Homogeneidad de los Datos

En las pruebas paramétricas de estadística, como la t de Student y el análisis de varianza de Fisher, se exige como requisito previo la homogeneidad de las varianzas. Esta técnica es un valioso auxiliar para decidir la homogeneidad o heterogeneidad del error estadístico.

Al respecto, se debe considerar que la varianza corresponde a la suma de las diferencias de los valores individuales en relación con el promedio, elevadas al cuadrado y divididas entre los grados de libertad, es decir, son variaciones alrededor de la medida de tendencia central.

Técnica Numérica de Homogeneidad de Varianzas. Prueba de Barlett, debido a los datos que se tiene (datos normales). Los datos utilizados para dicha prueba son los presentados en las **Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4**, para las diferentes matrices a validar. Los Resultados de homogeneidad de varianza se obtuvieron con MINITAB. Y estos se presentan en Las **Figuras 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8**. **Se considera que hay homogeneidad de varianzas cuando el p-value obtenido es mayor a 0.05, para la Prueba de Barlett.**

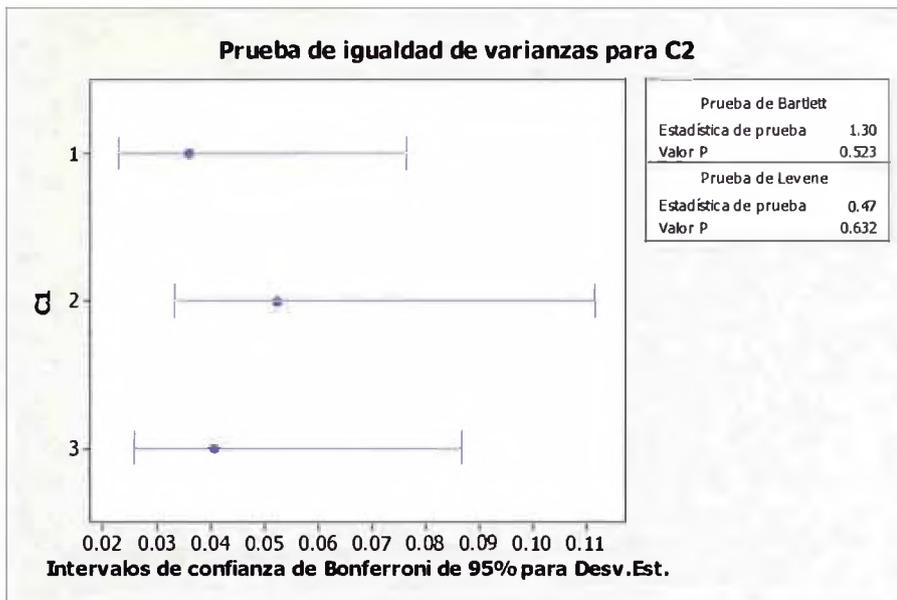
Hipótesis

Ho : Existe Homogeneidad de variancias

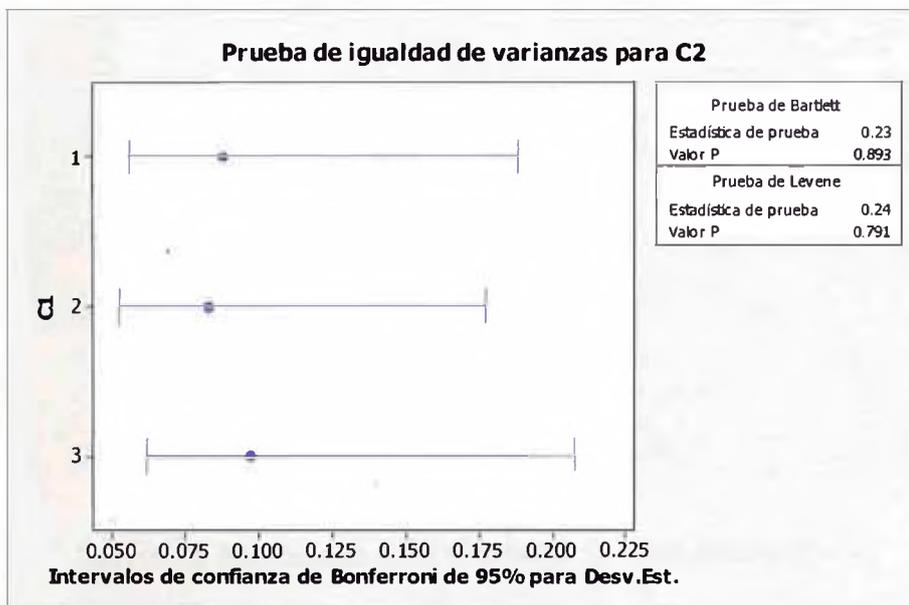
Ha: Al menos una variancia es diferente de las demás

Regla de Decisión

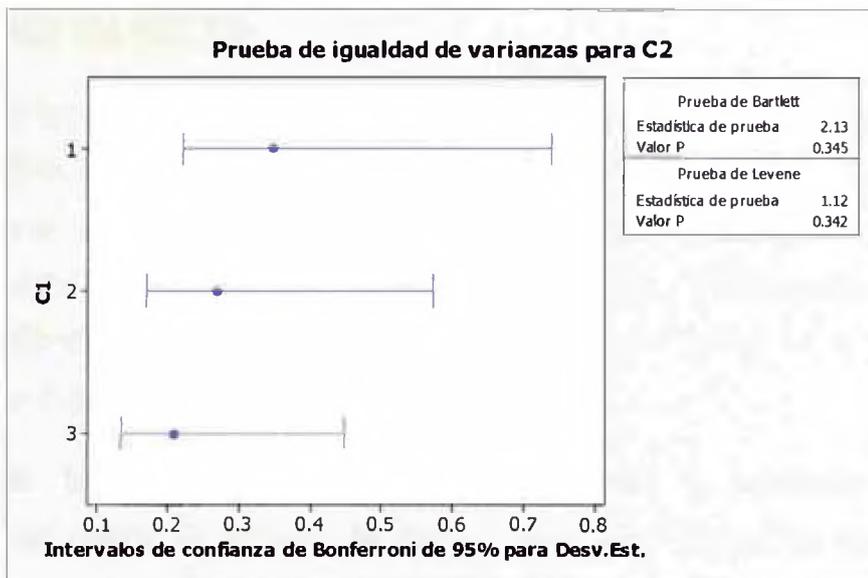
Se acepta la Hipótesis Nula Ho si: **p value > 0.05**



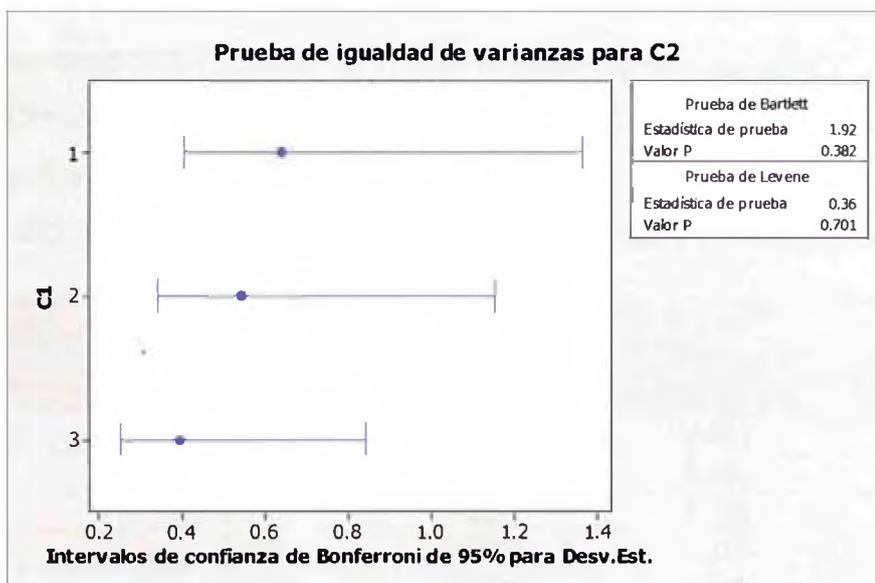
**Figura 3.5 Resultados de la Prueba de Bartlett para el Nivel 1
(Agua Potable con 1 ppm N)**



**Figura 3.6 Resultados de la Prueba de Bartlett para el Nivel 2
(Agua Superficial con 2.9 ppm N)**



**Figura 3.7 Resultados de la Prueba de Bartlett para el Nivel 3
(Agua Subterránea con 10 ppm N)**



**Figura 3.8 Resultados de la Prueba de Bartlett para el Nivel 4
(Agua Residual con 20 ppm N)**

Como se puede observar de las **Figuras 3.5, 3.6, 3.7, 3.8**, el p-Value es menor en todos los casos, por lo tanto se aprueba H_0 : Existe Homogeneidad de Variancias de los analistas para las matrices evaluadas.

3.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Luego de determinar que no existe ningún valor rezagado o atípico y además los resultados siguen un comportamiento normal y que existe homogeneidad en las varianzas, se procede a determinar la precisión, hallando la desviación estándar de repetibilidad y reproducibilidad, así como también la desviación estándar relativa de repetibilidad y desviación estándar de reproducibilidad. Para ello se evalúan los parámetros de precisión de los datos obtenidos en las **Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4**, para cada matriz a evaluar.

Evaluación de la desviación estándar de repetibilidad y desviación estándar de reproducibilidad: Cálculo de la Media General (m), Desviación Estándar de Repetibilidad (S_r) y Reproducibilidad (S_R).

1. Para la evaluación del promedio, se calculó el promedio obtenido por cada analista, y finalmente se calculó el promedio de los promedios obtenidos (media general).y por cada matriz.
2. El S_r se calcula con la Ecuación (4) y el S_R se calcula con la Ecuación (7)
3. El RSD_r y el RSD_R se calculan como en el punto 1.3.1.5 b
4. El r y el R se calculan como en el punto 1.3.1.5 c
5. Los Límites de RSD_r y RSD_R se calculan multiplicando los RSD_r y RSD_R por 2.8, (1.3.1.5 d)

NIVEL	NIVEL 1 (1 ppm N)	NIVEL 2 (2.9 ppm N)	NIVEL 3 (10 ppm N)	NIVEL 4 (20 ppm N)
MATRIZ	A. Potable	A. Superficial	A. Subterránea	A. Residual
PROMEDIO	1.023	2.801	9.893	19.677
S_r	0.044	0.090	0.282	0.536
S_R	0.046	0.094	0.290	0.566
RSD_r	4.270	3.216	2.847	2.726
RSD_R	4.481	3.351	2.929	2.877
r	0.122	0.252	0.789	1.502
R	0.128	0.263	0.811	1.585
LÍMITE RSD_r (%)	11.956	9.004	7.972	7.632
LÍMITE RSD_R (%)	12.546	9.382	8.203	8.056

TABLA 3.14 Resultados de los Promedios, Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad y Reproducibilidad

Gráficamente se tiene:

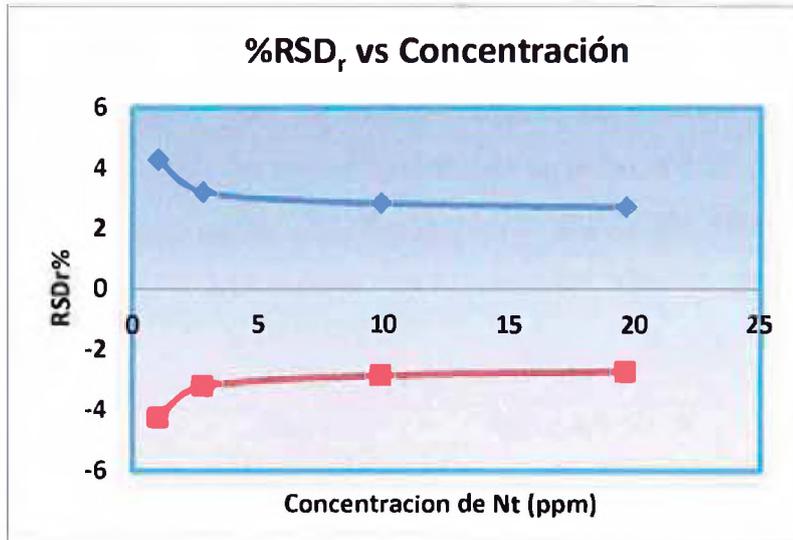


Figura 3.9 Tendencia de la Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad (S_r)

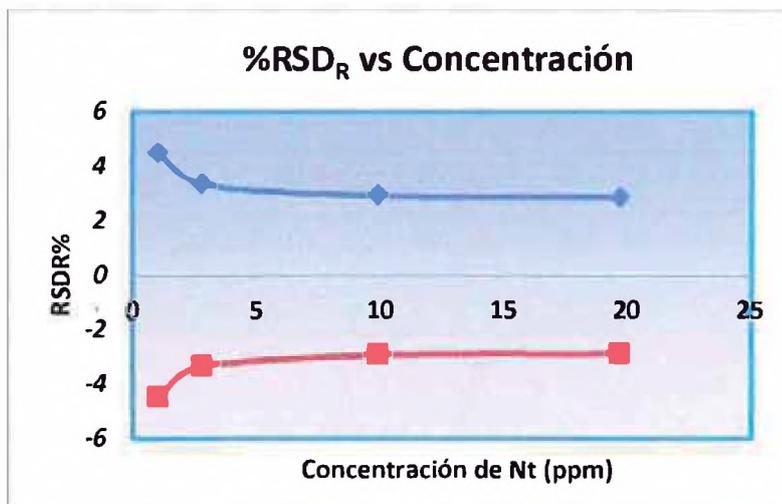


Figura 3.10 Tendencia de la Desviación Estándar de Reproducibilidad (S_R)

De las **Figura 3.9** y **3.10** se puede apreciar que la desviación estándar relativa tanto de la repetibilidad como de la reproducibilidad sigue una tendencia similar a la trompeta de Hortwitz, donde la DSR de la repetibilidad y de la reproducibilidad disminuyen conforme aumenta la concentración del analito, nitrógeno total.

3.4 RECUPERACIONES EN MATRICES Y CARTAS DE CONTROL

Con los 30 datos obtenidos para las cuatro matrices, se establecieron los Intervalos de Recuperaciones para cada matriz, los cuales se muestran en la **Tabla 3.15**. Se considera los límites de aviso (2s), y los límites de control (3s), donde s es la **desviación estándar** de los 30 datos. Las **Figuras 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14** A su vez se muestran las primeras cartas de control para las recuperaciones

Matriz	Recuperación %
Agua Consumo	90-106
Agua Superficial	92-108
Agua Subterránea	93-107
Agua Residual	95-105

TABLA 3.15 Intervalo de los Porcentajes de Recuperaciones obtenidas por Matrices

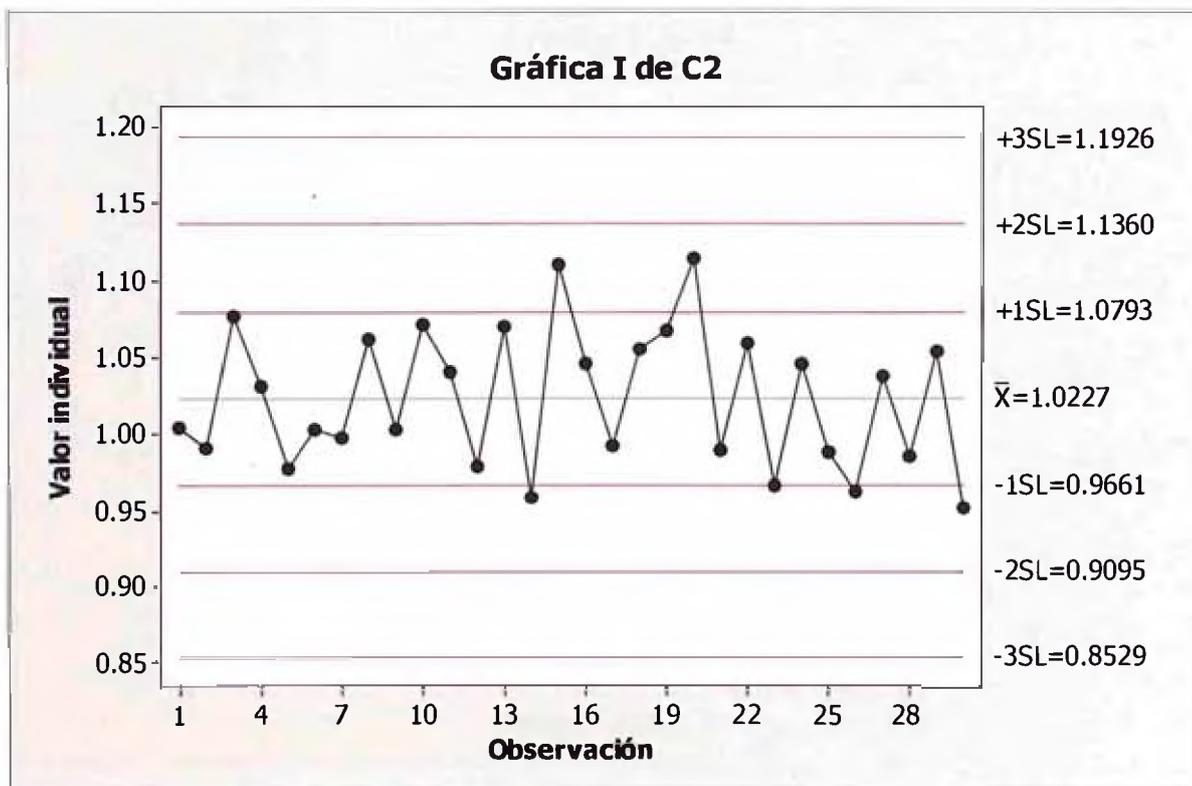


Figura 3.11 Carta de Control de Recuperaciones – Matriz Agua de Consumo

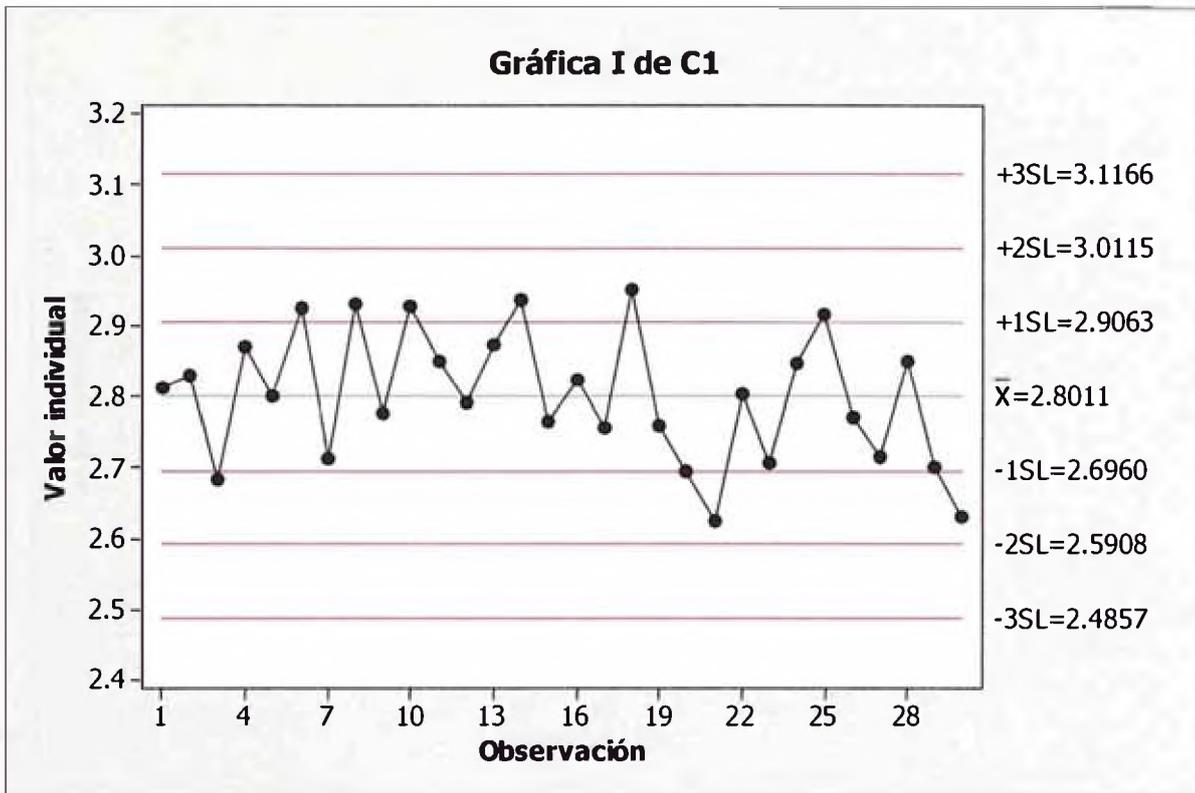


Figura 3.12 Carta de Control de Recuperaciones – Matriz Agua Superficial

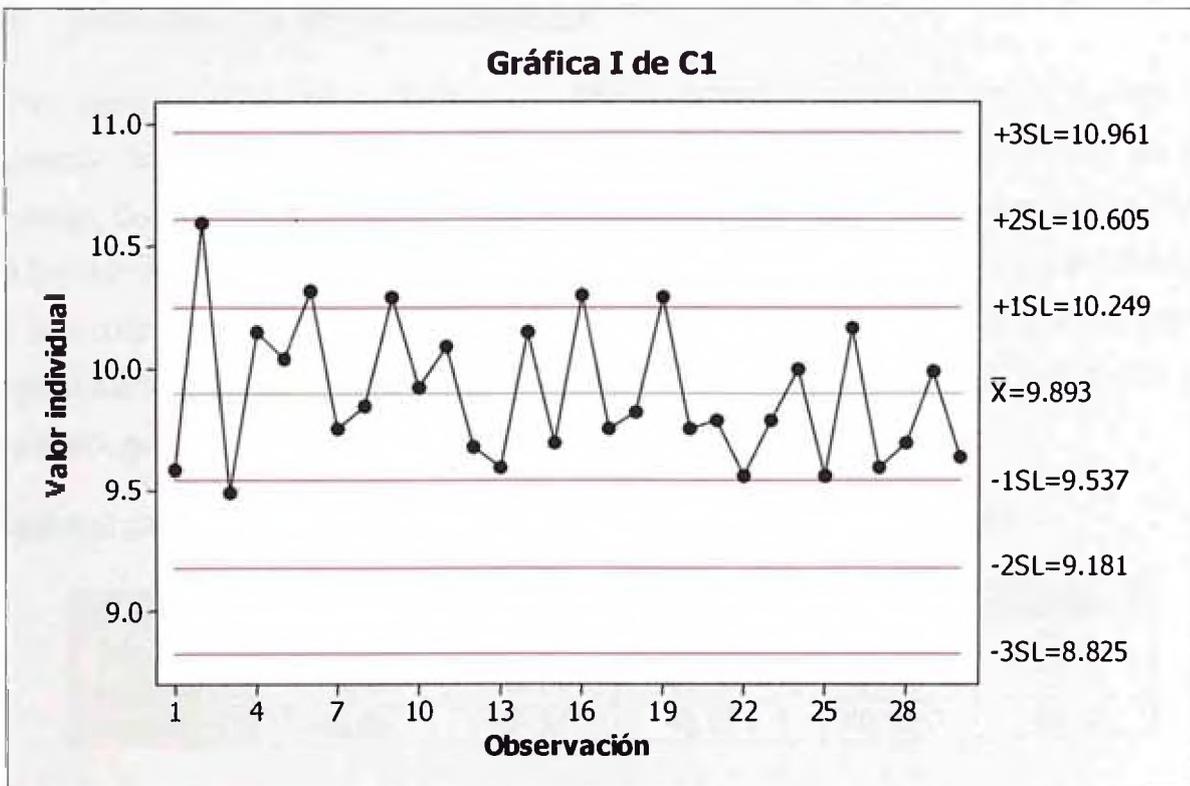


Figura 3.13 Carta de Control de Recuperaciones – Matriz Agua Subterránea

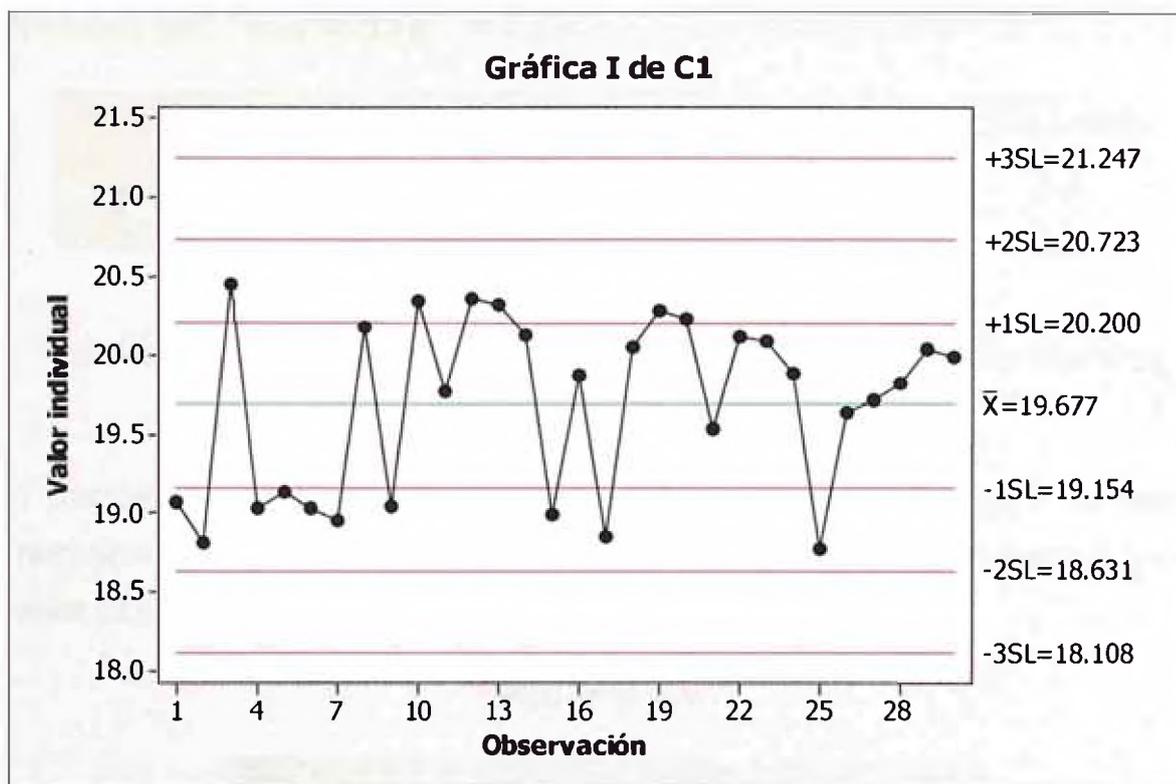


Figura 3.14 Carta de Control de Recuperaciones – Matriz Agua Residual

3.5 VERACIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO

Para determinar la veracidad del método a validar lo compararemos con un material de referencia certificado (MRC). Para ello se repite cinco veces la lectura de un material de referencia por tres analistas. Considerando el valor del MRC como el valor convencional, mediante la aplicación de la t de Student se podrá determinar con un cierto nivel de confianza si existe diferencia significativa entre la estimación obtenida y el valor de referencia. En caso de no existir diferencia se considerará demostrada la veracidad (exactitud) para este tipo de muestras y a dicho nivel de concentración. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Nivel Alto (QC Nitrógeno Total – 46.7 ppm Nt, Wibby Env., 8109-10) ver Anexo 1.

ANALISTAS	X1	X2	X3	X4	X5
Analista 1	47.29	47.20	45.18	48.99	46.34
Analista 2	46.04	45.34	46.11	47.23	47.32
Analista 3	45.89	46.67	46.56	45.43	48.32

TABLA 3.16 Resultados obtenidos por los cinco analistas de un material de Referencia certificado de nitrógeno Total – Rango Alto

Nivel Bajo (MRC Nitrógeno Total, 5.499 ppm, Inorganic Venture, B"-NUT01109), ver Anexo 2

ANALISTAS	X1	X2	X3	X4	X5
Analista 1	5.37	5.47	5.54	5.37	5.53
Analista 2	5.43	5.25	5.43	5.35	5.44
Analista 3	5.53	5.43	5.65	5.54	5.32

TABLA 3.17 Resultados obtenidos por los cinco analistas de un material de Referencia certificado de nitrógeno Total - Rango Bajo

Se procederá a calcular el h de Mandel para eliminar los valores atípicos, si los hubiera, comparándolo con el h de tablas para 3 analistas, y se compara si el h calculado es menos que el h de tablas para tres analistas (1.15), se obtuvieron los siguientes resultados:

MRC -Nivel Alto

ANALISTAS	PROMEDIO	ABS(h)	EVALUACIÓN
Analista 1	47.00	1.111	Conforme
Analista 2	46.41	0.828	Conforme
Analista 3	46.57	0.283	Conforme
PROMEDIO	46.66		
DESV EST	0.3050		

MRC -Nivel Bajo

ANALISTAS	PROMEDIO	ABS(h)	EVALUACIÓN
Analista 1	5.45	0.197	Conforme
Analista 2	5.38	1.084	Conforme
Analista 3	5.49	0.887	Conforme
PROMEDIO	5.44		
DESV EST	0.0573		

TABLA 3.18 Resultados obtenidos por los tres analistas para el MRC Wibby Environmental e Inorganic Ventures, Valor Certificado 47.2 ppm y 5.4 ppm de Nt, respectivamente.

De la **Tabla 3.18** se puede observar que el h calculado < h tablas por lo tanto los valores obtenidos por cada analista no presentan valores atípicos. Para el cálculo del t de Student para la exactitud, se utilizara el promedio de los analistas y su desviación estándar. Y se compara con el t de Student para tres analistas (G.L.: 2) y con un nivel de confianza de 95% para dos colas.

Media del MR por el método a evaluar	46.66	5.44
Desviación estándar de proceso	0.3050	0.0573
Número de analistas	3	3
Valor del Material de Referencia	47.2	5.4
t calculado	3.064	1.273
t tablas	4.303	4.303

TABLA 3.19 Resultados obtenidos para la evaluación de la veracidad del Método, con MRC

De la **Tabla 3.19** Se observa que el **t calculado < t tablas**, por lo tanto se puede afirmar que el método es veraz con un nivel de confianza del 95%

3.6 VERACIDAD OBTENIDA POR INTERLABORATORIOS

Como parte de la evaluación de la veracidad, se vio la necesidad de demostrar que el método validado brindaba resultados confiables, es por ello que se decidió participar en un interlaboratorio, con la Compañía Phenova. El 15 de noviembre del 2012 se envió los resultados obtenidos, la muestra es llamada Nutriente - #1 (PT-NUT1-WP), Study: WP1012. LS Resultados obtenidos fueron, aceptables como se muestra en el **Anexo 3**, donde el Valor Asignado a la muestra fue 33 ppm Nt y con el Método Validado obtuvimos como resultado 34.4 ppm Nt. Los resultados fueron considerados aceptables.

3.7 LIINEALIDAD DEL MÉTODO.

Para evaluar la Linealidad del Método Validado, se preparó cinco puntos de calibración, y un blanco de calibración. Los puntos fueron 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0 ppm de Nitrógeno a partir del Ácido Glutámico. La curva sigue todo el procedimiento del método descrito en **Figura 2.1**, y son leídos finalmente en un Espectrofotómetro UV-Visible, a una longitud de onda de 410 nm. Las absorbancias obtenidas y los cálculos para la evaluación de la pendiente, el intercepto y la correlación, se muestran en la **Tabla 3.20**.

# de punto	X	Y	X*Y	X*X	Y*Y
1	0	0	0.000	0.000	0.000
2	0	0	0.000	0.000	0.000
3	0	0	0.000	0.000	0.000
4	0	0	0.000	0.000	0.000
5	0	0	0.000	0.000	0.000
6	1	0.0980	0.098	1.000	0.010
7	1	0.0985	0.099	1.000	0.010
8	1	0.1000	0.100	1.000	0.010
9	1	0.0982	0.098	1.000	0.010
10	1	0.0983	0.098	1.000	0.010
11	2	0.2120	0.424	4.000	0.045
12	2	0.2140	0.428	4.000	0.046
13	2	0.2090	0.418	4.000	0.044
14	2	0.2121	0.424	4.000	0.045
15	2	0.2121	0.424	4.000	0.045
16	2.5	0.2679	0.670	6.250	0.072
17	2.5	0.2560	0.640	6.250	0.066
18	2.5	0.2680	0.670	6.250	0.072
19	2.5	0.2680	0.670	6.250	0.072
20	2.5	0.2559	0.640	6.250	0.065
21	3	0.3209	0.963	9.000	0.103
22	3	0.2991	0.897	9.000	0.089
23	3	0.3110	0.933	9.000	0.097
24	3	0.2990	0.897	9.000	0.089
25	3	0.3209	0.963	9.000	0.103
26	5	0.5280	2.640	25.000	0.279
27	5	0.5100	2.550	25.000	0.260
28	5	0.5280	2.640	25.000	0.279
29	5	0.5280	2.640	25.000	0.279
30	5	0.5101	2.551	25.000	0.260
SUMA	67.500	7.023	23.574	226.250	2.458
MEDIA	2.250	0.234	0.786	7.542	0.082

Donde: X: Concentración, Y: Absorbancia

Tabla 3.20 Evaluación de la Linealidad en el Espectrómetro UV-VISIBLE

Con los resultados obtenidos en la **Tabla 3.19** y aplicando las ecuaciones **(8)**, **(9)** y **(10)**, se obtienen los Resultados de las **Tabla 3.21**, los cuales usaremos para la determinación de la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación que se muestran en la **Tabla 3.22**. Estos Resultados también se pueden determinar por Excel.

PUNTOS DE CURVA	6
NUMERO DE REPLICAS	5
NUMERO DE DATOS	30
GRADOS DE LIBERTAD (n-2)	28
$S_x^2 = \sum(X^2) - ((\sum X)^2/n)$	74.375
$S_y^2 = \sum(Y^2) - ((\sum Y)^2/n)$	0.814
$S_{xy} = \sum XY - ((\sum X * \sum Y)/n)$	7.772

TABLA 3.21 Datos para la obtención de estadísticos para la linealidad

COEFICIENTE DE REGRESION (slope)	0.1045
COEFICIENTE DE REGRESION (intercepto)	-0.0010
COEF. DE REG. MULTIPLE (R)	0.9919
ESTIMADO DEL ERROR ESTANDAR (Syx)	0.00688
COEFICIENTE DE DETERMINACION(R ²)	0.99837

TABLA 3.22 Resultados de Pendiente, Intercepto, y Coeficiente de Determinación

Con los datos obtenidos encontramos la pendiente y el intercepto de la curva de calibración así como el coeficiente de correlación de dicha curva.

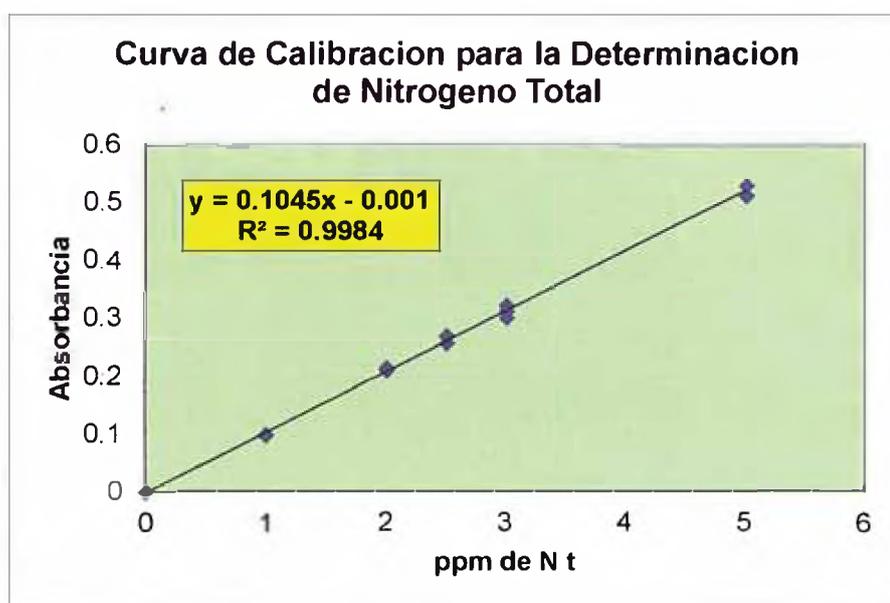


Figura 3.15 Curva de Calibración para la determinación de Nitrógeno Total por el Método Validado

Se realizan los cálculos para la prueba de hipótesis para la pendiente.

PRUEBA DE HIPOTESIS DE LA PENDIENTE	
t calculado > t tablas	
(Para G.L. : N -2)	
Sb	0.0008
tb	131.0610
IC	b+/- t*sb
t tablas	2.0484
IC SUP.	0.10614
IC INF	0.10287
CUMPLE	

Tabla 3.23 Prueba de Hipótesis para la pendiente

Se observa que la t calculada es mayor que la t tablas por lo que se concluye que se cumple la hipótesis para la pendiente.

Se realizan los cálculos para la prueba de hipótesis para el intercepto

PRUEBA DE HIPOTESIS DEL INTERCEPTO	
t calculado < t tablas	
(Para G.L. : N -2)	
Sa	0.0022
ta	-0.4703
IC	a +/- t*sa
t tablas	2.0484
IC SUP	0.00346
IC INF	-0.00552
CUMPLE	

Tabla 3.24 Prueba de Hipótesis para el Intercepto

Se observa que la t calculada es menor que el t tablas por lo que se concluye que se cumple la hipótesis para el intercepto

Se realizan los cálculos para la prueba de hipótesis para el Coeficiente de Correlación

PRUEBA DE HIPOTESIS DEL COEFICIENTE DE CORRELACION	
t calculado > t tablas	
(Para G.L. : N -2)	
Sr	0.0076
t cal	131.0610
a	0.00005812
t tablas	2.0484
CUMPLE	

Tabla 3.25 Prueba de hipótesis del Coeficiente de correlación

Se observa que la t calculada es mayor que la t tablas por lo que se concluye que se cumple la hipótesis para el coeficiente de correlación

Se realizan los cálculos para la demostración de la regresión y la linealidad

Regresión	F calculado > F tablas
Linealidad	F calculado < F tablas

Usando Minitab, calculamos los parámetros de evaluación:

Fuente	GL	SC	MC	F Calculado	Ftablas	Significancia
Regresion	1	0.81223	0.81223	17167.97	4.20	ES SIGNIFICATIVA
Error Residual	28	0.00132	0.00005			
Falta de ajuste	4	0.00027	0.00007	1.54	2.78	NO ES SIGNIFICATIVA LA DESVIACION
Error puro	24	0.00105	0.00004			
Total	29	0.81355				

Tabla 3.26 Prueba de Fisher para la determinación de la Linealidad y la Regresión

Se rechaza la hipótesis planteada y se acepta la hipótesis nula, concluyendo que para un nivel de significancia del 95%:

- Existe una regresión significativa entre la absorbancia y la concentración
- La falta de ajuste no es significativa, por lo tanto presenta linealidad

Criterios de aceptación de todas las pruebas

- 1.- Prueba de Hipótesis del Pendiente: t calculado $>$ t tablas
- 2.- Prueba de Límite de confianza para el Intercepto: t calculado $<$ t tablas
- 3.- Prueba de Hipótesis de la Coeficiente de Correlación: t calculado $>$ t tablas
- 4.- Prueba de Hipótesis para demostrar regresión y desvío de linealidad:

Regresión: F calculado $>$ F tablas

Linealidad: F calculado $<$ F tablas

Como cumple con todos los criterios de aceptación, se demuestra que existe linealidad en el intervalo de 1-5 ppm N.

3.8 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN MÉTODO

Hallaremos el límite de detección del método para poder saber cuál es la mínima cantidad de nitrógeno de ácido glutámico que se puede determinar. Para la determinación del límite instrumental en la determinación de nitrógeno total en aguas se llevó a cabo 10 réplicas del blanco de calibración realizada por tres analistas diferentes, el cual es el que nos indica en nivel de ruido en la lectura del espectrofotómetro. Los resultados fueron los siguientes:

Blancos de Calibración	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	0.089	0.093	0.098
2	0.113	0.188	0.132
3	0.095	0.102	0.054
4	0.114	0.091	0.122
5	0.103	0.102	0.098
6	0.107	0.111	0.132
7	0.092	0.097	0.092
8	0.165	0.122	0.102
9	0.086	0.062	0.093
10	0.194	0.110	0.162
Promedio	0.116	0.108	0.109
Desviación Estándar	0.036	0.032	0.030
LDI	0.107	0.097	0.089

Tabla 3.27 Resultados para la determinación del Límite de Detección Instrumental

Calculando el límite de detección instrumental.

L.D. Instrumental (ppm N)	0.098
----------------------------------	--------------

Calculamos ahora la concentración de la nitrógeno total, que se va a adicionar, el cual está comprendido entre 2 y 5 veces el límite de detección instrumental calculado. Se considerará cinco veces el límite de detección instrumental.

Concentración de la solución fortificada (ppm):	0.49
Se preparó estándares de (ppm):	0.50

Calculo del Límite de Detección del Método: Para el límite de detección del método se prepara estándares de 0.5 ppm de N, y se analizan 7 réplicas, por tres analistas diferentes, y luego se evalúa el cálculo del LDM, utilizando la desviación estándar de estos datos. Los resultados fueron los siguientes:

Sol. Fortificada (0,50 mg/L)	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	0.60	0.58	0.59
2	0.49	0.42	0.53
3	0.59	0.45	0.42
4	0.41	0.55	0.44
5	0.49	0.46	0.53
6	0.45	0.49	0.61
7	0.42	0.51	0.59
Desviación estándar(s)	0.08	0.06	0.08
Límite de Detección del Método (LDM): $t \times s$	0.24	0.18	0.24
Límite de Cuantificación (LCM): $2.5 \times \text{LDM}$	0.60	0.45	0.59
Promedio	0.49	0.49	0.53

Tabla 3.28 Resultados para la determinación del Límite de Detección del Método

Promediando los resultados de los tres analistas, obtenemos el límite de detección y de cuantificación.

LDM (Lim. Det. Met.)	0.233 ppm
LCM (Lim. Cuan. Met.)	0.743 ppm

Tabla 3.29 Limite de Detección y Limite de Cuantificación del Método

Se puede verificar que la concentración preparada se encuentra en el intervalo de LDM y 5 LDM, y los porcentajes de recuperación de los estándares preparados están en el rango de 50 – 150 %. Y el % RSD es menor igual al 20%.

3.9 SENSIBILIDAD DEL MÉTODO

La sensibilidad del método se evalúa en base a la pendiente de la curva de calibración utilizada para la determinación de la concentración de nitrógeno total, para este caso, la pendiente de la curva de calibración, y la cual se determinara un intervalo en la cual debe de encontrarse. Se obtuvieron los siguientes datos:

Analista/Día	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 1	Analista 2
BK	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
STD 1	0.0980	0.0985	0.1000	0.0982	0.0983
STD 2	0.2120	0.2140	0.2090	0.2121	0.2141
STD 3	0.2560	0.2680	0.2680	0.2559	0.2679
STD 4	0.2991	0.3210	0.3110	0.2990	0.3209
STD 5	0.5280	0.5100	0.5240	0.5280	0.5101
Sensibilidad	0.1052	0.1031	0.1051	0.1052	0.1031

Tabla 3.30 Resultados para la determinación la sensibilidad, cinco curvas

De estos datos de sensibilidades, calculamos el intervalo de confianza en la cual debería estar presente, dicha sensibilidad, en base a su promedio y su desviación estándar.

Desviación Estándar	0.0011
Promedio	0.1043

De ello obtenemos el intervalo de confianza:

Sensibilidad	0.1043
Intervalo de confianza (+/-)	0.0014

Tabla 3.31 Resultados de Sensibilidad y su Intervalo de confianza

3.10 ROBUSTEZ DEL MÉTODO.

La robustez mide la sensibilidad que presenta el método ante pequeñas variaciones en los factores que intervienen en la realización del método. Utilizaremos la prueba de Youden-Steiner. La **Tabla 3.32** muestra los parámetros críticos del método que variaremos para la prueba.

F.C.	Detalle del Factor critico	Nom.+Var.
A/a	Temperatura de Digestión en Autoclave	103 - 107 °C
B/b	Tiempo de Digestión en Autoclave	19 - 21 min
C/c	Temperatura para desarrollo de color	98 – 102 °C
D/d	Temp. de Enfriamiento antes de lectura	24 – 26 min
E/e	pH de la muestra	6.5 – 7.5

TABLA 3.32 Factores a evaluar y niveles por cada factor

Se procede a realizar la combinación de los factores según la Tabla 3.32, para ello se evaluó una matriz complicada (agua residual) con una adición de 2.9 ppm N.

Factor/Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	103	103	103	103	107	107	107	107
B/b	29	29	31	31	29	29	31	31
C/c	98	102	98	102	98	102	98	102
D/d	24	24	26	26	26	26	24	24
E/e	6.5	7.5	6.5	7.5	7.5	6.5	7.5	6.5
F/f	F	f	f	F	F	F	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	2.4146	2.8449	2.7336	2.7260	2.8516	2.7536	2.8040	2.7669
Recuperación	83	98	94	94	98	95	97	95

TABLA 3.33 Combinación de Factores para la evaluación de la Robustez

Con los resultados obtenidos aplicamos los cálculos de la **Tabla 1.5** y de la **Ecuación (14)**, y lo comparamos con el t de Tablas para un G.L. (4-1) y a un 95% de confianza para dos colas, este valor es **3.18** (el n =4 por que se replica cuatro veces cada factor). Los resultados se muestran en la Tabla

3.34. Se utilizó un S igual al SR para 2.0 ppm Nt. Interpolando el SR de la **Tabla 3.14** para 2.0 ppm es **0.097**.

Factor	Variable	Promedio	Diferencia(D)	t calculada	t tablas
Temperatura de Digestión (°C)	103	2.68	0.11	1.67	3.18
	107	2.79			
Tiempo de Digestión (min)	29	2.72	0.04	0.61	3.18
	31	2.76			
Temperatura de Baño María (°C)	98	2.70	0.07	1.05	3.18
	102	2.77			
Tiempo de Baño María (min)	24	2.71	0.06	0.86	3.18
	26	2.77			
pH de la muestra.	6.5	2.67	0.14	2.04	3.18
	7.5	2.81			
F/f	F				
	f				
G/g	G				
	g				

TABLA 3.34 t calculada y t Tablas, para la demostración de la robustez

Se puede ver del cuadro que para todos los parámetros evaluados, el **t calculado < t tablas**, por lo tanto en método presenta robustez. El factor que más diferencia causó fue el pH de la muestra, seguido de la temperatura de digestión. Por lo tanto se deben de controlar más dichos parámetros.

3.11 INTERVALO/ RANGO DE TRABAJO DEL MÉTODO

En el intervalo de trabajo se verificó que el método analítico proporciona precisión, exactitud, y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, del mismo modo que dentro del intervalo. Se ha demostrado que existe un rango de trabajo hasta 6 ppm N. Ya que a concentraciones más altas la linealidad se pierde, y ya no hay proporcionalidad. Es decir ya no se cumple la Ley de Beer.

Con los datos obtenidos encontramos la pendiente y el intercepto de la curva de calibración así como el coeficiente de correlación de dicha curva.

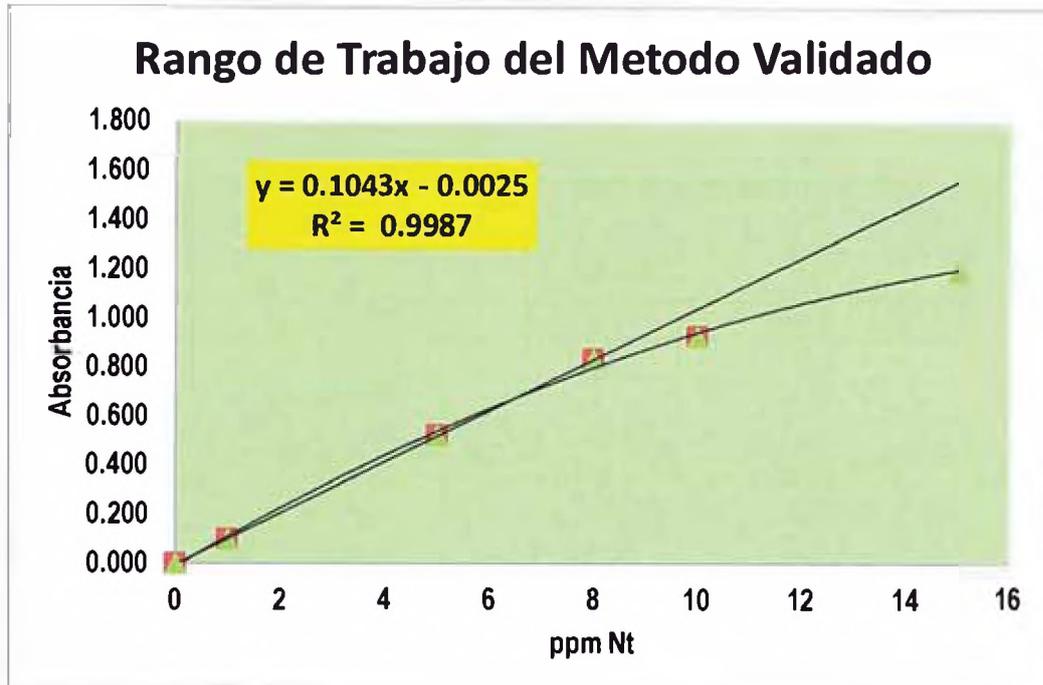


Figura 3.16 Desviación de la linealidad para concentraciones mayores de 5 ppm N

Con lo cual se concluye que el **rango de trabajo es hasta 6 ppm Nt**, concentraciones más altas, pierde la linealidad, el intervalo de trabajo va desde el límite de cuantificación 0.960 ppm N, hasta los 6 ppm N.

3.12 SELECTIVIDAD

Para la evaluación de la selectividad del método se realizó 5 lecturas de una muestra de agua residual las cuales generalmente vienen con el interferente potencial Fe^{3+} , a un nivel aproximado entre 0.5 y 2 ppm. Tomando la misma muestra se adicionó Fe^{3+} en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 ppm, para evaluar su efecto en la determinación del Nitrógeno Total. En la **Tabla 3.35** se muestra los resultados obtenidos.

Valor de Muestra (ppm)	Valor de Muestra con 0.0 ppm Fe	Valor de Muestra con 0.5 ppm Fe	Valor de Muestra con 1.0 ppm Fe	Valor de Muestra con 2.0 ppm Fe
1	1.1232	1.1427	1.1343	1.1787
2	1.1323	1.1343	1.14382	1.1602
3	1.1533	1.1743	1.1537	1.1732
4	1.1432	1.1676	1.1532	1.1692
5	1.132	1.1654	1.1465	1.1643
Media	1.1368	1.1569	1.1463	1.1691
Desv. Est.	0.0116	0.0173	0.0079	0.0073
t Calculado		2.588	2.674	9.945
1	4.3322	4.34543	4.3442	4.3654
2	4.2853	4.3043	4.3103	4.3232
3	4.3132	4.332	4.3343	4.3765
4	4.2654	4.2943	4.3054	4.341
5	4.2965	4.3143	4.3023	4.3332
Media	4.2985	4.3181	4.3193	4.3479
Desv. Est.	0.0229	0.0185	0.0168	0.0200
t Calculado		2.362	2.769	5.519

Tabla 3.35 Evaluación de la Selectividad en Agua Residual con Interferente Fe³⁺

Como se puede apreciar de la **Tabla 3.35**, la concentración de Nt tiende a aumentar conforme aumenta la concentración de Hierro, esto debido a que parte del persulfato oxida el Fe³⁺, y da una interferencia positiva en el análisis. Para verificar hasta qué punto el método es selectivo para una determinada concentración de Fe³⁺, usamos la t de Student para compararlo con la t de Tablas, para cuatro grados de libertad (5 datos) y con un nivel de significancia del 95 % para dos colas. Se observa que para concentraciones de 2 ppm de Fe³⁺, el método deja de ser selectivo, por ello se acepta hasta concentraciones de 1 ppm de Fe³⁺ donde el $t_{\text{Calculado}} < t_{\text{Tablas}} = 2.7764$. Por lo tanto el método es Selectivo para concentraciones menores a 1 ppm de Fe³⁺, el cual es el interferente más común en las muestras de agua.

3.13 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DE ENSAYO

La estimación de la incertidumbre del método para determinar nitrógeno total en aguas por el método a validar, está basado en la Guía para Determinar la Incertidumbre de EURACHEM²⁴. Se calculará la Incertidumbre para una muestra de agua superficial con una concentración de 2.0 ppm como ejemplo, y se identificara las fuentes principales de incertidumbre.

Método: Determinación de Nitrógeno por el Método Validado

Producto: Agua (Potable, Subterránea, Superficial, Residual).

3.13.1 El Mensurando

Nitrógeno total en ppm como N.

3.13.2 Modelo físico

A 10 mL de muestra estándar o una porción diluida de ella a 10 mL se adiciona a tubos de digestión, luego se adiciona 5 mL de reactivo de digestión y se tapa ajustadamente y se mezcla. Calentar por autoclave a 105 +/- 5°C, por 20 minutos, y esperar que enfrié a temperatura ambiente. Luego ajustar el pH de la muestra a neutralidad, se adiciona 10 mL de solución de ácido sulfúrico (10N) y agitar. Adicionar 0.5 mL de reactivo ácido sulfanílico-brucina, agitar, y colocarlo en un baño con agua a 100°C por exactamente 25 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, luego leer la muestra en un espectrofotómetro a 410 nm.

3.13.3 Modelo matemático

$$C_{N_{tot}} (ppm) = Lectura (ppm) \times F_{dilucion}$$

(49)

3.13.4 Fuentes de incertidumbre: Las fuentes de incertidumbre se determinaron con un diagrama causa efecto, como se muestra en la **Figura 3.17**.

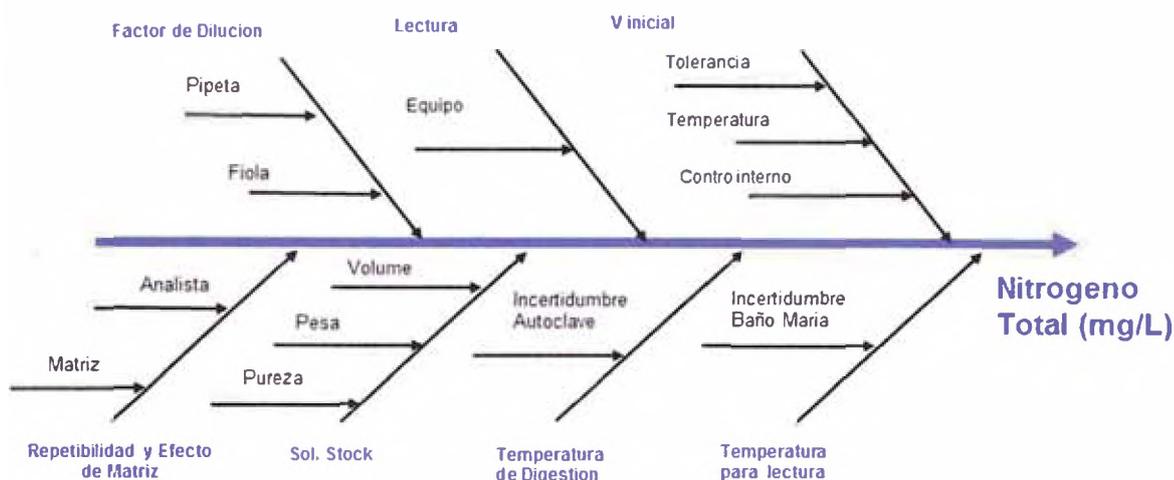


Figura 3.17 Diagrama de causa y efecto para determinar las fuentes de incertidumbre que afectan al método de determinación de nitrógeno en cuerpos de agua

De la **Figura 3.17** se puede observar que hay siete fuentes de incertidumbre por considerar: el volumen inicial de la muestra, el factor dilución se toma en cuenta cuando la muestra presenta un alto contenido de nitrógeno, la incertidumbre que se introduce cuando se utiliza una curva de calibración para cuantificar, la repetibilidad y el efecto de la matriz, ingresa como un factor importante de incertidumbre, preparar la solución stock para la curva de calibración, la temperatura de digestión en autoclave y por último la incertidumbre que aporta la temperatura de desarrollo de color previo a la lectura en el espectrofotómetro. En la siguiente ecuación se agrupan estas fuentes de incertidumbre.

$$U^2 N = U^2_{vol} + U^2_{rep} + U^2_{T_{lect}} + U^2_{T_{dig}} + U^2_{Fd} + U^2_{SS} + U^2_{Lect} \quad (50)$$

Donde:

U_{vol}: debido a las fuentes de error que se generan al momento tomar la alícuota de la muestra

U_{rep}: debido a las fuentes de error que se generan cuando el análisis lo realizan diferentes analistas en diferentes días y para diferentes matrices

U_{T lect}: debido a las fuentes de error que se generan cuando las muestras son introducidas en el baño maría (100°C) para el desarrollo de color, antes de la lectura en el espectrofotómetro

U_{T dig}: debido a las fuentes de error que se generan cuando las muestras son puestas a digerir en la autoclave a la temperatura de 105 ° C.

U_{Fdi}: debido a las fuentes de error que se generan cuando se toma una alícuota menor de muestra y se afora en una fiola de un determinado volumen.

U_{Lect}: debido a las fuentes de error que se generan cuando se utiliza una curva de calibración para determinar la concentración de un analito en una muestra

U_{ss}: debido a las fuentes de error que se generan cuando se prepara la solución stock que se utiliza como patrón de curva de calibración.

3.13.5 Desarrollo de la incertidumbre por cada una de las fuentes determinadas

Con el diagrama de causa y efecto se determinaron siete fuentes que aportan variación en el resultado y que proporcionan a la incertidumbre al método que estamos estudiando (volumen inicial, la reproducibilidad en el análisis de la muestra y matriz, temperatura de digestión, temperatura para el desarrollo del color, lectura, factor dilución y preparación de la solución stock).

Incertidumbre debida al volumen inicial de la muestra

El cálculo de la incertidumbre de la medición del material volumétrico (pipeta de 10 mL), relaciona la especificación o variación máxima del material, la incertidumbre debida al control interno y finalmente la incertidumbre del material debido a la diferencia de temperatura experimental y la especificada en la calibración del material. Combinando estos tres tipos de incertidumbre obtendremos la incertidumbre estándar por tomar una alícuota con un material de vidrio, obteniendo la siguiente ecuación.

$$U_{vol} = \sqrt{u_{vm}^2 + u_{ci}^2 + u_{temp}^2} \quad (51)$$

Donde:

u_{vm}: es la incertidumbre estándar debida a la variación máxima que indica la especificación del material de vidrio.

u_{ci}: es la incertidumbre estándar debida al control interno del ambiente donde se utiliza dicho material de vidrio.

u_{temp}: es la incertidumbre debido a la diferencia entre la temperatura experimental y la temperatura a la cual se calibró el material.

Vol. de Pipeta (mL)	10
Vol. de alícuota (mL)	10

Especificación	
Variación máxima (mL) +/-	0.030
Inc. Std. de especificación (mL)	0.012

Control Interno	
Incertidumbre Expandida (mL)	0.060
Inc. Std del volumen (mL)	0.030

Variación de Temperatura	
Variación de Temperatura (°C) +/-	2
Coef. de Dil. de agua 1/°C	0.00021
Inc. Std de Var. de temperatura(°C)	0.00242487

TABLA 3.36 Datos para la incertidumbre del volumen inicial de la muestra

Con los resultados obtenidos de incertidumbres estandar, el siguiente paso es realizar la propagacion de las incertidumbres, obteniendose la incertidumbre estandar de volumen

Incertidumbre Estándar (mL)	0.0325
Incertidumbre Estándar Relativa	0.0032

TABLA 3.37 Resultados de incertidumbre estándar y relativa para el Vol. Inicial

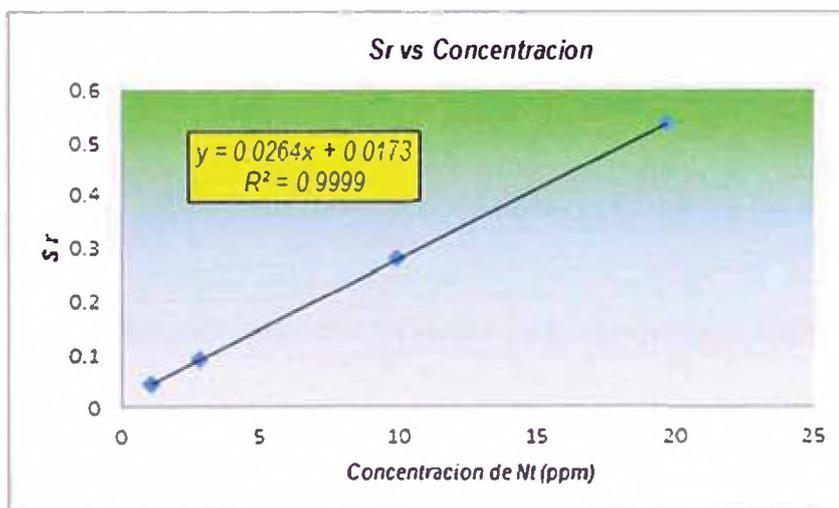
3.13.5.1 Incertidumbre debida a la repetibilidad cuando se analiza una muestra

El cálculo de esta incertidumbre se basa en la evaluación de la precisión de resultados de diferentes niveles en diferentes matrices. Los niveles de concentración se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos en la **Tabla 3.14**, de esta Tabla hacemos una gráfica de Sr (Desviación estándar

de Repetibilidad) vs concentración de Nt. Para finalmente obtener una ecuación de que relaciones estas dos variables y así utilizarla para cualquier concentración. La **Tabla 3.38** es la utilizada para hacer la Gráfica.

Nivel	A. Consumo	A. Superficial	A. Subterránea	A. Residual
Promedio	1.023	2.801	9.893	19.677
Sr	0.044	0.090	0.282	0.536

TABLA 3.38 S_R vs Promedios de Resultados por Niveles



Pendiente	0.0264
Intercepto	0.0173

Figura 3.18 Curva de Relación entre el S_R y Concentración de Nt (ppm)

Calculo de la incertidumbre debido a la repetibilidad: para 2 ppm de Nt, se reemplaza en la ecuación obteniéndose los resultados de la **Tabla 3.39**.

Concentración de la Muestra (ppm)	2.0004
Incertidumbre Estándar (ppm)	0.0717
Incertidumbre Estándar Relativa	0.0358

TABLA 3.39 Resultados de la Incertidumbre Estándar y Relativa de la Repetibilidad

3.13.5.2 Incertidumbre debida a la temperatura antes de la Lectura

El cálculo de esta incertidumbre es netamente la incertidumbre que indica el certificado de calibración del baño maría para 100°C. Se considera el Factor de Cobertura que dice el certificado. El **Anexo 5** Presenta el Certificado de Calibración de Baño María.

Resultados del Certificado	
Incertidumbre Expandida	0.18
Factor de Cobertura (Certificado)	2

TABLA 3.40 Certificado de Calibración del Baño María a 100°C

Temperatura de Calentamiento	100
Incertidumbre Estándar (°C)	0.09
Incertidumbre Estándar Relativa	0.0009

TABLA 3.41 Incertidumbre Estándar y Relativa de la Temperatura antes de Lectura

3.13.5.3 Incertidumbre debida a la temperatura de digestión: El cálculo de esta incertidumbre es netamente la incertidumbre que indica el certificado de calibración de la autoclave a la temperatura de 105 ° C. **El Anexo 4** Presenta el Certificado de Calibración del Autoclave.

Resultados del Certificado	
Incertidumbre Expandida	0.35
Factor de Cobertura (Certificado)	2

TABLA 3.42 Certificado de Calibración del Autoclave a 105°C

Temperatura de Digestión (°C)	105
Incertidumbre Estándar (°C)	0.175
Incertidumbre Estándar Relativa	0.0017

TABLA 3.43 Incertidumbre Estándar y Relativa de la Temperatura de Digestión

3.13.5.4 Incertidumbre debida a un factor de dilución (de ser necesario)

El cálculo de esta incertidumbre está basado en la combinación de las incertidumbres debida a la toma de la alícuota (pipeta) y al volumen final de enrase (fiola), primero se calcula la incertidumbre por tomar una alícuota de 10 mL por ejemplo y luego calcular la incertidumbre por enrasar la dilución a un volumen final de 50 mL. Para este ejemplo ya calculamos la incertidumbre por tomar una alícuota de 10 mL, quedaría calcular la incertidumbre por enrasar a un volumen final de 50 mL

Vol. de fiola (mL)	50
---------------------------	----

Especificación	
Variación máxima (mL) +/-	0.08
Inc. Std. de la especificación (mL)	0.03

Control Interno	
Incertidumbre Expandida (mL)	0.056
Inc. Std del volumen (mL)	0.028

Variación de Temperatura	
Variación de Temperatura (°C) +/-	2
Coef. de Dil. de agua 1/°C	0.00021
Inc. Std. de Var. de temperatura(°C)	0.01212

Incertidumbre Estándar (mL)	0.0447
Incertidumbre Estándar Relativa	0.0009

TABLA 3.44 Datos para la incertidumbre del Factor de Dilución

Combinarlo con la Incertidumbre Estándar de la pipeta, obtenemos la incertidumbre de la dilución

Incertidumbre Estándar (mL)	0.0325
Incertidumbre Estándar Relativa	0.0032

Factor de Dilución	5
Incertidumbre Estándar (mL)	0.0050
Incertidumbre Estándar Relativa	0.0010

TABLA 3.45 Incertidumbre Estándar y Relativa de la dilución

3.13.5.5 Incertidumbre debida a la preparación de solución stock para curva de calibración

El cálculo de esta incertidumbre está basado en la preparación de una solución stock (de ácido glutámico) de la cual se hace diluciones sucesivas para preparar la curva de calibración. Para el cálculo de esta incertidumbre se combinan tres factores: Contribución del peso de la sal, pureza de la sal y el volumen final al cual se prepara el patrón, finalmente se combina estas tres contribuciones, para obtener la incertidumbre debida a la preparación de una solución stock

Incertidumbre debida al pesaje del ácido glutámico.

El primer paso es revisar el Certificado de la Balanza para extraer la ecuación de Lectura corregida e incertidumbre expandida de la medición en la balanza, en la cual reemplazamos el peso de Acido glutámico. Dicho certificado los encontramos en el **Anexo 7**

Peso de Patrón	
Peso de A. Glutámico (g)	1.051
Peso de N (g)	0.100
Inc.Exp.Medicion	0.000232
Factor de Cobertura	2
Incertidumbre Estándar	0.000116

TABLA 3.46 Datos para calcular La incertidumbre estándar del peso de Muestra

Incertidumbre debida a la corrección de peso por la balanza utilizada (**Ver Anexo 7**)

Corrección	
Peso de Muestra (R) (g)	1.0510
Lectura de Corrección de Balanza	1.0509
Desviación de Lectura	0.000002

TABLA 3.47 Datos para calcular la Desviación de la Lectura por la Corrección

La incertidumbre estándar de Calibración se obtiene por combinación de la incertidumbre estándar del peso de muestra (Tabla 3.46) y la desviación de la lectura por la corrección (Tabla 3.47).

Incertidumbre Estándar Calibración	0.00012
---	---------

Incertidumbre debida a la resolución de la balanza (triangular)

Resolución (manual) (g)	0.00001
-------------------------	---------

Incertidumbre Estándar Resolución	0.000003
-----------------------------------	----------

Incertidumbre debida a la deriva de la balanza

Del certificado, ubicamos los errores máximos corregidos tanto del certificado actual como del certificado anterior de la balanza, y luego se procede a calcular la máxima diferencia. En base a esta máxima diferencia es que se calcula la incertidumbre estándar de la deriva. Los Certificados los encontramos en el **Anexo 6 y 7**. Combinamos las tres incertidumbres estándar (calibración, Resolución y Deriva).

Máximo Error Corregido (actual)	0.000120
Máximo Error Corregido (anterior)	0.000505
Máxima diferencia	0.000385

Incertidumbre Estándar Deriva	0.000111
-------------------------------	----------

Incertidumbre Estándar (g)	0.00016
Incertidumbre Relativa	0.00161

TABLA 3.48 Datos para la incertidumbre del peso del Ácido Glutámico

El siguiente paso es calcular la incertidumbre debida a la pureza del ácido glutámico, como indica el certificado del reactivo. Utiliza la desviación con respecto al 100% cuando es un reactivo 100% puro.

Grado de pureza (%)	99.9
Desviación de Pureza al 100%	0.001

Incertidumbre Estándar (ppm)	0.00057
Incertidumbre Relativa	0.00578

TABLA 3.49 Incertidumbre Estándar y Relativa del peso del Ácido Glutámico

Y por último se determina la incertidumbre del material de vidrio en el cual se prepara la solución stock, este tipo de cálculo se realiza como el material de vidrio antes evaluado.

Incertidumbre del material de vidrio (fiola de 1000 mL)

Especificación	
Variación máxima (mL) +/-	0.400
Inc. Std. de especificación (mL)	0.163
Vol. de Fiola (mL)	1000

Control Interno	
Incertidumbre Expandida (mL)	0.236
Inc. Std del volumen (mL)	0.118

Variación de Temperatura	
Variación de Temperatura (°C) +/-	2
Coef. de Dil. de agua 1/°C	0.00021
Inc. Std de Var. de T(°C)	0.24248711

Incertidumbre Estándar (mL)	0.3153
Incertidumbre Estándar Relativa	0.0003

TABLA 3.50 Incertidumbre Estándar y Relativa de la fiola en que se prepara el patrón

Incertidumbre de la solución stock

$$C_{solStock} = \frac{1000.m.p}{V} \quad (52)$$

Propagando las incertidumbres

Concentración (ppm)	99.9068
Incertidumbre Estándar	0.00601
Incertidumbre Estándar Relativa	0.00006

TABLA 3.51 Incertidumbre Estándar y Relativa de la preparación de Solución Stock.

3.13.5.6 Incertidumbre debida a la cuantificación con una curva de calibración:

De los resultados obtenidos en la **Tabla 3.20**, utilizamos para calcular la incertidumbre en el resultado por el uso de una Curva de Calibración para cuantificar. Usar los resultados obtenidos en la **Tabla 3.21** y **Tabla 3.22**.

Parámetros	
Sx/y: Estándar de Error	0.0069
b1: pendiente	0.10450
m: Replicas a evaluar	5
n: Numero de datos de la curva	30
Concentración a evaluar	2.0096
S _{xx}	74.3750
Prom. de Conc. (ingresar)	2.250

TABLA 3.52 Resultados obtenidos para el cálculo de la incertidumbre debida al uso de una curva de calibración para cuantificar

Con estos datos de entrada calculamos la incertidumbre debida a la determinación de la concentración usando una curva de calibración.

Incertidumbre Estándar	0.04788
Incertidumbre Estándar Relativa	0.02393

TABLA 3.53 Incertidumbre Estándar y Relativa debido a la Curva de Calibración

3.13.6 Incertidumbre Combinada

Con los resultados de todas las incertidumbres relativas, calculamos la incertidumbre relativa usando la **Ecuación (34)**.

Fuentes de Incertidumbre	Valor	Incert. Estándar	Inc. Est. Relativa
Volumen Inicial	10	0.0325	0.00325
Temperatura de Digestión	105	0.175	0.00167
Temperatura de Lectura	100	0.09	0.00090
Solución Stock	99.9068	0.00601	0.00006
Repetibilidad	2.01	0.071966986	0.03581
Curva de Calibración	2.01	0.04809	0.02393

TABLA 3.54 Resumen de los aportes de incertidumbre de cada fuente

Para el cálculo de la Incertidumbre combinada se requiere de la concentración de la muestra que se requiere calcular su incertidumbre, supongamos que tenemos lo siguiente: La lectura de la muestra es 0.2092, utilizando la curva de calibración se determina que la concentración de la muestra y estamos asumiendo que no se ha realizado ninguna dilución

Lectura	0.2090
Concentración	2.01
Dilución	1

3.13.7 Incertidumbre Expandida

Con estos datos calculamos la incertidumbre combinada y expandida para tal concentración, usando las **Ecuaciones (35) y (36)**.

Incertidumbre Estándar Comb.	0.0869
Incertidumbre Relativa	0.0432
Incertidumbre Expandida	0.1738

RESULTADO FINAL

2.01	+/-	0.17
-------------	------------	-------------

Gráficamente podemos ver el aporte de cada fuente de incertidumbre. De la **Figura 3.19** podemos apreciar que el mayor aporte para la incertidumbre del resultado final, es la repetibilidad, seguido de la lectura con la curva de calibración, para la concentración de 2 ppm de N (mg/L), Por lo tanto se debe de controlar mucho más estos factores para evitar que la incertidumbre sea más grande. Cuando se requiera una dilución simplemente se adiciona a la ecuación de propagación de Incertidumbres. Dando valores a diferentes concentraciones podemos hallar una ecuación que relacione la concentración con la incertidumbre.

Concentración (ppm)	Incertidumbre	%
1.04	0.13	12.7
2.00	0.17	8.7
2.96	0.22	7.4
3.91	0.27	6.9
4.87	0.32	6.6

TABLA 3.55 Datos para hallar la Concentraciones e Incertidumbre

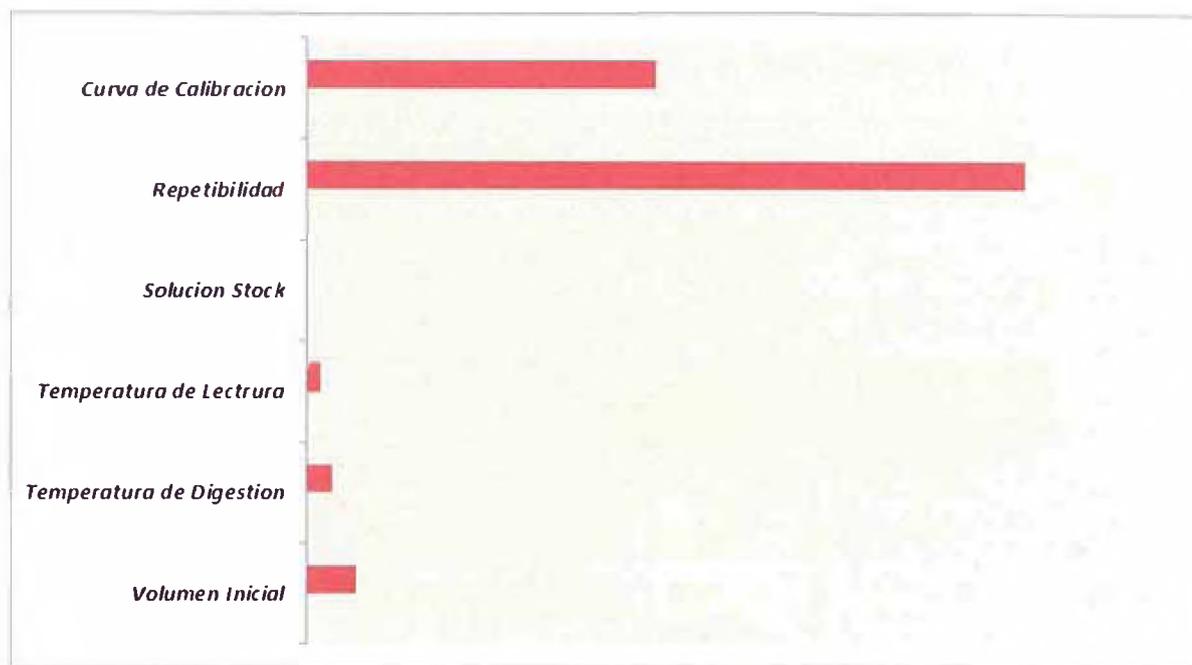


Figura 3.19 Grafico de los aportes porcentuales de cada una de las fuentes de incertidumbre

Si se aumenta la concentración de la muestra, el aporte de la incertidumbre debido a la curva de calibración disminuye, esto es razonable debido a que a concentraciones más altas el valor presenta menor desviación comparado cuando se lee valores cercanos al primer punto de curva, donde la tendencia es a tener mayor desviación. En cuanto al aporte de la repetibilidad (S_r), esto aumenta conforme aumenta la concentración. Es por esta razón que conforme aumenta la concentración aumenta la incertidumbre, pero en % con respecto a la concentración realmente disminuye, ver **Figura 3.9.**

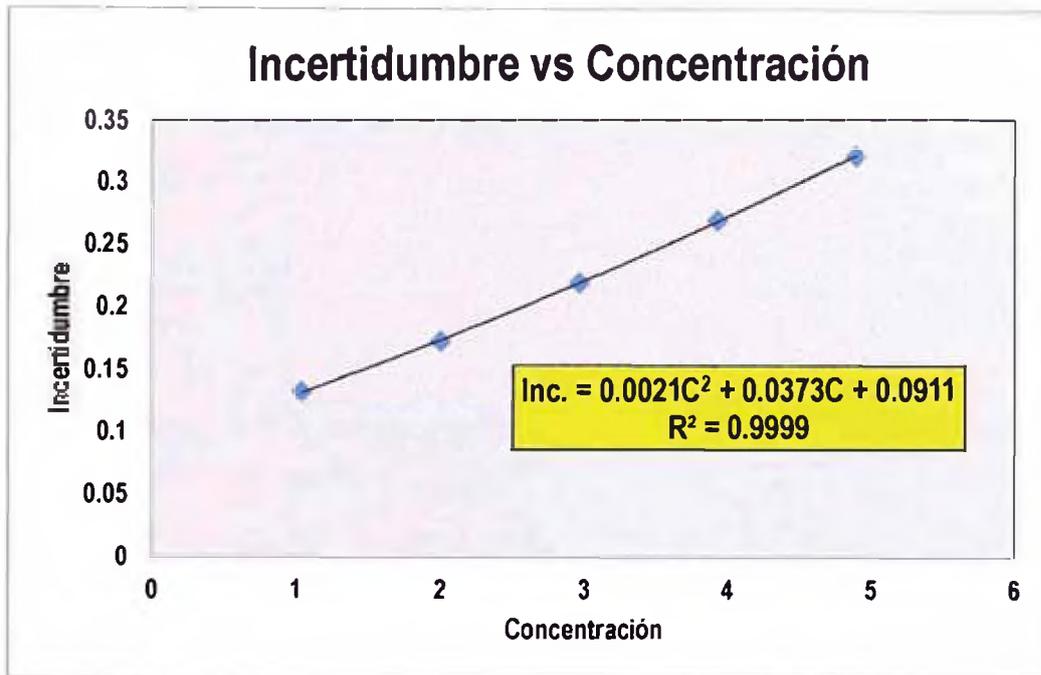


Figura 3.20 Ecuación de Relación entre la Concentración y la Incertidumbre

La **Figura 3.20** es construida a partir de la **Tabla 3.55**, en el cual se calcula la incertidumbre para diversas concentraciones, con ello se elabora una ecuación la cual nos sirve para calcular la incertidumbre de una muestra cualquiera para el nivel de concentración determinado. La **Figura 3.20** muestra la ecuación a utilizar.

CONCLUSIONES

El Método Analítico desarrollado (validado) para la cuantificación de Nitrógeno Total en matrices tales como Agua Superficial, Agua Subterránea, Agua Consumo y Agua Residual, cumple con los parámetros de validación mínimos sugeridos por los Organismos Normativos. Se ha demostrado que este nuevo método es un método analítico lineal, en el rango de concentración de 0.8 – 5 ppm y con un porcentaje de recuperación mínima de 90% para aguas de consumo y máxima de 108% para aguas superficiales, para concentraciones en el rango de 1-20 ppm. La concentración de 1.6 ppm de Nt, está dentro de este intervalo concentraciones y por lo tanto de las recuperaciones el cual es aceptado ya que esto nos garantiza resultados con precisión y la exactitud queda asegurada por la verificación de los MRC y por el Interlab, y los demás parámetros de validación. Los niveles que exigen los Estándares de Calidad del Agua (ECAs)²⁵ es de 1.6 ppm para la Categoría 4 (Conservación del Ambiente acuático), específicamente en Lagunas, Lagos, y Ríos de la Costa y la Sierra, a dicho nivel los resultados están asegurados con este método validado. El Método presenta un RSDR% que varía de 8 al 10%, y un Límite de Detección y Cuantificación de 0.233 ppm y 0.743 ppm de Nt, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ NICKSON, R. T.; J. M. MCARTHUR; B. SHRESTHA; T. O. K MYINT; D. LOWRY. *Applied Geochemistry* 20, 2005, 55p.

² CHEEVAPON, V.; P. MENASUETA. *Marine Pollution Bulletin* 47, 2003, 43p.

³ MOLINER, Y.; C. Molins; P. CAMPÍNS. *Talanta*, 62 (2004) 373p.

⁴ DE JONGE, V. C.; M. ELLIOTT ORIVE; E. CAUSES. Historical Development, Effects and Future Challenges of a Common Environmental Problem: Eutrophication. *Hydrobiologia*. (2002) 475/476p.

⁵ NRC (National Research Council). Clean Coastal Waters. Understanding and Reducing the Effects of Nutrient Pollution. National Academy of Science. *National Academic Press*. Washington, D. C. USA. (2000), 405p.

⁶ VALIELA, I.; M. GEIST; J. MCCLELLAND; G. P. TOMASKY. Nitrogen Loading from Watersheds to Estuaries: Verification of the Waquoit Bay Nitrogen Loading Model. *Biogeochemistry*, 49 (2000) 277-293pp.

⁷ US-EPA. Nutrient Criteria Technical Guidance Manual. Estuarine and Coastal Marine Waters. In U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water 4304. EPA-822-B-01- 003, 2001.

⁸ TETT, P.; L. GILPIN; H. SVENDSEN; C. P. ERLANDSSON; U. LARSSON; S. KRATZER; E. FOUILLAND; C. JANZEN; J. LEE; C. GRENZ; A. NEWTON; J. GOMES FERREIRA; T. FERNANDES; S. SCORY. Eutrophication and some European waters of restricted exchange. *Continental Shelf Research*, 23 (2003) 1635-1671pp.

⁹ APHA, A. WWA, WPCF.1997. *Manual de métodos normalizados para análisis de aguas potables y residuales*. 20th ed, Madrid, España. (1997) 4-126 - 4-167 pp.

¹⁰ PÉREZ, N. B.; L. CREACH; A. MARAÑÓN; A. FERNÁNDEZ; H. I. GUERRA DÍAZ. Evaluación de la calidad de las aguas del río los Guaos de la provincia de Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Química*. Vol.XI, No 1(1999).

¹¹ MOLINER, Y. Aportaciones de la química analítica a la resolución de diversos problemas medioambientales. TESIS DOCTORAL. Universidad de valencia. España. (2005) 33- 72 pp.

¹² Junko Ebina, Tsuyoshi Tsutsui and Toyozo Shirai, "Simultaneous Determination of Total Nitrogen and Total Phosphorus in water using Peroxodisulfate Oxidation", *Water res.* Vol 17, N° 12, pp. 1721-1726, 1983

¹³ Charles J. Patton and Jennifer R. Kryskalla, "Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory—Evaluation of Alkaline Persulfate Digestion as an Alternative to Kjeldahl Digestion for Determination of Total and Dissolved Nitrogen and Phosphorus in Water", U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report 03-4174, Denver, Colorado 2003.

¹⁴ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Method 4500-N B. "*In-Line UV/Persulfate Digestion and Oxidation with Flow Injection Analysis*"; American Public Health Association. 22st Edition, 2012.

¹⁵ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Method 4500-N C. "*Persulfate Method*"; American Public Health Association. 22st Edition, 2012.

¹⁶ USEPA, Method N° 352.1 in Methods for chemical analysis of water and wastes, Nitrogen, "*Nitrate (Colorimetric, Brucine)*", United States Environmental Protection Agency, 1979.

¹⁷ Francisco Buscarons Úbeda, "*Análisis inorgánico cualitativo sistemático*", Editorial Reverte, 1986, Pág.292.

http://books.google.com.pe/books?id=5xjctvSHSJIC&pg=PA292&lpq=PA292&dq=reaccion+del+nitrato+con+brucina&source=bl&ots=e_J8RqU6yw&siq=BDi29Z2-IOvLZiDqPZbheFZrZaA&hl=es419&sa=X&ei=JhC4UOe3KIGu8ATOq4GACg&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q=reaccion%20del%20nitrato%20con%20brucina&f=false, revisado el 15-11-2012.

¹⁸ Guía para la validación de Métodos de Ensayo, Diario El Peruano, Pág. 238363. Normas Legales 2003.

<http://www.indecopi.gob.pe/repositorioaps/0/0/ier/acre01/quiaValidacion.pdf>, revisado el 13-11-2012.

¹⁹ PNTP-ISO 5725-I, "*Exactitud (veracidad y precisión) de los Métodos y Resultados de Medición*", Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad de un método de medición normalizado, 1ra Edición, 1999, Pág. 20-29.

²⁰ EURACHEM Guide: "*The fitness for purpose of analytical methods.*"

²¹ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sección 1030 C. "*Method Detection Level/2. Determination Detections Levels*"; American Public Health Association. 22st Edition, 2012.

²² Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sección 1030 C. "*Method Detection Level/1.Introduccion*"; American Public Health Association. 22st Edition, 2012.

²³ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sección 1020 B. "*Quality Control/4. Method Detection Level Determination and Application*"; American Public Health Association. 22st Edition, 2012.

²⁴ EURACHEM / CIITAC Guide: "*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*", Second Edition, 2000.

²⁵ Diario "El Peruano", Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para agua, Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM, 31 de Julio del 2008, 3773227.



ANEXOS